

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg- Essen

Aus der Klinik für Hämatologie

**Therapie von Patienten mit paroxysmaler nächtlicher
Hämoglobinurie (PNH) mit Eculizumab**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinischen Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Olga Girmann
aus Balakowo
2017

Dekan: Univ.-Prof. /Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Röth
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. P.A. Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2018

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	5
1.1.1	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	5
1.1.2	Molekulare Ursachen und Pathophysiologie	6
1.1.3	Epidemiologie	8
1.1.4	Klinische Merkmale der PNH	8
1.1.5	Thrombophilie und Thrombosen	10
1.1.6	Störung der Nierenfunktion	11
1.1.7	Störung des NO-Spiegels	12
1.1.8	Prognose und Mortalität	13
2	Diagnostik und Differentialdiagnostik	15
3	Therapieansätze	18
3.1	Supportive Therapiemaßnahmen	18
3.2	Komplementinhibition durch Eculizumab	19
3.2.1	Ergebnisse klinischer Studien zu Eculizumab	20
3.3	Stammzelltransplantation	23
4	Fragestellung	23
5	Patienten und Methoden	24
5.1	Patienten	24
5.2	Eculizumab Therapie	24
5.3	Auswertung der einzelnen Parameter	24
5.4	Beurteilung der Eculizumab Therapie	25
5.5	Durchflusszytometrie	26
5.6	Direkter monospezifische Coombs-Test (DAT)	27
5.7	Immunfixationsanalyse	27
5.8	Statistische Analyse	27
6	Ergebnisse	28
6.1	Patientendaten	28
6.1.1	Geschlechterverteilung	28

6.1.2	Altersverteilung	29
6.2.1	Dauer und Art der Therapie	30
6.2.2	Ansprechen auf die Eculizumab Therapie	31
6.2.3	Behandlungsverlauf	33
6.2.4	Thromboembolische Komplikationen in der Vorgeschichte	34
6.2.5	Nebenwirkungen von Eculizumab	35
6.3	Veränderung der Hämolyseparameter unter Eculizumab Therapie	36
6.3.1	LDH Wert	36
6.3.2	Hämoglobin	37
6.3.3	Transfusionsbedarf	38
6.3.4	Haptoglobin	39
6.3.5	Hämopexin	40
6.3.6	Bilirubin	41
6.3.7	Erythropoetin	41
6.3.8	Retikulozyten	42
6.3.9	Retikulozytenproduktionsindex	43
6.3.10	Ferritin	44
6.4	Entwicklung der PNH-Klonggröße unter Eculizumab Therapie	47
6.5	Coombs-Test	47
7	Diskussion	48
8	Zusammenfassung	58
9	Literatur	59
10	Abkürzungen	71
11	Tabellen	73
12	Danksagung	81
13	Lebenslauf	82

1 Einleitung

1.1.1 Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene erworbene nicht maligne Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen.

Klinisch kann sich die Erkrankung unterschiedlich äußern und weist verschiedene Schweregrade auf. Charakteristisch für die PNH ist eine klassische Trias. Erstens eine Coombs-negative hämolytische Anämie, in Folge einer intravasalen Hämolyse mit Hämoglobinurie, zweitens eine Thrombophilie und drittens eine Knochenmarkinsuffizienz, mit einer Zytopenie bis hin zu einer Panzytopenie und unter Umständen eine daraus folgenden Infektneigung (Parker C. J. et al., 2005, Hillmen P. et al., 1995, de Latour R. P. et al., 2008).

Die PNH wurde als klinische Entität erstmalig im Jahr 1882 von Strübing beschrieben (Strübing P., 1882). 1911 berichteten Marchiafava und Micheli über diese Form der hämolytischen Anämie mit der charakteristischen Hämoglobinurie. Deshalb wird diese Erkrankung auch als Strübing-Marchiafava-Micheli-Syndrom bezeichnet (Röth A. et al., 2009).

Zu Beginn des neunzehnten Jahrhunderts vermutete man zunächst eine pathologische Veränderung der Erythrozytenmembran als einzige Ursache für das Auftreten der PNH. 1954 wurde erstmals erkannt, dass die Ursache der PNH in der Störung des Komplementsystems liegt (Pillemer L. et al., 1954). Seit etwa fünfzig Jahren ist bekannt, dass sämtliche Blutzellen von der Erkrankung betroffen sein können.

Nicholson-Weller fanden eine fehlende Expression der komplementregulatorischen GPI-verankerten (Glykosylphosphatidylinositol) Proteine nicht nur bei Erythrozyten, sondern auch auf der Oberfläche von Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten. Aus diesen Erkenntnissen leiteten die Autoren die Ursache für die bei den PNH Patienten auftretenden Symptome, wie thrombotische Komplikationen und eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, ab (Nicholson-Weller A. et al., 1985).

Seit 1993 ist das Gen, das für den GPI-Synthesedefekt verantwortlich ist, als PIG-A (Phosphatidylinositolglykan A) Gen bekannt. In diesem Gen liegt eine somatische Mutation der Blutzellen bei PNH Patienten vor (Miyta T. et al., 1993).

1.1.2 Molekulare Ursachen und Pathophysiologie

Das bei den PNH Patienten mutierte PIG-A-Gen ist an einem zentralen Schritt in der Synthese des GPI-Ankerproteins beteiligt. Als Resultat dieser Mutation kommt es zur Störung der Biosynthese des Ankerproteins und damit zum teilweisen oder vollständigen Fehlen GPI-verankerter Proteine auf der Zelloberfläche.

Der erste Schritt in der Biosynthese der GPIs besteht in der Übertragung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) vom UDP-N-Acetylglucosamin als Donor auf Phosphatidylinositol (PI), wodurch GlcNAc-PI entsteht (Masterson W. J. et al., 1989). In den Zellen, in denen das PIG-A-Gen eine Mutation aufweist, ist diese Bildung von GlcNAc-PI defekt (Takahashi M. et al., 1993).

