

Rolle der von Willebrand-Faktor-spaltenden-Protease ADAMTS-13  
bei Patienten mit systemischer Inflammation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Clemens Luitpold Bockmeyer**  
**geboren am 27.02.1980 in Köln**

**Gutachter:**

- 1.
- 2.
- 3.

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**Dum spiro, spero.**

---

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>Seite</b>
<b>1..... EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. SYSTEMISCHES INFLAMMATIONSSYNDROM (SIRS) UND SEPSIS.....	1
1.1.1. Epidemiologie .....	1
1.1.2. Klinisches Bild und Diagnostik .....	2
1.1.3. Pathophysiologie .....	3
1.2. THROMBOTISCHE MIKROANGIOPATHIE .....	8
1.2.1. Von Willebrand-Faktor (VWF).....	9
1.2.2. VWF-spaltende-Protease: ADAMTS-13 .....	10
1.2.3. Nachweismethoden der ADAMTS-13 .....	12
<b>2..... HYPOTHESE .....</b>	<b>14</b>
<b>3..... MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1. DEFINITION VON SIRS, SCHWERER SEPSIS UND SEPTISCHER SCHOCK.....	15
3.2. STUDIENDESIGN .....	17
3.3. VWF-PLASMASPIEGEL UND VWF-MULTIMERE .....	19
3.4. AKTIVITÄT DER ADAMTS-13 .....	21
3.5. VALIDIERUNG .....	24
3.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	25
<b>4..... ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
4.1. PATIENTEN MIT SCHWERER SEPSIS ODER SEPTISCHEM SCHOCK... 26	
4.1.1. Klinische Befunde .....	26
4.1.2. ADAMTS-13, VWF und klinisch-chemische Parameter .....	28
4.2. PATIENTEN MIT SIRS NACH HERZOPERATION MIT CPB.....	40
4.2.1. Klinische Charakterisierung .....	40
4.2.2. ADAMTS-13, VWF und klinisch-chemische Parameter .....	42

---

<b>5..... DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
5.1. ADAMTS-13: STAND DER FORSCHUNG .....	50
5.2. VERMINDERTE ADAMTS-13 AKTIVITÄT .....	55
5.3. THROMBOZYTOPENIE BEI SEPSIS .....	61
<b>6..... SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>64</b>
<b>7..... LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>8..... EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>9..... DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>76</b>
<b>10.. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>28</b>
<b>11.. DATENANHANG.....</b>	<b>82</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	„a disintegrin and metallo-protease with thrombospondin type 1 motifs“
APACHE	„Acute Physiology and Chronic Health Evaluation“
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
BSA	Rinderalbumin
CD36	Thrombospondin Rezeptor
CPB	kardiopulmonaler Bypass
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
FFP	„Fresh Frozen Plasma“
HMW-VWF	Hochmolekularer VWF
IL	Interleukin
ISTH	„International Society on Thrombosis and Haemostasis“
ITS	Intensivstation
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
ProCT	Procalcitonin
PT	Prothrombinzeit
rh	rekombinant human
VWF:RCo	VWF-Ristocetin-Cofaktoraktivität
SAPS	„Simplified Acute Physiological Score“
SIRS	Systemisches Inflammationssyndrom
SOFA	„Sequential Organ Failure Assessment“
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TMA	Thrombotische Mikroangiopathie
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TTP	Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura
ULVWF	ultralanger VWF
VWF	Von Willebrand-Faktor
VWF:Ag	VWF-Antigenkonzentration
VWF:CB	VWF-Kollagenbindungskapazität

# 1. Einleitung

## 1.1. Systemisches Inflammationssyndrom (SIRS) und Sepsis

Als lokale Entzündung (Inflammation) wird eine adäquate humorale und zelluläre Immunreaktion des Körpers auf exogene Einwirkungen wie z.B. Verletzungen, Verbrennungen, Allergene, Fremdgewebe und Infektionen durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Viren bezeichnet. Auch durch endogene Reize wie Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien können Entzündungen ausgelöst werden. Diese lokal begrenzte Reaktion ist Teil des lebenserhaltenden Abwehrmechanismus des Organismus (Wirtsreaktion).

Sobald Entzündungen jedoch Teil einer fehlgeleiteten Reaktion des Körpers sind und dabei systemische Ausmaße erreichen, spricht man von einem systemischen Inflammationssyndrom („Systemic Inflammatory Response Syndrome“, SIRS). Bei systemischen Entzündungen weiten sich die entzündungsspezifischen Reaktionskaskaden unkontrolliert auf den gesamten Körper aus und entwickeln dabei im Sinne einer überschießenden Immunantwort ein lebensbedrohliches Krankheitsbild (Cohen 2002). Ein SIRS kann sowohl durch infektiöse als auch durch nichtinfektiöse Prozesse ausgelöst werden (z.B. nekrotisierende Pankreatitis, schweres Trauma, kardiopulmonaler Bypass (CPB)). Der Begriff Sepsis bedeutet eine systemische Reaktion im Sinne eines SIRS bei nachgewiesener oder wahrscheinlicher Infektion (Bone et al. 1992).

### 1.1.1. Epidemiologie

Das SIRS und dessen schwerwiegende Folgen wie septischer Schock und Multiorganversagen stellen unter älteren, immuninkompetenten oder kritisch kranken Patienten die häufigste Todesursache auf operativen Intensivstationen dar (Bloos und Reinhart 2002). In den Vereinigten Staaten treten jährlich 700 000 Todesfälle durch eine Sepsis auf operativen Intensivstationen auf (Sands et al. 1997, Lind-Zwirble und Angus 2004). Die Inzidenz der Sepsis liegt mit 300 Fällen pro 100 000 Einwohnern in den USA im Vergleich zu den vielbeachteten Erkrankungen wie AIDS (17/100 000, Centers for Disease Control and Prevention 2000; Incidence rate for 1999), Kolon- und Rektumkarzinom (48/100 000), Brustkrebs (110/100 000,

American Cancer Society 2000) oder kongestivem Herzversagen (200/100 000, American Heart Association) überraschend hoch (Angus und Wax 2001). Neueste, bisher unveröffentlichte Daten des 'Kompetenznetzwerkes Sepsis' zur Inzidenz der Sepsis in Deutschland weisen auf ca. 150 000 neu betroffene Patienten pro Jahr hin. Die Sepsis stellt mit jährlich ca. 60 000 Todesfällen die dritthäufigste Todesursache nach kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland dar (Brunkhorst et al. 2005).

### 1.1.2. Klinisches Bild und Diagnostik

Klinisch stehen aufgrund der endogenen Pyrogenfreisetzung eine gestörte Thermoregulation, Schocksymptomatik mit Tachykardie und Hypotonie und Tachypnoe mit respiratorischer Alkalose im Vordergrund (Annane et al. 2005). Häufig treten Veränderungen im Bereich der Nieren-, Leber- und Gastrointestinalfunktion auf. Pulmonale Manifestationen wie das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) können sowohl Ursache als auch Folge einer Sepsis sein. Bewußtseinsstörungen von leichter Verwirrtheit bis zum Koma sind meist auf eine Veränderung der zerebralen Perfusion zurückzuführen (Bauer und Reinhart 2004).

Laborchemisch fallen neben Veränderungen des Blutbildes und des Gerinnungsstatus metabolische Störungen wie Hyperglykämie, Hyperlaktatämie, Hyperurikämie und Hypophosphatämie auf. Zur Sicherung einer zugrundeliegenden Infektion sollten Blut-, Urin- und Sputumkulturen und bei entsprechender klinischer Symptomatik auch Kulturen aus anderen Körperflüssigkeiten (z.B. Liquor) angelegt werden. Während in der Vergangenheit die positive Blutkultur die *conditio sine qua non* der Sepsisdiagnose darstellte, ist nach modernem Verständnis die inflammatorische Wirtsreaktion auf eine bakterielle, fungale oder virale Infektion ausschlaggebend für die Diagnose. Dabei erfolgt der Nachweis bakterieller oder fungaler Erreger durch die Messung bestimmter endogener Mediatoren wie des Prohormones Procalcitonin (ProCT), welches der bisher klinisch am häufigsten genutzte Sepsismarker ist (Brunkhorst et al. 2002b, Guven et al. 2002).

**Akutphase-Proteine** Von den zahlreichen Mediatoren und Akutphase-Proteinen, von denen eine Beteiligung am Entzündungsgeschehen vermutet wird oder nachgewiesen ist, eignen sich für diagnostische und therapeutische Zwecke insbesondere solche, deren Auftreten sehr spezifisch für entzündliche Erkrankungen oder bestimmte Phasen einer entzündlichen Erkrankung ist, deren Konzentration



oder enzymatische Aktivität sich drastisch und diagnostisch signifikant verändern sowie ebenjene, welche die für Diagnose oder therapeutisches Monitoring erforderliche Stabilität und Halbwertszeit im Organismus aufweisen. (Brunkhorst et al. 2002). Man unterscheidet zwischen negativen oder inversen und positiven Akutphase-Proteinen. Der als positives Akutphase-Protein fungierende von Willebrand-Faktor (VWF) ist mit dem Schweregrad des Endothelschadens bei systemischen Inflammationszuständen und des ARDS sowie der Letalität assoziiert (Ware et al. 2001).

### 1.1.3. Pathophysiologie

**Sepsis – Verlust der Homöostase** Die Entstehung und der Verlauf generalisierter entzündlicher Prozesse werden überwiegend von Proteinen gesteuert und sind von einem mehr oder weniger zeitlich begrenzten Auftreten bestimmter biologisch aktiver Moleküle begleitet. Während der Initialphase eines SIRS und/oder einer Sepsis kommt es zur exzessiven Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und/oder IL-6 (Lavkan et al. 1998, Blackwell und Christman 1996). Nach der Initialphase überwiegt zur Begrenzung möglicher destruktiver Effekte die Plasmakonzentration anti-inflammatorisch wirksamer Zytokine wie IL-4 und/oder IL-10 (Opal und DePalo 2000). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zahlreiche Therapiestudien unternommen, denen eine definierte Blockade der Entzündungskaskade als Rationale zugrunde lag (Bloos und Reinhart 2002).

Zwischenzeitlich ist bekannt, dass die Wirtsreaktion eine komplexe physiologische Reaktion darstellt, an der sowohl das Entzündungs- sowie das Gerinnungssystem aktivierende endogene Substanzen (z. B. TNF- $\alpha$  bzw. Tissue-Faktor) als auch inhibierende Substanzen (z. B. IL-10 bzw. Antithrombin) beteiligt sind (Levi et al. 2002, Knobl 2002).

**Hämostasestörungen** Einer der wegweisenden Fortschritte in der Aufklärung der Pathophysiologie der Sepsis besteht in der Erkenntnis einer gegenseitigen Beeinflussung der Entzündungsreaktion, der Blutgerinnung und der Fibrinolyse (Opal 2003), insbesondere dahingehend, dass die Entstehung und der Verlauf generalisierter entzündlicher Prozesse eng mit der Aktivierung und den daraus resultierenden Veränderungen des Blutgerinnungssystems vergesellschaftet sind. Die simultane Aktivierung der Immunantwort und des Blutgerinnungssystems in

Folge einer Gewebsschädigung stellt ein phylogenetisch sehr altes Strategieelement zur Überlebenssicherung dar (Opal 2003). Untersuchungen über den Zeitverlauf und das Ausmaß der Störungen im Gerinnungs- und Fibrinolyse-System, die enge Beziehung zur endothelialen Dysfunktion und die Kenntnis um die Faktoren, Mediatoren und Signaltransduktionswege, welche diese Veränderungen initiieren und regulieren, haben die Rolle der Hämostasestörungen bei Sepsis verdeutlicht (Levi und Ten Cate 1999).

Sowohl frühe, durch die Wirtsreaktion getriggerte Ereignisse innerhalb der Sepsiskaskade als auch Endotoxine selbst haben direkt schädigende Effekte auf das vaskuläre Endothel (Wheeler und Bernard 1999), wobei es durch die Exposition sub-endothelialer Strukturen zur thrombozytären Reaktion kommt (primäre Hämostase). Aktivierte Thrombozyten beschleunigen durch ihre veränderte Membranoberfläche die plasmatische Gerinnungskaskade (sekundäre Hämostase). Dabei besteht der erste Schritt in der Bindung und Aktivierung des Faktors XII, der über Faktor V und X schließlich in einer Thrombingenerierung resultiert (intrinsisches System, Muller-Berghaus 1989).

Der Tissue-Faktor, der physiologisch vorwiegend im Subendothel vorkommt, nimmt eine zentrale Rolle bei der gesteigerten plasmatischen Gerinnungskaskade ein, da er sowohl durch Entzündungsmediatoren wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Komplement C5a als auch durch Endotoxine vermehrt an der Endothelzelloberfläche exponiert (Esmon et al. 1999). Die Wechselwirkungen des Tissue-Faktor mit Faktor VIIa aktivieren den Faktor V und X, so dass als Folge einer Amplifikation der intrinsischen und extrinsischen Gerinnung über Thrombin-medierte Prozesse unlösliche Fibrin-Thrombozyten Aggregate resultieren (Gando et al. 1992, Gando et al. 1998). Die mechanische Okklusion der Gefäße verschlechtert die durch den Endothelschaden ohnehin eingeschränkte Mikrozirkulation (Lorente et al. 1993, Astiz und Rackow 1998). Die verminderte Gewebepfusion führt folglich zum hypoxämischen Gewebeschaden und zur Organdysfunktion bis hin zum Organversagen. (Gando et al. 1995). Der Gewebsschaden verursacht eine Exacerbation der Entzündung, die in der erneuten Aktivierung und Endotheladhäsion von neutrophilen Granulozyten und der weiteren Freisetzung inflammatorischer Zytokine resultiert (Hotchkiss und Karl 2003).

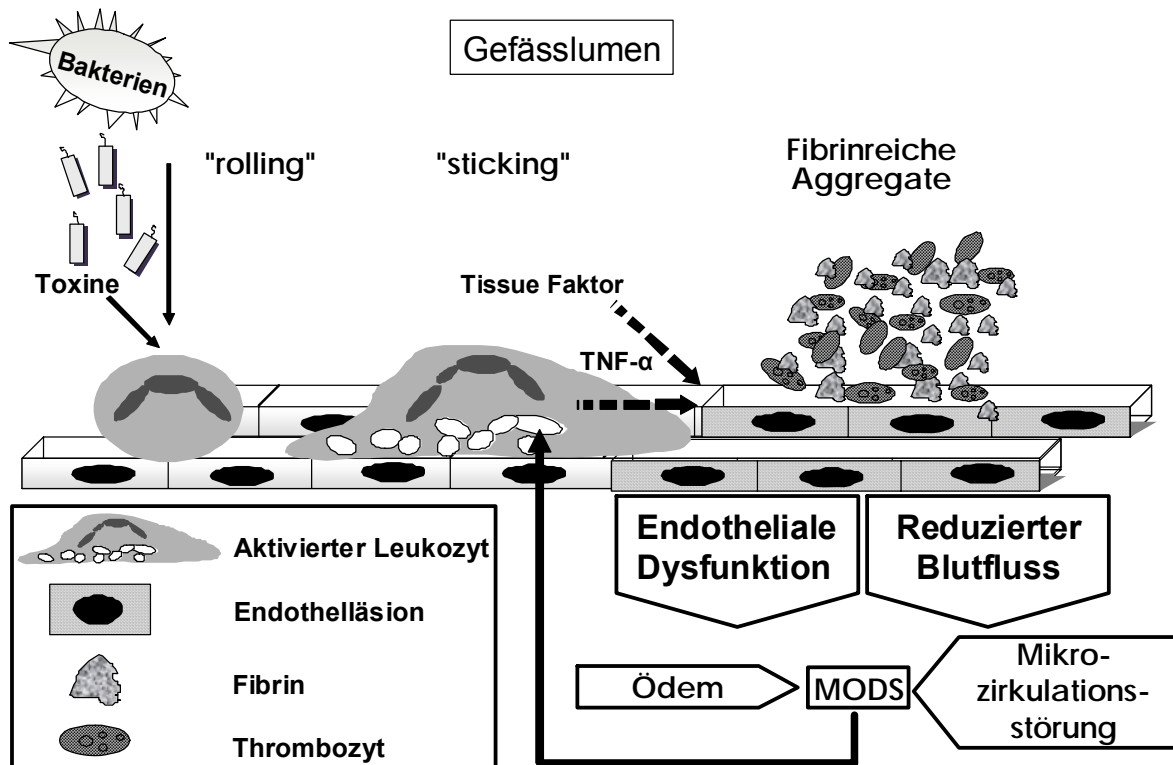


Abbildung 1: Vereinfachte synoptische Darstellung der gestörten Mikrozyklulation bei systemischer Inflammation: In der Blutbahn zirkulierende Bakterien und/oder deren Toxine aktivieren Leukozyten. In der Folge kommt es zur Anlagerung der Leukozyten und Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Durch den Endothelschaden kommt es zum Ödem sowie zur Freisetzung von Tissue Faktor. Die generierten Fibrin-Thrombozyten Aggregate führen zur gestörten Mikrozyklulation mit Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS). Der Gewebsschaden führt zur erneuten Aktivierung der Leukozyten (modifiziert nach Cohen 2002).

Bei gesunden Probanden wurde als Folge einer Verabreichung von Endotoxin oder TNF- $\alpha$  ein deutlicher Anstieg des Thrombin-Anti-Thrombin-Komplexes, eines Parameter, welcher mit der Thrombinbildung korreliert, nachgewiesen (Levi et al. 1993, Vervloet et al. 1998, Hesselvik et al. 1991, Kidokoro et al. 1996, Levi et al. 1997). Neben dieser Aktivierung des Gerinnungssystem bei Sepsis wurden auch Fibrin-Abbauprodukte, insbesondere D-Dimere, in erhöhter Konzentration nachgewiesen (Lorente et al. 1993). Beide Prozesse weisen auf eine parallele Aktivierung der plasmatischen Gerinnung sowie des Fibrinolyse-Systems hin (Mammen 1998).

**Blockade der Fibrinolyse** Bei Patienten mit Sepsis wird zusätzlich eine Unterdrückung der Fibrinolyse bei gleichzeitiger Aktivierung der Gerinnung beobachtet (Vervloet et al. 1998, Kidokoro et al. 1996). Plasmin als wesentliches Effektormolekül der Fibrinolyse spaltet in einem charakteristischen Muster Fibrinstränge und proteolytisiert Fibrinogen sowie die Gerinnungsfaktoren V und VIII.

Eine Anzahl endogener Faktoren weist durch Hemmung der Aktivierung von Plasminogen und/oder der fibrinolytischen Aktivität des Plasmin anti-fibrinolytische Effekte auf: der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und der Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse-Inhibitor (Bajzar et al. 1996, Iba et al. 1998). An intravaskulär auftretenden Fibrinfasern, die infolge der gestörten Abbaureaktion auftreten, werden Erythrozyten fragmentiert, wodurch eine mikroangiopathische hämolytische Anämie sowie Schistozyten nachgewiesen werden können (Bick 1994). Durch Exposition gesunder Freiwilliger mit TNF- $\alpha$  oder Endotoxin wurde eine initiale Aktivierung der Fibrinolyse mit anschließender profunder, langanhaltender Inhibition belegt (Levi et al. 1993, Levi et al. 1997).

**Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)** Die massive Aktivierung sowie das Ungleichgewicht von Hämostase und Fibrinolyse resultieren in einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC, disseminated intravascular coagulation, Bick 1994). Dabei werden endogene Modulatoren der Hämostase wie Protein C oder Antithrombin im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie in ihrer Plasmakonzentration deutlich vermindert und es kommt neben Blutungskomplikationen zum Auftreten mikrovaskulärer Thrombosen (Dhainaut et al. 2004). Letzteres wird als primärer und ursächlicher Faktor einer sich entwickelnden Organdysfunktion angesehen (Levi und Ten Cate 1999, McGilvray und Rotstein 1998). Bei der DIC treten häufig fibrinreiche Thromben in der Mikrozirkulation auf, welche überwiegend Erythrozyten und Fibrin enthalten (Asada et al. 1985), wobei zusätzlich in einer weiteren Studie auch thrombozytenreiche Thromben mikroskopisch nachgewiesen wurden (Watanabe et al. 1979). Die DIC gilt als eine der Ursachen für die hohe Letalität der Sepsis, wobei die Inzidenz einer DIC bei Sepsis je nach Definition von Sepsis und DIC zwischen 30 und 70 % angegeben wird (Friedman et al. 1998).

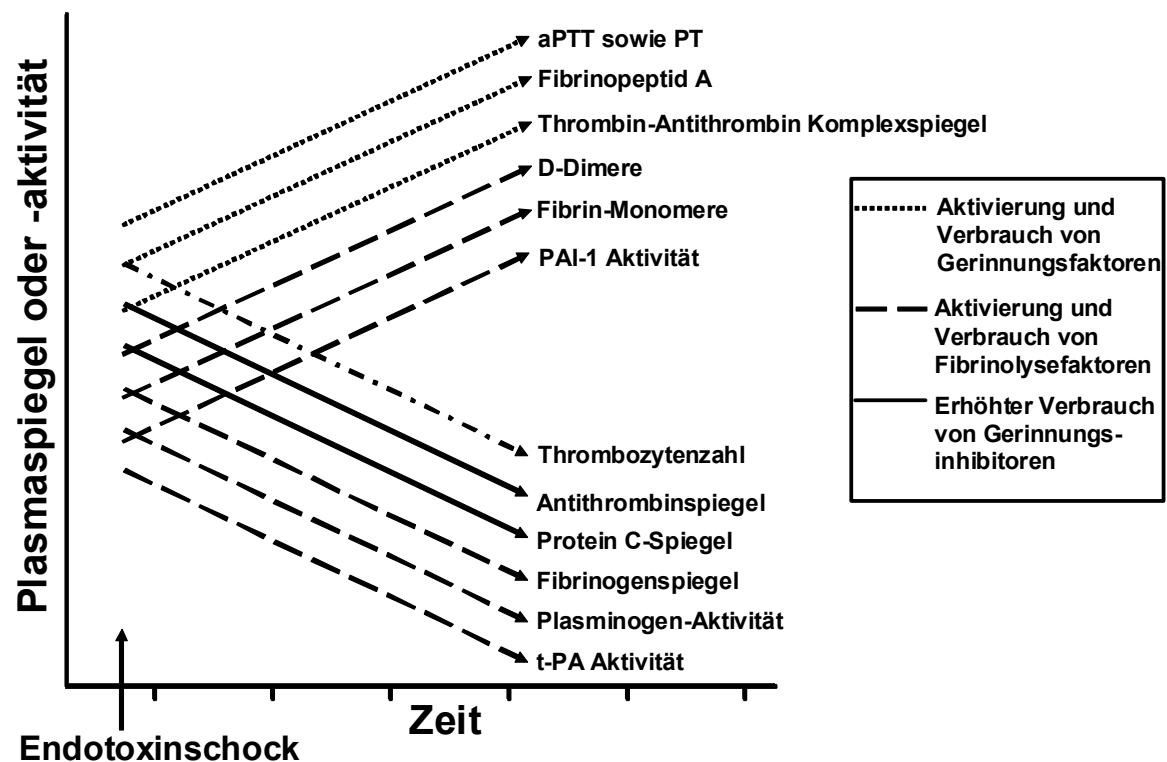


Abbildung 2: Sepsis assoziierte Gerinnungs- und Fibrinolyse-Störungen führen in einem dynamischen Prozess zur Entwicklung einer DIC mit der Veränderung spezifischer Laborparameter (aPTT aktivierte partielle Thromboplastinzeit, PT Prothrombinzeit, PAI-1 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, t-PA Tissue-Plasminogen-Aktivator, Bick 1994).

Die Rolle der Thrombozyten als wesentlicher, initialer Mediator der primären Hämostase mit anschließender Thrombusbildung wird erst in letzter Zeit zunehmend bei sepsis-assoziierten Gerinnungsstörungen untersucht (Levi 2004, Yagushi et al. 2004). Die Inzidenz einer Thrombozytopenie ( $<150 \cdot 10^9/l$ ) bei kritisch kranken Patienten liegt bei 35 bis 44 % (Vanderschueren et al. 2000, Strauss et al. 2002). Gegenwärtig wird die Thrombozytopenie bei systemischer Inflammation neben anderen Ursachen wie Blutverlust, Medikamenten-induzierter Thrombozyten-elimination, Bildungsstörungen, Hypersplenismus oder idiopathischen Störungen überwiegend auf eine Thrombozytenaktivierung zurückgeführt (Salat 1999, Neame et al. 1980, Vincent et al. 2002). Darunter versteht man das Phänomen der Ausbildung einer phospholipid-reichen Oberfläche, der Expression von Rezeptoren für Adhäsion und Aggregation, der Freisetzung von Gerinnungsaktivatoren, wie z.B. des VWF und Tissue-Faktor, der Freisetzung von proinflammatorischen Proteinen, die zur Interaktion mit Endothelzellen und Leukozyten führen (Gawaz et al. 1997), sowie der

Abschnürung von Mikrovesikeln mit prokoagulanter Aktivität (Scholz et al. 2002). Somit kommt den Thrombozyten nicht nur bei der Thrombusbildung, die im Falle einer Gefäßverlegung zum Organversagen wesentlich beiträgt, sondern auch bei der Regulation von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle zu. Wichtige Differentialdiagnosen zur Thrombozytopenie im Rahmen einer Sepsis oder DIC stellen mikroangiopathische Thrombozytopenien, wie die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP), das hämolytisch urämische Syndrom oder das HELLP-Syndrom dar, bei denen die plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse kaum beeinflusst werden (McCrae et al. 2001). Die Thrombozytopenie bei Patienten mit Sepsis tritt bereits innerhalb der ersten vier Tage nach Aufnahme auf die Intensivstation auf (Akca et al. 2002). Neben der absoluten Thrombozytenzahl sind die zeitlichen Veränderungen der Thrombozytenzahl mindestens genauso entscheidend, da beide Parameter zur Beurteilung des Schweregrades der Sepsis und zur Vorhersage des Outcome geeignet erscheinen (Vanderschueren et al. 2000, Mavrommatis et al. 2000, Russwurm et al. 2002).

Bereits Mitte der Neunziger Jahre gab es Hinweise darauf, dass Veränderungen wesentlicher Gerinnungsparameter, inklusive der Protein-C Defizienz, den klinisch relevanten Kriterien zur Diagnose einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks zeitlich vorausgehen (Mammen 1998, Mesters et al. 1996, Kidokoro et al. 1996), wobei auch diese Ergebnisse die Formulierung einer Hypothese des ‚Kontinuums der Gerinnungsstörung‘, beginnend beim initialen Trauma über SIRS, Infektion, endothelialer Dysfunktion, septischer Schock und MOF, unterstützen (Gando 2002). Die klinische Bedeutung der Gerinnungsstörung bei Sepsis wird durch jüngere positive Behandlungsergebnisse durch Substitution von rekombinantem humanem aktiviertem Protein C (PROWESS-Studie), das einen anti-inflammatorischen, anti-thrombotischen und profibrinolytischen Wirkmechanismus aufweist, als bisher einzig erfolgreicher Therapieansatz unterstrichen (Bernard et al. 2001, Balk 2000).

## **1.2. Thrombotische Mikroangiopathie**

Zum Formenkreis der primären thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) werden die TTP und das hämolytisch urämische Syndrom gezählt. Klinisch stehen bei der TTP durch Mikrothrombosierung auftretende neurologische Defizite im Vordergrund, hingegen tritt beim hämolytisch urämischem Syndrom eine Nieren-

insuffizienz als Hauptsymptomatik auf (Moake 2002). Laborchemisch manifestiert sich die Erkrankung durch das Auftreten einer Thrombozytopenie und mechanischen hämolytischen Anämie mit dem Nachweis von Schistozyten. Erst 2001 wurden die disseminiert auftretenden Mikrothromben bei der TTP auf die Aktivitätsverminderung eines Enzyms zurückgeführt, das spezifisch den VWF limitiert proteolysiert und damit einen essentiellen Beitrag zur Regulation der prokoagulatorischen Aktivität leistet (Levy GG et al. 2001).

### 1.2.1. Von Willebrand-Faktor (VWF)

Der VWF ist ein adhäsives Serum-Glykoprotein, welches beim Menschen in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird und entweder nach Stimulation sofort sezerniert oder bis zur Freisetzung in den Weibel-Palade-Vesikeln der Endothelzellen oder in den  $\alpha$ -Granula der Megakaryozyten gespeichert wird. Im Plasma zirkuliert der VWF in einer Konzentration von 5-10  $\mu\text{g/ml}$  (Tomokiyo et al. 2004). Durch die posttranslationale Bildung von Dimeren und deren weitere Zusammenlagerung entstehen lange Ketten mit mehr als 20 Primäreinheiten, die als Multimere bezeichnet werden und ein Molekulargewicht von bis zu 20 000 000 Da und eine Länge von 2  $\mu\text{m}$  erreichen können (Sadler 1998). Da jede Primäreinheit Bindungsstellen für subendotheliale Strukturen (Kollagen) einerseits und Thrombozyten andererseits besitzt, ergibt sich durch die Formation zu Multimeren ein Multiplikationseffekt für die Wirksamkeit des VWF (Furlan 1996). Der aufgrund der Einwirkung von Scherkräften langkettig getreckte VWF vermittelt bei der primären Hämostase die Anlagerung der Thrombozyten an subendotheliales Kollagen und aggregiert als extrazelluläres Adaptermolekül die Thrombozyten (Sadler 2002).