Damit weisen diese Zellen eine teilweise oder vollständig Defizienz aller GPI-Ankerproteine auf. Unter diesen Proteinen finden sich unter anderem wichtige Regulationsproteine des Komplementsystems, wie das Protein CD55, der sogenannten "Decay Accelerating factor (DAF)" und CD59, der "Membrane-Inhibitor of reactive lysis (MIRL)" (Meri S. et al., 1990). Das DAF Protein blockiert die Bildung und Stabilität der C3 und C5-Konvertasen, das MIRL Protein verhindert hingegen die Bildung des Membranangriffskomplexes C5b-C9 (MAC) (Parker C. J. et al., 2000; DeZern A.E. et al., 2015).

C3 und C5-Konvertasen sind enzymatische Komplexe und initiieren zusätzlich die Bildung und Aktivität des Membranangriffskomplexes (MAC). MAC ist eine zytolytische Untereinheit des Komplementsystems, die durch Porenbildung in der betroffenen Zelle zur Zellyse führt.

Aufgrund der Mutation des PIG-A-Gens weisen die betroffenen PNH Zellen folgerichtig keine, oder nur eine geringe Expression von CD55 und CD59 an der Zelloberfläche auf. Als Resultat sind diese hämatopoetischen Zellen deutlich sensibler gegenüber der Komplementkaskade mit einhergehender Zytolyse (Nicholson-Weller et al., 1983).

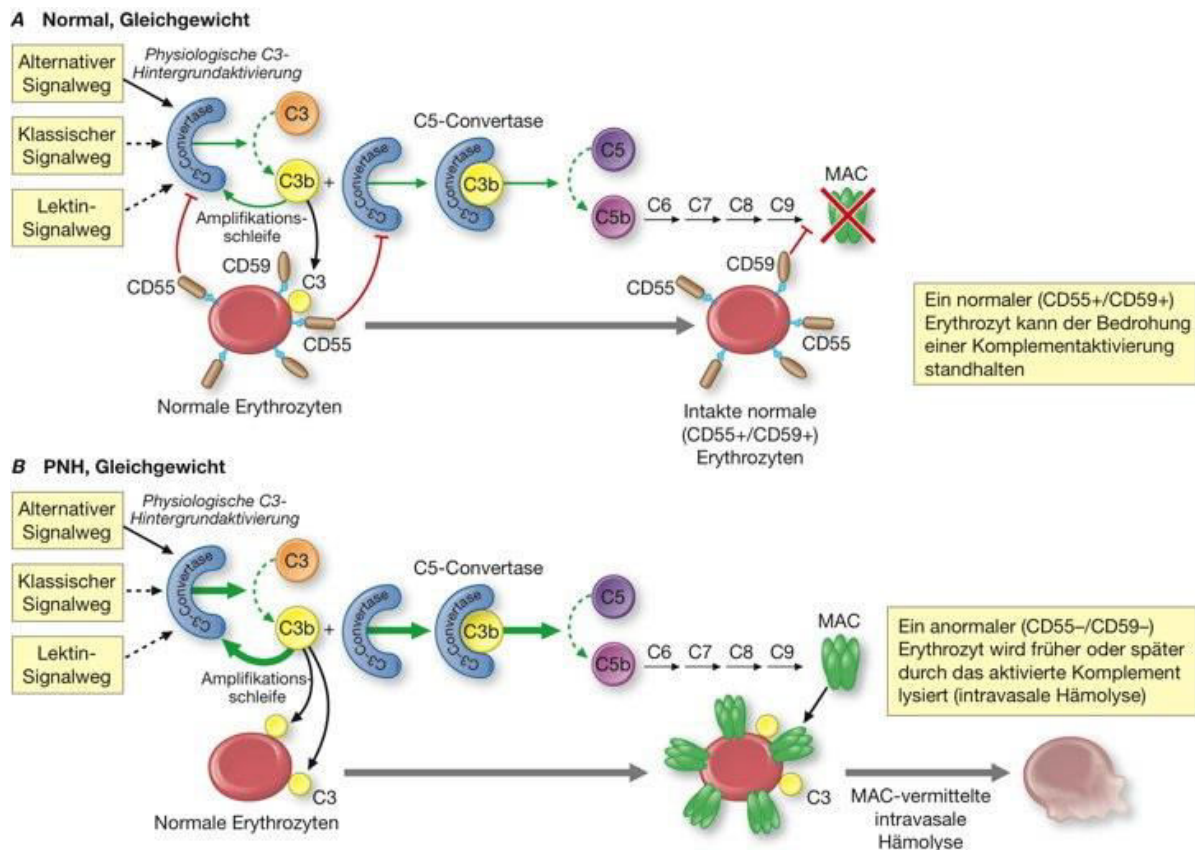


Abb. 1: Pathophysiologie der komplementvermittelten Hämolyse der PNH (aus Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage).

Als Folgen tritt eine hämolytische Anämien auf, wobei ein isolierter Defekt von CD59 alleine bereits eine Hämolyse auslösen kann, während es bei einem isolierten Defekt von CD55 nicht der Fall ist (Yamashina M. et al., 1990; Holguin M.H. et al., 1992).

Die somatische Mutation im PIG-A-Gen in einer oder mehreren pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen konnte bei allen betroffenen PNH Patienten nachwiesen werden (Miyata T. et al., 1994; Yamada N. et al., 1995).

Die aus mutierten Stammzellen hervorgehenden GPI-defizienten Zellen im Knochenmark expandieren weiter und nehmen einen großen Anteil des gesamten blutbildenden Systems ein.

Bei PNH Patienten ist zusätzlich zu den anderen Oberflächenproteinendefekten ein CD14-Defekt auf der Oberfläche der Monozyten nachgewiesen worden. Das CD14 ist für die Bindung des Lipopolysaccharids, das aus dem Abbau der Zellmembran der Darmbakterien entsteht, zuständig. Durch den CD14-Defekt entsteht ein Überschuss des Lipopolysaccharids (LPS), das zu einer Aktivierung des

Komplementsystems und somit zur Hämolyse führen kann (Rosse W.F. et al., 2003). Dies verstärkt die bei PNH Patienten gestörte Komplementaktivität: zum einen fehlen mit dem Gen die für die GPI-Anker wichtigen Inhibitoren, die vor der komplementvermittelten Lyse schützen und zum anderen kommt es durch den Überschuss an LPS zu einer vermehrten Aktivierung der Komplementkaskade.

1.1.3 Epidemiologie

Bei der PNH handelt es sich um eine sehr seltene hämatologische Erkrankung. Die Prävalenz beträgt maximal bis zu 16 pro eine Million Einwohner. Die Inzidenz liegt bei ca. 1,3 Fällen pro eine Million Personen und Jahr. Da diese Erkrankung oft nicht direkt erkannt wird, liegt die Inzidenz möglicherweise deutlich höher (Späth-Schwalbe E. et al., 1995).

Die Verteilung zwischen den beiden Geschlechtern ist in etwa ausgewogen. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 25. und 45. Lebensjahr, wobei die Krankheit in jedem Alter auftreten kann. Kinder und Jugendliche können von der PNH ebenfalls betroffen sein (Dacie J. V. et al., 1972). Eine familiäre Häufung liegt nicht vor (Ware R. E. et al., 1991).

1.1.4 Klinische Merkmale

Die Hämolyse und Hämoglobinurie sind die Leitsymptome der PNH. Unbehandelt lässt sich eine chronische Hämolyse nachweisen, die nach individuellem Krankheitsverlauf und hinsichtlich der Intensität, der Zeitdauer und der Häufigkeit stark variiert.

Die chronisch verlaufende Hämolyse wird von Episoden mit akuten hämolytischen Schüben begleitet. Ein akuter hämolytischer Schub äußert sich durch das typische klinische Zeichen der PNH, der Hämoglobinurie und einem morgendlichen colafarbenden Urin. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der PNH ist die Hämoglobinurie jedoch nur bei etwa 25% der Patienten nachweisbar (Parker C. J. et al., 2005). Während des Tages nimmt der Urin oft wieder seine normale Farbe an.



Abb. 2: Urin mit verschiedenen Färbungen, links der typische colafarbene Morgenurin und rechts der Normalurin. Die Dunkelfärbung vergeht im Laufe des Tages (Foto aus Röth A. et al., 2009).

Die chronische intravasale Hämolyse bei der PNH ist Ursache für eine Reihe weitere Symptome: Anämie, Schwäche, Blässe, Fatigue und Atemnot. Aufgrund dieser ernsten Symptome ergibt sich für die Patienten unter anderem die Notwendigkeit von Bluttransfusionen (Röth A. et al., 2008; Rother R. P. et al., 2005; Rosse W. F. et al., 2003).

Eine erhöhte Infektanfälligkeit bei PNH Patienten kann durch eine Leukopenie verursacht werden. Bei vielen Patienten ist zusätzlich eine Zytopenie nachzuweisen. Manche Patienten zeigen eine isolierte Verminderung einer Zelllinie, andere zeigen das Vollbild eines Knochenmarkversagens mit Panzytopenie. Die Zytopenie wird neben dem Fehlen von funktionell wichtigen Oberflächenproteinen auf den Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten mit einer Funktionsstörung des Immunsystems in Zusammenhang gebracht. Da bereits geringe Infektionen das Auftreten der Hämolyse und hämolytischen Krisen begünstigen, ist dies für den Krankheitsverlauf mit entscheidend (Lee G. R., 1993).

Symptomatik	Klinische Merkmale
Müdigkeit	Anämie
Blässe der Haut und Schleimhäute	Hämoglobinurie
Dunkler (Morgen-) Urin	Hämorrhagie
Gelbverfärbung von Haut Konjunktiven	Ikterus
Kopfschmerzen	Akute und chronische
Rückenschmerzen	Niereninsuffizienz
Abdominale Beschwerden	Splenomegalie
Erektile Dysfunktion	Hepatomegalie
Dysurie	Thrombosen
Fieber	Infektionen
	Neurologische Symptome

Tab. 1: Klinische Symptome und Diagnosen bei PNH.

1.1.5 Thrombophilie und Thrombosen

Eine weitere Komplikation sind Thrombosen (Hillmen P. et al., 1995 und 2004; Socié G. et al., 1996; Ostendorf P.C. et al., 1997). Sie sind bei 40-67% aller PNH Patienten für den Tod verantwortlich (Hillmen P. et al., 1995 und 2007). Insbesondere venöse Thrombosen an atypischen Stellen, wie die Milzvenen-, Pfortader-, Leberventhrombosen (Budd-Chiari-Syndrom), zerebrale Venenthrombosen, aber auch primäre Thrombosen im arteriellen System, treten bei bis zu 60% aller PNH Patienten auf. Die Wahrscheinlichkeit einer Thrombose steht nicht im direkten Zusammenhang mit der PNH-Klongröße, wie früher angenommen wurde. Es kommen Thrombosen auch bei Patienten mit einem kleinen PNH-Klon vor (Hall C. et al., 2003).

Die Ursachen der Thromboseneigung sind multifaktoriell. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stickstoffmonoxidkonzentration über mehrere Wege im direkten Zusammenhang mit Thrombopathie steht. Weiterhin können auch GPI-defiziente Thrombozyten durch das Komplementsystem aktiviert werden. Diese Aktivierung der Thrombozyten durch das Komplementsystem führen zu einer Steigerung der Prothrombinase Aktivierung und damit zu einer Thrombosebildung (Röth A. et al., 2009). Als weitere Möglichkeit wird eine direkte Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade durch die intravasale Hämolyse diskutiert (Rosse

W. F. et al., 2004; Hugel B. et al., 1999; Hill A. et al., 2013).

Symptome einer Lebervenenenthrombosen können Bauchschmerzen, Ikterus, Hepatomegalie, Aszitesbildung, Gewichtszunahme und Blutungen sein.

Seltener als eine Lebervenenenthrombose kommt es bei PNH Patienten zu einer Ausbildung von Portalvenenthrombose, die sich klinisch durch Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Störungen der Leberfunktion äußern (Mathieu D. et al., 1995).

Die Zerebralvenen, von allem die sagittale Zerebralvenen und Sinusse, sind die nächsthäufigsten Thromboselokalisationen bei PNH Patienten.