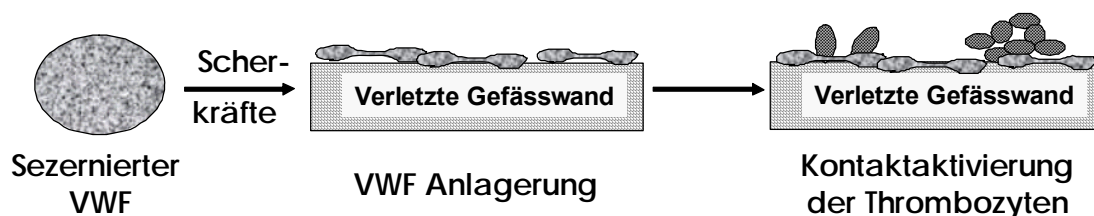


Abbildung 3: In Folge einer Gefäßverletzung resultiert die direkte Exposition des VWF zum freigelegten, ursprünglich subendothelialen Kollagen und zu den durch Kollagen kontaktaktivierten Thrombozyten mit konsekutiver Generierung und Fixierung des initialen Thrombozytenagglomerates (primäre Hämostase, Tsai 2003b).

### 1.2.2. VWF-spaltende-Protease: ADAMTS-13

Die biologische Funktion des VWF wird durch eine Protease, welche unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Barium- oder anderen mehrwertigen Metallionen aktiviert wird, reguliert (Tsai 1996). Dieses Enzym wird als VWF-spaltende-Protease („VWF-cleaving protease“), systematisch als ADAMTS-13\* bezeichnet (\* A disintegrin-and metallo-protease with thrombospondin type 1 motifs). In Abhängigkeit von einwirkenden Scherkräften spaltet die ADAMTS-13 ultralange VWF-Multimere (ULVWF-Multimere) im Bereich der A2-Domäne in Multimere unterschiedlicher Größe mit geringerem Molekulargewicht (Soejima et al. 2001). Anhand von *in-situ* Hybridisationsanalysen der ADAMTS-13-mRNA in der Leber wurden die Sternzellen als Hauptsyntheseort identifiziert (Tarr et al. 2002, Zhou et al. 2005, Uemura et al. 2005). Die Plasmakonzentration beträgt unter physiologischen Bedingungen 1 µg/ml bei einem Molekulargewicht von 180 bis 200 kDa und die Halbwertszeit zwischen 48 und 72 Stunden (Furlan et al. 1999, Tsai et al. 1994, Plaimauer et al. 2002). Die Aktivität liegt bei gesunden Probanden zwischen 40 und 170 % (Mannucci et al. 2001). Das einzige bisher bekannte Substrat ist der VWF, der spezifisch zwischen den Aminosäuren Tyrosin (842) und Methionin (843) gespalten wird (Furlan et al. 1996).

Neben der Bestimmung der Ristocetin-Cofaktoraktivität (VWF:RCo) oder der Kollagenbindungskapazität (VWF:CB) des VWF stellt die Multimerenanalyse mittels Agarose-Gelelektrophorese ein wesentliches Kriterium zur Charakterisierung der biologischen Funktion des VWF auf molekularer Ebene dar (Budde et al. 2004). Dabei ist eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Multimere, welche vorwiegend aus bis zu 16 Einzelbausteinen (Dimere) zusammengesetzt sind, ein Anzeichen dafür, dass die Aktivität der ADAMTS-13 im Normalbereich liegt (Barrington und Kaersgaard 1999). Nach derzeitigem Stand der Forschung werden die VWF-Multimere wie folgt eingeteilt: nieder-molekulare Multimere, zusammengesetzt aus maximal fünf Dimeren (Elektrophorese-Banden eins bis fünf; siehe Abbildung 4), mittelmolekulare Multimere, zusammengesetzt aus maximal 10 Dimeren (Banden sechs bis 10) sowie hochmolekulare Multimere, zusammengesetzt aus 11 bis vorwiegend 16 Dimeren (HMW-VWF; ab Bande 11 bis ca. 16; Budde, 50. Scientific and Standardisation Committee, Meeting der ISTH, Venedig Juni 2004). Das Auftreten von Multimeren, die aus mehr als 16 Einzelbausteinen zusammengesetzt sind, sogenannte ULVWF-Multimere, sowie insgesamt eine Verschiebung des jeweiligen



Anteils zu höher molekulargewichtigen Multimeren gelten als ein Anzeichen dafür, dass die Aktivität der ADAMTS-13 im pathologisch verminderten Bereich liegt (Barington und Kaersgaard 1999). Das kleinste Multimer, bestehend aus einem Dimer (Bande 1), entspricht in seiner molekularen Grösse etwa dem pentameren Immunglobulin M (ca. 900 kDa; Abbildung 4).



Abbildung 4: VWF-Multimerenmuster eines Normalplasmapools (NP) und eines TTP Patienten (TTP) mit pathologischen ULVWF-Multimeren. Mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich die unterschiedlich grossen VWF-Multimere auftrennen. Entsprechend ihrem Molekulargewicht werden die VWF-Multimere zu drei Gruppen zusammengefasst: niedermolekularer, mittelgewichtiger und hochmolekularer VWF. VWF-Multimere, die aus mehr als 16 Einzelbausteinen zusammengesetzt sind, werden als sogenannte ULVWF-Multimere bezeichnet. Diese treten nur bei deutlich verminderter ADAMTS-13 Aktivität auf (modifiziert nach *Budde et al. 2004*).

Die unter ADAMTS-13 Aktivitätsverminderung auftretenden ULVWF-Multimere im Plasma (Tsai 2002) stellen die pathophysiologische Grundlage der TTP dar. Zur adäquaten Therapie der TTP werden Plasmapräparate infundiert, welche aufgrund ihrer Herstellungsweise eine nachweisbare ADAMTS-13 Aktivität enthalten (Furlan et al. 1999). Neben der kongenitalen Form der ADAMTS-13 Defizienz (Upshaw-Schulman Syndrom) ist eine Aktivitätsverminderung durch auto-inhibitorische Antikörper nachgewiesen (Veyradier et al. 2004, Tsai et al. 2000).

Bei der TTP kommt es zu charakteristischen Veränderungen, welche sich in einer Verdickung der Gefässwände durch das Anschwellen der Endothelzellen und dem Auftreten von Schistozysten manifestieren (Burns et al. 2004). Da die ULVWF-Multimere aufgrund ihrer verstärkten Affinität zu den Thrombozyten diese spontan aktivieren und in Abwesenheit eines Endothelschadens aggregieren, entstehen

Thromben in der Mikrozirkulation, die vor allem aus VWF-Thrombozytenaggregaten zusammengesetzt sind (Tsai 2003b, Hosler et al. 2003).

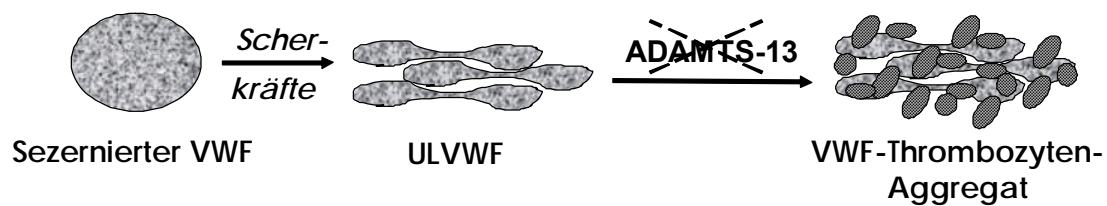


Abbildung 5: Generierung eines thrombozytenreichen Thrombus unter ADAMTS-13 Mangel. ULVWF-Multimere aktivieren und aggregieren die Thrombozyten unter physiologischen Flussbedingungen in Abwesenheit eines Endothelschadens (Tsai 2003b).

**ADAMTS-13 Mangel** Nach bisherigem Wissenstand sind Defizite in der proteolytischen Aktivität der ADAMTS-13 multifaktoriell bedingt. Zu den diskutierten Faktoren gehören neben polygenetischen Prädispositionen und Mutationen (Schneppenheim et al. 2003), die mit Funktionseinschränkungen des Proteins gekennzeichnet sind, Schwangerschaft, akute und chronische Entzündungen, renale Insuffizienz (Sanchez-Luceros et al. 2004, Mannucci et al. 2001) und die Anwendung vasopressorisch-wirksamer Arzneimittelzubereitungen wie z. B. Vasopressin und dessen stabilisierten Analoga wie z. B. Desmopressin, Terlipressin® (Reiter et al. 2003, Mannucci et al. 2004).

### 1.2.3. Nachweismethoden der ADAMTS-13

Grundsätzlich kann die Bestimmung der Protease-Aktivität in Patientenplasma direkt oder indirekt erfolgen. In Abhängigkeit der Arbeitsmethode wird die Größe des endogen vorhandenen VWF als Marker für die Aktivität der ADAMTS-13 abgebildet oder die Funktionalität des VWF bestimmt (Tsai 2003a). In der nachstehenden Tabelle sind die gebräuchlichen Verfahren zusammengefasst, insgesamt zeichnen sich alle Methoden durch einen hohen Zeitaufwand und das unbedingte Erfordernis einer Standardisierung aus (Studt et al. 2003, Tripodi et al. 2004). In Deutschland hat sich in der klinischen Diagnostik der im deutschen Referenzlabor (Professor Budde, Labor Arndt & Partner, Hamburg) angewandte Assay durchgesetzt (Schneppenheim et al. 2003). Dieser stellt ein modifiziertes Testsystem nach Gerritsen dar und detektiert nach derzeitigem Kenntnisstand auch moderat verminderte ADAMTS-13 Aktivitäten (Gerritsen et al. 1999). Bisher steht kein klinisch hinreichend evaluiertes, homogenes Testsystem zur Verfügung.

Tabelle 1: Übersicht über angewandte Assays zur Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität (Miyata et al. 2005).

Erstbeschreiber	Substrat	Denaturierung der VWF Multimere	Aktivierung der ADAMTS-13	Trennmethode zur Bestimmung der Restaktivität der VWF-Spaltstücke	Finale Detektion der VWF-Spaltstücke	Indikator für VWF-Proteolyse	Bemerkungen	Literatur
Furlan	Aufgereinigt aus Kryopräzipitat	Urea, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Ba <sup>++</sup>	elektrophoretisch (Agarose)	Peroxidase-konjugierter VWF-Antikörper	Verminderter Anteil an HMW-VWF	hochsensitiv, cutt- off 1 %, aufwändig	(Furlan et al. 1996)
Tsai	Aufgereinigt aus Kryopräzipitat	Guanidium-HCl, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Guanidium	elektrophoretisch (Polyacrylamid)	Anti-VWF, sekundärer <sup>125</sup> I-Antikörper	Generierung von 176 kDa Spaltprodukten	Kein Ba <sup>++</sup>	(Tsai 1996)
Gerritsen	Aufgereinigt aus Kryopräzipitat	Urea, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Ba <sup>++</sup>	VWF:CBA (ELISA)	Peroxidase-konjugierter VWF-Antikörper	Verminderte Bindung der VWF-Multimere an Kollagen III	initial Proteolyse endogenen VWF, sensitiv, Cutt-off 3 %	(Gerritsen et al. 1999)
Schneppenheim	rhVWF	Urea, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Ba <sup>++</sup>	VWF:CBA (ELISA)	Peroxidase-konjugierter VWF-Antikörper	Verminderte Bindung der VWF-Multimere an Kollagen III	sensitiv, Cutt-off 3 % (modifizierter Gerritsen-Test)	(Schneppenheim et al. 2003)
Böhm	Aufgereinigt aus Kryopräzipitat	Urea, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Ba <sup>++</sup>	VWF:RisCof (Aggregometer)	Trübung durch Latex-agglutination	Verminderte Ristocetin vermittelte Bindung der VWF-Multimere an Thrombozyten	sensitiv, Cutt-off 6 % (modifizierter Gerritsen-Test)	(Bohm et al. 2002)
Obert	rhVWF	Urea, Trispuffer niedriger Ionenstärke, Dialyse,	Ba <sup>++</sup>	VWF:Ag (Sandwich-ELISA)	Anti-VWF, sekundärer <sup>125</sup> I-Antikörper	Deutlicher Abfall des VWF:Ag Spiegels	Two Site IRMA, sensitiv, spezifisch, geringer Zeitaufwand	(Obert et al. 1999)
Kokame	FRETS-VWF73 (Minimalsubstrat, 73 Aminosäuren, fluoreszenzmarkiert)	Nicht erforderlich	Ba <sup>++</sup>	Fluoreszenz-plattenleser	Veränderte Fluoreszenz (440nm)	Spaltung des FRETS-VWF73	Geringer Zeitaufwand, physiologische Bedingungen	(Kokame et al. 2004)
Zhou	GST-VWF73-6His (Minimalsubstrat, 73 Aminosäuren, beidseitig markiert)	Nicht erforderlich	Nicht erforderlich	ELISA (anti-GST beschichtete Mikrotiterplatte)	Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen 6XHis	Abspaltung von 6His am C-Terminus des VWF73, verminderte Extinktion	Geringer Zeitaufwand, Kosteneffizienz, physiologische Bedingungen	(Zhou und Tsai 2004)
Whitelock	rhVWF A2 Domäne mit N-terminalen His-Tag und C-terminalen Tag-100	Nicht erforderlich	Nicht erforderlich	Sandwich-ELISA (Ni <sup>2+</sup> -beschichtete Mikrotiterplatte, Qiagen)	Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen die Tag-100 Sequenz der VWF-A2-Domäne	Abspaltung von Tag-100 am C-Terminus der VWF-A2-Domäne, verminderte Extinktion	Geringer Zeitaufwand, Kosteneffizienz, physiologische Bedingungen	(Whitelock et al. 2004)

FRETS Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Substrat, GST Glutathion-S-Transferase, rh rekombinant human

## 2. Hypothese

Der Einfluß der primären Hämostase im Rahmen von Mikrozirkulationsstörungen bei inflammatorischen Reaktionen ist bisher nur unzureichend aufgeklärt. Trotz Hinweisen, dass bei systemischer Inflammation thrombotische Komplikationen nicht nur durch DIC, sondern auch durch TMA bedingt sein können, ist bisher keine Analyse der ADAMTS-13 Aktivität und der biologischen Funktion der VWF-Multimere bei systemischer Inflammation infektiöser oder nicht-infektiöser Genese erfolgt.

Wir stellen die folgenden Hypothesen auf:

- (1) Eine Verminderung der ADAMTS-13 Aktivität kann bei Patienten mit SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis oder septischem Schock auch ohne Vorliegen einer TTP nachweisbar sein und
- (2) infolgedessen können bei diesen Patienten pathologische ULVWF-Multimere im Plasma auftreten.

Zur Prüfung der Hypothesen 1 und 2 wurde zunächst eine prospektive Longitudinalstudie bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock und aufgrund der positiven Ergebnisse eine zweite Studie bei herzchirurgischen Patienten mit SIRS durchgeführt.

Dabei wird ein Nutzen bezüglich einer frühzeitigen Diagnostik der Thrombozytopenie, der Mikrothrombisierung und des drohenden Multiorganversagens bei Sepsis erwartet. Eine Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität und/oder der veränderten funktionellen Eigenschaften des VWF könnten zur Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko zur Entwicklung einer Sepsis-assoziierten Mikroangiopathie beitragen. Anhand der erarbeiteten theoretischen Grundlagen könnten neue therapeutische Strategien zur Behandlung des Multiorganversagens bei Sepsis entwickelt werden. Insbesondere durch die gezielte Beeinflussung der Interaktion zwischen VWF und VWF-modifizierenden Enzymen wie der ADAMTS-13 würden sich neue therapeutische Optionen ergeben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Definition von SIRS, schwerer Sepsis und septischer Schock

Tabelle 2: Definition von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischer Schock (Astiz und Rackow 1998, Levi et al. 2003) modifiziert nach einem Konsensus-Vorschlag der Arbeitsgruppe Sepsis der European Society of Intensive Care Medicine (Landry et al. 2001) und den Empfehlungen der Deutschen Sepsis Gesellschaft ([www.sepsis-gesellschaft.de](http://www.sepsis-gesellschaft.de)). Cut-Off Werte der diesen Definitionen zugrunde liegenden Parameter sind im Datenanhang, Tabelle 9 dargestellt.

---

**SIRS** ist die Antwort auf eine systemische Entzündung. Mindestens 2 der nachfolgenden Parameter müssen pathologische Werte aufweisen: Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Leukozytenzahl.

**Sepsis** ist ein SIRS, das aufgrund einer Infektion vorhanden ist.

**Schwere Sepsis** ist eine Sepsis mit Organdysfunktion. Diese Dysfunktionen gehen einher mit Perfusionsstörungen, die anhand einer metabolischen Azidose, Oligurie, Hypoxämie, arteriellen Hypotension, Thrombozytopenie oder Alteration des mentalen Status erkannt werden können.

**Septischer Schock** ist die bei adäquater Volumentherapie sepsis-induzierte Hypotension oder sepsis-induzierte Notwendigkeit zur Anwendung vasopressorisch-wirksamer oder inotroper Substanzen zur Stabilisation des Blutdrucks.

---

Score Systeme dienen in der Intensivmedizin zur objektiven Erfassung der Krankheitsschwere und tragen zum Vergleich der Patientenkollektive auf verschiedenen Intensivstationen (ITS), des Einflusses von therapeutischen Interventionen und/oder der Beurteilung des klinischen Verlaufes über die Zeit bei.

**SOFA-Score** Zur Beurteilung der Schwere der Multiorgandysfunktion wurde der „Sequential Organ Failure Assessment“-Score (SOFA-Score) angewandt. Dieser

setzt sich aus einem Kreislauf- (mittlerer arterieller Blutdruck bzw. Katecholaminapplikation), Beatmungs- ( $PO_2/FIO_2$ ), Gerinnungs- (Thrombozytenzahl), Leber- (Bilirubin), Nieren- (Urinausscheidung oder Kreatinin im Serum) und ZNS-Subscore (Glasgow-Koma-Scale) zusammen (Vincent et al. 1996). Eine Gesamtpunktzahl wurde für jeden Beobachtungstag der Patienten berechnet (maximal erreichbare Punktzahl 24).

**APACHE II- und SAPS II-Score** Diese beiden Score Systeme wurden zur Beurteilung des individuellen Risikos eines Patienten entwickelt. Sie dienen als Prognoseparameter und werden einmalig innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme auf die ITS berechnet (Knaus et al. 1985). Der „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation“ (APACHE) II-Score setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

- (1) 12 physiologisch-biochemische Parameter (Temperatur, mittlerer arterieller Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz, Oxygenierung, arterieller pH-Wert, Natrium,- Kalium,- Kreatinin im Serum, Leukozyten, Hämatokrit und Glasgow-Koma-Scale),
- (2) Lebensalter und
- (3) chronische Vorerkrankungen.

In den „Simplified Acute Physiological Score“ (SAPS) II-Score gehen folgende Punktwerte ein:

- (1) 12 physiologische Parameter (systolischer Blutdruck, Herzfrequenz, Oxygenierung, Temperatur, Harnstoff im Serum, 24-h-Urinausscheidung, Kalium, Natrium im Serum, Leukozyten, Bikarbonat, Bilirubin und Glasgow-Koma-Scale),
- (2) Alter,
- (3) Aufnahmemodus und
- (4) Art der Grunderkrankung (Le Gall et al. 1993).

**Gerinnungsscore** Nach den Empfehlungen der „International Society on Thrombosis and Hemostasis“ (ISTH) wird bei Patienten mit Sepsis oder Organversagen folgender Gerinnungsscore zur Definition einer schweren DIC („overt DIC“) aufgestellt (Taylor et al. 2001). Dabei werden die Anzahl der Thrombozyten, die Prothrombinzeit, der Fibrinogen- und der D-Dimer-Spiegel berücksichtigt, wobei insbesondere der Tagesverlauf entscheidend ist. Die Abstufung des D-Dimer-

Spiegels erfolgte anhand des vom Hersteller vorgegebenen Referenzbereichs und von Abstufungen analog der Studie von Dhainaut et al. 2005. Beim Fibrinogen-Spiegel werden nur zwei Abstufungen berücksichtigt. Ab fünf von maximal acht erreichbaren Punkten wird in der Regel von einer schweren DIC gesprochen (Taylor et al. 2001).

Tabelle 3: Kriterien zur Diagnose einer schweren DIC. Ab fünf von maximal acht erreichbaren Punkten wird in der Regel von einer schweren DIC gesprochen (Taylor et al. 2001).

Gerinnungstest	ISTH-Score
Thrombozytenzahl [ $10^9/l$ ]	
< 100	1
< 50	2
Prothrombinzeit [%]	
48-36	1
< 36	2
Fibrinogen [g/l]	
< 1,0	1
D-Dimere [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
0,25 – 2,5	2
> 2,5	3

### 3.2. Studiendesign

Die prospektive Longitudinalstudie bei Patienten mit SIRS, schwerer Sepsis und septischem Schock wurde an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsklinik Jena nach Zustimmung der Ethikkommission durchgeführt (Ethikvotum 0173-08/01 vom 07.09.2001). Von Patienten oder vertretungsberechtigten Angehörigen sowie den gesunden Probanden liegen Einverständniserklärungen zur Teilnahme an der Studie vor.

**Patienten** Für die erste Gruppe von elf konsekutiven, intensivpflichtigen Patienten wurde der Studientag 1 als der Tag festgelegt, an dem erstmalig die Kriterien für schwere Sepsis oder septischen Schock vorlagen. Die erste Blutabnahme erfolgte innerhalb von sechs Stunden nach Diagnosestellung. Die Patienten wurden bis zur Entlassung von der ITS oder bis zum Todestag beobachtet

(Tag X). Für die Einteilung der Patienten in Verstorbene und Überlebende wurde der Beobachtungszeitraum auf ITS berücksichtigt. Neben den routinemäßigen Datenerfassungs- und Monitoring-Massnahmen auf der ITS wurden folgende gerinnungsspezifische Parameter im Plasma bestimmt: Die Ristocetin-Cofaktoraktivität des VWF (VWF:RCo), der VWF-Antigenkonzentration (VWF:Ag), die Kollagenbindungskapazität des VWF (VWF:CB), sowie die ADAMTS-13 Aktivität. Der berechnete Quotient zwischen dem VWF:Ag und der ADAMTS-13 Aktivität definiert das Missverhältnis von Enzym und Substrat, zeigt den Schweregrad der zugrunde liegenden Mikroangiopathie an und wurde daher als TMA-Index definiert. Diese Parameter wurden bei allen Patienten an den ersten und letzten fünf Tagen auf der ITS bestimmt. An den dazwischen liegenden Tagen wurden die Parameter lediglich im 3-Tagesrhythmus bestimmt. Nach diesem Tages-Schema wurden Multimerenanalysen des VWF von dem Plasma von drei Patienten durchgeführt.

In die zweite Gruppe wurden 22 konsekutive intensivpflichtige Patienten, die nach Operationen am offenen Herzen unter Verwendung des kardiopulmonalen Bypasses (CPB) ein schweres SIRS entwickelten, eingeschlossen. Dabei wurde der erste postoperative Tag als der Studientag 1 definiert. An fünf aufeinander folgenden Tagen wurde eine Plasmaprobe entnommen. Dabei wurde an allen fünf Studientagen VWF:RCo, VWF:CB, VWF:Ag, ADAMTS-13 Aktivität und TMA-Index bestimmt. Zudem wurde bei vier ausgewählten Patienten, die eine ADAMTS-13 Aktivität < 20% an einem von fünf Tagen aufwiesen, eine VWF-Multimerenanalyse durchgeführt.

Alle Patienten wurden initial kalkuliert und nach Eintreffen mikrobiologischer Kulturbefunde gezielt mit Antibiotika behandelt. Keiner der Patienten wurde mit Vasopressin oder Vasopressinanaloga behandelt (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (DDAVP), Terlipressin®). Bei keinem der Patienten bestand aufgrund der Anamnese ein Verdacht auf eine TTP, hämolytisch urämisches Syndrom oder idiopathische Thrombozytopenie.

**Gewinnung der Blutproben** Die Blutproben wurden täglich in Citrat-Monovetten (Sarstedt, Numbrecht) über einen arteriellen Katheter abgenommen, anschließend innerhalb von 30 min nach Abnahme zentrifugiert (2.500 x g, 15 min, 4° C), aliquotiert und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren (maximale Aufbewahrungsdauer zwölf Monate).



### 3.3. VWF-Plasmaspiegel und VWF-Multimere

**Standardkurve** Ein Normalplasmapool bestehend aus dem Plasma von 45 gesunden Probanden (18 Frauen und 27 Männer), die jeweils ein unauffälliges Blutbild inklusive Gerinnungsstatus aufwiesen, wurde zur Erstellung einer Standardkurve bei den jeweiligen ELISA Testverfahren verwendet. Beim weiblichen Probandenkollektiv lag weder ein Verdacht auf eine Schwangerschaft noch eine Medikation mit oralen Kontrazeptiva vor. Der VWF:Ag, die VWF:RCo, die VWF:CB und die ADAMTS-13 Aktivität des Plasmapools wurde bei den im Anschluß beschriebenen Methoden jeweils als 100 % angenommen.

Die VWF:RCo Aktivität reflektiert die Interaktion zwischen der A1 Domäne des VWF und dem Thrombozytenrezeptor GPIIb $\alpha$  (CD42b). Durch Inkubation von Citratplasma, formalinfixierten Thrombozyten und Ristocetin wird diese funktionelle Eigenschaft des VWF erfasst. Das Antibiotikum Ristocetin bewirkt eine Konformationsänderung des VWF von seiner globulären Form in eine gestreckte, aktivierte Form. Über die dadurch freigelegte Bindungsstelle kommt es in Abhängigkeit von der Grösse der Multimere des VWF zur unterschiedlich starken Aggregation der Thrombozyten, die mittels Aggregometer verifiziert wird. Anhand der Extinktionsveränderung erhält man eine qualitative Aussage über die biologische Funktion des VWF (Dade-Behring Gerinnungsanalyser, Behring Coagulation System (BCS), Macfarlane et al. 1975).

Das Prinzip der VWF:CB beruht auf der Bindung der A3 Bindungsdomäne des VWF an Kollagen, das auf Mikrotiterplatten immobilisiert wird. Um selektiv die funktionellen Eigenschaften des VWF und weniger dessen Konzentration zu erfassen, wird durch eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen eine Gleichgewichtsreaktion zwischen hoch und niedermolekularem VWF begünstigt (Brown und Bosak 1986). Bei Parallelbestimmung von VWF:Ag (Cejka 1982) und VWF:CB mittels immunologischer Methoden im ELISA Format aus einer Plasmaverdünnung erhält man über den Quotienten von VWF:CB und VWF:Ag eine globale Aussage über die Affinität des VWF zu Kollagen. Für diese Bestimmung wurden 96-Well-Platten (Nunc-ImmunoPlate, Maxisorp Surface, Wiesbaden) mit Kollagen I beschichtet (6  $\mu$ g/ml, Nycomed, Unterschleissheim). Parallel dazu wurde zur Bestimmung des VWF:Ag Plasmaspiegels eine 96 Well Platte (Nunc-ImmunoPlate; Maxisorp Surface, Wiesbaden) mit primären VWF-Antikörper beschichtet (5,7  $\mu$ g/ml,

Dako, Hamburg). Nachfolgende Schritte erfolgen für beide Methoden in gleicher Weise.

Tabelle 4: Schema zur Erstellung der Standardkurve für den VWF:Ag und VWF:CB Assay. Pool Normalplasmapool, PVP Probenverdünnungspuffer.

VWF:Ag oder VWF:CB	Pool (1: 10 vorverdünnt)	PVP
100%	100µl	400µl
50%	100µl	900µl
25%	50µl	950µl
12,5%	25µl	975µl
6,25%	25µl	1975µl
3,13%	500µl der 6,25 %	500µl
1,5%	500µl der 3,13 %	500µl

Die bei -80°C gelagerten Citratplasmaproben wurden bei 37°C für 10 min im Wasserbad aufgetaut. Jede Patientenprobe wurde 1:10 mit Probenverdünnungspuffer (PVP; phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) mit 5% Rinderalbumin (BSA) Roth, Karlsruhe) vorverdünnt und in Abhängigkeit vom zu erwartenden VWF:Ag Gehalt weiterverdünnt. Je 100 µl werden als Doppelbestimmung auf die mit Kollagen und VWF-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Platten wurden bei 37°C für 90 min im wasserdampfgesättigten Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % BSA (Roth, Karlsruhe) in PBS erfolgte die Detektion des VWF mittels Peroxidase-konjugiertem Anti-VWF Antikörper (Dako, Hamburg) bei einer Verdünnung von 1:2000 in 0,1 % BSA (Roth, Karlsruhe) in PBS, sowie eine erneute Inkubation bei 37°C für 90 min im Brutschrank. Nach dreimaligem Waschen der Platten wurden diese mit TMB (Biorad, München) visualisiert und bei 450nm im Mikroplattenreader vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand der jeweils zugrundeliegenden Standardkurve.