1.1.6 Störung der Nierenfunktion

Zur klinischen Manifestation der PNH gehört auch eine Nierenfunktionstörung. Renale Schäden verschiedener Grade finden sich bei bis zu 65% der PNH Patienten. 21% der PNH Patienten weisen bereits bei der Erstdiagnose eine schwere Störung der Nierenfunktion oder ein Nierenversagen auf (Nair R. K. et al., 2008; Hillmen P. et al., 2010).

Es werden zwei Ursachen für die Nierenfunktionstörungen in Erwägung gezogen: eine chronische Ablagerung von Hämosiderin durch das bei der Zellyse entstehende freie Hämoglobin, sowie mikrovaskuläre Thrombosen in den Nierengefäßen (Hillmen P. et al., 2010).

Durch die intravasale Hämolyse kommt es zu einer übermäßigen Freisetzung des freien Hämoglobins aus den zerstörten PNH Erythrozyten.

Freies Hämoglobin oxidiert zunächst zu Methämoglobin (Oslo J. S. et al., 2004) und wird anschließend über die Niere ausgeschieden. Der Transport innerhalb des Retikuloendothelialen Systems erfolgt dabei durch die Bindung von Haptoglobin an Methämoglobin. Dieser Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex wird von dem CD163-Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor auf der Oberfläche der Makrophagen und Monozyten erkannt, gebunden und abgebaut. Durch die bei PNH Patienten große Menge an freiem Hämoglobin entsteht ein Ungleichgewicht in der Konzentration von Hämoglobin zu Haptoglobin. Der Überschuss an Hämoglobin führt zu einer vermehrten Konzentration ungebundenen Hämoglobins, dass nicht weiter abgebaut werden kann. Dieses freie Hämoglobin wird im Glomerulus filtriert und fällt im Tubulus aus (Rother R. P. et al., 2005).

Dieser Vorgang kann sowohl akut als auch chronisch zu einer tubulären Nierenschädigung führen. Das betroffene Nephron bleibt solange funktionsunfähig,

bis das Hämoglobin abgebaut wird, was zu einer Akkumulation von Hämosiderin, einem wasserunlöslichen Komplex aus Ferritin Bruchstücken und Eisen führen kann. Dies wiederum kann zu tubulären Entzündungen und schließlich zu einer Niereninsuffizienz führen (Nath K. A. et al., 2001).

1.1.7 Störung des NO-Spiegels

Die Oxidation des freien Hämoglobin erfolgt unter Verbrauch von Stickstoffmonoxid (NO). Dies kann schon durch sehr kleine Menge von freiem Hämoglobin geschehen (Oslo J. S. et al., 2004). Durch die erhöhte Konzentration des freien Hämoglobins sinkt die NO-Konzentration im Plasma.

Zusätzlich beeinflusst wird der NO-Spiegel durch das Enzym Arginase, das aus den hämolysierten Erythrozyten freigesetzt wird. Arginase vermindert die Menge an L-Arginin, das wiederum ein Substrat für die Bildung von NO ist. Die Folgen der Erschöpfung des Stickstoffmonoxids im Plasma sind vielfältig: NO ist ein zentraler Regulator des Tonus der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts und der Gefäßweite, es reguliert die Thrombozytenaktivierung und -aggregation, sowie den Gerinnungsfaktor XIII, was die Bildung von Thromben begünstigt. Zusätzlich beeinflusst das NO eine endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (Rother R.P. et al., 2005). Die Verminderung des NO führt zu einer Vasokonstriktion, welche dann eine Thrombusbildung begünstigen kann. Weiter ist NO auch ein entscheidender Regulator des Gefäßtonus für die afferenten renalen Blutgefäße. Änderungen innerhalb des renalen Blutflusses durch den NO-Mangel führt zu einem direkten Effekt auf die glomeruläre Filtrationsrate und den renalen Plasmastrom (Schlaich M. P. et al., 2008; Delles C. et al., 2004; Schneider R. et al., 2003; Gabbai F. B., 2001).

Klinisch äußert dies sich durch eine eingeschränkte Tubulusfunktion und eine verminderte Kreatininclearance bei den betroffenen Patienten (Clark D. A. et al., 1981). Typischerweise treten diese Symptome während der hämolytischen Krisen der PNH auf.

Es gibt eine Reihe weiterer klinischen Symptome der PNH, die auf den Stickstoffmonoxid Mangel und der daraus resultierenden Dystonie der glatten Muskulatur zurückzuführen ist (Rother R. P. et al., 2005). Diese sind abdominale Beschwerden, Dysphagie, pulmonale Hypertonie, Atemnot, erektile Dysfunktion, Rücken-, Muskel- und Kopfschmerzen Diese Symptome treten im engen

Zusammenhang mit der hämolytischen Aktivität der PNH auf (Parker C. et al., 2005; Rother R. P. et al., 2005). Die Abnahme der NO-Konzentration ist mit verantwortlich für eine Dystonie der glatten Muskulatur, eine Thrombopathie und eine endotheliale Dysfunktion (Rother R. P. et al., 2005).

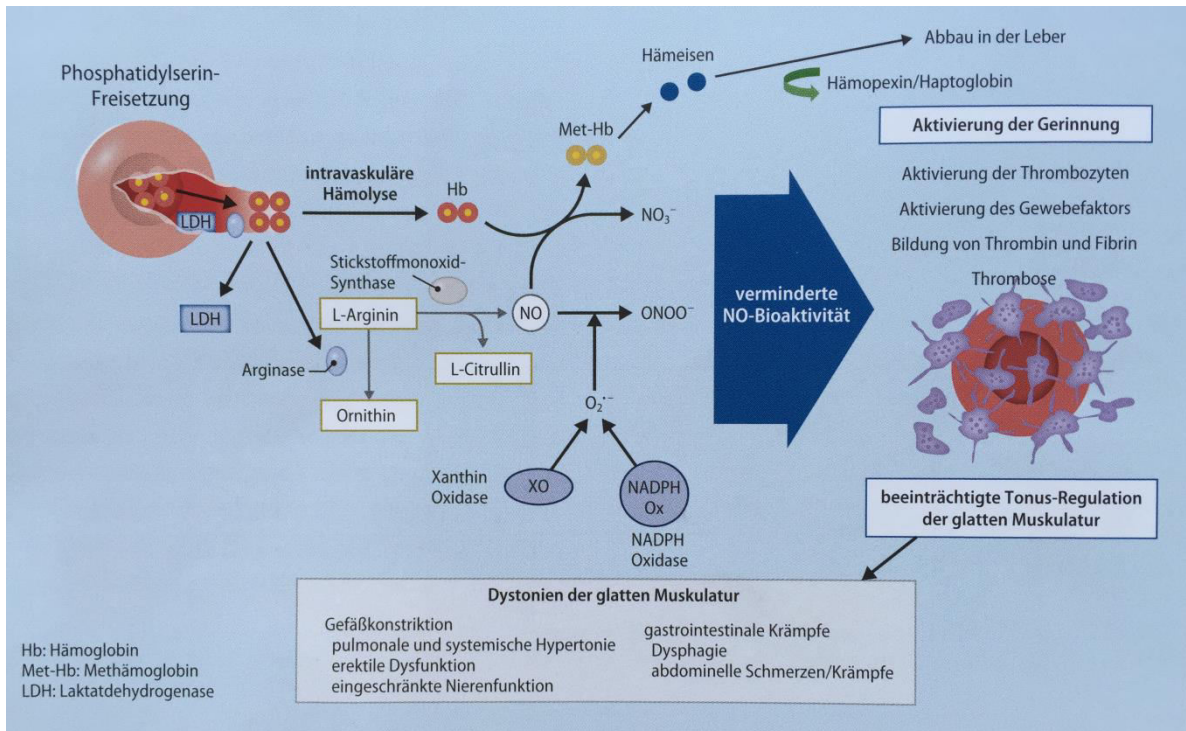


Abb. 3: Pathophysiologie der PNH: Pathophysiologisch steht bei der PNH die intravasculäre Hämolyse der PNH Erythrozyten mit der daraus resultierenden Reduktion der Verfügbarkeit von NO im Vordergrund (aus Röth A., 2016).

1.1.8 Prognose und Mortalität

Der Verlauf der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie kann unterschiedlich sein. Einige Patienten haben einen akuten Verlauf der Krankheit innerhalb von Monaten, die meisten zeigen aber einen chronischen Verlauf über Jahre oder Jahrzehnte. In den meisten Studien beträgt die mediane Überlebenszeit 10 bis 22 Jahre nach Diagnosestellung (Dacie J.V. et al., 1972; Socié G. et al., 1996; de Latour R. P. et al., 2008).

Eine spontane Heilung wurde in fünfzehn Prozent der Fälle beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür kann eine begrenzte Lebenszeit der PNH-Klone sein (Hillmen P. et al., 1995).

Man unterscheidet anhand der Klinik und dem Verlauf der Erkrankung

entsprechend der Empfehlung der „International PNH Interest Group“ (IPIG) die klassische PNH, mit anderen Knochenmarkerkrankungen (AA, MDS, MPN) assoziierte PNH und schließlich die subklinische PNH (Parker C. J. et al., 2005). Bei der klassischen Form der PNH steht die intravasale Hämolyse im Vordergrund, die klinisch und laborchemisch nachweisbar ist. Eine Knochenmarkdiagnostik weist in diesem Fall keinen Anhalt für eine andere Erkrankung auf. Dagegen weist die PNH, die mit einer Knochenmarkerkrankung assoziiert ist, am häufigsten eine aplastische Anämie oder einem Myelodysplastischem Syndrom (MDS) zusammen mit der klinisch und laborchemisch nachweisbaren Hämolyse auf. Patienten der subklinischen Gruppe weisen keine Hämolyse auf, jedoch ist in durchflusszytometrischen Untersuchungen ein kleiner Anteil an GPI-defizienten PNH Zellen nachweisbar.

Die häufigste Todesursache bei PNH Patienten sind Thrombosen innerhalb des venösen Systems (Rosse W .F. et al., 2004; Socié G. et al., 1996). Tödlich verlaufende Blutungen können zusätzlich im Rahmen der Erkrankung auftreten, besonderes im Gastrointestinaltrakt und im zentralen Nervensystem. Auftretende Infektionen stellen einen weiteren Anteil der Todesursachen dar. Die im Zusammenhang mit der PNH auftretenden anderen Knochenmarkerkrankungen, wie der akute Leukämie (AML) oder dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) können ebenfalls zum Tod der PNH Betroffenen führen. Etwa 10 % der Patienten sterben an den Folgen einer mit der PNH assoziierten aplastischen Anämie (Hill A. et al., 2007). Bei 8-18% ist ein Nierenversagen die Todesursache der PNH Patienten (Nishimura J. et al., 2004). Therapeutisch bedingte Todesursachen können durch Komplikationen bei einer Knochenmarktransplantation oder durch Bluttransfusionen sehr selten auftretende Hämosiderose sein (Socié G. et al., 1996).

Todesursachen
Primärerkrankungsbedingt:
Thrombosen
Blutungen
Infektionen
Akute Leukämien
Myelodysplastische Syndrom
Niereninsuffizienz
Therapiebedingt:
Infektionen
Hämosiderose

Tab. 2: Todesursachen bei PNH Patienten.

2 Diagnostik und Differentialdiagnostik

Da sich die Symptomatik der PNH vielfältig und unspezifisch darstellt, ist die Diagnose der PNH schwer zu stellen, denn die Krankheit wird oft übersehen und erst nach längerer Zeit eindeutig diagnostiziert (Röth A. et al., 2009).