**Multimerendarstellung** Die Multimerenanalyse des VWF stellt den Goldstandard für die Charakterisierung des VWF in seiner komplexen Funktion dar. In Kooperation mit Professor Budde (Labor Arndt & Partner, Hamburg) wurde die Multimerenanalyse von ausgewählten Patientenproben durchgeführt (Ruggeri und Zimmerman 1981, Schneppenheim et al. 1988). Zur horizontalen, elektro-phoretischen Auftrennung (Multiphor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) der VWF-Multimere wurde 1,2 % Agarose (LGT, Sigma-Aldrich, Seelze) in Trenngel-

puffer gelöst (0,375 M Tris, 0,1 % SDS, pH 8,8). In einer vertikalen Giessapparatur wurde ein 215 mm x 95 mm x 1,5 mm grosses Gel zwischen 2 Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen des Gelkamms, wurde ein 0,8 %iges Agarose-Sammelgel gegossen, wobei die Agarose (HGT P, Sea Kem) in Sammelgelpuffer (0,125 M Tris, 0,1 % SDS, pH 6,8) gelöst wurde. Die zu analysierenden Plasmaproben wurden für 10min bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit Probenverdünnungspuffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 % SDS, 0,8 % HGT Agarose, pH 8,0) auf eine VWF:Ag Konzentration zwischen 5 und 10 % verdünnt. Zur Denaturierung des VWF wurden die Proben für 20 Minuten bei 60°C in ein Wasserbad gestellt und anschliessend je 20 µl Probe in die Geltaschen pipettiert. Für die spätere Analyse der Patientenproben wurde zeitgleich Normalplasmapool (1:20 verdünnt) auf das Gel aufgetragen.

Die VWF-Multimere wurden bei 60 V und 16°C für 15 Stunden ihrer Grösse nach aufgetrennt. Nach Äquilibration des Gels für zehn Minuten in Blotpuffer (0,05 M Phosphatpuffer) wurde der VWF auf eine Nitrocellulose Membran mittels Tank-Blot-Verfahren (Transphor Tank Blot, Höfer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 33 V, 2,5 mA über 2 Stunden bei Raumtemperatur transferiert.

Anschließend wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran für 15 Stunden mit 5 % Milchpulver in Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS) blockiert. Zur Detektion der VWF-Multimere wurde die Membran eine Stunde mit einem Peroxidase markierten Anti-VWF-Antikörper inkubiert (Dako, Hamburg), welcher 1:6500 in TBS rekonstituiert wurde. Zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wurde die Membran in TBS mit 0.1 % Tween (Roth, Karlsruhe) und anschliessend in TBS gewaschen. Nach Inkubation der Membran mit enhanced chemiluminescence (ECL) Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wird das Chemolumineszenz Signal per CCD Kamera (Fluorchem) dargestellt (Budde et al. 1990).

### **3.4. Aktivität der ADAMTS-13**

Die Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität erfolgte indirekt über eine Bestimmung der residualen VWF:CB. Dabei stellt rekombinanter humaner VWF (rhVWF, Schneppenheim et al. 2001) als Substrat für die ADAMTS-13 den Goldstandard dar, da der rhVWF aufgrund seiner nativen Struktur einen hohen Anteil an ULVWF-Multimere bei fehlender Triplet-Struktur aufweist. Der aus Kryopräzipitat oder humanem Plasma isolierte VWF, der aufgrund der im Plasma endogen

vorhandenen ADAMTS-13 bereits proteolysiert ist, eignet sich aufgrund eines höheren Blindwertes weniger für den Assay.

Um bei der Gewinnung des rhVWF aus humanen Nierenzellkulturen dessen Proteolyse durch eventuell vorhandene Proteasen zu verhindern, wurde der Zellkulturüberstand mit 2mM Pefabloc-SC (Roche, Mannheim) und 15 mM EDTA (Roth, Karlsruhe) für vier Stunden bei Raumtemperatur versetzt (Schneppenheim et al. 2003). Anschließend wurde das rhVWF-haltige Zellkulturmedium für 4Std, anschließend über Nacht und noch einmal eine Stunde bei Raumtemperatur in 4 % Polyethylenglycol (20 kDa; Merck, Darmstadt), 5 mM Tris, pH 8, dialysiert und konzentriert (Porengrösse 12-14 kDa, Medicell, London), so dass final der rhVWF:Ag Gehalt zwischen 1,0 und 1,6 U/mL lag und das EDTA entzogen war. Bis zur Verwendung wurde der rhVWF bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zu je 1100  $\mu\text{l}$  aliquotiert maximal zwölf Monate eingefroren (Schneppenheim et al. 2003).

Zur Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität wurde das Citratplasma der Patienten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 10 Minuten aufgetaut. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde die angegebene Menge Normalplasmapool mit Harnstofflösung (1,5 M, pH 8, Sigma-Aldrich, Seelze) zur Denaturierung wie in nachfolgender Tabelle beschrieben verdünnt.

Tabelle 5: Verdünnungsschema für die Standardkurve des ADAMTS-13 Assays

ADAMTS-13 Aktivität in %	Normalplasmapool in $\mu\text{l}$	1,5 M Urea in $\mu\text{l}$
200	40	160
100	40	360
75	10	123
50	10	190
40	10	240
33	10	290
20	10	490
10	10	990
5	500 $\mu\text{l}$ der 10% Verdünnung	500
2,5	500 $\mu\text{l}$ der 5% Verdünnung	500

Die Patientenplasmaproben wurden seriell verdünnt (1:10, 1:20, 1:40). Anschließend wurden sowohl von den Verdünnungen der Standardreihe als auch von den Patientenplasmaverdünnungen je 50  $\mu\text{l}$  in Eppendorf Tubes überführt. Zur

Proteolyse des im Plasmapool und in den Patientenproben vorhandenen VWF wurde zu jeder Probe und Pufferkontrolle 5 µl Bariumchlorid (Sigma-Aldrich, Seelze) zur Aktivierung der endogen vorhandenen ADAMTS-13 gegeben. Anschliessend wurde jede Probe für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde jede Probe mit je 100 µl rhVWF als Substrat für die ADAMTS-13 versetzt. Während der Inkubation von 2 h bei 37 °C wurde der rhVWF in Abhängigkeit von der in den Proben vorhandenen ADAMTS-13 Aktivität gespalten. Durch Fällung der Bariumionen mittels Natriumsulfat (Sigma-Aldrich, Seelze) wurde die Reaktion beendet. Nach Zentrifugation (2 min, 13.000 x g) und Verdünnung in Probenverdünnungspuffer (Endkonzentration des rhVWF 0,6-0,9 U/mL) erfolgte eine Inkubation in Kollagen-III-beschichteten Cova-Link Streifen (Nunc, Wiesbaden) (Gerritsen et al. 1999). Zur Vorbereitung wurden diese zunächst für 1 h mit 100 µl Kollagen III (1,5 µg/ml) beschichtet (Southern Biotechnologies, Bezug über Biomol, Hamburg) und anschliessend mit 2,5 % BSA (Sigma-Aldrich, Seelze) für 15 Minuten blockiert. Innerhalb der zweistündigen Inkubation lagern sich aus der Proteolyse resultierende rhVWF-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und der daraus resultierenden Affinität zu Kollagen III an. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) erfolgte eine Inkubation für 1 h mit 1:4000 in PBS; 0,5 % BSA (Sigma-Aldrich, Seelze) verdünntem Peroxidase-markierten Anti-VWF-Antikörper (Dako, Hamburg). Dieser wurde mittels kommerziellem ELISA-Detektionskit (TMB, Biorad, München) bei 450 nm im Mikroplattenleser vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der ADAMTS-13 Aktivität anhand der Standardkurve und Kalkulation der einzelnen Patientenverdünnungen.

**Inhibitor Assay** Die Spezifität des Assays wurde durch Aktivitätshemmung der ADAMTS-13 Aktivität durch Autoantikörper im Plasma von Patienten mit erworbener TTP, welches von der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt wurde, überprüft. Durch folgendes Testverfahren wurde der Autoantikörper nachgewiesen: Der zur Kalibration der Standardkurve eingesetzte Normalplasmapool und das Patientenplasma, jeweils 1 zu 10 in 5 mM Tris, 1,5 M Urea (pH 8,0) vorverdünnt, wurden in gleichen Anteilen vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Lag nach der Inkubation und anschließender ADAMTS-13 Bestimmung eine ADAMTS-13 Restaktivität nicht unterhalb von 30 % vor, wurde ein Autoantikörper in Patientenproben ausgeschlossen.

### 3.5. Validierung

**Referenzwerte** Um den Referenzbereich der angewandten Methoden bei gesunden Probanden festzulegen, wurde das Plasma von 13 gesunden Probanden [55 (38/73) Jahre; 7 Frauen, 6 Männer] untersucht: VWF:Ag [0,94 (0,73/0,96) U/ml], VWF:RCo [157 (139/170) %], VWF:CB [112 (98/123) %], VWF:CB/VWF:Ag [1,2 (1,0/1,5)], VWF:RCo/VWF:Ag [1,0 (1,0/1,2)], ADAMTS-13 Aktivität [66 (59/70) %] und TMA-Index [1,3 (1,1 /1,8)]. Angegeben sind jeweils Median und (1./3. Quartil). Legt man als Referenz für den TMA-Index den in der Literatur angegebene maximalen VWF:Ag Gehalt von 150 % (Schneppenheim 2000) und den unteren Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität von 40 % (Mannucci et al. 2001) zugrunde, erhält man als oberen Normbereich für den TMA-Index einen Wert von 3,75.

Plasma von Patienten mit TTP, welches von der Klinik für Kinder und Jugendheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt wurde, diente zur Evaluierung des pathologischen Referenzbereichs des ADAMTS-13 Assays (Median aus 22 Messungen 14 (5/16) %).

**Interassayvarianz** Eine weitere Validierung des Assays erfolgte durch die Bestimmung von drei Plasmaproben von Patienten mit Verdacht auf TMA, wobei jeweils die Plasmaproben zeitgleich durch das deutsche Referenzlabor von Professor Budde, Hamburg und übereinstimmend im Labor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsklinik Jena bestimmt wurde.

**Endogene VWF-Konzentration** Es gibt bisher wenige Studien bezüglich ADAMTS-13 Aktivitätsbestimmungen bei Patienten mit endogen erhöhten VWF-Plasmaspiegeln. Zudem ist der Einfluss des endogenen VWF bei der indirekten Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität über die externe Zugabe von rekombinantem VWF bisher nur in einer Studie systematisch untersucht (Studt et al. 2003). Insbesondere bei stark erhöhten VWF:Ag Plasmaspiegeln ist möglicherweise der Einfluss des endogen vorhandenen VWF nicht vollständig auszuschliessen. Zum Ausschluss falsch niedriger Werten haben wir eine Versuchsreihe mit unterschiedlich langen Vorinkubationszeiten durchgeführt: 0,5h, 2h und 18h. Bei der Analyse von drei verschiedenen Plasmaproben mit jeweiliger ADAMTS-13 Aktivität von ca. 20% und einem VWF:Ag von 4 U/ml zeigten sich lediglich marginale Unterschiede in der ADAMTS-13 Aktivität bei unterschiedlich langen Vorinkubationszeiten. Bei Zugabe von EDTA statt Bariumionen beobachtet man mit zunehmender Inkubationszeit eine

steigende unspezifische Hydrolyse des VWF. Weiterhin ist nicht untersucht, in wie weit eine verlängerte Inkubationszeit die ADAMTS-13 Aktivität vermindert. Daher haben wir uns an den Literaturangaben orientiert, zumal von Mannucci der Assay auch bei erhöhten endogenen VWF-Mengen angewandt wurde (Mannucci et al. 2001) und erhöhte VWF-Mengen keinen Einfluss auf den Assay haben sollen (Studt et al. 2003).

### **3.6. Statistische Auswertung**

Unterschiede zwischen Medianwerten wurden mittels parameterfreien Testverfahren auf Signifikanz geprüft. Für den Vergleich zwischen Patientengruppen sowie zwischen Patienten und Kontrollen wurde der U-Test nach Mann-Whitney und für den Vergleich der Daten, die bei den Patienten an den verschiedenen Beobachtungstagen erhalten wurden, wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon verwendet. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert von  $p < 0,05$  eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde mit Winstat Excel berechnet und die angegebenen Medianwerte mit zugehöriger Streubreite (1./3. Quartil), sowie die Grafiken anhand von Origin 7.0 erstellt. Bei Verwendung von Box Blots wurde der Median als Srich angegeben, das 1./3. Quartil als Boxgrenzen sowie die 10./90. Perzentile als Whiskers. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock wurde aufgrund der geringen Patientenzahl auf die Angabe der 10./90. Perzentile verzichtet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock**

#### **4.1.1. Klinische Befunde**

Zwischen Nicht-Überlebenden (n=6) und Überlebenden (n=5) bestanden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Alter, Geschlecht, ITS-Liegedauer und die Anzahl der initialen Organversagen. Am Tag der Diagnose der schweren Sepsis oder des septischen Schocks lagen keine signifikanten Unterschiede im APACHE II-Score, SAPS II-Score, initialen ISTH-Score sowie den SOFA-Subscores vor. Signifikante Unterschiede bestanden in der Behandlung mit unfraktioniertem Heparin sowie der Dauer der mechanischen Beatmung (Tabelle 6).



Tabelle 6: Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (n=11);  
Gegenüberstellung Verstorbene vs. Überlebende.

	Verstorbene (n=6)	Überlebende (n=5)
Alter (Jahre)	66.5 (51/72)	47.0 (47/59)
weiblich (n)	2	3
<b>Krankheitsschweregrad</b>		
Grundkrankheiten (n)		
COPD	2	-
Diabetes mellitus	1	1
Malignes Tumorleiden	1	2
Leberzirrhose	-	-
Herzinsuffizienz	2	1
Chronisches Nierenversagen	2	-
Immunsuppression	-	-
Scores an Tag 1 (Punkte)		
APACHE II	25.0 (21/29)	22.0 (15/22)
SAPS II	47.0 (38/67)	39.0 (36/48)
ISTH-Score	4 (4/5)	4 (4/5)
Anzahl der Organversagen an Tag 1 (n)	3 (3/4)	4 (3/5)
SOFA Subscores an Tag 1 (Punkte)		
Herz-Kreislauf	3.5 (3/4)	4.0 (4/4)
Atmung	3.0 (2/3)	3.0 (2/3)
Niere	1.5 (1/3)	1.0 (1/2)
Gerinnung	1.5 (1/2)	2.0 (2/3)
Leber	1.0 (0/2)	1.0 (1/2)
ZNS	1.5 (0/4)	2.0 (0/2)
Infektionsherd (n)		
Lunge	5	2
Intraabdominal	2	1
Urogenitaltrakt	-	2
andere	1	-
Erreger (n)		
Grampositiv	3	1
Gramnegativ	3	2
Pilze	2	1
<b>Behandlung (Prozent der ITS Liegetage)</b>		
Katecholamine		
Adrenalin	0 (0/10)	0 (0/0)
Noradrenalin	68.2 (48.1/94.1)	40.0 (40.0/47.9)
Dobutamin	90.0 (75.0/100)	40.0 (30.4/73.3)
Low-dose Hydrocortison	35.0 (10/66.7)	26.1 (10.4/40.0)
Rekombinantes Protein C (aktiviert)	-	-
DVT Prophylaxe		
Niedermolekulares Heparin	46.7 (0/73.5)	87.0 (40/91.7)
Unfraktioniertes Heparin	44.1 (17.6/70) ‡	0 (0/27.3)
Breitspektrum Antibiotika	100 (100/100)	100 (86.7/100)
Nierenersatzverfahren	58.9 (37.5/100)	0 (0/8.3)
Mechanische Beatmung	95.0 (81.3/100) ‡	60 (40/72.9)
Blut Produkte (Packs / ITS Aufenthalt)		
Erythrozytenkonzentrate	7.5 (6/10)	5.0 (3/12)
Humanplasma	13 (4/24)	8 (4/10)
Thrombozytenkonzentrate	2.0 (0/3)	2.0 (2/5)
Chirurgische Interventionen (n)		
(Post)trauma	-	1
Herz-Kreislauf	1	1
Abdominal	2	3
Hct an Tag 1 ( $\Delta\%$ /24h)	-2.5 (-4/-2)	-4.0 (-5/3)
<b>Outcome</b>		
ITS Aufenthalt (Tage)	14.5 (11/28)	19.0 (12/27)
Krankenhausaufenthalt (Tage)	14.5 (11/28)	34 (15/44)
Überleben nach 90 Tagen (n)	-	5

Datenangaben in Median (1. / 3. Quartil) oder absolut; ‡ p &lt; 0.05

Individuelle demographische, mikrobiologische und klinisch relevante Aspekte des Patientenkollektives sind im Anhang dargestellt (Anhang, Tabelle 10).

#### 4.1.2. ADAMTS-13, VWF und klinisch-chemische Parameter

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 6 bis 8) werden verstorbene Patienten den Überlebenden anhand verschiedener Parameter im Tagesverlauf gegenübergestellt. Dabei werden die ADAMTS-13 Aktivität, der VWF:Ag und weitere klinisch-chemische Parameter der Patienten am Tag 1 und an den letzten vier intensivpflichtigen Tagen (*Tag x-n; x*) dargestellt.

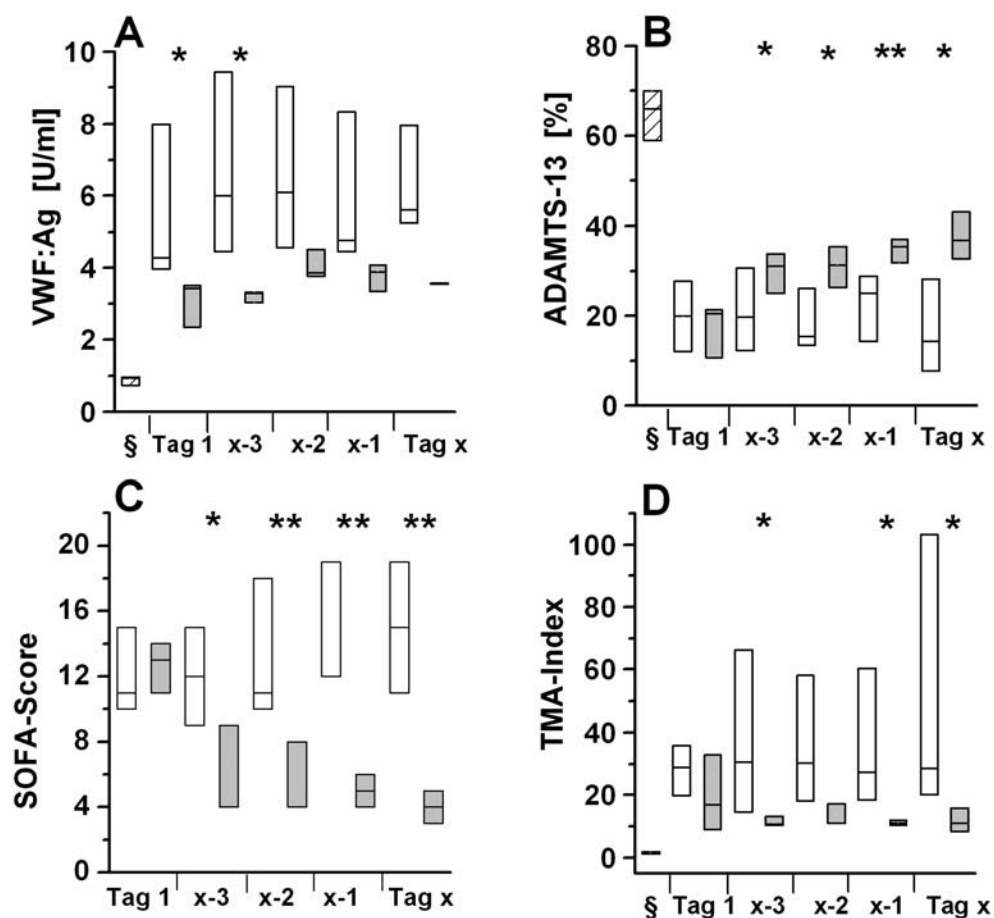


Abbildung 6: Unterschiede zwischen verstorbenen (leere Boxplots) und überlebenden (graue Boxplots) Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock bezüglich VWF:Ag (A), ADAMTS-13 Aktivität (B), SOFA-Score (C) und TMA-Index (D) (§ Referenzbereich von 13 gesunden Probanden - keine Angabe beim SOFA-Score; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Tag 1: Tag der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock; Tag x-3 bis x: Tage vor Entlassung oder Versterben).

**VWF:Ag, ADAMTS-13, SOFA-Score und TMA-Index** Die VWF:Ag Konzentration war am Tag 1, Tag x-n und Tag x signifikant im Vergleich zum

gesundem Kontrollkollektiv erhöht. Zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden ergaben sich signifikante Unterschiede am ersten und am viertletzten Studientag (Abbildung 6 **A**). Die proteolytische Aktivität der ADAMTS-13 war verglichen mit Plasmaproben gesunder Probanden an allen Tagen signifikant vermindert. Am Tag 1 der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock zeigten sich keine Unterschiede zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden sowohl in der ADAMTS-13 Aktivität als auch im SOFA-Score (**B/C**). Es bestanden jedoch signifikante Unterschiede an den letzten vier Studientagen im SOFA-Score, begleitet von signifikanten Unterschieden in der ADAMTS-13 Aktivität (**B/C**). Anhand der Verdünnung von Normalplasmapool mit Patientenplasma konnten bei allen Patienten Autoantikörper gegen ADAMTS-13 ausgeschlossen werden. Der TMA-Index als mögliches Maß für das Risiko hinsichtlich der Entwicklung einer thrombotischen Mikroangiopathie war bei allen Patienten gegenüber Plasma gesunder Probanden signifikant erhöht (**D**). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied an den letzten beiden Studientagen zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden.

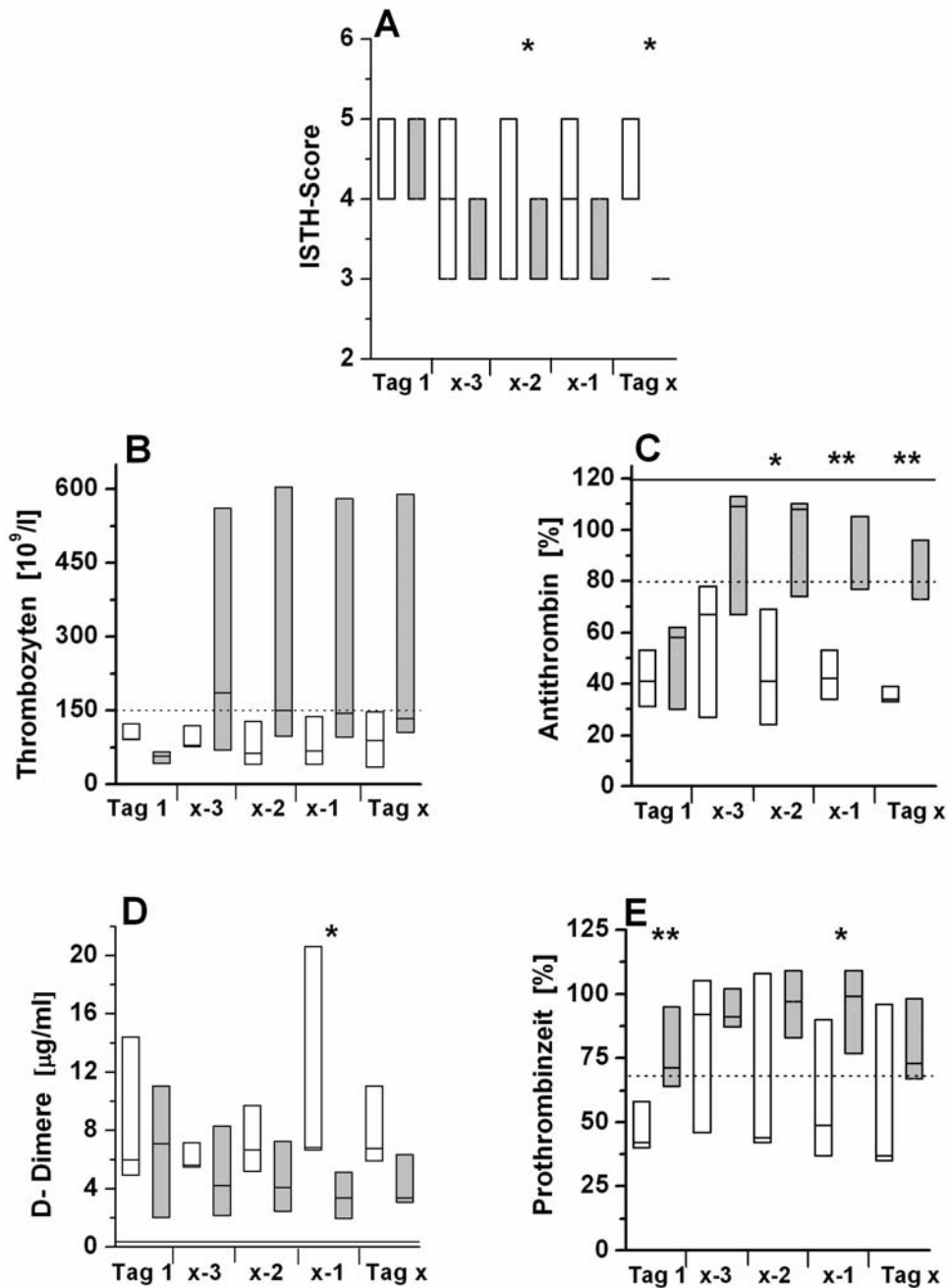


Abbildung 7: Vergleich von verstorbenen (leere Boxplots) und überlebenden (graue Boxplots) Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock bezüglich ISTH-Score (A), Thrombozyten (B), Antithrombin (C), D-Dimere (D) und Prothrombinzeit (E) (schwere DIC: ISTH-Score > 4; Unterer Normbereich: gestrichelte Linie / oberer Normbereich: durchgezogene Linie; \*p<0.05, \*\*p<0.01; Tag 1: Tag der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock; Tag x-3 bis x: Tage vor Entlassung oder Versterben).

**ISTH-Score und Antithrombin** Manche Patienten wiesen an den Beobachtungstagen einen ISTH-Score > 4 auf (schwere DIC), jedoch waren die Unterschiede zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden nicht so ausgeprägt wie die der verminderten ADAMTS-13 Aktivitäten (Abbildung 7 A). Aufgrund ausgeprägter interindividueller Schwankungen der Thrombozytenzahl waren keine Unterschiede zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden nachweisbar (B),

während die Antithrombin Aktivität an den letzten 3 Studientagen zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden signifikant unterschiedlich war (**C**). Bei allen Patienten lagen die D-Dimer Werte an den Beobachtungstagen über 2,5 µg/ml (**D**), während die Prothrombinzeit weitgehend im Normbereich lag (**E**).

**ProCT, IL-6, CRP und Albumin** ProCT (Abbildung 8 **A**) und vor allem die IL-6 Serumkonzentrationen (**B**) waren bei nicht-überlebenden Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock signifikant höher, während für das C-reaktive-Protein (CRP) keine Unterschiede bestanden (**C**). Weiterhin waren bei den Überlebenden die Albumin-Werte an den letzten vier Studientagen signifikant höher, was auf eine bessere Leberfunktion bei den Überlebenden hindeutet (**D**). Gesamt-Bilirubin und Kreatinin wiesen keine Unterschiede auf.

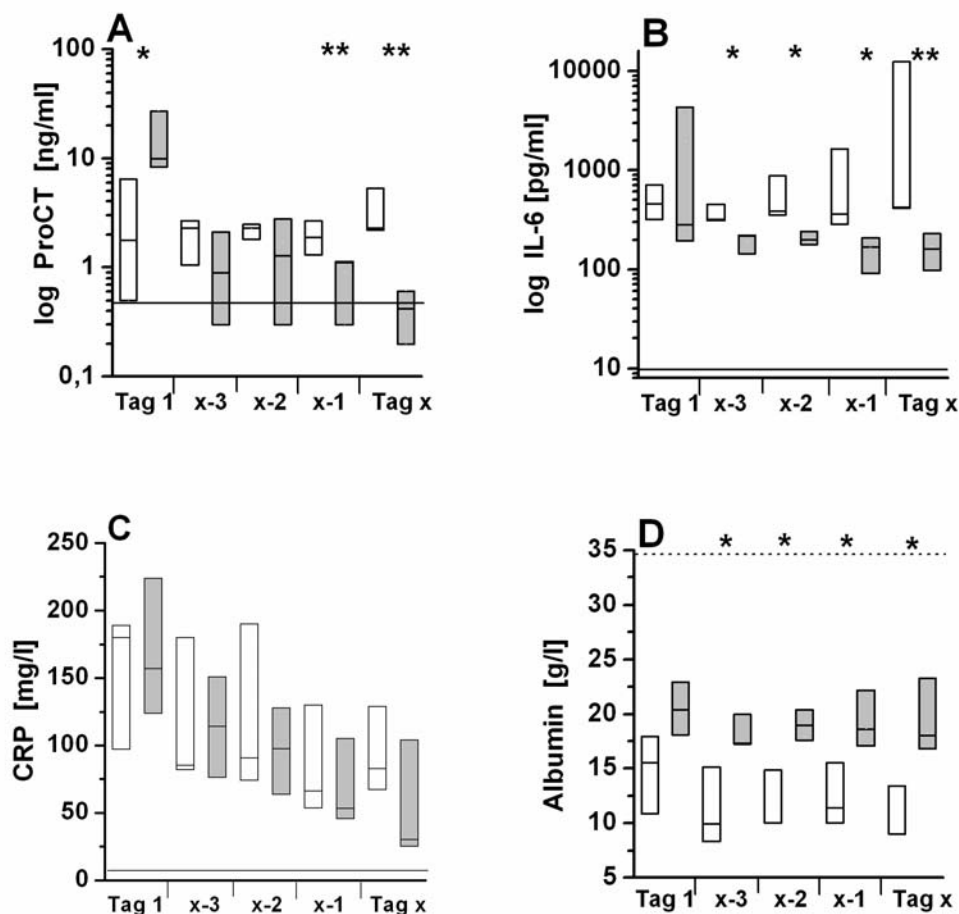


Abbildung 8: Inflammationsparameter und Albumin von verstorbenen (leere Boxplots) und überlebenden (graue Boxplots) Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Tag 1: Tag der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock; Tag x-3 bis x: Tage vor Entlassung oder Versterben; Unterer Normbereich: gestrichelte Linie / oberer Normbereich: durchgezogene Linie).