Der Goldstandard der PNH Diagnose ist die Durchflusszytometrie des peripheren Blutes (Schrezenmeier H. et al., 2011). Die Indikation eine Durchflusszytometrie durchzuführen sind unter anderem folgende Befunde: nachgewiesene intravasale Hämolyse, bereits diagnostizierte PNH assoziierte Erkrankungen, Thrombosen unklarer Genese und therapieresistente Eisenmangelanämien (Parker C. et al., 2005).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die einzelnen GPI-defizienten Zellfraktionen zu identifizieren und den Grad der Defizienz festzustellen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich auch kleine PNH-Klone bei Diagnosestellung nachzuweisen (Röth A. et al., 2011). Dabei wird die Expression von GPI-verankerter Proteinen auf der Oberfläche verschiedener Zellreihen bestimmt. Es wird zwischen Zellen mit vollständigem Verlust (Typ-III-Zellen) und Zellen mit teilweisem Oberflächenprotein Verlust (Typ-II-Zellen) unterschieden. Zellen mit normal ausgebildeten Oberflächenproteinen werden als Typ-I-Zellen bezeichnet (Holguin M. H. et al., 1989).

Um die PNH Diagnose sicher zu stellen, ist es notwendig, das Fehlen von mindestens zwei unterschiedlichen GPI-verankerten Molekülen auf mindestens zwei Zellreihen nachzuweisen (Röth A. et al., 2009). Die Patienten sollten nach Möglichkeit zuvor keine Bluttransfusion erhalten haben, da Erythrozytenkonzentrate die Anzahl der Zellen mit normaler Expression der Oberflächenmembranproteine erhöhen. (Parker C. J. et al., 2005). Die Größe des PNH-Klons kann am besten anhand des Anteils der GPI-defizienten Granulozyten beurteilt werden, da deren Anzahl durch eine Transfusion nicht verändert wird (Rosse W. F. et al., 2004). Darüber hinaus gilt die Bestimmung der Anzahl der Granulozyten als genauer für die PNH Diagnose, da Granulozyten nicht durch Hämolyse zerstört werden (Piedras J. et al., 2000)

Bei der Erstdiagnose der PNH mit einem großen PNH-Klon wird empfohlen, die Klongröße alle sechs Monate für zwei Jahre lang zu kontrollieren. Die durchflusszytometrische Untersuchung hilft auch, die Größe des PNH-Klons im Verlauf zu beobachten. Verändert sich die Klongröße oder die klinische Symptome, müssen die Untersuchungsintervalle der Analysen individuell angepasst werden. Bei einer stabilen Klongröße sowie unter der Eculizumab Therapie sollte die Klongröße Untersuchung einmal jährlich durchgeführt werden. Patienten mit aplastischer Anämie oder MDS und einem kleinen PNH-Klon sollten zunächst einmal jährlich kontrolliert werden (Hillmen P. et al., 2010; Clark D. A. et al., 1981).

Zusätzlich zur Durchflusszytometrie gehört zur PNH Diagnostik der direkte Coombs-Test, auch direkter Antiglobulin-Test (DAT) genannt. Der Coombs-Test ist bei der PNH in der Regel negativ (Röth A. et al., 2009). Allerdings fällt der Coombs-Test bei Patienten unter Eculizumab Therapie durch eine nun veränderte extravaskuläre Hämolyse meistens positiv aus (Röth A. et al., 2010).

Andere ältere diagnostische Untersuchungsmethoden sind weniger spezifisch und weniger sensitiv und sollten heute nicht mehr angewendet werden: Die erhöhte Lysebereitschaft von PNH Erythrozyten kann im Zuckerwasser- und Säure-Hämolyse/HAM-Test nachgewiesen werden (Kliche K. O. et al., 1990). Diese beiden Tests galten bis zur Entdeckung des GPI-Defektes und dem routinemäßigen Nachweis fehlender GPI-verankerter Oberflächenproteine durch Fluoreszenz-Durchflusszytometrie als Standarddiagnostik.

Die Laborbefunde der PNH zeigen eine hämolytischen Anämie mit einem negativen

Coombs-Test. Die Erythrozyten zeigen eine normale osmotische Resistenz. Auffällige Laborwerte, die auf eine Hämolyse hinweisen, sind erhöhte Werte der Laktat-Dehydrogenase, ein erhöhtes indirektes Bilirubin, eine Verminderung der Serumeisens, eine Retikulozytose und eine Polychromasie. Neben der Anämie könnte sich eine Leuko- und/oder eine Thrombozytopenie abzeichnen, auch eine relative Lymphozytose ist möglich (Hartmann R. C. et al., 1959). Dagegen sind Sphärozyten oder andere außerordentliche Zellen im Blutbild nicht zu finden. Die charakteristische Hämosiderinurie kann mit der Berliner-Blau-Färbung diagnostiziert werden.

Die Knochenmarkdiagnostik von PNH Patienten vervollständigt die Diagnostik bezüglich einer Schädigung der Stammzellen. Das Knochenmark eines PNH Patienten zeigt eine vermehrte Zelldichte. Die Erythrozyten werden vermehrt nachgebildet, die Anzahl der Retikulozyten ist deutlich erhöht, wie es bei einem typischen Befund der hämolytischen Anämie der Fall ist (Kliche K. O. et al., 1990).

Mögliche Laborbefunde der PNH
<ul style="list-style-type: none">• Hämolytische Anämie mit negativem Coombs-Test• Normale osmotische Resistenz der Erythrozyten• Verminderung des Haptoglobins• Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH)• Erhöhung des indirekten Bilirubins• Verminderung des Serumeisens• Retikulozytose• Polychromasie• Leukozytopenie• Thrombozytopenie• Hämosiderinurie

Tab. 4: Laborbefunde bei PNH.

3 Therapieansätze

Die verschiedenen Therapiemaßnahmen bei PNH lassen sich in supportive und kurative Maßnahmen unterteilen. Die einzige kurative Therapiemaßnahme ist die allogene Knochenmarktransplantation.

Zu den supportiven Therapien zählen:

- Substitution von Erythrozytenkonzentraten
- Erythropoetinsubstitution bei relativem oder absoluten Erythropoetinmangel
- Folsäure-, ggf. Eisensubstitution
- Antibiotika bei Behandlung bakteriellen Infektionen
- Antikoagulation, primärprophylaktisch, therapeutisch und postthrombotisch
- Immunsuppressive Behandlung
- Komplementinhibition mit Eculizumab

3.1 Supportive Therapiemaßnahmen

Das Wesentliche der symptomatischen Therapie einer PNH Erkrankung ist die Transfusion von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten. Es ist jedoch nicht notwendig gewaschenen Konzentrate zu verwenden. Es wurde nicht bestätigt, dass residuelles Spenderplasma transfundierter Konzentrate eine hämolytische Krisen auslösen könnte (Röth A. et al., 2009).