**Vergleich zwischen ADAMTS-13 und IL-6** Aufgrund einer möglichen Inhibition der ADAMTS-13 Aktivität durch erhöhte IL-6 Konzentrationen (Crawley et

al. 2005) verglichen wir die Beobachtungstage mit jeweils maximaler ADAMTS-13 Aktivität mit den entsprechenden IL-6 Konzentrationen. Wir fanden an den Beobachtungstagen mit der niedrigsten ADAMTS-13 Aktivität jeweils die am stärksten pathologisch erhöhten IL-6 Konzentrationen (Abbildung 9).

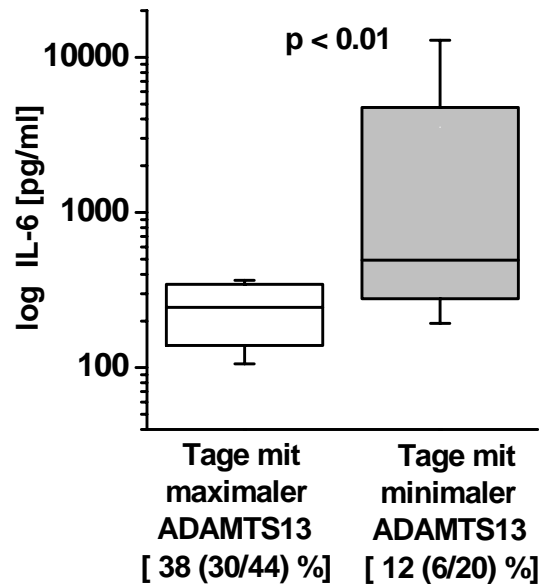


Abbildung 9: Vergleich zwischen Beobachtungstagen mit jeweils maximaler bzw. minimaler ADAMTS-13 Aktivität und assoziierten Interleukin-6 Spiegeln bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (n=11).

**VWF:CB und VWF:RCo** Die Beobachtung, dass eine verminderte ADAMTS-13 Aktivität mit einer offensichtlich höheren Letalität einhergeht, veranlasste uns, die biologische Funktion der VWF-Multimere bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock detailliert zu untersuchen. Insbesondere war von Interesse, ob sich die verminderte ADAMTS-13 Aktivität in einer veränderten VWF-Funktion widerspiegelt. Dabei zeigte sich bei alleiniger Darstellung der VWF:CB bei allen Patienten eine signifikante Erhöhung der Werte an Tag 1, Tag x-n sowie Tag x gegenüber gesunden Kontrollen. Am letzten Beobachtungstag war eine signifikante Differenz zwischen nicht-überlebenden und überlebenden Patienten nachweisbar (Abbildung 10 **A**). Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei der Bestimmung der VWF:RCo: Insgesamt waren die Werte an den oben genannten Zeitpunkten bei den Patienten signifikant erhöht. Zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden ergaben sich signifikante Unterschiede an den letzten vier Studientagen (**B**).

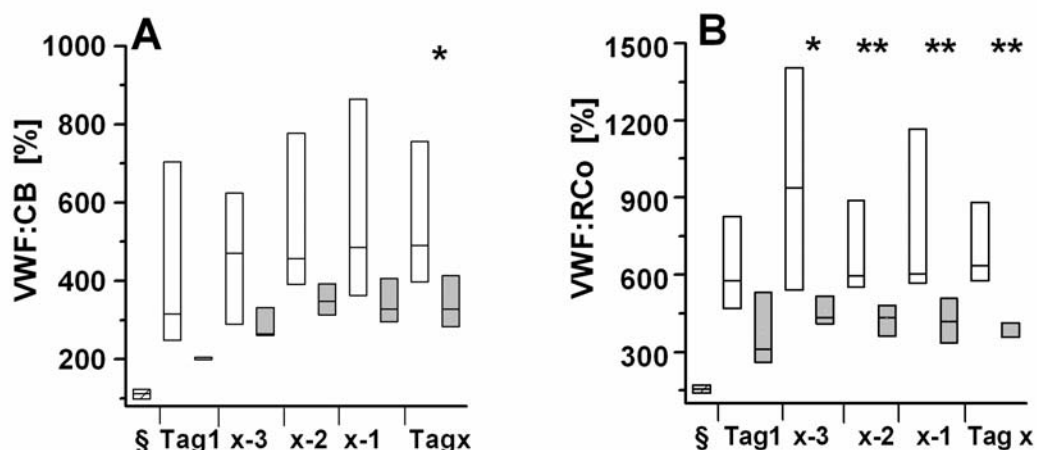


Abbildung 10: Funktionsparameter des VWF: VWF:CB (A) und VWF:RCo (B) von verstorbenen (leere Boxplots) und überlebenden (graue Boxplots) Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (§ Referenzbereich von 13 gesunden Probanden, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Tag 1: Tag der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock; Tag x-3 bis x: Tage vor Entlassung oder Versterben).

Jedoch ist zu berücksichtigen, dass bei alleiniger Darstellung der VWF:CB oder VWF:RCo ein Grossteil der Ergebnisse vom VWF:Ag Gehalt direkt beeinflusst wird. Zur Minimierung dieses Effektes wird die VWF:CB oder der VWF:RCo normalisiert, indem die Quotienten zwischen VWF:CB und VWF:Ag oder VWF:RCo und VWF:Ag berechnet werden. Beim Vergleich dieser Quotienten ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollen [VWF:CB/VWF:Ag 1,2 (1/1,5)] und Patienten [VWF:CB/VWF:Ag an Tag x: 0,93 (0,71/1,26)]. Auch die Nicht-Überlebenden und Überlebenden unterschieden sich an den Beobachtungstagen nicht [VWF:CB/VWF:Ag an Tag x: 0,98 (0,71/1,26) vs. 0,80. (0,72/1,16)].

**VWF-Multimeren-Analyse** Bei drei Patienten wurde an allen Beobachtungstagen zusätzlich eine VWF-Multimeren-Analyse durchgeführt. Anhand der gelelektrophoretischen Separation, immunochemischen Visualisierung und densitometrischen Quantifizierung wurde das Auftreten von ULVWF durch den Vergleich des Patientenplasmas mit Normalplasmapool untersucht. An Tagen mit einer ADAMTS-13 Aktivität um 20 % konnte ULVWF sowohl bei überlebenden als auch bei nicht-überlebenden Patienten nachgewiesen werden. In nachfolgenden Abbildungen 11 bis 13 werden von einem verstorbenen und zwei überlebenden Patienten einzelne ausgewählte Tage der elektrophoretischen Auftrennung der Multimere gezeigt. Anhand der Densitometrie wurde der Anteil an HMW-VWF des jeweiligen Patienten in Prozent vom HMW-VWF des Normalplasmapools berechnet, wobei der physio-

logische Anteil an HMW-VWF im Normalplasmapool als 100% definiert wurde. Weiterhin wird der individuelle Tagesverlauf des VWF:Ag Gehalts (ausgefüllte Kreise) und der ADAMTS-13 Aktivität (ungefüllte Quadrate) dargestellt.

Bei den verstorbenen Patienten (**Fallnummer 1**, Anhang, Tabelle 10) ließ sich zu Studienbeginn zum Zeitpunkt der Diagnose des septischen Schocks eine deutlich verminderte ADAMTS-13 Aktivität (um ca. 10 %) nachweisen, die im Beobachtungsverlauf alternierten, jedoch keine Tendenz zum Anstieg erkennen ließen (Abbildung 11). Nach 35 Tagen verstarb der Patient mit deutlich erniedrigten ADAMTS-13 Werten um 5%. Der alternierende Verlauf der ADAMTS-13 Aktivität wurde durch die Gabe von Humanplasma („Fresh frozen plasma“, FFP), welches routinemäßig aufgrund eines Mangel an plasmatischen Gerinnungsfaktoren oder einer Blutungsneigung appliziert wurde, hervorgerufen. Der Zeitpunkt und die Anzahl an verabreichten Einheiten sind durch Pfeile angedeutet. Durch die Multimerenanalyse konnten zu Studienbeginn (Tag 2, 3, 4) und an den letzten Tagen (Tag 32, 33, 34) ULVWF-Multimere nachgewiesen werden. Die Präsenz der ULVWF-Multimere ist durch einen Rahmen gekennzeichnet und mit einer deutlich verminderten ADAMTS-13 Aktivität assoziiert.



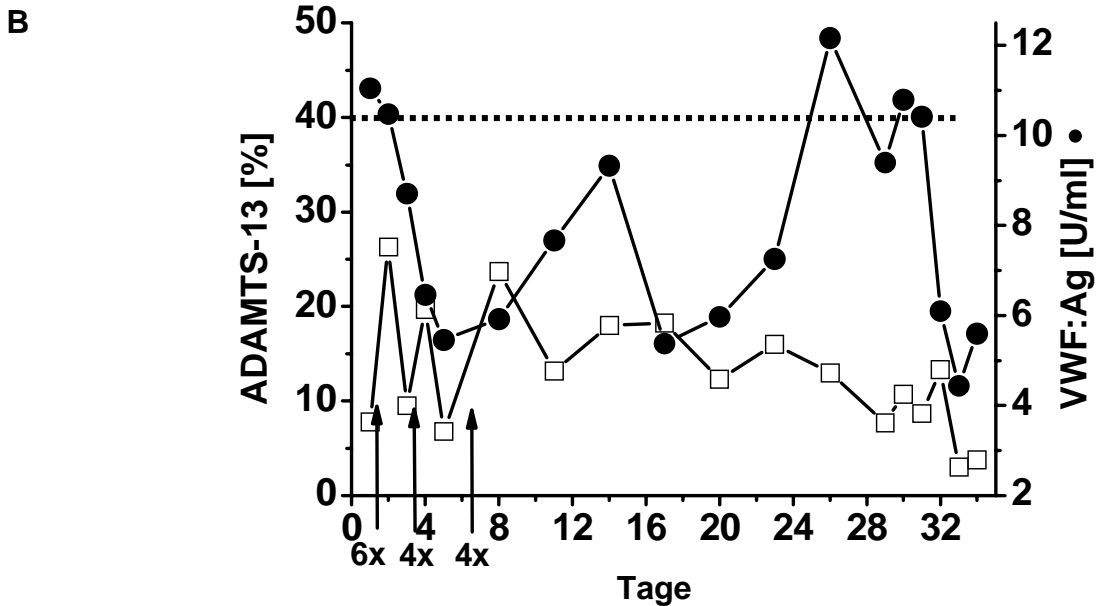
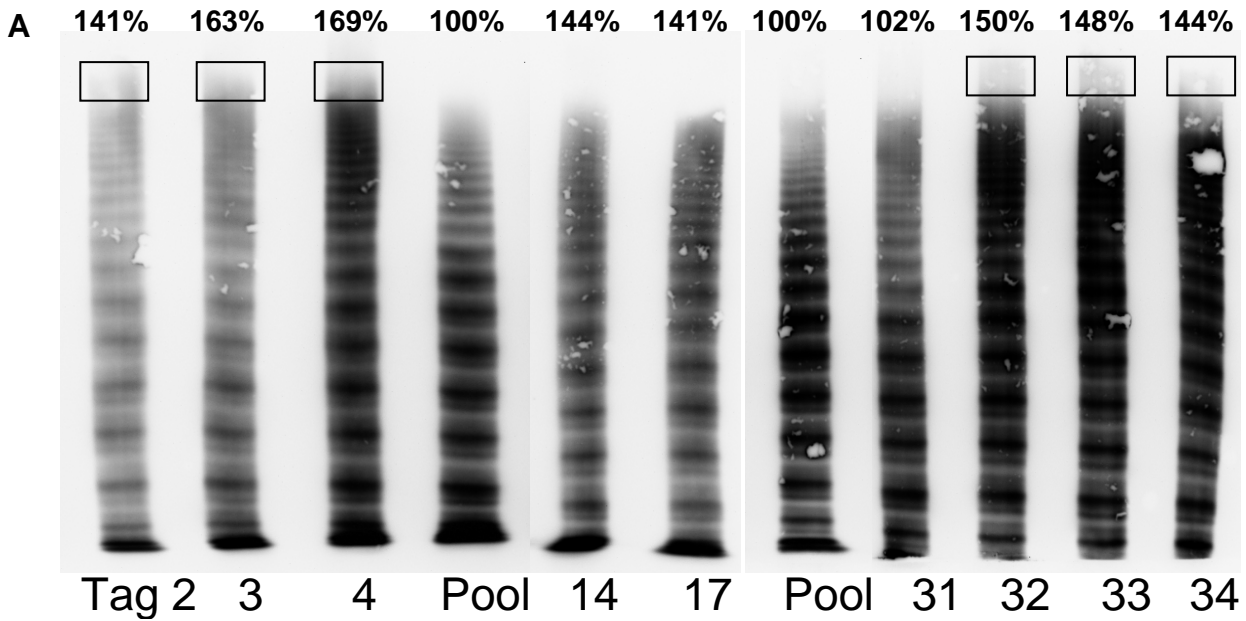


Abbildung 11: VWF-Multimeren-Analyse (1,2 % Agarose) (A) und individueller Tagesverlauf von ADAMTS-13 (leere Quadrate) und VWF:Ag (schwarze Punkte) (B) bei einem verstorbenen Patient (Fallnummer 1). Dargestellt werden hier und in den zwei folgenden Abbildungen ausgewählte Patiententage. Der Gehalt an HMW-VWF der Patienten wird mit dem HMW-VWF-Anteil des Normalplasmapools (Pool) verglichen, indem letzterer Anteil als 100 % definiert wird. Bei densitometrischem Nachweis von ULVWF ist der jeweilige Anteil an ULVWF mit einem Kasten umrahmt. Die Pfeile kennzeichnen Zeitpunkt und Menge des verabreichten Humanplasmas. Der untere Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität wurde als 40 % (gestrichelte Linie) und der obere Normbereich der VWF:Ag Konzentration als 1,5 U/ml angenommen.

Im Gegensatz dazu findet sich einem überlebenden Patienten (**Fallnummer 8**, Anhang, Tabelle 10) - ausgehend von einer ADAMTS-13 Aktivität von ca. 20 % - ein steter Anstieg auf eine nicht pathologisch Aktivität am Verlegungstag von über 40 % (Abbildung 12). Die an Tag eins bis vier nachweisbaren ULVWF-Multimere sind parallel zu der ansteigenden ADAMTS-13-Aktivität am Tag der Verlegung nicht mehr nachweisbar. Der Patient wurde an Tag 11 auf eine Normalstation verlegt.

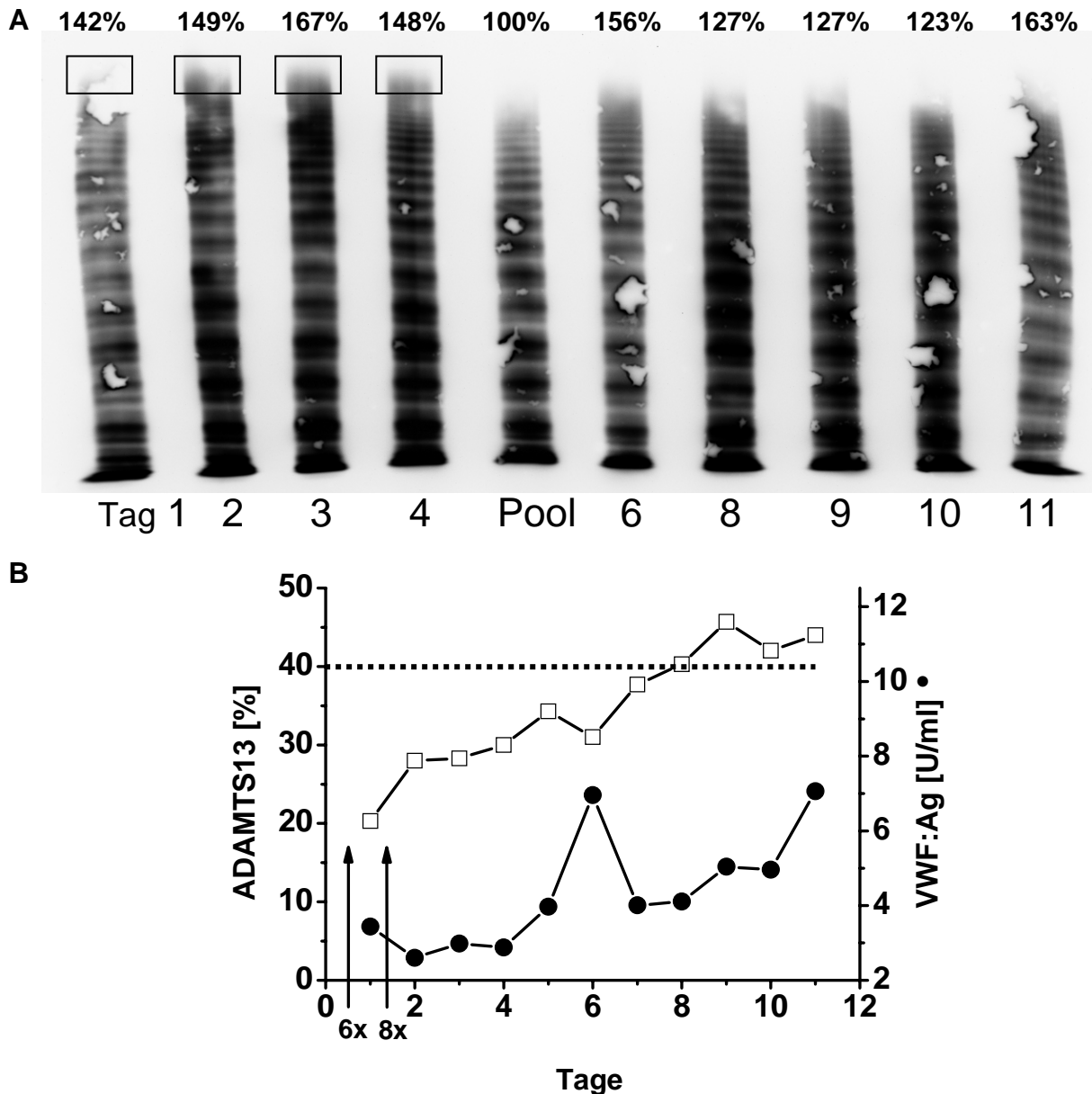


Abbildung 12: VWF-Multimeranalyse (1,2 % Agarose) (A) und individueller Tagesverlauf von ADAMTS-13 (leere Quadrate) und VWF:Ag (schwarze Punkte) (B) bei einem überlebenden Patienten (Fallnummer 8). Der Gehalt an HMW-VWF der Patienten wird mit dem HMW-VWF-Anteil des Normalplasmapools (Pool) verglichen, indem letzterer Anteil als 100 % definiert wird. Bei densitometrischem Nachweis von ULVWF ist der jeweilige Anteil an ULVWF mit einem Kasten umrahmt. Die Pfeile kennzeichnen Zeitpunkt und Menge des verabreichten Humanplasmas. Der untere Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität wurde als

---

40 % (gestrichelte Linie) und der obere Normbereich der VWF:Ag Konzentration als 1,5 U/ml angenommen.

Ein weiterer überlebender Patient (**Fallnummer 11**, Tabelle 10) zeigte bis zum Tag 20 durchgehend niedrige Aktivitäten von ca. 10 %, die nach intra- und post-operativer FFP Applikation auf Werte um 30 % ansteigen (Abbildung 13). Diese bleiben im weiteren Tagesverlauf erhöht, fallen jedoch am letzten Tag noch einmal auf 15 %. Auch bei diesem Überlebenden ließen sich lediglich zu Beobachtungsbeginn bei niedriger ADAMTS-13 Aktivität, also bis zum Tag 20, ULVWF-Multimere nachweisen, die dann im weiteren Tagesverlauf bis zur Verlegung nicht mehr nachweisbar waren.

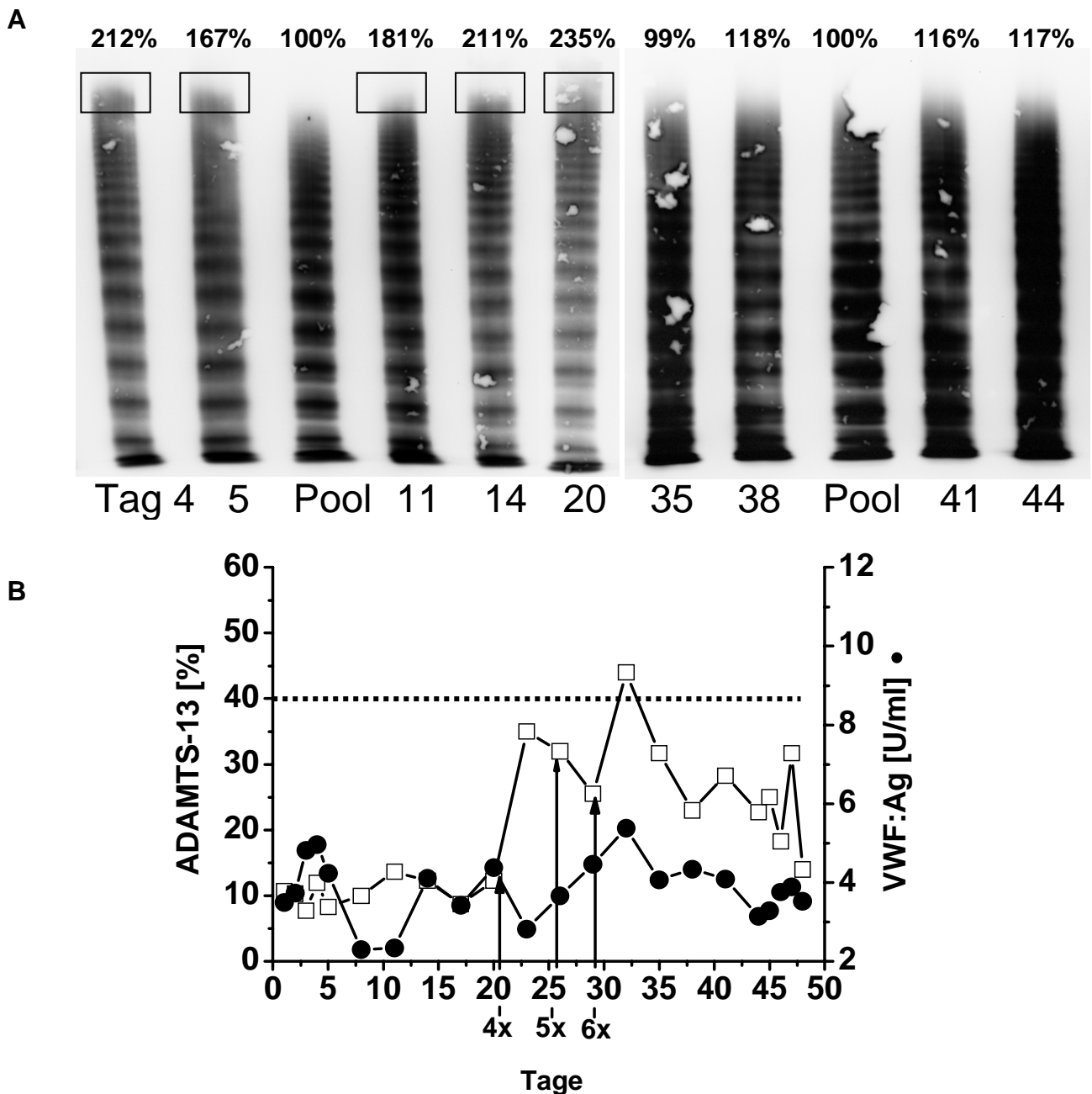


Abbildung 13: VWF-Multimerenanalyse (1,2 % Agarose) (A) und individueller Tagesverlauf von ADAMTS-13 (leere Quadrate) und VWF:Ag (schwarze Punkte) (B) bei einem überlebenden Patient (Fallnummer 11). Der Gehalt an HMW-VWF der Patienten wird mit dem HMW-VWF-Anteil des Normalplasmapools (Pool) verglichen, indem letzterer Anteil als 100 % definiert wird. Bei densitometrischem Nachweis von ULVWF ist der jeweilige Anteil an ULVWF mit einem Kasten umrahmt. Die Pfeile kennzeichnen Zeitpunkt und Menge des verabreichten Humanplasmas. Der untere Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität wurde als 40 % (gestrichelte Linie) und der obere Normbereich der VWF:Ag Konzentration als 1,5 U/ml angenommen.

Bei Betrachtung der Tage mit ULVWF-Nachweis gegenüber Tagen ohne ULVWF finden wir einen signifikanten Unterschied in der ADAMTS-13 Aktivität (Abbildung 14 A). In gleicher Weise finden wir einen Unterschied an diesen Tagen

sowohl im D-Dimer Level (**B**) als auch im TMA-Index (37,7 (17,1/62,9) vs. 17,5 (11,8/36,2),  $p < 0,05$ ).

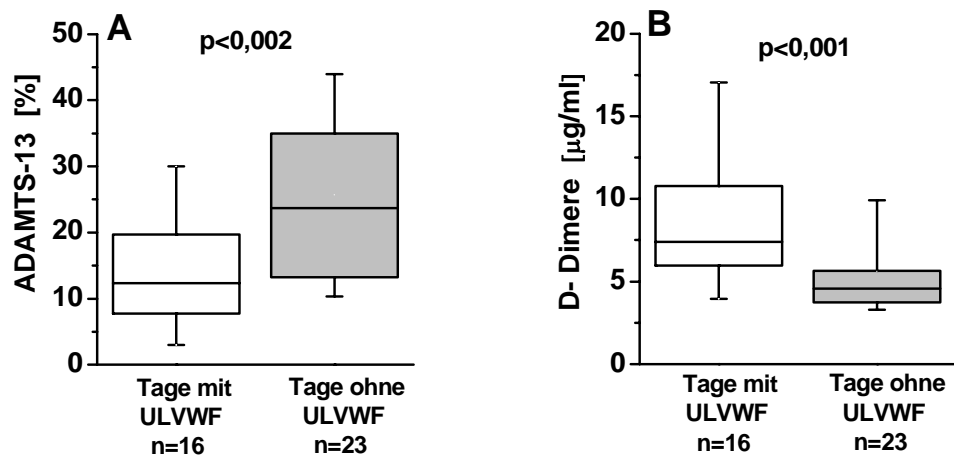


Abbildung 14: Vergleich der ADAMTS-13 Aktivität (A) und der D-Dimere (B) an Tagen mit und ohne ULVWF-Nachweis bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (n=11).

## **4.2. Patienten mit SIRS nach Herzoperation mit CPB**

### **4.2.1. Klinische Charakterisierung**

Bei dieser Patientengruppe (n=22) war die überwiegend zugrunde liegende Ursache für einen herzchirurgischen Eingriff eine koronare Herzerkrankung. Die operative Therapie erfolgte durch Anlage eines aortokoronaren Venenbypasses (ACVB) und/oder linken Mammaria interna Bypasses (LIMA) unter intraoperativer Verwendung des kardiopulmonalen Bypass (CPB). Zusätzlich wurde die Herzfunktion bei acht dieser Patienten per Implantation einer intraaortalen Ballonpumpe (IABP) unterstützt. Bei acht Patienten wurde eine Operation an der Herzklappe durchgeführt. Aufgrund von negativ geladenen Oberflächenstrukturen kann als Komplikation des CPB die Gerinnungskaskade aktiviert sowie über neutrophile Granulozyten die Freisetzung von Entzündungsmediatoren stimuliert werden. Im unmittelbaren postoperativen Tagesverlauf über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen erfüllten im mittleren Durchschnitt  $84 \pm 8 \%$  der Patienten mindestens zwei der vier SIRS Kriterien.