Eine Verabreichung von rekombinantem Erythropoetin wird im Falle eines absoluten oder relativen Erythropoetinmangels wie z.B. bei einer chronischen Niereninsuffizienz vorgesehen. Dadurch steigt die Produktion von GPI-defekten Erythrozyten und damit die mögliche Gefahr, eine hämolytische Krise zu entwickeln. Deshalb sollte in dieser Situation eine engmaschige Kontrolle der Hämolyseparameter stattfinden.

Da PNH Patienten viel Eisen durch die Hämoglobin- und Hämosiderinurie verlieren, ist eine orale Eisensubstitution erforderlich. Eine intravenöse Gabe von Eisen sollte vermieden werden, da dies zu einer Steigerung der Erythropoese und der Anzahl der PNH Erythrozyten führen kann, was eine hämolytische Krise auslösen kann. Eine Substitution von Folsäure (5 mg/Tag p. o.) und von Vitamin B12 bei einem Mangel ist ebenfalls sinnvoll, da deren Verbrauch bei einer kompensatorisch

gesteigerten Erythropoese im Knochenmark erhöht ist (Parker C. J. et al., 2005; Röth A. et al., 2009).

Es wurde beobachtet, dass Infektionen das Auftreten von hämolytischen Schüben begünstigen, da diese zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen können. Deshalb sollten PNH Patienten bei einem bakteriellen Infekt zeitnah antibiotisch behandelt werden. Die Arbeitsgruppe von Hall konnte in einer retrospektive Studie zeigen, dass das Risiko für das Auftreten einer Thrombose innerhalb von zehn Jahren bei der Patientengruppe mit einem PNH-Klon größer als 50% GPI-defiziente Granulozyten um den Faktor acht erhöht war, gegenüber der Patientengruppe mit einem kleinen Klon (Hall C. et al., 2003).

PNH Patienten mit diagnostizierten Thrombosen sollten lebenslang mit Antikoagulanzen behandelt werden. Ein Rezidivrisiko für thromboembolische Ereignisse besteht jedoch auch trotz einer effektiven Antikoagulation (Hill A. et al., 2013). Hierbei werden standardmäßig Gerinnungshemmer wie Marcumar etc. eingesetzt. Alternativ könnte auch eine systemische oder lokale Lysetherapie z. B. bei dem Budd-Chiari-Syndrom diskutiert werden (Hill A. et al., 2003).

3.2 Komplementinhibition durch Eculizumab

Eine neue Therapiestrategie stellt die Inhibition des Komplementsystems durch Eculizumab (Soliris[®]) dar. Dieser humanisierte monoklonale Antikörper bindet den Komplementfaktor C5, verhindert dessen Spaltung in die Fragmente C5a und C5b und blockiert damit die nachfolgende Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 (MAC) (Röth A. et al., 2009, DeZern A. E: et al., 2015).

Eculizumab verhindert die terminale Komplementkaskade und dadurch die komplementvermittelte Zerstörung der PNH Erythrozyten (Thomas T. C. et al., 1996).

Seit der Zulassung von Eculizumab im Juni 2007 in Europa ist die Therapie mit dem Medikament bei symptomatischen PNH Patienten zum Goldstandard geworden.

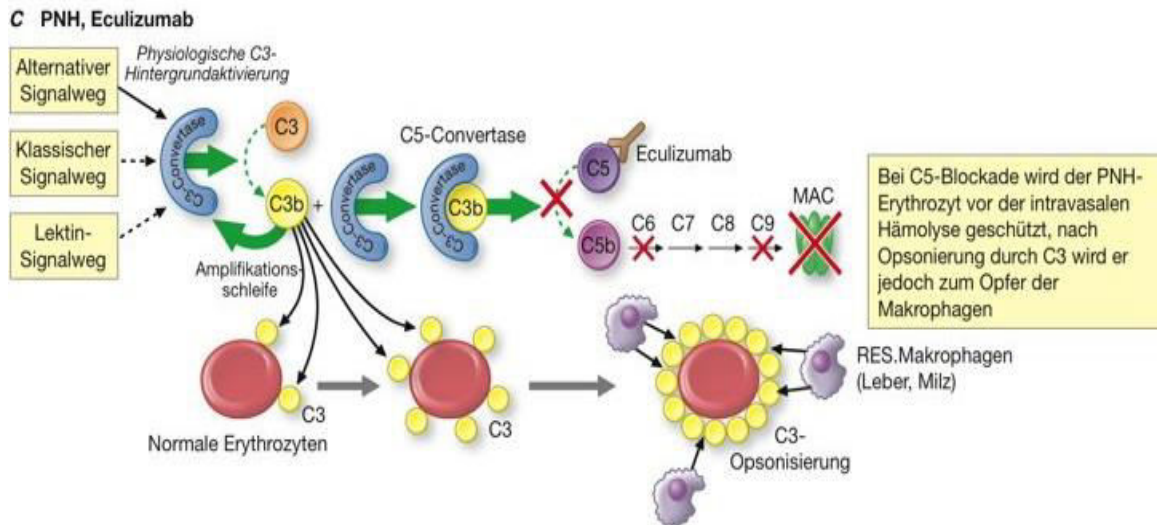


Abb. 4: Wirkmechanismus von Eculizumab bei PNH (aus Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage).

3.2.1 Ergebnisse klinischer Studien zu Eculizumab

Die Arbeitsgruppe von Hillmen veröffentlicht 2006 die Ergebnisse einer randomisierten, placebokontrollierten, multizentrischen Phase 3 Studie "TRIUMPH" (Hillmen P. et al., 2006). Ziel dieser Studie war es herauszufinden, wie sich unter der Gabe von Eculizumab der Hämoglobin Wert stabilisiert und in welchem Umfang die Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate reduziert werden konnte.

Zusätzlich wurden die labormedizinischen Parameter für die intravasale Hämolyse und die Veränderung der Lebensqualität ausgewertet.