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten mit SIRS nach herzchirurgischem Eingriff unter Verwendung des kardiopulmonalen Bypass (CPB; n=22). Die Definition der akuten Organdysfunktion erfolgte anhand der Kriterien der deutschen Sepsisgesellschaft (Anhang, Tabelle 9). Der Euro-Score stellt ein einfaches und objektives Verfahren dar, um die postoperative Frühmortalität bei herzchirurgischen Patienten abzuschätzen (European System for Cardiac Operative Risk Evaluation, Nashef et al. 1999 Anhang, Tabelle 12). LIMA linker Mammaria interna Bypass.

Alter (Jahre)	70 (60/75)
weiblich (n)	6
Komorbidität (n)	
COPD	3
Diabetes mellitus II	11
Chronisches Nierenversagen	4
EURO-Score (Punkte)	9 (6/11)
Ejektionsfraktion (%)	45 (30/65)
<b>Chirurgische Interventionen</b>	
Aortokoronarer Venenbypass (ACVB) (n)	18
Notfälle	4
Intraaortale Ballonpumpe	8
Zusätzlicher LIMA Bypass	11
Zusätzliche Herzklappenoperation	5
Zusätzliche Herzwandaneurysmaoperation	2
Anzahl der Gefäßstransplantate	3(2/4)
Klappenoperation (n)	3
Linksherz-Unterstützungssystem (n)	1
OP Zeit (min)	242 (210/291)
Bypasszeit (min)	135 (112/156)
Klemmzeit (min)	66 (41/88)
Reperusionszeit (min)	38 (32/60)
Hämatokrit von präoperativ zu Tag 1 ( $\Delta\%$ /24h)	-0.14 (-0.16/-0.12)
<b>Postoperativer Tag 1</b>	
Scores (Punkte)	
APACHE II	24 ( 20/29)
SAPS II	32 (26/49)
ISTH-Score	2 (2/2)
SOFA-Subscores	
Herz-Kreislauf	4 (3/4)
Atmung	1 (1/2)
Niere	1 (1/2)
Gerinnung	0 (0/1)
Leber	0 (0/1)
ZNS	4 (4/4)
Multiorgan dysfunktion (n)	20
Individuell erfüllte Kriterien (n)	
Metabolische Azidose	14
Renale Dysfunktion	3
Arterielle Hypoxämie	5
Arterielle Hypotension	10
Thrombozytopenie	10
<b>Postoperativer Tag 2 bis 5</b>	
Patienten mit septischem Schock (n)	2
Patienten mit Multiorganversagen (n)	2
Grampositiver Infektionsherd in der Lunge (n)	2
<b>Behandlung</b>	
Blut Produkte (Packs / 5 postoperative Tage)	
Erythrozytenkonzentrate	63
Humanplasma	55
Thrombozytenkonzentrate	26
<b>Outcome</b>	
ITS Aufenthalt (Tage)	9 (6/12)
Krankenhausaufenthalt (Tage)	18 (12/23)
Überleben nach 90 Tagen (n)	18

Datenangaben in Median (1. / 3. Quartil)

Individuelle demographische und klinisch relevante Aspekte dieser 22 Patienten sind im Anhang dargestellt (Anhang, Tabelle 11).

#### 4.2.2. ADAMTS-13, VWF und klinisch-chemische Parameter

In den folgenden Abbildungen werden die ADAMTS-13 Aktivität, der VWF:Ag und weitere klinisch-chemische Parameter der Patienten an fünf postoperativen Tagen dargestellt (Tag 1 bis 5, Abbildung 15 bis 16).

##### VWF:Ag, ADAMTS-13, TMA-Index und SOFA-Score

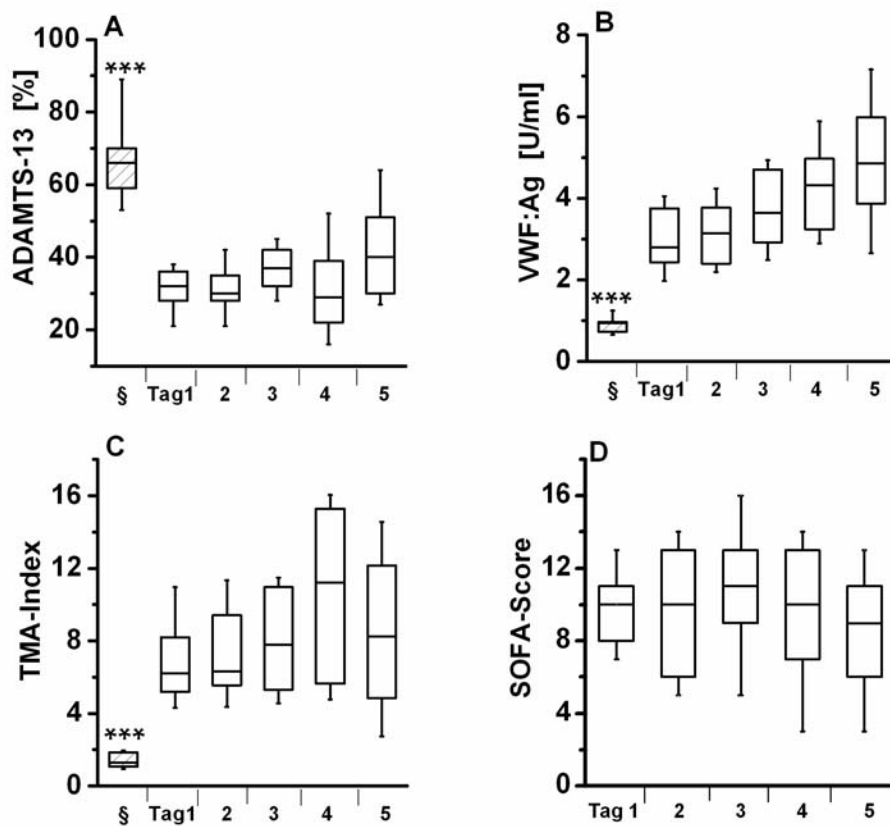


Abbildung 15: Postoperativer Verlauf über fünf Tage bei Patienten mit SIRS nach CPB (n=22): ADAMTS-13 Aktivität (A), VWF:Ag (B), TMA-Index (C) und SOFA-Score (D) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (§) - keine Angabe des SOFA-Scores bei gesunden Kontrollen. Signifikante Unterschiede traten bei diesen Parametern an allen 5 postoperativen Tagen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Die ADAMTS-13 Aktivität ist bereits am ersten postoperativen Tag signifikant gegenüber gesunden Kontrollen vermindert. Am fünften postoperativen Tag kommt es zu einem moderaten Anstieg sowie zur Zunahme der Amplitude der ADAMTS-13 Aktivität, nachdem die Aktivität zuvor im Median regelhaft unter 40% lag (Abbildung 15 A). Die VWF:Ag Konzentration steigt innerhalb der ersten fünf postoperativen



Tage als Ausdruck einer verzögerten Akutphase-Reaktion kontinuierlich an **(B)**, wodurch der TMA-Index am Tag vier das Maximum erreicht und anschließend abfällt **(C)**. Der SOFA-Score erreicht ein Maximum an Tag drei **(D)**.

**ISTH-Score, Antithrombin, ProCT, CRP, IL-6 und Albumin** Zur weiteren Charakterisierung der Patienten sind in (Abbildung 16) hämostaseologische und inflammatorische Parameter dargestellt. Im Gegensatz zu den Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock lag der ISTH-Score im Median bei 3 Punkten **(A)**. Somit lag bei den Patienten mit SIRS nach CPB keine schwere DIC vor, jedoch war die Anzahl der Thrombozyten erniedrigt **(B)**. Die D-Dimer Werte lagen über den gesamten Zeitraum deutlich über 2,5 µg/ml **(C)**, während die Prothrombinzeit unverändert im Normalbereich lag **(D)**. Der ProCT Wert erreichte durchschnittlich stark erhöhte Werte um ca. 60 ng/ml, die im Tagesverlauf tendenziell abfielen **(E)**. Die medianen Interleukin-6 Werte schwankten zwischen 200 und 400 pg/ml **(F)**. Der CRP Spiegel verdoppelte sich von Tag 1 zu Tag 2. **(G)**. Die Kreatinin Werte lagen überwiegend im pathologischen Bereich **(H)**. Das Gesamt-Bilirubin war mit Ausnahme von 2 Patienten (Fallnummer 2 und 6) überwiegend im Normbereich. Antithrombin, Fibrinogen und Albumin wurde bei diesen Patienten nicht bestimmt.

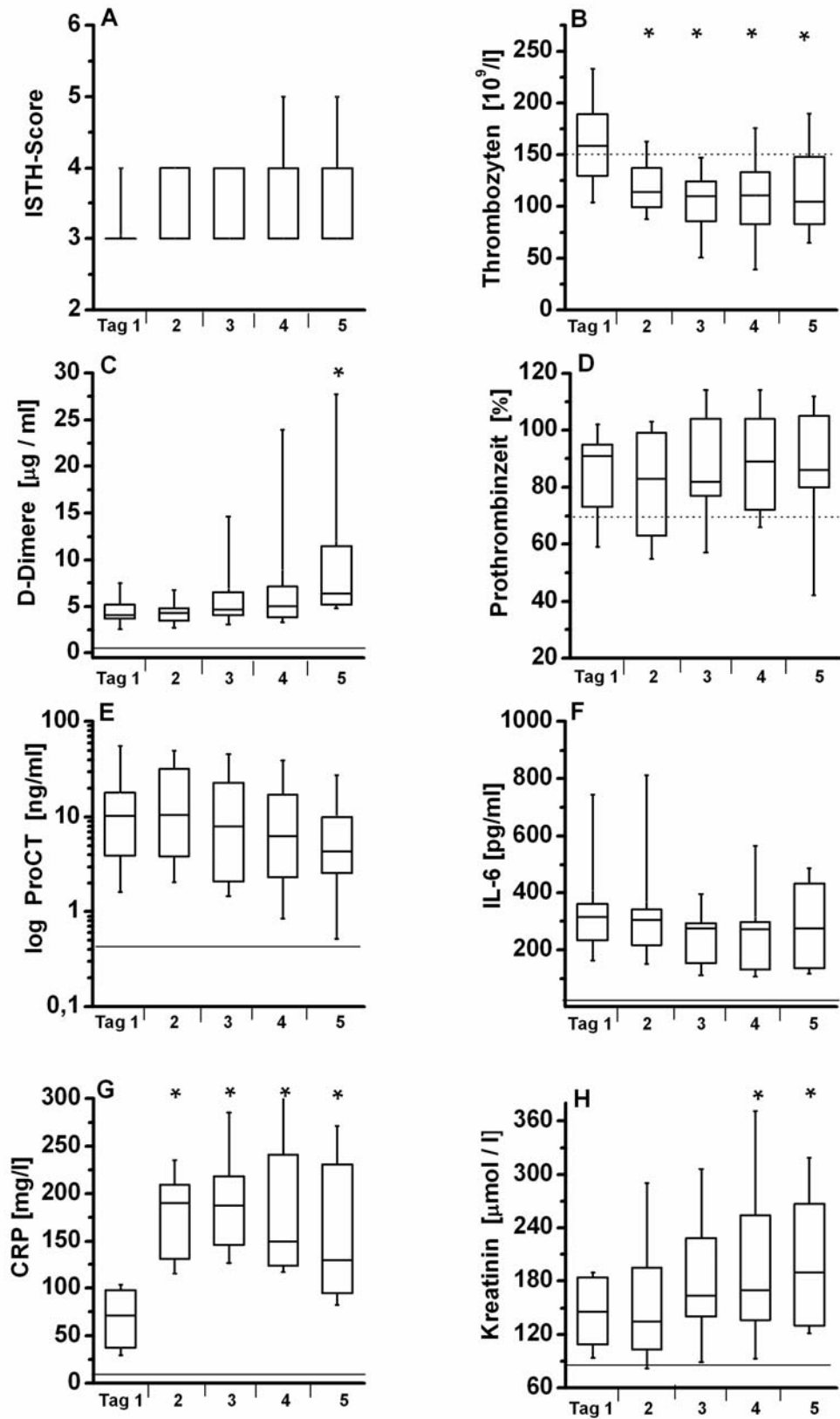


Abbildung 16: Hämostaseologische und inflammatorische Parameter bei Patienten mit SIRS nach CPB (n=22; schwere DIC: ISTH-Score > 4; Unterer Normbereich: gestrichelte Linie / oberer Normbereich: durchgezogene Linie; \* p<0.05 zu Tag 1, ANOVA).

**Organversagen, SIRS und ADAMTS-13 Aktivität** Das Ausmass des Organversagens und SIRS wurde anhand von SOFA-Score, ProCT-Werten und Interleukin-6 analysiert und mit den Werten der ADAMTS-13 Aktivität, dem TMA-Index und der Thrombozytenanzahl assoziiert.

Betrachtet man Patiententage mit maximalem SOFA-Score [12 (11/14) Punkte], sowie mit minimalem SOFA-Score [9 (5/10) Punkte] und der assoziierten ADAMTS-13 Aktivität, stellt man einen signifikanten Unterschied in der ADAMTS-13 Aktivität fest (Abbildung 17 **A**), jedoch nicht beim TMA-Index [8,5 (6,1/11,0) vs. 7,3 (5,3/8,8)], der Thrombozytenanzahl [105 (89/162) vs. 120 (107/159)  $10^9/l$ ] und ProCT [8,8 (3,7/23) vs. 4,8 (3,4/12) ng/ml].

Betrachtet man in gleicher Weise die Tage mit maximalen ProCT Werten [11,3 (4,8/32,1) vs. 4,2 (2,1/8,3) ng/ml], so stellt man wiederum lediglich bei der ADAMTS-13 Aktivität einen signifikanten Unterschied fest (**B**), hingegen keinen bei der Thrombozytenzahl [130 (90/162) vs. 115 (92/148)  $10^9/l$ ], dem SOFA-Score [11 (9/13) vs. 10 (6/11) Punkte] und TMA-Index [7,8 (5,6/11,0) vs. 7,3 (5,3/12,0)].

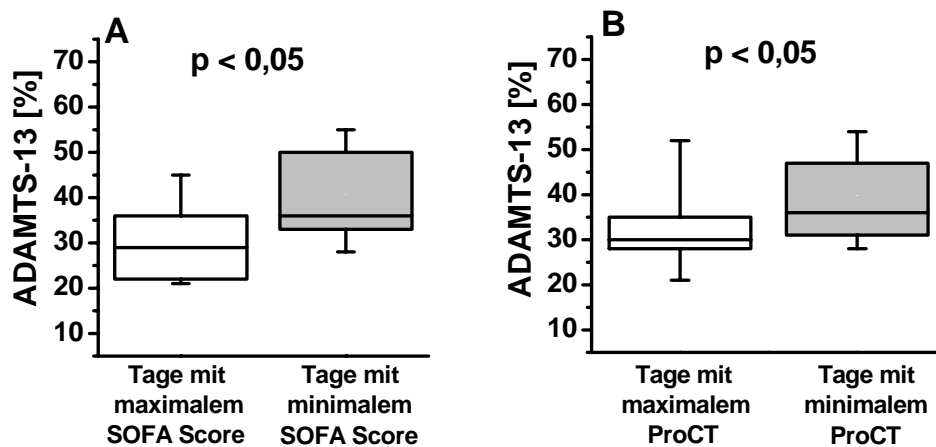


Abbildung 17: (A) ADAMTS-13 Aktivität bei Patienten mit SIRS nach CPB an Tagen mit maximalem SOFA-Score im Vergleich zu Tagen mit minimalem SOFA-Score (n=21); (B) analoge Darstellung der ADAMTS-13 Aktivität an Tagen mit maximalen und minimalen ProCT Werten.

An Tagen mit maximalen Interleukin-6 Spiegeln [376 (305/764) pg/ml] ist im Gegensatz zu den Tagen mit minimalen Interleukin-6 Spiegeln [238 (128/277) pg/ml] die assoziierte ADAMTS-13 Aktivitäten tendenziell niedriger [30 (28/37) vs. 37 (28/47) %]. Der TMA-Index [7,0 (4,7/9,0) vs. 6,7 (4,6/8,9)], die Thrombozytenzahl [123 (95/165) vs. 122 (83/148)  $10^9/l$ ] sowie der SOFA-Score [11(10/13) vs. 10 (5/12)] unterschieden sich nicht an diesen Tagen.

Bei Aufarbeitung der hämodynamischen Parameter, wie Katecholaminapplikation, Pulmonalarterienverschlussdruck (Wedge-Druck), zentralvenöser Druck, mittlerer arterieller Blutdruck, Cardiac Index, totaler systemischer Gefäßwiderstand und Lungengefäßwiderstand ergeben sich keine Zusammenhänge mit inflammatorischen sowie hämostaseologischen Parametern.

Bei der Auswertung der Thrombozytenzahlen wurden alle Tage mit dem maximalen und minimalen Thrombozytenwert innerhalb des Beobachtungszeitraums und der assoziierten ADAMTS-13 Aktivität untersucht, wobei lediglich Tage einbezogen wurden, an denen am Vortag weder FFP noch Thrombozytenkonzentrate appliziert wurden (n=12). Dabei traten sowohl bei der ADAMTS-13 Aktivität, dem TMA-Index, dem SOFA-Score als auch bei den ProCT-Werten keine signifikanten Unterschiede auf. (ADAMTS-13 [34 (28/37) vs. 32 (29/42) %]; TMA-Index [6,6 (5,2/8,2) vs. 8,0 (5,6/13,3)]; SOFA-Score [10 (9/12) vs. 10 (9/12) Punkte]; ProCT [10,3 (4,4/15,7) vs. 6,4 (2,1/10,4) ng/ml]).

Betrachtet man jedoch die relative Veränderung der Thrombozytenzahl innerhalb von 24 Stunden, findet man bei einem Thrombozytenabfall > 30 % zum Folgetag am Vortag eine signifikant niedrigere ADAMTS-13 Aktivität im Vergleich zu Tagen mit einem Anstieg der Thrombozytenzahl am Folgetag (Abbildung 18 **A**). Dieser Unterschied zeigt sich ebenfalls beim TMA-Index mit einem signifikant erhöhten TMA-Index an Tagen mit einem Thrombozytenabfall > 30 % zum Folgetag (**B**).

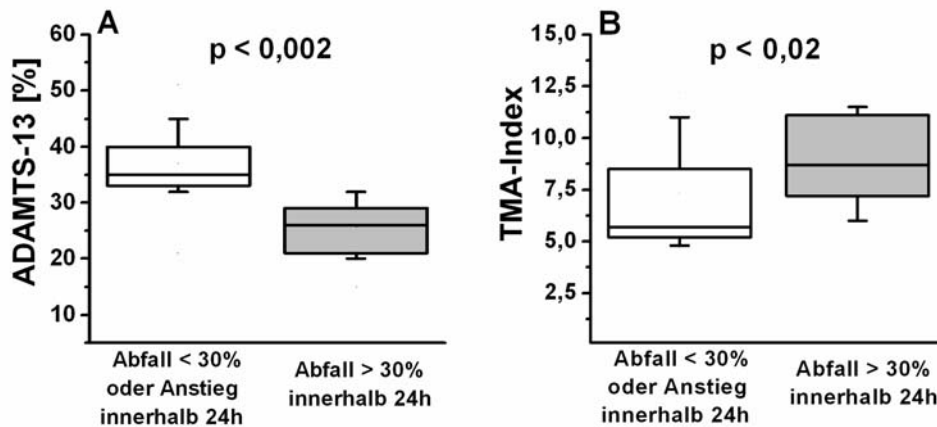


Abbildung 18: (A) ADAMTS-13 Aktivität bei 12 Patienten mit SIRS nach CPB in Abhängigkeit eines Anstiegs der Thrombozytenzahl oder Abfalls < 30 % vs. Thrombozytenabfalls > 30 % innerhalb von 24 Stunden; (B) TMA-Index an analogen Tagen.

**VWF:CB und VWF:RCo** Aufgrund der erniedrigten ADAMTS-13 Aktivität bei Patienten nach herzchirurgischem Eingriff unter Verwendung der Herz-Lungenmaschine haben wir die Auswirkungen auf die Spaltung des VWF untersucht, indem wir die VWF:CB und der VWF:RCo gemessen haben. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte VWF:CB (Abbildung 19 **A**), sowie VWF:RCo Aktivität (**B**) des VWF im Vergleich zu gesunden Probanden.

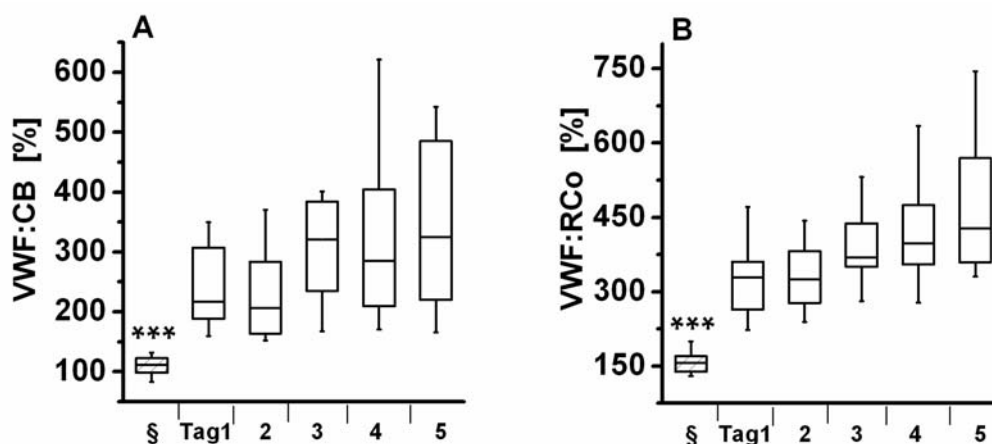


Abbildung 19: Darstellung der VWF:CB und VWF:RCo bei Patienten mit SIRS nach CPB über fünf postoperative Tage (n=22) und gesunden Kontrollen (§; n=13). Signifikante Unterschiede traten bei diesen Parametern, welche die Affinität des VWF zu Kollagen bzw. Thrombozyten widerspiegeln, an allen 5 postoperativen Tagen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (\*\*\*) p < 0,001).

**VWF-Multimeren-Analyse** Unter Berücksichtigung der VWF-Gesamtkonzentration durch Bildung des Verhältnisses aus VWF:CB/VWF:Ag und VWF:RCo/VWF:Ag unterschieden sich die Werte nicht von den Kontrollen [Tag 1:

1.1 (0.8/1.5) und 1.1 (0.9/1.3)]. Daher haben wir bei vier Patienten, die an mindestens einem postoperativen Tag eine ADAMTS-13 Aktivität unter 20% aufwiesen, die VWF-Multimere untersucht (Fallnummer 2, 5, 9, 16). Dabei finden wir bei drei Patienten an mindestens drei Tagen ULVWF-Multimere (Fallnummer 5, 9, 16).

Beispielhaft haben wir eine 73 jährige Patientin mit akutem anterolateralem Myokardinfarkt aufgeführt, bei der angiographisch eine koronare Dreifäß-erkrankung nachgewiesen wurde (**Fallnummer 9**). Nach erfolgloser perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) wurde unter Notfallbedingungen ein aorto-koronarer Venenbypass angelegt und eine intraaortale Ballonpumpe implantiert. Anhand der densitometrischen Auswertung wurden ULVWF-Multimere nachgewiesen und der Anteil an HMW-VWF dieser Patientin in Prozent vom HMW-VWF des Normalplasmapools berechnet, wobei der physiologische Anteil an HMW-VWF im Pool als 100% definiert wurde (Abbildung 20).

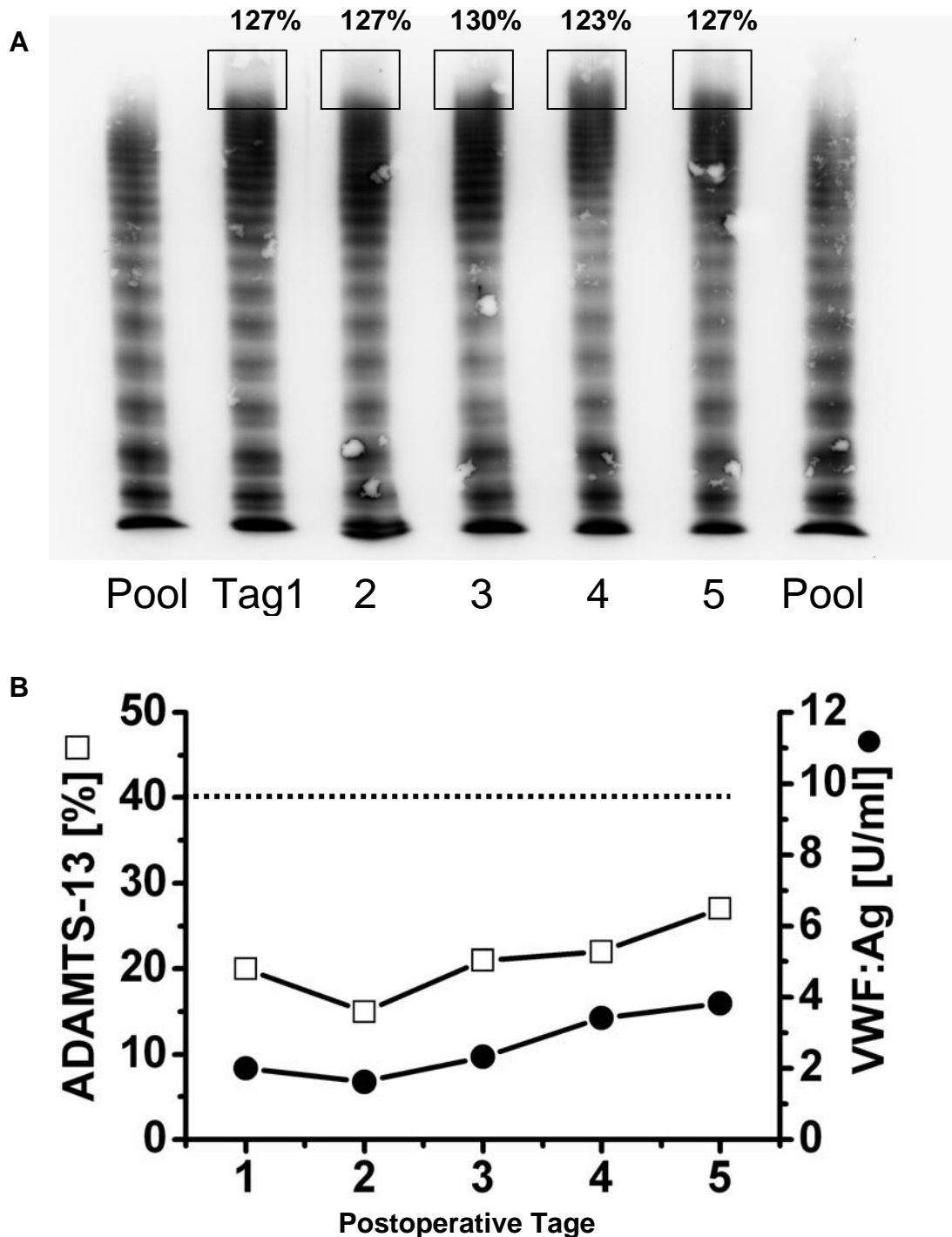


Abbildung 20: VWF-Multimeranalyse (1,2 % Agarose) (A) und individueller Tagesverlauf von ADAMTS-13 (leere Quadrate) und VWF:Ag (schwarze Punkte) (B) bei einer Patientin nach operativer Revaskularisation bei Zustand nach Myokardinfarkt (Fallnummer 9). Dargestellt sind fünf post-operative Patiententage. Der Gehalt an HMW-VWF der Patienten wurde mit dem HMW-VWF-Anteil des Normalplasmapools (Pool) verglichen, indem letzterer Anteil als 100 % definiert wurde. Bei densitometrischem Nachweis von ULVWF wurde in der Abbildung der jeweilige Anteil an ULVWF von einem Kasten umrahmt. Der untere Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität wurde als 40 % (gestrichelte Linie) und der obere Normbereich der VWF:Ag Konzentration als 1,5 U/ml angenommen.

## 5. Diskussion

Eine endotheliale Dysfunktion, verursacht durch die unkontrollierte Freisetzung von Entzündungs- und Gerinnungsmediatoren, wird gemeinsam mit der DIC als eine der wesentlichen Ursachen für das (Multi)organversagen bei Sepsis angesehen (Gando 2001). Sowohl durch die Endothelläsion als auch durch die systemische Entzündungsreaktion kommt es zur massiven Freisetzung von VWF (Kayal et al. 1998). Für das Ausmaß der thrombogenen Wirkung des VWF ist seine Affinität zu Kollagen und zu Thrombozyten entscheidend (Sadler 2002a). Daher stellt sich die Frage, ob es neben der Konzentrationserhöhung des VWF auch zu einer Veränderung der thrombophilen Eigenschaften beispielsweise verursacht durch eine veränderte ADAMTS-13 Aktivität bei Patienten mit systemischen Entzündungsreaktionen kommt. Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock und Patienten mit SIRS nach CPB zeigten jeweils unterschiedliche Schweregrade der systemischen Entzündungsreaktion, ersichtlich an den unterschiedlichen SOFA-Scores und den Plasmakonzentrationen inflammations-assoziiierter Marker. Entsprechend einer gesteigerten generalisierten Entzündung zeigte sich bei den Patienten eine unterschiedlich stark erniedrigte ADAMTS-13 Aktivität bei gleichzeitig bis zu zehnfach erhöhtem VWF:Ag und veränderter VWF-Funktionalität.

### 5.1. ADAMTS-13: Stand der Forschung

Aufgrund der Heterogenität der einzelnen ADAMTS-13 Bestimmungsmethoden ist für den Normbereich der ADAMTS-13 Aktivität bisher keine allgemein akzeptierte Grenze definiert. Die Angabe des Normbereichs schwankt zwischen den einzelnen Methoden erheblich (Tarr et al. 2002). Bei dem von uns angewandten Assay liegt der Normbereich basierend auf der Messung von 177 gesunden Kontrollen zwischen 40 % und 170 % (Mannucci et al. 2001). In der Regel wird dieser Assay angewendet, um anhand eines Cut-Offs von 40% eine milde Form der TMA zu definieren. In Kenntnis der Vielzahl unterschiedlicher Assays wird deutlich, dass es ein zukünftiges Ziel sein muss, einen klinisch anwendbaren und standardisierten Assay zu etablieren.

In Zusammenarbeit mit dem Referenzlabor von Prof. Budde in Hamburg wurde zur Validierung unseres ADAMTS-13 Assays ein Blindversuch mit drei



Plasmaproben durchgeführt. Dabei lag die Interassayvarianz bei 25 % und bei der internen sechsmaligen Messung von gleichen Proben bei 16 %. Für die Validität der Methode spricht, dass wir an Tagen mit verminderter ADAMTS-13 Aktivität (< 30 %) ULVWF-Multimere mittels Gelelektrophorese nachwiesen. Die Gabe von FFP korrespondierte mit einem jeweils deutlichen Anstieg der ADAMTS-13 Aktivität bei gleichzeitiger Verminderung bis zum vollständigen Verschwinden der ULVWF-Multimere.

Neben einer TMA wurden bisher die in der Tabelle 8 zusammengefassten Krankheiten bezüglich der ADAMTS-13 Aktivität und des VWF:Ag Gehalts untersucht. Die Werte sind in Form des TMA-Index ausgedrückt und auf Basis der in der Publikation angegebenen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung berechnet. Dabei muss beachtet werden, dass im Gegensatz zur tageweisen Berechnung in unserer Studie der Quotient in der Tabelle 8 direkt aus den Extrema von ADAMTS-13 und VWF:Ag berechnet wurde.

Tabelle 8: TMA-Indices ausgewählter Krankheitsentitäten. Die Angaben basieren auf den Extrema der angegebenen Standardabweichungen. \*In der Studie von Lattuada wurden jedoch die angegebenen Quartile zur Berechnung verwendet.

Literatur	TMA-Index der Patienten	Diagnose	TMA-Index der Kontrollen
Mannucci et al. 2003	0.8 - 4.3	Systemischer Lupus erythematosus	0.5 - 1.9
	0.8 - 5.3	Systemische Sklerose	0.6 - 2.4
Tsai HM 2002	0.5 - 4.9	Nabelschnurblut	n.d.
Reiter et al. 2003	4.2 - 6.1	1 h nach DDAVP Infusion	0.5 - 0.9
*Lattuada et al. 2003:	5.0 - 35.2*	HELLP-Syndrom	0.3 - 3.9*
Mannucci et al. 2001	0.4 - 11.4	Neugeborene	0.3 - 4.3
	0.7 - 16.7	4 Tage nach Bauchoperation	0.3 - 4.3
	0.5 - 33.6	Chronische Niereninsuffizienz	0.3 - 4.3
	2.1 - 40.7	Akute Infektion	0.3 - 4.3
	1.6 - 293.3	Leberzirrhose	0.3 - 4.3

Bei unseren Patienten mit SIRS nach CPB lag der höchste TMA-Index bei 22. Im mittleren Durchschnitt lag der mediane TMA-Index über alle Tage bei  $8 \pm 2$ .

Dieser erhöhte TMA-Index kommt durch eine ca. dreifach erhöhte VWF:Ag Konzentration und ca. zweifach verminderte ADAMTS-13 Aktivität gegenüber gesunden Kontrollen zustande. Bei drei von vier untersuchten Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraums an mindestens einem Tag einen TMA-Index  $> 15$  hatten, traten ULVWF-Multimere auf. Die Bedeutung der TMA-Indices zeigt sich darin, dass an Tagen mit erhöhten TMA-Indices ein Thrombozytenabfall am Folgetag beobachtet wird. Einzeln betrachtet lag die Aktivität der ADAMTS-13 an den postoperativen Tagen eins bis vier überwiegend unterhalb von 40 %. Erst am fünften postoperativen Tag lag der Median der ADAMTS-13 Aktivität mit 40 (30/51) % im unteren Normbereich. Die ADAMTS-13 Aktivität lag bei 5 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes mindestens einmal unter 20 %, jedoch nie unter 10%. Zum Vergleich sei hier auf Patienten nach abdominalchirurgischem Eingriff ( $n=24$ ; Cholezystektomie, Kolektomie und Gastrektomie) verwiesen: Mannucci berichtet über einen Abfall von  $83 \pm 27$  % auf  $58 \pm 27$  % der ADAMTS-13 Aktivität prä-operativ gegenüber dem vierten post-operativen Tag (Mannucci et al. 2001).

Die bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock gefundenen ADAMTS-13 Aktivitäten sind die niedrigsten, die bisher in der Literatur außerhalb einer TTP beschrieben wurden. Bei den septischen Patienten lag der Wert der ADAMTS-13 Aktivität an vier von insgesamt 133 gemessenen Patiententagen nahe dem Detektionslimit des Assays von 5 %. Zusätzlich hatten vier Patienten an mindestens einem Studientag eine ADAMTS-13 Aktivität unter 10 %. Alle elf Patienten hatten an mindestens einem Studientag eine ADAMTS-13 Aktivität unter 30 %. Bemerkenswert ist weiterhin der Unterschied in der ADAMTS-13 Aktivität zwischen Nicht-Überlebenden und Überlebenden an den 4 letzten Tagen auf der ITS. Die Veränderungen in den ADAMTS-13 Aktivitäten waren im Tagesverlauf sowohl mit dem Auftreten von ULVWF-Multimeren, erhöhten IL-6 Spiegeln als auch mit einem höheren SOFA-Score assoziiert. Das Auftreten von ULVWF- Multimeren spiegelte sich weiterhin in erhöhten D-Dimer Werten als Surrogatmarker für eine verstärkte Thrombinaktivität wider. Zusätzlich zu den erniedrigten ADAMTS-13 Werten muss man den erhöhten Substratgehalt in Form der VWF:Ag Konzentration berücksichtigen. Betrachtet man alle Patiententage der Verstorbenen ( $n=69$ ) im Vergleich zu jenen der Überlebenden ( $n=64$ ), an denen der VWF:Ag Gehalt bestimmt wurde, lag der Medianwert des VWF:Ag Gehalt bei den Verstorbenen ca.

doppelt so hoch [6,0 (4,4/8,0) vs. 3,6 (3,0/4,3) U/ml]. Der TMA-Index ist bei den septischen Patienten deutlich höher als bei den Patienten mit SIRS. Der maximale TMA-Index lag bei 148 bei nicht-überlebenden Patienten und bei 68 bei den überlebenden Patienten. Diese TMA-Indices sind im Vergleich zu bisher gemessenen ADAMTS-13 Aktivitäten und VWF:Ag Konzentrationen stärker erhöht (Tabelle 8).

Das Ungleichgewicht an ADAMTS-13 und VWF-Substrat könnte Ursache für das Auftreten von ULVWF-Multimeren sein. In unserer klinischen Studie konnten solche ULVWF-Multimere erstmals außerhalb einer diagnostizierten TTP nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen dem dargestellten Nicht-Überlebendem und Überlebenden besteht darin, dass bei dem Nicht-Überlebendem an den letzten 3 Tagen auf der ITS ULVWF-Multimere vorlagen, hingegen bei den beiden Überlebenden an den letzten vier Tagen auf der ITS keine ULVWF-Multimere nachgewiesen werden können. Dieses Phänomen könnte durch die bei den Nicht-Überlebenden niedrigere ADAMTS-13 Aktivität oder den höheren TMA-Index erklärt werden. An Tagen mit vs. ohne ULVWF-Multimere fanden wir signifikante Unterschiede in der medianen ADAMTS-13 Aktivität von 12,3 vs. 23,7 %, den TMA-Indices von 36,2 vs. 17,5 und den D-Dimer Konzentrationen von 7,5 vs. 4,6 µg/ml.

Die über ULVWF-Multimere vermittelte Thrombozytenaggregation spielt eine potentielle Rolle bei der Entstehung eines Organversagens im Rahmen von systemischen Inflammationsreaktionen. Thrombozytenreiche Mikrothromben können die Verminderung der Gewebepfusion, die ohnehin durch die verstärkte Fibrin-generierung reduziert ist, aggravieren. Aufgrund der multifaktoriellen Aktivierung von Reaktionskaskaden im Rahmen einer systemischen Inflammation können möglicherweise bereits ADAMTS-13 Aktivitäten von ca. 30 % oder TMA-Indices von > 15 dazu führen, dass bei Patienten mit systemischer Inflammationsreaktion ULVWF-Multimere auftreten. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der aktuell vertretenen Meinung, dass erst bei einer ADAMTS-13 Aktivität <10 % ULVWF mit paralleler Generierung thrombozytenreicher Thromben auftreten (Barbot et al. 2001, Tsai 2002). Eine aktuelle Studie an gesunden Probanden (n=15, 28±5 Jahre) zeigt jedoch, dass bereits durch Infusion von 2 ng/kg Endotoxin ULVWF-Multimere bei gleichzeitigem ADAMTS-13 Aktivitätsabfall von 120 % auf 77 % auftreten (Reiter et al. 2005). Zur weitergehenden Untersuchung dieser Fragestellung wird zurzeit in Folgestudien u.a. die Mikrozirkulation in verschiedenen Geweben mittels immun-

histochemischer Darstellung im Sepsismodell des Schweins an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie untersucht.

Als semiquantitativer Nachweis der HMW-VWF-Multimere dient die VWF:CB oder VWF:RCo Aktivität, indem die Affinität des VWF zum Kollagen oder zu den Thrombozyten bestimmt wird. Der Vorteil der VWF:CB gegenüber der VWF:RCo Bestimmung liegt darin, dass dieser die hochmolekularen Multimere spezifischer erfasst (Schneppenheim und Budde 2005). Jedoch liegt der entscheidende Vorteil der VWF-Multimerendarstellung im direkten visuellen Nachweis von ULVWF und der geringen VWF-Ausgangskonzentration, wobei 0,01 U/ml VWF:Ag für eine Analyse ausreichend ist. Die Ratio aus VWF:CB/VWF:Ag oder VWF:RCo/VWF:Ag wird als indirekter HMW-VWF Nachweis bei von Willebrand-Syndrom (Typ II) eingesetzt (Budde et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen erwartet man ein rechnerisches Verhältnis von annähernd eins. Hingegen treten bei der TTP durch die gesteigerte thrombogene Affinität des VWF VWF:CB/VWF:Ag- oder VWF:RCo/VWF:Ag-Werte von  $> 2,0$  auf. Eine mögliche Ursache, warum die Bildung einer Ratio bei septischen Patienten nicht geeignet erscheint, liegt darin, dass im Gegensatz zur TTP bei Sepsis der VWF:Ag stark erhöht ist. Somit steigen beide Parameter der Ratio an und eine Aussage zur thrombogenen Aktivität des VWF mittels Ratio ist lediglich eingeschränkt möglich. Alternativ kann möglicherweise der TMA-Index, der das Missverhältnis des *Steady-State* von Substrat und Enzym wiedergibt, als funktioneller Parameter zur Beschreibung der durch ULVWF-Multimere hervorgerufenen spontanen, unkontrollierten Thrombozytenaggregation eingesetzt werden.

Zur Bewältigung dieser Problematik konnte in Kooperation mit Prof. Popp (Institut für physikalische Chemie der FSU Jena) auf Basis der UV-Resonanz Raman Spektroskopie und einer hierarchischen Clusteranalyse ein Verfahren entwickelt werden, mit welchem Patienten mit thrombotischer Mikroangiopathie (ADAMTS-13 Aktivität  $< 20\%$ ) sich von gesunden Probanden unterscheiden lassen (Harz et al. unveröffentlicht). Zu diesem Zweck wurden Kryopräzipitate aus dem Plasma von 16 Patienten und 18 gesunden Kontrollen präpariert und die resolubilisierten Präzipitate auf Quarzträger manuell gespottet. Über 2 bis 4 Minuten wurde die Resonanzenergie (1 mW) nach Anregung mit Frequenz-verdoppeltem Argonlaser (244 nm) registriert. Signifikante Intensitätsveränderungen zweier Banden ( $1615\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) erlauben beim derzeitigen Stand der Untersuchungen eine hinreichende

Diskriminierung zwischen gesunden Kontrollen und TMA-Patienten, was im Vergleich zu konventionellen Methoden ein Zeitersparnis für eine sichere TMA-Diagnose bedeuten würde. Präklinische Evaluierungsstudien befinden sich in Vorbereitung.

Gegenwärtig wird die TTP anhand der Kardinalsymptome hämolytische Anämie und Thrombozytopenie diagnostiziert und bei nachgewiesenem ADAMTS-13 Mangel mit FFP therapiert (George und Vesely 2001). Zur Untersuchung der Wirkung einer Plasmapherese bei septischen Patienten wurde eine Studie mit 106 intensivpflichtigen Patienten durchgeführt (Busund et al. 2002). Ein septischer Schock wurde in 57 % der Fälle der Plasmapherese-Gruppe (n=54) und in 54 % der Fälle der Kontrollgruppe (n=52) diagnostiziert. Die 28-Tage-Mortalität der Patienten in der Plasmapherese-Gruppe lag bei 33 % und in der Kontrollgruppe bei 54 %. Dabei sind in der Plasmapherese-Gruppe 33 % der Patienten am Multiorganversagen verstorben, hingegen in der Kontrollgruppe 46 % der Patienten. Weitere Todesursachen waren Herz-Kreislaufversagen (39 % vs. 36 %) und ARDS (11 % vs. 14 %) (Busund et al. 2002). Dadurch wird ein potentieller Zusammenhang in Bezug auf die erfolgreiche Anwendung von Plasmapherese / Plasmaaustausch bei Sepsis-assoziierten Mikroangiopathien im Vergleich zur Anwendung bei TTP aufgeworfen und der mögliche Zusammenhang zwischen beiden Krankheitsentitäten unterstrichen (Carcillo und Kellum 2002).

## 5.2. Verminderte ADAMTS-13 Aktivität

Mögliche Ursachen für die verminderte ADAMTS-13 Aktivität können sein:

**(I) Polymorphismen** Bei der Genexpression der Protease kommen Mutationen als Ursache einer hereditären TTP oder eines hämolytisch urämisches Syndroms aufgrund der Anamnese als Ausschlusskriterium nicht in Frage.

**(II) ADAMTS-13 Pro-Peptid Synthese** Aufgrund der beschriebenen Leberdysfunktion bei kritisch kranken Patienten (Jaeschke et al. 2000) kommt eine verminderte Synthese des Pro-Peptids der ADAMTS-13 in Frage. Bei Antithrombin und Albumin als Surrogat-Marker für die Lebersyntheseleistung zeigten sich an den letzten drei Tagen signifikante Unterschiede zwischen überlebenden und nicht-überlebenden Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock. Dies deutet auf eine schlechtere Leberfunktion bei Verstorbenen hin. Durch gezielte Analyse der

bei der Expression in Leberzellen involvierten Transkriptionsfaktoren oder Promotoren können in Zukunft weitere Ergebnisse über das komplex regulierte Netzwerk unter pro-inflammatorischen Bedingungen gewonnen werden. Erste Ergebnisse einer weiterführenden Studie zeigten keine Veränderung der ADAMTS-13 mRNA Konzentration in parenchymalen Leberzellkulturen (Hep3B) nach inflammatorischer Stimulation mit Endotoxin und pro-inflammatorischen Mediatoren (Claus et al. 2005). Ebenso zeigt eine Analyse der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der vermuteten Promoterregion der ADAMTS-13 deutliche strukturelle Ähnlichkeiten mit der Architektur eines eher marginal regulierten Gens auf.

**(III) Einfluss des Pro-Peptids** Kürzlich wurde der Sekretionsmechanismus der ADAMTS-13 an transient transfizierten Zellen aufgeklärt. Nach Synthese des Pro-Peptids und extensiver Glykolysierung ist der limitierende Schritt bei der Sekretion die Faltung des Pro-Peptids im endoplasmatischen Retikulum (Majerus et al. 2003). Diese Faltung könnte entweder durch bisher nicht näher identifizierte endogene Chaperone initiiert (Loechel et al. 1999) oder durch einen 'cysteine-switch' Mechanismus inhibiert werden (Rodriguez-Manzaneque et al. 2002). Der ADAMTS-13 Pro-Peptidanteil scheint jedoch für die Faltung und Sekretion der ADAMTS-13 nicht relevant zu sein. Sowohl das Pro-Peptid als auch die reife ADAMTS-13 sollen unter *in-vitro* Bedingungen vergleichbare Eigenschaften und Funktionen hinsichtlich der Wirkung auf den VWF besitzen (Majerus et al. 2003).

**(IV) Plasmaaktivität der ADAMTS-13** Infolge einer gestörten Co-Lokalisation des Enzym/Substrat Komplexes könnte eine effiziente Wirkung der ADAMTS-13 verhindert werden. Über die mit CD36 (Thrombospondinrezeptor) interagierende Thrombospondin-1-like Domäne könnte die ADAMTS-13 an der Endothelzelloberfläche in unmittelbarer Nähe der VWF-Sekretion verankert werden (Dong et al. 2003). Padilla beschreibt eine Verankerung der VWF-Multimere über P-Selectin (CD62P), das ebenfalls an der Endothelzelloberfläche lokalisiert ist und für eine adäquate Co-Lokalisation von dem im Plasma zirkulierenden Enzym und seinem Substrat essentiell sein könnte (Padilla et al. 2004). P-Selektin, das vergleichbar mit VWF in den Weibel-Palade-Vesikeln von Endothelzellen gespeichert wird, verankert sich nach Zellstimulation an der Endothelzelloberfläche und spielt bei der Adhäsion der Leukozyten eine wesentliche Rolle (Bernardo et al. 2005). Durch Endotoxin-abhängige Zellstimulation wird P-Selektin über einen transkriptionsabhängigen Mechanismus vermehrt exprimiert (Eppihimer und Schaub 2001), wobei sowohl bei

der Sepsis als auch bei der TTP das lösliche P-Selektin in erhöhter Konzentration im Plasma vorliegt (Fijnheer et al. 1997). Andererseits treten bei der Sepsis und im septischen Schock Antikörper gegen CD36 in erhöhten Konzentrationen auf (Favaloro 1993, Yesner et al. 1996, Salat et al. 1999), wodurch man zu dem Schluss kommen kann, dass über einen bisher unbekanntem pathophysiologischen Mechanismus die Anlagerung der ADAMTS-13 an das Substrat VWF gestört ist. Dies könnte durch eine gestörte Anlagerung der Thrombospondin-Domäne infolge CD36-Blockade und/oder gesteigerte VWF-Anlagerung an lösliches P-Selektin, verursacht sein. Eine adäquate Anheftung der sezernierten ULVWF-Multimere ans Endothel scheint für die suffiziente ULVWF-Spaltung notwendig zu sein, da entfalteter ULVWF mit höherer Affinität gespalten wird. Die Entfaltung des ULVWF durch auf ihn einwirkende Scherkräfte, soll bevorzugt stattfinden, wenn dieser an die Endothelzelloberfläche angelagert ist (Lopez und Dong 2004, Lopez und Dong 2005).

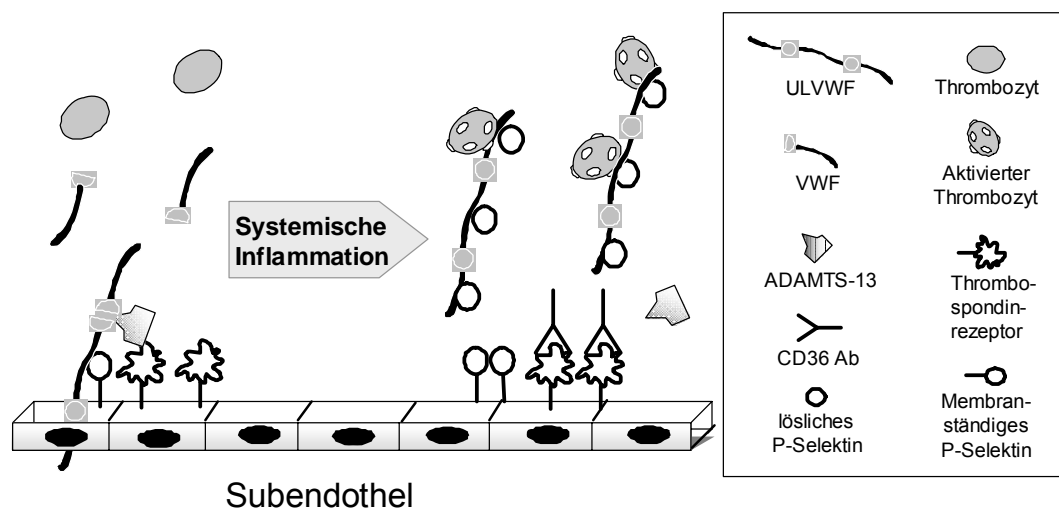


Abbildung 21: Hypothese zur gestörten Co-Lokalisation von ADAMTS-13 und VWF bei systemischer Inflammation: Durch das Auftreten von löslichem P-Selektin sowie Antikörpern (Ab) gegen den Thrombospondinrezeptor (CD36) könnte die Interaktion zwischen ADAMTS-13 und VWF gestört werden.

**(V) Autoantikörper gegen ADAMTS-13** Die erworbene Form der TTP ist die Folge von zirkulierenden Autoantikörpern, welche die Protease hemmen (Studt et al. 2004, Rieger et al. 2005). Der Nachweis erfolgt durch Verdünnung des Patientenplasmas mit Normalplasmapool, indem sich überschüssige Antikörper aus dem Patientenplasma an die ADAMTS-13 des Normalplasmapools anlagern und folglich die Aktivität der Referenz-ADAMTS-13 vermindert wird. Aufgrund negativer Ergebnisse konnte in unserer Studie die Präsenz Aktivitäts-vermindernder Auto-

antikörper gegen die ADAMTS-13 Aktivität bei sämtlichen Patienten und an allen Beobachtungstagen ausgeschlossen werden.

**(VI) Antikörper vermittelte Plasma-Clearance der ADAMTS-13** In Abwesenheit von Inhibitoren liegt die Halbwertszeit der ADAMTS-13 bei TTP-Patienten zwischen 2,1 und 3,3 Tagen, wodurch die ADAMTS-13 die langsamste bisher bekannte Abbaurate unter allen Plasmaproteasen besitzt (Furlan et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Studie wurde durch Scheiflinger das Phänomen einer Antikörpervermittelten Clearance der ADAMTS-13 bei einem TTP-Patienten beschrieben (Scheiflinger et al. 2003). Bisher gibt es bei Ausschluss inaktivierender Antikörper keine weiteren Erklärungen, ob beispielsweise eine gesteigerte Rezeptor-vermittelte Endozytose mit anschließender Fragmentierung und Inaktivierung eventuell aufgrund einer verstärkten Glykolysierung der ADAMTS-13 in einer erhöhten Plasma-Clearance resultiert.

**(VII) Einfluss von Zytokinen auf die ADAMTS-13 Aktivität** Kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe um Moake ein Zusammenhang zwischen der Freisetzung inflammatorischer Zytokine und der Funktionalität des VWF postuliert (Bernardo et al. 2004). IL-8 und TNF- $\alpha$  führen konzentrationsabhängig unter physiologischen Flussbedingungen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von ULVWF. IL-6 führt lediglich nach Anlagerung an den löslichen IL-6-Rezeptor zu einer vermehrten ULVWF-Freisetzung (IL-6+sIL-6R). Unter physiologischen Flussbedingungen führen sowohl IL-6+sIL-6R als auch IL-6 zu einer verminderten Spaltung der ULVWF-Multimere durch Inhibition der ADAMTS-13 (Bernardo et al. 2004). Bereits unmittelbar nach CPB wird im Plasma ein Anstieg von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  beobachtet (Hirai 2003, Tomic et al. 2005). IL-6 als pleiotroper Mediator der Inflammation und potentieller Inaktivator der ADAMTS-13 Aktivität stellt dadurch möglicherweise ein regulierendes Bindeglied zwischen Inflammation und Hämostase dar.

**(VIII) Einfluss von Hämoglobin auf die ADAMTS-13 Aktivität** Bei Inkubation von stark hämolytischem Serum eines Patienten mit Verdacht auf antikörpermedierte TTP mit Normalplasma, wurde ein Abfall der ADAMTS-13 Aktivität im Normalplasma beobachtet. Bei Entfernung der Immunglobuline aus dem hämolytischen Serum beobachtete man bereits alleine durch das hämolytische Serum einen Abfall der ADAMTS-13 Aktivität im Normalplasma, jedoch nicht bei alleiniger Inkubation der Immunglobuline mit Normalplasma. Daher wird eine



Abhängigkeit der ADAMTS-13 Aktivität von Hämolyse-Produkten oder einer Hämoglobin Konzentration ab mindestens 2 mg/ml im Serum diskutiert. Sowohl bei einer Inkubation von Normalplasma mit rekombinantem Hämoglobin als auch mit Hämoglobin erythrozytären Ursprungs beobachtet man diesen Effekt (Studt et al. 2005). In welchem Ausmaß dieser Effekt bei Patienten mit Sepsis eine Rolle spielt lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht beurteilen, da die freie Hämoglobin-Konzentration im Serum nicht bestimmt wurde.

#### **(IX) Einfluss von Thrombin und Plasmin auf die ADAMTS-13 Aktivität**

Sowohl eine Thrombin- als auch Plasmin-vermittelte Fragmentation der ADAMTS-13 resultiert in deren Inaktivierung (Crawley et al. 2005). Diese zeit- und konzentrations-abhängig Proteolyse der ADAMTS-13 stellt eine mögliche Verbindung zwischen der initialen Aktivierung der primären Hämostase, dem Schlüsselenzym der plasmatischen Gerinnung sowie einem Mediator der Fibrinolyse her. Untermuert wird diese Hypothese durch unsere Ergebnisse, insbesondere durch das Auftreten von ULVWF an Tagen mit gesteigerter D-Dimer Konzentration als Fibrinolyse-Marker. Weiterhin könnte der bis zu 6 Monate anhaltend erhöhte Spiegel von Thrombin - gemessen als Thrombin-Antithrombin Komplex und Prothrombin-fragmente - im Plasma von Patienten unmittelbar nach CPB eine Ursache für die verminderte ADAMTS-13 Aktivität nach herzchirurgischem Eingriff unter Verwendung des CPB sein (Paparella et al. 2004).

#### **(X) Reziproke humorale Regulation**

Bereits 2001 wurde ein reziprokes Verhalten von ADAMTS-13 Aktivität und VWF:Ag Konzentration postuliert (Mannucci et al. 2001). Dieses Phänomen wurde 2004 systematisch untersucht, indem durch Infusion von DDAVP bei gesunden Probanden ein Anstieg des VWF:Ag Spiegels bei gleichzeitigem Abfall der ADAMTS-13 Aktivität festgestellt wird. Als Kontrollgruppe dienen Patienten mit von Willebrand-Syndrom (Typ III), die einen absoluten, quantitativen VWF:Ag Mangel haben. Bei dieser Kontrollgruppe ändert sich weder der VWF:Ag Gehalt noch die ADAMTS-13 Aktivität nach DDAVP Applikation. Es scheint plausibel, dass von Willebrand-Syndrom-(Typ III)-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine höhere ADAMTS-13 Aktivität aufweisen, wobei die Aktivität bei Infusion von VWF-haltigem Kryopräzipitat abfällt. Weiterhin spiegelt sich in dieser Arbeit die bekannte Abhängigkeit des VWF:Ag Gehalts von der Blutgruppe in einer inversen ADAMTS-13 Aktivität wider (Brown et al. 2002, Mannucci et al. 2004). Durch eine andere Arbeitsgruppe kann ebenfalls an gesunden Probanden

innerhalb einer Stunde nach DDAVP Applikation eine im Vergleich zum Ausgangswert zur Hälfte reduzierte ADAMTS-13 Aktivität bei gleichzeitig 3,7-fach erhöhter VWF:Ag Konzentration nachgewiesen werden. Die ADAMTS-13 Aktivität bleibt für mindestens sechs Stunden erniedrigt und steigt erst nach 24 Stunden wieder auf Normalwerte an (Reiter et al. 2003). Nach Infusion von 2 ng/kg Endotoxin findet man einen VWF:Ag Anstieg von 0,96 auf 2,41 U/ml und einen Abfall der ADAMTS-13 Aktivität von 120 % auf 77 % (Reiter et al. 2005). Zusammen mit unseren Beobachtungen werfen diese Aspekte weitere Diskussionspunkte auf, insbesondere ob eine exzessive VWF-Freisetzung bei Patienten mit systemischer Inflammation die proteolytische Aktivität der ADAMTS-13 erschöpft. Erste systematische Untersuchungen zur Aktivität der ADAMTS-13 nach DDAVP-Applikation bei kritisch kranken Patienten, welche im Rahmen einer weiterführenden Studie gegenwärtig an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena erhoben werden, lassen einen weiteren Abfall der ohnehin erniedrigten ADAMTS-13 Aktivität bei exorbitant erhöhter VWF:Ag Konzentration erkennen (Bockmeyer et al., unveröffentlichte Daten). Möglicherweise kommt es bei erhöhter VWF-Substratkonzentration zu einer „suizidalen“ Inhibition der ADAMTS-13, die darin begründet ist, dass ein gewisser Anteil der ADAMTS-13 während der VWF-Spaltung im Übergangszustand stabilisiert und das Enzym somit inaktiviert wird (Furlan et al. 1998, Tsai und Lian 1998, Moake 2002a). Jedoch ist nach der bisher verfügbaren Literatur davon auszugehen ist, dass die ADAMTS-13 kein *single-hit-enzyme* ist, sondern wie beispielsweise aktiviertes Protein C zahlreiche Substratmoleküle nacheinander spalten kann (Dahlbäck und Villoutreix 2005). Auch bei maximal erhöhten VWF:Ag Konzentrationen von 12 U/ml muss zumindest noch eine Restaktivität der ADAMTS-13 vorliegen, da sowohl die charakteristische Triplet-Struktur der VWF-Multimere als auch die Abwesenheit von ULVWF-Multimeren nachgewiesen werden kann (Brunkhorst et al., zur Veröffentlichung eingereichte Daten).

In welchem Ausmaß die einzelnen geschilderten Punkte eine Rolle spielen lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig bewerten. Insbesondere, ob der beobachtete ADAMTS-13 Mangel primär aufgrund der humoralen Imbalance von Enzym und Substrat oder eher durch die Interaktion mit inflammatorischen Cytokinen und/oder Gerinnungsparametern zustande kommt, werden zukünftige

Studien aufzeigen. Ebenso bleibt daher offen, ob eine verminderte ADAMTS-13 Aktivität eher Ursache oder Folge einer gesteigerten systemischen Inflammation ist.

### 5.3. Thrombozytopenie bei Sepsis

Die Mechanismen der häufig auftretenden Thrombozytopenie bei Sepsis sind bisher unvollständig geklärt, obwohl das Ausmass und die Dauer der Thrombozytopenie sowie die Veränderungen der absoluten Thrombozytenzahl im Tagesverlauf etablierte Parameter zur *Outcome*-Vorhersage sind (Martinez et al. 1999, Vanderschueren et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass der Schweregrad der Sepsis zum einen indirekt proportional mit der Thrombozytenzahl sowie zum anderen proportional mit deren Aktivierung korreliert (Mavrommatis et al. 2000, Russwurm et al. 2002). Gegenwärtig wird die sepsis-assoziierte Thrombozytopenie durch verminderte Produktion und erhöhtem Verbrauch in der Mikrozirkulation sowie über antikörper-vermittelten Zelluntergang erklärt (Aird und Mark 2002).

Wir zeigen anhand der Präsenz von ULVWF einen möglichen neuen pathophysiologischen Zusammenhang für das Phänomen der über Thrombozytenaktivierung vermittelten Mikroangiopathie bei Sepsis auf. Aktivierte Thrombozyten setzen *in-vivo* über einen P-Selektin abhängigen Mechanismus vermehrt VWF aus den Weibel-Palade-Vesikeln frei (Dole et al. 2005). Dies führt möglicherweise bei gleichzeitig verminderter ADAMTS-13 Aktivität zu einem *Circulus vitiosus*, da ungespaltene ULVWF-Multimere die Thrombozyten erneut aktivieren, welche wiederum ULVWF freisetzen. In Übereinstimmung mit tierexperimentellen Ergebnissen aus einem Sepsis-Modell, bei dem die Anheftung von Thrombozyten an das aktivierte Endothel einer Vielzahl von Organen, u.a. Lunge und Leber, nachgewiesen wurde (Shibazaki et al. 1999), zeigen wir anhand der Präsenz von ULVWF bei gleichzeitig verminderter ADAMTS-13 im Plasma von Patienten mit systemischer Inflammation einen möglichen pathophysiologischen Zusammenhang für das Phänomen der über Thrombozytenaktivierung vermittelten Mikroangiopathie bei Sepsis auf. Neben der P-Selektin vermittelten Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Polgar et al. 2005), sollen zusätzlich mit aktivierten Thrombozyten dekorierte ULVWF-Multimere, verankert auf der Endothelzelloberfläche, einen Beitrag zur Adhäsion der Leukozyten unter arteriellen Scherkräften leisten (Bernardo et al. 2005). In der Folge mag es durch deren Aktivierung zur Freisetzung von

Entzündungsmediatoren kommen. Dies verdeutlicht die zentrale Stellung der Regulation des VWF über ADAMTS-13 bei Inflammation und Hämostase.

Bei der Subgruppenanalyse der PROWESS-Studie findet man die bedeutendste Reduktion der 28-Tage-Mortalität durch rekombinantes aktiviertes Protein C in der Gruppe mit einem Ausgangswert der Thrombozyten von  $<50 \cdot 10^9/l$  (63 % Mortalität in der Placebo Gruppe vs. 36 % Mortalität in der Protein C Gruppe). Betrachtet man lediglich die Patienten, die das Nadir der Thrombozytenzahl innerhalb der ersten 5 Studientage aufwiesen, war der Mortalitätsunterschied noch gravierender (84 % vs. 33 %). Im Vergleich dazu führt die Gabe von rekombinatem aktiviertem Protein C sowohl in der Subgruppe mit einem Ausgangswert der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit  $> 2$ fach oberhalb des Referenzbereichs (51 % vs. 39 %) als auch in der Gruppe mit einem Ausgangswert der PT  $> 1,2$ fach oberhalb des Referenzbereichs (35 % vs. 28 %) zu einer geringeren Mortalitätsreduktion. Vergleichbar mit letzterer Mortalitätsreduktion war jene in der Subgruppe der Patienten mit einer Thrombozytenzahl von  $50-100 \cdot 10^9/l$  (33 % vs. 26 %) (FDA CLINICAL REVIEW 2001, [www.fda.gov](http://www.fda.gov)). Dies verdeutlicht einmal mehr die Assoziation der Mortalitätsreduktion bei kritisch kranken Patienten mit Veränderung der Thrombozytenzahl.

Durch neurohumorale Regulation kommt es im akuten Stadium der Inflammation zur vermehrten Ausschüttung von Vasopressin, die jedoch im weiteren Verlauf durch Erschöpfung unter das physiologische Niveau absinkt (Landry et al. 1997, Singer et al. 2004). Trotz der bisher unzureichenden Untersuchungen über die Effekte einer Vasopressin-Applikation auf die Hämostase und die Thrombozytenzahl bei Patienten mit septischem Schock (Mutlu und Factor 2004), wird Vasopressin aufgrund seines starken vasokonstriktiven Effekts zunehmend als *Ultima Ratio* bei refraktären septischen Schockzuständen eingesetzt (Cummins und Hazinski 2000, Field 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde bei 17 Patienten mit Katecholamin-resistentem, septischen Schock ein signifikanter Abfall der Thrombozyten von  $155 \pm 67$  auf  $84 \pm 72 \cdot 10^9/l$  innerhalb von 24 Stunden nach Terlipressin<sup>®</sup>-Applikation unkommentiert beobachtet (Leone et al. 2004). Wir vermuten, dass sich diese Thrombozytopenie auf einen ADAMTS-13 Mangel oder ein Auftreten von ULVWF zurückführen lässt, da wir eine erniedrigte ADAMTS-13 Aktivität und einen erhöhten VWF:Ag Gehalt bei Patienten mit septischem Schock festgestellt haben, sowie die Verstärkung dieses Missverhältnisses durch

---

Vasopressin-Applikation bekannt ist (Reiter et al. 2001). Auch in weiteren Studien an Patienten mit Multiorgandysfunktion und Katecholamin-resistentem septischem Schock wird ein signifikanter Thrombozytenabfall bei Vasopressin-Gabe beobachtet (Dünser et al. 2004, Dünser et al. 2001). Aufgrund des beschriebenen Mechanismus könnte durch Vasopressin-Applikation bei einer Sepsis-assoziierten TMA die bestehende Thrombozytopenie und Mikrozirkulationsstörung verstärkt werden und in der Folge eine zunehmende Minderperfusion des Kapillarbett resultieren.

## 6. Schlussfolgerung

Bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock war die ADAMTS-13 Aktivität mit Werten zwischen 3 und 52 % am deutlichsten vermindert. Dabei lagen 125 der 133 gemessenen Werte unterhalb von 40%. In der Gruppe der Patienten mit SIRS lag die ADAMTS-13 Aktivität mit Werten zwischen 14 und 72 % über den Werten der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock, jedoch lagen auch hier 75 der 101 gemessenen Werte unterhalb von 40%. Dies zeigt, dass die ADAMTS-13 Aktivität bei Patienten mit generalisierter Inflammationsreaktion im Vergleich zu altersgleichen klinisch unauffälligen Probanden erniedrigt ist und dass eine Assoziation zwischen der ADAMTS-13 Aktivität und dem Schweregrad der Inflammationsreaktion wahrscheinlich ist. Somit mag ein intensives Monitoring der funktionellen proteolytischen ADAMTS-13 Aktivität sowie des resultierenden VWF-Multimerenmusters von klinischer Bedeutung sowohl für eine frühzeitige Diagnose als auch eine zielorientierte Therapie sein. Die bei erniedrigter ADAMTS-13 Aktivität beobachteten ULVWF-Multimere können über die Aktivierung der Thrombozyten die im Verlauf einer Sepsis beobachtete Mikrothrombosierung mit konsekutiver Obstruktion der Kapillaren verstärken. Durch die Gabe von ADAMTS-13 als mögliches Agens zur Verbesserung der Mikrozirkulation in den Organen könnte ein antikoagulanter Zustand hergestellt werden, wodurch die Bedeutung einer frühzeitigen Diagnose der verminderten VWF-Proteolyse hervorgehoben wird. Plasmaaustausch, mittels ADAMTS-13-haltigem Plasma oder Kryo-Überstand, der arm an VWF:Ag ist und reich an ADAMTS-13, sowie die Gabe rekombinanten Enzyms könnten eine potentielle Therapiestrategie bei Patienten mit Sepsis-assoziiierter Mikroangiopathie sein. Unter Berücksichtigung vorausgegangener Studien und der erarbeiteten Assoziationen von Sepsis und TMA sind zukünftige Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv notwendig, um die pathophysiologische Rolle der ADAMTS-13 und der VWF-Multimere bei inflammatorischen Reaktionen weiter aufzudecken.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aird WC und Mark EJ. 2002. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 15-200. A 53-year-old man with a myocardial infarct and thromboses after coronary-artery bypass grafting. *N Engl J Med*, 346 (20):1562-1570.
- Akca S, Haji-Michael P, de Mendonca A, Suter P, Levi M, Vincent JL. 2002. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med*, 30 (4):753-756.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. 2005. Septic shock. *Lancet*. Jan 1-7;365(9453):63-78.
- Angus DC und Wax RS. 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. Jul; 29 (7 Suppl):S109-116.
- Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Lopez JA. 2002. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*. Jun 1;99(11):3971-3977.
- Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. 1985. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res*, 38 (5):469-479.
- Astiz ME und Rackow EC. 1998. Septic shock. *Lancet*, 351 (9114):1501-1505.
- Bajzar L, Morser J, Nesheim M. 1996. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem*, 271 (28):16603-16608.
- Balk RA. 2000. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin*, 16 (2):179-192.
- Barbot J, Costa E, Guerra M, Barreirinho MS, Isvarlal P, Robles R, Gerritsen HE, Lammle B, Furlan M. 2001. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol*, 113 (3):649-651.
- Barrington KA, Kaersgaard P. 1999. A very-high-purity von Willebrand factor preparation containing high-molecular-weight multimers. *Vox Sang*, 76 (2):85-89.
- Bauer M und Reinhart K. 2004. *Intensivmed*, 41: 465-475.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344 (10):699-709.
- Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. 2004. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*, 104 (1):100-106.
- Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Choi H, Moake JL, Dong JF. 2005. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J Thromb Haemost*. Mar; 3(3):562-570.
- Bick RL. 1994. Disseminated intravascular coagulation. Objective laboratory diagnostic criteria and guidelines for management. *Clin Lab Med*, 14 (4):729-768.
- Bick RL und Murano G. 1994. Physiology of hemostasis. *Clin Lab Med*, 14 (4):677-707.
- Blackwell TS, Christman JW. 1996. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*, 77 (1):110-117.

- Bloos F und Reinhart K. 2002. New treatment approaches in sepsis. *Zentralblatt Fur Chirurgie*, 127 (3):174-179.
- Bohm M, Vigh T, Scharrer I. 2002. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol*, 81 (8):430-435.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Brown JE, Bosak JO. 1986. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thromb Res*, 43 (3):303-311.
- Brown SA, Collins PW, Bowen DJ. 2002. Heterogeneous detection of A-antigen on von Willebrand factor derived from platelets, endothelial cells and plasma. *Thromb Haemost. Jun*;87(6):990-996.
- Brunkhorst FM, Karzai W, Reinhart K. 2002. Aktuelle Aspekte zur Sepsisdiagnose. *Zentralbl Chir*, 127 (3):165-173.
- Brunkhorst FM, Al-Nawas B, Krummenauer F, Forycki ZF, Shah PM. 2002. Procalcitonin, C-reactive protein and APACHE II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect. Feb*;8(2):93-100.
- Brunkhorst FM, Engel C, Reinhart K, Bone H-G, Brunkhorst R, Burchardi H, Eckhardt K-U, Forst H, Gerlach H, Grond S, Gründling M, Huhle G, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seeger W, Stüber F, Weiler N, Welte T, and Loeffler M for the German Competence Network Sepsis (SepNet). Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - results from the German "Prevalence" Study. *Critical Care* 2005, 9 (Suppl 1): S83.
- Budde U, Schneppenheim R, Plendl H, Dent J, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. 1990. Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes. *Thromb Haemost*, 63 (2):312-315.
- Budde U, Angerhaus D, Obser T, Schneppenheim R. 2004. Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie. Feb*;24(1):65-70.
- Burns ER, Lou Y, Pathak A. 2004. Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 75 (1):18-21.
- Busund R, Koukline V, Utrobin U, Nedashkovsky E. 2002. Plasmapheresis in severe sepsis and septic shock: a prospective, randomised, controlled trial. *Intensive Care Med*, 28 (10):1434-1439.
- Carcillo JA und Kellum JA. 2002. Is there a role for plasmapheresis/plasma exchange therapy in septic shock, MODS, and thrombocytopenia-associated multiple organ failure? We still do not know--but perhaps we are closer. *Intensive Care Med. Oct*;28(10):1373-1375.
- Cejka J. 1982. Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. *Clin Chem*, 28 (6):1356-1358.
- Claus RA, Bockmeyer CL, Kentouche K, Sieber M W, Oberle V, Kaufmann R, Deigner HP, Loesche W. 2005. Transcriptional Regulation of ADAMTS13. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(1):41-45.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. 2005. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood. Feb* 1;105(3):1085-1093.
- Cummins RO und Hazinski MF. 2000. The Most Important Changes in the International ECC and CPR Guidelines 2000 *Circulation*. 102: 371 - 376.



- Dahlback B und Villoutreix BO. 2005. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* Jun 13;579(15):3310-3316.
- Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, Nelson DR. 2005. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med.* Feb;33 (2):341-348.
- Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, Lopez JA, Cruz MA. 2003. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 278 (32):29633-29639.
- Eppihimer MJ und Schaub RG. 2001. Soluble P-selectin antagonist mediates rolling velocity and adhesion of leukocytes in acutely inflamed venules. *Microcirculation*, 8 (1):15-24.
- Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. 1999. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*, 84 (3):254-259.
- Favaloro EJ. 1993. Differential expression of surface antigens on activated endothelium. *Immunol Cell Biol*, 71 ( Pt 6):571-581.
- Fay PJ, Coumans JV, Walker FJ. 1991. von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J Biol Chem*, 266 (4):2172-2177.
- FDA CLINICAL REVIEW. 2001. DROTRECOGIN ALFA (ACTIVATED) [RECOMBINANT HUMAN ACTIVATED PROTEIN C (rhAPC)] XIGRIS™ BLA# 125029/0 Approved: November 21, 2001.
- Field JM. 2003. Update on cardiac resuscitation for sudden death: International Guidelines 2000 on Resuscitation and Emergency Cardiac Care. *Curr Opin Cardiol.* Jan;18(1):14-25.
- Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. 1997. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost*, 77 (6):1081-1085.
- Fischer BE, Thomas KB, Dorner F. 1998. von Willebrand factor: measuring its antigen or function? Correlation between the level of antigen, activity, and multimer size using various detection systems. *Thromb Res.* Jul 1;91(1):39-43.
- Freeman BD, Reaume AG, Swanson PE, Epstein CJ, Carlson EJ, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. 2000. Role of CuZn superoxide dismutase in regulating lymphocyte apoptosis during sepsis. *Crit Care Med*, 28 (6):1701-1708.
- Friedman G, Silva E, Vincent JL. 1998. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*, 26 (12):2078-2086.
- Furlan M. 1996 Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol.* Jun;72(6):341-348.
- Furlan M, Robles R, Lammle B. 1996. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87 (10):4223-4234.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B. 1998. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 339 (22):1578-1584.
- Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lammle B. 1999. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 81 (1):8-13.
- Gando S, Tedo I, Kubota M. 1992. Posttrauma coagulation and fibrinolysis. *Crit Care Med*, 20 (5):594-600.
- Gando S, Nakanishi Y, Tedo I. 1995. Cytokines and plasminogen activator inhibitor-1 in posttrauma disseminated intravascular coagulation: relationship to multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 23 (11):1835-1842.

- Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Aoi K, Kemmotsu O. 1998. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 26 (12):2005-2009.
- Gando S. 2001. Disseminated intravascular coagulation in trauma patients. *Semin Thromb Hemost*, 27 (6):585-592.
- Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Ishitani T, Morimoto Y, Kemmotsu O. 2002. Combined activation of coagulation and inflammation has an important role in multiple organ dysfunction and poor outcome after severe trauma. *Thromb Haemost*, 88 (6):943-949.
- Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. 1997. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*, 23 (4):379-385.
- George JN und Vesely SK. 2001. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*, 68 (10):857-858, 860, 863-854 passim.
- Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lammle B, Furlan M. 1999. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost*, 82 (5):1386-1389.
- Guven H, Altintop L, Baydin A, Esen S, Aygun D, Hokelek M, Doganay Z, Bek Y. 2002. Diagnostic value of procalcitonin levels as an early indicator of sepsis. *Am J Emerg Med*. May;20(3):202-206.
- Hesseltvik JF, Malm J, Dahlback B, Blomback M. 1991. Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost*, 65 (2):126-129.
- Hirai S. 2003 Systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. Dec;9(6):365-370.
- Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. 2003. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*, 127 (7):834-839.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Iba T, Kidokoro A, Yagi Y. 1998. The role of the endothelium in changes in procoagulant activity in sepsis. *J Am Coll Surg*, 187 (3):321-329.
- Jaeschke H, Farhood A, Cai SX, Tseng BY, Bajt ML. 2000. Protection against TNF-induced liver parenchymal cell apoptosis during endotoxemia by a novel caspase inhibitor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. Nov 15;169(1):77-83.
- Kayal S, Jais JP, Aguin N, Chaudiere J, Labrousse J. 1998. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 157 (3 Pt 1):776-784.
- Keller TT, Mairuhu AT, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VE, ten Cate H, Brandjes DP, Levi M, van Gorp EC. 2003. Infections and endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 60 (1):40-48.
- Kidokoro A, Iba T, Fukunaga M, Yagi Y. 1996. Alterations in coagulation and fibrinolysis during sepsis. *Shock*, 5 (3):223-228.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13 (10):818-829.
- Knobl P. 2002. Pathophysiology and therapy of sepsis-associated coagulation disorders. *Wien Med Wochenschr*, 152 (21-22):559-563.
- Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. 2004. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*, 103 (2):607-612.

- Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC Jr, Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA. 1997. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*. Mar 4;95(5):1122-1125.
- Landry DW und Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock *N Engl J Med*. Aug 23;345(8):588-595.
- Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica*. 2003 Sep;88(9):1029-1034.
- Lavkan AH, Astiz ME, Rackow EC. 1998. Effects of proinflammatory cytokines and bacterial toxins on neutrophil rheologic properties. *Crit Care Med*, 26 (10):1677-1682.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. 1993. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama*, 270 (24):2957-2963.
- Leone M, Albanese J, Delmas A, Chaabane W, Garnier F, Martin C. 2004. Terlipressin in catecholamine-resistant septic shock patients. *Shock*. Oct;22(4):314-319.
- Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. 1993. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA*, 270 (8):975-979.
- Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. 1997. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest*, 27 (1):3-9.
- Levi M und Ten Cate H. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*, 341 (8):586-592.
- Levi M, ten Cate H, van der Poll T. 2002. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med*, 30 (5 Suppl):S220-224.
- Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. 2003. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*, 60 (1):26-39.
- Levi M. 2004. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost*. Dec;2(12):2094-2095.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 31 (4):1250-1256.
- Linde-Zwirble WT, Angus DC. 2004. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care*, 8 (4):222-226.
- Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C, Albrechtsen R, Wewer UM. 1999. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem*, 274 (19):13427-13433.
- Lopez JA und Dong JF. 2004. Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS-13 on endothelial cells. *Semin Hematol*, 41 (1):15-23.
- Lopez JA und Dong JF. 2005. Shear stress and the role of high molecular weight von Willebrand factor multimers in thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Apr;16 Suppl 1:11-16.
- Lorente JA, Garcia-Frade LJ, Landin L, de Pablo R, Torrado C, Renes E, Garcia-Avello A. 1993. Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest*, 103 (5):1536-1542.
- Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. 1975. Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh*, 34 (1):306-308.
- Majerus EM, Zheng X, Tuley EA, Sadler JE. 2003. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J Biol Chem*, 278 (47):46643-46648.
- Mammen EF. 1998. Antithrombin III and sepsis. *Intensive Care Med*, 24 (7):649-650.

- Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. 2001. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 98 (9):2730-2735.
- Mannucci PM, Vanoli M, Forza I, Canciani MT, Scorza R. 2003. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). *Haematologica*. Aug; 88(8): 914-918.
- Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. 2004. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol*, 126 (2):213-218.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.
- Martinez MA, Pena JM, Fernandez A, Jimenez M, Juarez S, Madero R, Vazquez JJ. 1999. Time course and prognostic significance of hemostatic changes in sepsis: relation to tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med*. Jul;27(7):1303-1308.
- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. 2000. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*, 28 (2):451-457.
- McCrae KR, Bussel JB, Mannucci PM, Remuzzi G, Cines DB. 2001. Platelets: an update on diagnosis and management of thrombocytopenic disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:282-305.
- McGilvray ID, Rotstein OD. 1998. Role of the coagulation system in the local and systemic inflammatory response. *World J Surg*, 22 (2):179-186.
- Mesters RM, Mannucci PM, Coppola R, Keller T, Ostermann H, Kienast J. 1996. Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients. *Blood*, 88 (3):881-886.
- Miyata T, Kokame K, Banno F. 2005. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol*. Sep;12(5):384-389.
- Moake JL. 2002a. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 347 (8):589-600.
- Moake JL. 2002b. Thrombotic thrombocytopenic purpura: the systemic clumping "plague". *Annu Rev Med*, 53:75-88.
- Moore JC, Hayward CP, Warkentin TE, Kelton JG. 2001. Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood*. Sep 15;98(6):1842-1846.
- Muller-Berghaus G. 1989. Pathophysiologic and biochemical events in disseminated intravascular coagulation: dysregulation of procoagulant and anticoagulant pathways. *Semin Thromb Hemost*, 15 (1):58-87.
- Murdock PJ, Woodhams BJ, Matthews KB, Pasi KJ, Goodall AH. 1997. von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*, 78 (4):1272-1277.
- Mutlu GM und Factor P. 2004. Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med*. Jul; 30(7):1276-1291.
- Murphy SL. 2000. Deaths: final data for 1998. *Natl Vital Stat Rep*, 48 (11):1-105.
- Nashef SA, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. 1999. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardiothorac Surg*;16:9-13
- Neame PB, Kelton JG, Walker IR, Stewart IO, Nossel HL, Hirsh J. 1980. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood*, 56 (1):88-92.

- Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. 1999. Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost*, 82 (5):1382-1385.
- Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117 (4):1162-1172.
- Opal SM. 2003. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis*, 35 (9):545-554.
- Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, Nolasco L, Turner N, Berndt MC, Anvari B, Lopez JA, Dong JF. 2004. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*, 103 (6):2150-2156.
- Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR. 2004. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. Oct;30(10):1873-1881.
- Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. 2005. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*. Aug;3(8):1590-1596.
- Reiter RA, Knobl P, Varadi K, Turecek PL. 2003. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood*, 101 (3):946-948.
- Reiter RA, Varadi K, Turecek PL, Jilma B, Knobl P. 2005. Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost*. Mar;93(3):554-558.
- Riedemann NC, Guo RF, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, Speyer CL, Sarma JV, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. 2004. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *Faseb J*, 18 (2):370-372.
- Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, Zimmermann K, Scharrer I, Peyvandi F, Galbusera M, Remuzzi G, Bohm M, Plaimauer B, Lammle B, Scheiflinger F. 2005. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood*. Aug 15;106(4):1262-1267.
- Rodriguez-Manzanique JC, Westling J, Thai SN, Luque A, Knauper V, Murphy G, Sandy JD, Iruela-Arispe ML. 2002. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 293 (1):501-508.
- Ruggeri ZM, Zimmerman TS. 1981. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood*, 57 (6):1140-1143.
- Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W. 2002. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*, 17 (4):263-268.
- Sadler JE. 1998. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67:395-424.
- Sadler JE. 2002a. A new name in thrombosis, ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (18):11552-11554.
- Sadler JE. 2002b. Biomedicine. Contact--how platelets touch von Willebrand factor. *Science*, 297 (5584):1128-1129.
- Salat A, Bodingbauer G, Boehm D, Murabito M, Tochlow E, Sautner T, Mueller MR, Fuegger R. 1999. Changes of platelet surface antigens in patients suffering from abdominal septic shock. *Thromb Res*, 95 (6):289-294.
- Sanchez-Luceros A, Farias CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C, Salviu MJ, Woods AI, Meschengieser SS, Lazzari MA. 2004. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost*. Dec;92(6):1320-1326.

- Sands KE, Bates DW, Lanke PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR. 1997. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *Jama*, 278 (3):234-240.
- Scheifflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. 2003. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 102 (9):3241-3243.
- Schneppenheim R, Plendl H, Budde U. 1988. Luminography--an alternative assay for detection of von Willebrand factor multimers. *Thromb Haemost*, 60 (2):133-136.
- Schneppenheim R. 2000, 628-631, in: *Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, (ed. L. Thomas), 5. erw. Auflage 2000, TH-Books Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main]
- Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Schwaab R, Oldenburg J. 2001. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood*. Apr 1;97(7):2059-2066.
- Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, Hassenpflug W, Haberle J, Kentouche K, Kohne E, Kurnik K, Mueller-Wiefel D, Obser T, Santer R, Sykora KW. 2003. von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. *Blood*, 101 (5):1845-1850.
- Schneppenheim R und Budde U. 2005. Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: a 2004 update. *Semin Hematol*, Jan; 42(1):15-28.
- Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. 2002a. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost*, 88 (6):1033-1038.
- Senftleben U. 2003. NF-kappa B in critical diseases: a bad guy? *Intensive Care Medicine*, 29 (11):1873-1876.
- Shibazaki M, Kawabata Y, Yokochi T, Nishida A, Takada H, Endo Y. 1999. Complement-dependent accumulation and degradation of platelets in the lung and liver induced by injection of lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 67 (10):5186-5191.
- Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. 2004. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. Aug 7;364(9433):545-548.
- Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C. 2001. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)*, 130 (4):475-480.
- Strauss R, Wehler M, Mehler K, Kreutzer D, Koebnick C, Hahn EG. 2002. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit Care Med*. Aug;30(8):1765-1771.
- Studt JD, Bohm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lammler B. 2003. Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost*, 1 (9):1882-1887.
- Studt JD, Hovinga JA, Radonic R, Gasparovic V, Ivanovic D, Merkler M, Wirthmueller U, Dahinden C, Furlan M, Lammler B. 2004. Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood*. Jun 1;103(11):4195-4197
- Studt JD, Kremer Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, Lammler B. 2005. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS-

- 13 inhibitor: in-vitro inhibition of ADAMTS-13 activity by hemoglobin. *Blood*. Jan 15;105(2):542-544.
- Tarr PI, Tsai HM, Chandler WL. 2002. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 347 (26):2171-2173; author reply 2171-2173.
- Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. 2001. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, 86 (5):1327-1330.
- Tomic V, Russwurm S, Moeller, E, Claus RA, Blaess M, Brunkhorst FM, Bruegel M, Bode K, Bloos F, Wippermann J, Wahlers T, Deigner HP, Thiery J, Reinhart K, Bauer M. Transcriptomic and proteomic patterns of systemic inflammation in on- and off-pump coronary artery bypass grafting, *Circulation*, in press.
- Tomokiyo K, Kamikubo Y, Hanada T, Araki T, Nakatomi Y, Ogata Y, Jung SM, Nakagaki T, Moroi M. 2005. von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1078-1084.
- Tripodi A, Chantarangkul V, Bohm M, Budde U, Dong JF, Friedman KD, Galbusera M, Girma JP, Moake J, Rick ME, Studt JD, Turecek PL, Mannucci PM. 2004. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J Thromb Haemost*, 2 (9):1601-1609.
- Tsai HM. 1996. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87 (10):4235-4244.
- Tsai HM, Lian EC. 1998. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 339 (22):1585-1594.
- Tsai HM, Rice L, Sarode R, Chow TW, Moake JL. 2000. Antibody inhibitors to von Willebrand factor metalloproteinase and increased binding of von Willebrand factor to platelets in ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med*, 132 (10):794-799.
- Tsai HM. 2002. Deficiency of ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 100 (10):3839-3840; author reply 3839-3842.
- Tsai HM. 2003a. Is severe deficiency of ADAMTS-13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? Yes. *J Thromb Haemost*, 1 (4):625-631.
- Tsai HM. 2003b. Platelet activation and the formation of the platelet plug: deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (3):388-396.
- Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto TA, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. 2005. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*. Aug 1;106(3):922-924.
- van der Pol WL, Huizinga TW, Vidarsson G, van der Linden MW, Jansen MD, Keijsers V, de Straat FG, Westerdal NA, de Winkel JG, Westendorp RG. 2001. Relevance of Fcγ receptor and interleukin-10 polymorphisms for meningococcal disease. *J Infect Dis*, 184 (12):1548-1555.
- Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. 2000. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med*, 28 (6):1871-1876.
- van Deventer SJ. 2000. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med*, 26 Suppl 1:S98-102.
- Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlammadinger A, Mazurier C, Deckmyn H. 2000. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost*, 83 (1):107-113.

- Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. 1998. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*, 24 (1):33-44.
- Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, Obert B, Loirat C, Meyer D, Girma JP. 2004. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost*, 2 (3):424-429.
- Villa P, Iborra J, Serra J, Gilsanz A, Casana P, Aznar JA, Aznar J. 2001. Evaluation of an automated method for the quantification of von Willebrand factor antigen. Its application in the study of vascular dysfunction. *Haematologica*, 86 (11):1180-1185.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22 (7):707-710.
- Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. 2002. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, 30 (5 Suppl):S313-317.
- Ware LB, Conner ER, Matthay MA. 2001. von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury. *Crit Care Med*, 29 (12):2325-2331.
- Warren HS. 1997. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 336 (13):952-953.
- Watanabe T, Imamura T, Nakagaki K, Tanaka K. 1979. Disseminated intravascular coagulation in autopsy cases. Its incidence and clinicopathologic significance. *Pathol Res Pract*. Nov;165(3):311-22.
- Wheeler AP, Bernard GR. 1999. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*, 340 (3):207-214.
- Whitelock JL, Nolasco L, Bernardo A, Moake J, Dong JF, Cruz MA. 2004. ADAMTS-13 activity in plasma is rapidly measured by a new ELISA method that uses recombinant VWF-A2 domain as substrate. *J Thromb Haemost*, 2 (3):485-491.
- Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ. 2000. Reduction of von Willebrand factor by endothelial cells. *Thromb Haemost*. Sep;84(3):506-513.
- Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. 2004. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*. Dec;2(12):2096-2102.
- Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. 1996. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16 (8):1019-1025.
- Zeni F, Freeman B, Natanson C. 1997. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med*, 25 (7):1095-1100.
- Zhou W und Tsai HM. 2004. An enzyme immunoassay of ADAMTS13 distinguishes patients with thrombotic thrombocytopenic purpura from normal individuals and carriers of ADAMTS13 mutations. *Thromb Haemost*. Apr;91(4):806-811.
- Zhou W, Inada M, Lee TP, Benten D, Lyubsky S, Bouhassira EE, Gupta S, Tsai HM. 2005. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest*. Jun;85(6):780-788.



## 8. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. U. Budde, Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim, Frau D. Angerhaus, Frau E. Drewke, Frau K. Will, Herrn T. Obser, Prof. Dr. med. K. Reinhart, Prof. Dr. M. Bauer, Prof. Dr. T. Wahlers, Dr. med. J. Wippermann, Dr. med. F.M. Brunkhorst, Dr. med. D. Schmidt, Frau U. Pfeil, Frau P. Bloos, Dr. rer. nat. R. A. Claus, Dr. med. K. Kentouche, Hochschuldozent Dr. med. W. Lösche, Dr. rer. nat. V. Oberle, Frau E. Walther, Frau B. Specht, Herrn E. Beutmann, Dr. med. E. Bockmeyer und Frau U. Kahms,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22.09.2005

## 9. Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. med. F.M. Brunkhorst, der die initiale Idee für dieses Projekt hatte, sowie Herrn Prof. Dr. med. K. Reinhart und dem gesamten Personal der Intensivstation der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena, wobei insbesondere die Studienschwestern Frau Ulrike Pfeil und Frau Petra Bloos hervorzuheben sind, welche für die Bereitstellung der Plasmaproben und der entsprechenden klinischen Patientendaten von entscheidender und unabdingbarer Notwendigkeit waren.

Durch die Kooperation mit dem Gerinnungs-Labor von Professor Budde aus Hamburg, insbesondere der Bereitstellung des rekombinanten VWF und durch den Methodentransfer, wurde diese Studie erst ermöglicht. Dafür möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. U. Budde, Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim, Frau Dorthe Angerhaus, Frau Elke Drewke, Frau Karin Will und Herrn T. Obser bedanken.

Für die hilfsbereite Lösung von theoretischen und technisch, experimentellen Problemen im Rahmen der Datenerhebung, Datenanalyse, Auswertung und Manuskriptgestaltung möchte ich mich beim kommissarischen Leiter und den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena, Herrn Dr. rer. nat. R. A. Claus, Herrn Hochschuldozent Dr. med. W. Lösche und Herrn Dr. rer. nat. V. Oberle bedanken.

Bei Herrn Dr. med. K. Kentouche aus der Klinik für Kinder-und Jugendmedizin möchte ich mich für die einleitende und begleitende Initiative an dieser Studie, für experimentelle und theoretische Hilfestellungen während der Studie, sowie für die Bereitstellung von Plasmaproben bedanken.

Für die unabdingbare Bereitstellung von Plasmaproben sowie entsprechenden klinischen Patientendaten möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Wahlers und Herrn Oberarzt Dr. med. J. Wippermann bedanken.

Bei Frau Edith Walther, Frau Brigitte Specht, Herrn Gordon Otto und Herrn Erik Beutmann möchte ich mich für die hilfsbereite Unterstützung während meiner gesamten experimentellen Tätigkeit im Labor und für die Lösung labortechnischer Fragestellungen bedanken.

---

Bezüglich der Bereitstellung von Plasmaproben von altersgerechten gesunden Probanden will ich mich bei Dr. med. E. Bockmeyer für die Abnahme der Blutproben, sowie bei allen Probanden für ihre Kooperationsbereitschaft bedanken.

Bei Frau Ute Kahms, Mitarbeitern des Institutes für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der FSU Jena, möchte ich mich für die routinemässige Bestimmung der Plasmaproben auf die VWF:RCo Aktivität bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Studie zum einen durch den Förderverein des Klinikums der Universität Jena, der für mich ein Loder-Stipendium für den Zeitraum von einem Jahr bereit stellte, zum anderen durch das Thüringische Ministerium für Wissenschaft und Forschung (TMWFK, Projekt B-309-00014), welches für Verbrauchsmaterial aufkam, möchte ich mich bedanken.

## 10. Curriculum vitae

Clemens Luitpold Bockmeyer

geboren am 27. Februar 1980 in Köln

### Ausbildung:

- 09/1986      Lenbachallee-Grundschule, München  
04/1987      Walther-von-der-Vogelweide-Grundschule, Würzburg  
09/1990      Röntgen-Gymnasium, Würzburg  
05/1999      Allgemeine Hochschulreife, Würzburg  
Seit 10/1999 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU), Jena  
08/2001      Physikum, Jena  
09/2002      Stipendiat des Fördervereins des Klinikums der Universität Jena für eine experimentelle Promotion mit dem Thema "Rolle der von Willebrand-Faktor-spaltenden-Protease ADAMTS-13 bei Patienten mit systemischer Inflammation" (Betreuer: Prof. Dr. med. K. Reinhart, Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena).  
03/2003      Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Jena

### Praktische Ausbildung:

- 08/2000      Krankenpflegepraktikum, Rot-Kreuzklinik, Würzburg  
03/2002      Famulatur, Institut für Pathologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel  
08/2003      Forschungsaufenthalt, Gerinnungslabor Prof. U. Budde, Hamburg  
03/2004      Famulatur Abt. Allgemeine Chirurgie, General Hospital, Letterkenny, Irland  
08/2004      Famulatur, Abt. für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Klinikum Augsburg  
09/2004      Famulatur, Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde, FSU Jena  
02/2005      Famulatur, Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, FSU Jena

### Preise:

- 05/1999      Buchpreis des Fond der chemischen Industrie, Bester Abiturient im Fach Chemie, Würzburg  
09/2003      Posterpreis der Deutschen Sepsis Gesellschaft (DSG), Sektion „Klinische Sepsisforschung“, anlässlich des 1<sup>st</sup> International Congress on sepsis and multi organ dysfunction.

**Posterdemonstrationen:**

1<sup>st</sup> International Congress on Sepsis and multiorgan dysfunction, Weimar, 09/2003, Altered binding affinity and decreased proteolysis of von Willebrand factor in SIRS and septic shock.

48. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Hamburg, 02/2004, Decreased proteolytic activity of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in survivors and non-survivors with septic shock.

7. Kongress der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, Hamburg, 12/2004, Appearance of ultralarge multimers of von Willebrand factor in plasma of critically ill patients.

5<sup>th</sup> Bari International Conference on Hemophilia and Allied Disorders, von Willebrand factor (including ADAMTS-13) and Platelet Glycoproteins, Vieste, Italien, 05/2005, Thrombotic Microangiopathy (TMA) in patients with SIRS following open heart surgery - Role of VWF cleaving protease ADAMTS13.

2<sup>nd</sup> Workshop of Thrombotic Microangiopathies, Jena, 05/2005, Activity of ADAMTS13 in patients with ischemic stroke.

2<sup>nd</sup> International Congress on Sepsis and multiorgan dysfunction, Weimar, 09/2005, Thrombotic microangiopathy (TMA) in patients with SIRS following open heart surgery - Role of VWF cleaving protease ADAMTS13.

2<sup>nd</sup> International Congress on Sepsis and multiorgan dysfunction, Weimar, 09/2005, Increased Activity of Secreted Sphingomyelinase in SIRS and Sepsis

2<sup>nd</sup> International Congress on Sepsis and multiorgan dysfunction, Weimar, 09/2005, Persistent Transcriptional Activity of ADAMTS13 after Stimuli Potentially Triggering Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.

**Vorträge:**

18<sup>th</sup> European Platelet Meeting, Giessen, 10/2003, Von Willebrand-factor Cleaving Protease in Survivors and Non-survivors with Septic Shock

10<sup>th</sup> Erfurt Conference on Platelets, Erfurt, 06/2004, Thrombotic microangiopathy in patients with multiple organ dysfunction after extracorporeal circulation - Potential role of the von Willebrand-factor cleaving protease ADAMTS13.

49. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Mannheim, 02/2005, Thrombotic microangiopathy in patients with SIRS following open heart surgery – Role of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13

2<sup>nd</sup> Workshop of Thrombotic Microangiopathies, Jena, 05/2005, Thrombotic Microangiopathy (TMA) in patients with SIRS following open heart surgery - Role of VWF cleaving protease ADAMTS13.

**Zitierfähige Abstracts:**

C. L. Bockmeyer, F. M. Brunkhorst, R. A. Claus, K. Kentouche, K. Reinhart: Altered binding affinity and decreased proteolysis of von Willebrand factor in SIRS and septic shock. *Infection* **31** (2003) 300.

C. L. Bockmeyer, R. A. Claus, U. Budde, R. Schneppenheim, K. Kentouche, K. Reinhart, W. Lösche, F. M. Brunkhorst: Decreased proteolytic activity of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in survivors and non-survivors with septic shock. *Hämostaseologie* **24** (1/2004) P170.

C. L. Bockmeyer, W. Lösche, K. Reinhart, F. M. Brunkhorst, R. A. Claus. Thrombotic microangiopathy in patients with multiple organ dysfunction after extracorporeal circulation-potential role of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13. *Platelets* **15(8)** (12/2004) 482.

C. L. Bockmeyer, W. Lösche, K. Kentouche, U. Budde, K. Reinhart, F. M. Brunkhorst, R. A. Claus. Appearance of ultralarge multimers of von Willebrand factor in plasma of critically ill patients. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2004, **41**, Suppl.1, I/11.

A. C. Bunck, C. L. Bockmeyer, F. M. Brunkhorst, K. Reinhart, H. P. Deigner, Th. Wahlers, R. A. Claus. Increased activity of Secreted Sphingomyelinase in SIRS and Sepsis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2004, **41**, Suppl.1, I/11.

C. L. Bockmeyer, F. M. Brunkhorst, W. Lösche, U. Budde, R. Schneppenheim, T. Wahlers, K. Reinhart, M. Bauer, R. A. Claus: Thrombotic microangiopathy in patients with SIRS following open heart surgery - Role of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13. *Hämostaseologie* **25** (1/2005) V 96.

C. L. Bockmeyer, R. A. Claus, W. Lösche, U. Budde, R. Schneppenheim, T. Wahlers, K. Kentouche, K. Reinhart, M. Bauer, F. M. Brunkhorst. Thrombotic microangiopathy (TMA) in patients with SIRS following open heart surgery - Role of VWF cleaving protease ADAMTS13. *Infection* **33** (2005, Suppl. 1) 16.

R. A. Claus, C. L. Bockmeyer, V. Oberle, M. W. Sieber, R. Kaufmann, H.-P. Deigner, K. Kentouche, W. Loesche. Persistent Transcriptional Activity of ADAMTS13 after Stimuli Potentially Triggering Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Infection* **33** (2005, Suppl. 1) 38.

A. C. Bunck, C. L. Bockmeyer, F. M. Brunkhorst, K. Reinhart, H. P. Deigner, R. A. Claus. Increased Activity of Secreted Sphingomyelinase in SIRS and Sepsis. *Infection* **33** (2005, Suppl. 1) 17.

**Veröffentlichungen:**

R. A. Claus, A. Wuestholz, S. Mueller, C. L. Bockmeyer, N. H. Riedel, R. Kinscherf and H. P. Deigner (2005) Synthesis and anti-apoptotic activity of a novel analogue of the neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin. *ChemBioChem* **6**:726-737.

R. A. Claus, A. C. Bunck, C. L. Bockmeyer, F. M. Brunkhorst, W. Losche, R. Kinscherf, H.P. Deigner. (2005) Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J.* epub Jul 28.

R. A. Claus, C. L. Bockmeyer, K. Kentouche, M. W. Sieber, V. Oberle, R. Kaufmann, H.-P. Deigner, W. Loesche (2005) Transcriptional Regulation of ADAMTS13. *Thromb. Haemostasis* **94**:41-45.

C. L. Bockmeyer\*, F. M. Brunkhorst\*, R. A. Claus, U. Budde, K. Kentouche, R. Schneppenheim, W. Lösche, K. Reinhart. (2005) Decreased proteolysis of ultralarge von Willebrand factor multimers in patients with severe sepsis, zur Veröffentlichung eingereicht.

M. Harz, R. A. Claus, C. L. Bockmeyer, M. Baum, P. Rösch, K. Kentouche, H.-P. Deigner, J. Popp (2005) UV-Resonance-Raman Spectroscopical Study of Human Plasma of Healthy Donors and Patients with Thrombotic Microangiopathy, zur Veröffentlichung eingereicht.

\* *gleichberechtigte Erstautorenschaft*

## 11. Datenanhang

Tabelle 9: Grundlagen der Definition von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischer Schock (Astiz und Rackow 1998, Levi et al. 2003) modifiziert nach einem Konsensus-Vorschlag der Arbeitsgruppe Sepsis der European Society of Intensive Care Medicine (Landry et al. 2001) und den Empfehlungen der Deutschen Sepsis Gesellschaft ([www.sepsis-gesellschaft.de](http://www.sepsis-gesellschaft.de)).

**SIRS:** mindestens 2 Kriterien II

**Sepsis:** Kriterien I und mindestens 2 Kriterien II,

**Schwere Sepsis:** Kriterien I, mindestens 2 Kriterien II und mindestens 1 Kriterium III

**Septischer Schock:** Kriterien I und mindestens 2 Kriterien II sowie für wenigstens 2 Stunden ein systolischer arterieller Blutdruck  $\leq 90$  mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 70$  mmHg oder ein notwendiger Vasopressoreinsatz \*, um den systolischen arteriellen Blutdruck  $\geq 90$  mmHg oder den arteriellen Mitteldruck  $\geq 70$  mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch eine andere Schockform zu erklären. (\* Dopamin  $\geq 5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  bzw. Noradrenalin, Adrenalin, Phenylepinephrin oder Vasopressin unabhängig von der verabreichten Dosierung)

I. Infektiologische Genese der Infektion	II. Systemisches Inflammationssyndrom (SIRS)	III. Akute Organdysfunktion
Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien	<p><b>1. Fieber</b> (<math>\geq 38^\circ\text{C}</math>) oder Hypothermie (<math>\leq 36^\circ\text{C}</math>) bestätigt durch eine rektale oder intravasale Messung</p> <p><b>2. Tachykardie:</b> Herzfrequenz <math>\geq 90</math> /min</p> <p><b>3. Tachypnoe</b> (Frequenz <math>\geq 20</math>/min) o. Hyperventilation (<math>\text{PaCO}_2 \leq 4.3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}</math>)</p> <p><b>4. Leukozytose</b> (<math>\geq 12000/\text{mm}^3</math>) oder <b>Leukopenie</b> (<math>\leq 4000/\text{mm}^3</math>) o. <math>\geq 10\%</math> unreife Neutrophile im Differentialblutbild</p>	<p><b>1. Metabolische Azidose</b> (Base Excess <math>\leq -5</math> mmol/l oder eine Plasma-Laktat-Konzentration <math>&gt; 1,5</math>fach oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors)</p> <p><b>2. Renale Dysfunktion</b> (Urinausscheidung <math>\leq 0,5\text{ml/kg/h}</math> über zumindestens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins <math>&gt; 2</math>fach oberhalb dem Referenzbereich des jeweiligen Labors.)</p> <p><b>3. Arterielle Hypoxämie</b> (<math>\text{PaO}_2 \leq 10\text{kPa}</math> (<math>\leq 75\text{mmHg}</math>) unter Raumluft, <math>\text{PaO}_2/\text{FiO}_2</math>-Verhältnis von <math>\leq 33\text{kPa}</math> (<math>\leq 250\text{mmHg}</math>) unter Sauerstoffapplikation - eine manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung muß als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.)</p> <p><b>4. Arterielle Hypotension</b> (systolischer Blutdruck <math>\leq 90\text{mmHg}</math> oder mittlerer arterieller Blutdruck <math>\leq 70\text{mmHg}</math> über mind. 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)</p> <p><b>5. Thrombozytopenie</b> (Thrombozyten <math>\leq 100.000/\mu\text{l}</math> oder Thrombozytenabfall <math>&gt;30\%</math> innerhalb von 24Std. ohne akuten Blutverlust als Ursache)</p> <p><b>6. Akute Enzephalopathie</b> (eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium)</p>



Tabelle 10: Individuelle Charakterisierung der Patienten mit septischem Schock und schwerer Sepsis (Verstorbene n=6; Fallnummer 1-6 und Überlebende n=5; Fallnummer 7-11)

Fall Nr.	Alter	Genus	Mikrobiologie	Sepsisherd	Grundkrankheit	ITS Liege- dauer [Tage]	Schwere Sepsis/ Septischer Schock [Tage]	APACHE II [Punkte]	SAPS II [Punkte]	Initial ISTH- Score [Punkte]	Outcome
1	28	M	Pseudomonas, Enterococcus, Candida ssp.	Pneumonie, intra-abdominal	Intrakranielle Blutung, Leberabszess	38	28	25	38	2	Multiorgan versagen
2	51	F	E. coli	Intra-abdominal	Peritonitis, Dünndarmperforation	6	6	6	26	0	Multiorgan versagen
3	65	M	Pseudomonas, Klebsiella,	Pneumonie	Blasenkarzinom	12	12	34	73	2	Multiorgan versagen
4	72	F	Staph. aureus	Pneumonie, Wund-infektion	Hüftarthrose, Hüft TEP	28	27	21	45	3	Multiorgan versagen
5	68	M	<i>Nicht identifiziert</i>	Pneumonie	Arterielle Verschlusskrank, aortoiliakale Rekonstruktion	11	8	25	49	1	Septischer Schock
6	79	M	Staph. aureus, Candida ssp.	Pneumonie	Arterielle Verschlusskrankheit, aortoiliakale Rekonstruktion	17	10	29	67	1	Herzkreis- lauf- versagen
7	47	M	E. coli	Urogenital	Sepsis nach transrektaler Prostatomie	6	3	22	39	1	verlegt
8	63	F	Klebsiella Pneumoniae	Urogenital	Nephritischer Abszess	12	12	35	71	2	verlegt
9	59	F	Enterococcus	Intra-abdominal	Peritonitis, Ovarialabszess	19	5	13	36	1	verlegt
10	23	M	Enterobacter	Pneumonie	Polytrauma	27	18	15	27	0	verlegt
11	47	F	Candida ssp.	Pneumonie	Kolonkarzinom, Hemikolektomie Peritonitis	54	38	22	48	2	verlegt

Tabelle 11: Individuelle Charakterisierung der Patienten mit SIRS nach Herzoperation unter Verwendung des kardiopulmonalen Bypass (n=22)

Fall Nr.	Alter	Genus	Begleit- erkrankungen	EURO- Score [Punkte]	Operativer Eingriff	Anzahl der Gefäß- trans- plantate	OP- Dauer [min]	Bypass- zeit [min]	Klemm- zeit [min]	Reper- fusionzeit [min]	APACHE II [Punkte]	SAPS II [Punkte]	Initial ISTH- Score [Punkte]	Organdys- funktion* am Tag 1 Post Op	Postoperativer Verlauf
1	74	M	---	3	ACVB/ LIMA/ AKE <sub>bio.</sub>	2	240	150	110	33	34	24	0	3/5	Tag 4: Septischer Schock
2	61	M	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus II	21	LVAD	-	330	133	nd	nd	46	20	1	2/5	Tag 2: Pneumonie (Candida ssp)
3	75	M	Diabetes mellitus II		ACVB/ LIMA/ IABP (Notfall)	3	156	72	34	34	57	40	0	1/4	---
4	75	W	---	18	ACVB/ LV-Aneu- rysmektomie	3	291	136	56	35	50	27	0	1/4/5	---
5	77	M	---	7	Aneurysmektomie / ACVB/ IABP	1	280	170	10	118	30	20	0	1/4	---
6	58	M	---	8	AKE <sub>mechanisch</sub> / MKE <sub>mechanisch</sub>	-	210	136	90	30	44	35	0	1/3/4	---
7	81	M	Diabetes mellitus II	7	ACVB/ LIMA	4	171	90	53	32	46	23	0	1/2	---
8	67	W	COPD, Diabetes mellitus II	11	ACVB/LIMA/ AKE <sub>bio.</sub>	2	243	114	66	32	25	18	0	5	---

Fall Nr.	Alter	Genus	Begleit- erkrankungen	EURO- Score [Punkte]	Operativer Eingriff	Anzahl der Gefäß- trans- plantate	OP- Dauer [min]	Bypass- zeit [min]	Klemm- zeit [min]	Reper- fusions- zeit [min]	APACHE II [Punkte]	SAPS II [Punkte]	Initial ISTH- Score [Punkte]	Organdys- funktion* am Tag 1 Post Op	Postoperativer Verlauf
9	73	W	Diabetes mellitus II	11	ACVB/ IABP (Notfall)	4	240	124	75	39	51	24	0	1/4/5	---
10	55	M	Diabetes mellitus II	6	ACVB/ LIMA	4	189	67	39	25	21	8	0	1/4	Tag 2: Mediainfarkt, Tag 4: Pneumonie (Enterococcus)
11	62	M	Diabetes mellitus II	11	ACVB/ IABP (Notfall)	3	200	83	41	38	50	24	1	1/2/4/5	---
12	69	M	Diabetes mellitus II	9	ACVB/ LIMA/ AKE <sub>bio.</sub>	3	272	148	88	40	30	24	0	4/5	---
13	72	W	Vorderwand- aneurysma, Diabetes mellitus II	9	ACVB/ LIMA	3	150	73	43	28	32	19	0	1/4/5	---
14	56	M	COPD	3	ACVB/ LIMA	4	237	112	67	37	27	21	0	1/4	---
15	57	M	---	4	ACVB/ LIMA/ IABP	4	302	158	77	75	49	25	0	1/4	---

Fall Nr.	Alter	Genus	Begleit- erkrankungen	EURO- Score [Punkte]	Operativer Eingriff	Anzahl der Gefäß- trans- plantate	OP- Dauer [min]	Bypass- zeit [min]	Klemm- zeit [min]	Reper- fusions- zeit [min]	APACHE II [Punkte]	SAPS II [Punkte]	Initial ISTH- Score [Punkte]	Organdys- funktion* am Tag 1 Post Op	Postoperativer 5-Tages- Verlauf
16	70	W	Diabetes mellitus II	13	ACVB/ LIMA/ IABP (Notfall)	3	234	116	37	68	52	26	0	1/4	Tag 2: MOV
17	78	M	---	11	ACVB / AK-Re- konstruktion	1	450	315	180	60	27	24	0	1/4	Tag 4: MOV
18	76	M	COPD	13	AKE/ IABP	-	157	105	69	18	36	33	0	1/4	---
19	60	M	Diabetes mellitus II	5	ACVB/ IABP	3	244	132	34	95	26	14	0	3/4	Tag 4: Septischer Schock
20	71	W	---	10	Composite-Ersatz der Aorta / MK- Rekonstruktion	-	309	153	101	12	45	27	0	4	---
21	75	M	Mb. Parkinson	5	ACVB/ LIMA	4	250	156	84	67	40	19	0	3/4/5	---
22	62	M	Diabetes mellitus II	8	ACVB/ AKE	1	215	177	111	60	29	21	0	1/3/5	---

\*Als Kriterien der akuten Organdysfunktion wurden die Empfehlungen der Deutschen Sepsis Gesellschaft zugrunde gelegt:

1. Metabolische Azidose (Base Excess  $\leq -5$  mmol/l oder eine Plasma-Laktat-Konzentration  $> 1,5$ fach oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors)
2. Renale Dysfunktion (Urinausscheidung  $\leq 0,5$ ml/kg/h über zumindestens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins  $> 2$ fach oberhalb dem Referenzbereich des jeweiligen Labors.
3. Arterielle Hypoxämie ( $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa ( $\leq 75$ mmHg) unter Raumluft,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 33$ kPa ( $\leq 250$ mmHg) unter Sauerstoffapplikation - eine manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung muß als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.)
4. Arterielle Hypotension (systolischer Blutdruck  $\leq 90$ mmHg oder mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 70$  mmHg über mind. 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)
5. Thrombozytopenie (Thrombozyten  $\leq 100.000/\mu\text{l}$  oder Thrombozytenabfall  $>30\%$  innerhalb von 24 Std. ohne akuten Blutverlust als Ursache)
6. Akute Enzephalopathie (eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium)

ACVB Aortokoronarer Venenbypass, AKE<sub>bio</sub> biologischer Aortenklappenersatz, AK Aortenklappe, APACHE Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; COPD chronisch obstruktive Lungenerkrankung, IABP intraaortalen Ballonpumpe, ISTH International Society of Thrombosis and Haemostasis, LIMA linker Mammaria interna Bypass, LVAD Linksherz-Unterstützungssystem, MK Mitralklappe, MKE Mitralklappenersatz, MOV Multiorganversagen, SAPS Simplified Acute Physiology Score.

Tabelle 12: Der Euroscore stellt ein einfaches und objektives Verfahren dar, um die postoperative Frühmortalität bei herzchirurgischen Patienten abzuschätzen. (EURO-Score European System for Cardiac Operative Risk Evaluation, Nashef et al. 1999):

<b>EURO-Score</b>	<b>Risikogruppe</b>	<b>Erwartete Mortalität</b>
0-2 Punkte	niedrig	1.27-1.29%
3-5 Punkte	mittelgradig	2.90-2.94%
>5 Punkte	hoch	10.93-11.54%