Für die Studie wurden PNH Patienten ausgewählt, die mindestens vier Transfusionen in den vorangegangenen 12 Monaten erhalten hatten und die einen mittels Durchflusszytometrie bestätigten Anteil von mindestens 10% PNH Zellen und eine Thrombozytenzahl von mindestens 100/nl aufwiesen.

Die insgesamt 87 transfusionsabhängigen PNH Patienten wurden randomisiert und entweder der Eculizumab- (n = 43) oder der Placebogruppe (n = 44) zugeordnet.

Hierbei erhielten die Patienten der ersten Gruppe eine wöchentliche intravenöse Eculizumab Dosis von 600 mg über einen Zeitraum von vier Wochen. Hiernach wurde die Dosis auf 900 mg pro Woche erhöht und bis zum Untersuchungsende nach der 26. Woche beibehalten.

In der mit Eculizumab behandelten Gruppe wurde bei 49% der Patienten (21 von

43) eine Stabilisierung des Hämoglobin Wertes mit einer Verbesserung der Anämie erreicht, im Vergleich zu 0% der Patienten in der Placebogruppe. Eine komplette Unabhängigkeit von Transfusionen wurde bei 51% der Patienten des Eculizumab Arms erreicht, im Vergleich dazu erreichte kein Patient (0 von 44) der Placebogruppe eine Stabilisierung des Hämoglobin Wertes ohne Transfusion.

Während der Studie benötigte keiner der Patienten der Eculizumabgruppe Erythrozytenkonzentrat, im Vergleich dazu benötigten die Patienten in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 10 Einheiten im selben Zeitraum.

Bei der Auswertung der LDH Werte im Serum kam es in der Eculizumabgruppe zu einer Verminderung um 85,8% im Vergleich zu der Placebogruppe.

Eine klinisch signifikante Verbesserung der Lebensqualität der PNH Patienten wurde unter der Eculizumab Therapie festgestellt (FACIT-Fatigue und EORTC-QLQ-Fragebogen). Die typischen PNH Symptome, wie z.B. Dysphagie, abdominale Schmerzen, oder erektile Dysfunktion konnten ebenfalls durch Eculizumab verbessert werden (Hill A. et al., 2005; Rother R. P. et al., 2005).

Bei einer nicht placebokontrollierten multizentrischen Langzeitstudie "SHEPHERD" (Brodsky R.A. et al., 2008), die über einen Zeitraum von 52 Wochen dauerte, wurden insgesamt 97 PNH Patienten nach einheitlichen Vorgaben mit Eculizumab behandelt. Im Unterschied zur "TRIUMPH"-Studie wurden die Einschlusskriterien der PNH Patienten breiter gefasst. Statt mindestens vier Transfusionen pro 12 Monate wurden auch Patienten mit mindestens einer Bluttransfusion in 24 Monaten zugelassen. Ebenso wurde das Einschlusskriterium der Thrombozytenzahl von 100/nl auf 30/nl herabgesetzt. Ziel dieser Studie war die Erprobung der Langzeitverträglichkeit und Wirksamkeit von Eculizumab.

Durch die Gabe von Eculizumab konnte über die Messung des LDH Wertes langfristig eine 87%ige Reduktion der Hämolyse festgestellt werden. Zusätzlich sank während der Studie der Transfusionsbedarf. Die Gesamtzahl der Erythrozyten Transfusionen reduzierte sich um 52%, durchschnittlich von 12,3 auf 5,9 Einheiten, wobei 51% der Patienten während der Studienzeit von einer Bluttransfusion gänzlich unabhängig wurden.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten ebenfalls auf eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität mit Reduktion der Gabe von Erythrozytenkonzentraten und gleichzeitig einem geringen Vorkommen von unerwünschten PNH Komplikationen.

Die Auswertung aller 195 Patienten aus den beiden Studien ergab mit über 250 Behandlungsjahren von Eculizumab behandelten PNH Patienten eine wesentliche Reduktion des Risikos für thromboembolische Ereignisse um 85% (7,37 vs. 1,07 thromboembolische Ereignisse pro 100 Patientenjahre).

Zusätzlich konnten auch thromboembolische Ereignisse bei PNH Patienten durch eine Sekundärprophylaxe signifikant um 94% reduziert werden (10,61 vs. 0,62 thromboembolische Ereignisse pro 100 Patientenjahre) (Hillmen P. et al., 2007).

Bei den 195 mit Eculizumab behandelten PNH Patienten waren keine schwerwiegenden Nebenwirkungen aufgetreten. Die Patienten berichteten während der Behandlung lediglich über unspezifische Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Kopf- oder Rückenschmerzen, respiratorische Infekte, Übelkeit, Pyrexie, Myalgie und Müdigkeit, die in den meisten Fällen nur leicht bis mittelschwer ausgeprägt waren. In der TRIUMPH-Studie waren Kopfschmerzen die am häufigsten beobachtete Nebenwirkung unter Eculizumab. Dies ist wahrscheinlich als Folge der effektiven Unterbrechung der intravasale Hämolyse zu sehen. Das fehlende freie Hämoglobin führt zu einem Anstieg der Stickstoffkonzentration, die eine vasodilatatorische Wirkung ausübt, im Sinne eines „Nitrat-Kopfschmerzes“. Die Kopfschmerzen waren nur leicht und auf die beiden Erstgaben des Medikamentes begrenzt.

Durch die Eculizumab Therapie wird ein Anteil der natürlichen Immunabwehr gehemmt, dadurch steigt das Risiko für eine Meningokokkeninfektion. Nach der Fachinformation von Eculizumab (Fachinformation Soliris September 2015) wurden im Rahmen der klinischen Prüfungen drei Fälle von Meningokokkeninfektion beobachtet. Zwei Infektionen traten bei geimpften und einer bei einem ungeimpften Patienten auf. Deshalb muss zwei Wochen vor jeden Therapiebeginn eine Impfung gegen Meningokokken mit einem tetravalenten Konjugatimpfstoff durchgeführt werden. Da die Therapie mit Eculizumab lebenslang durchgeführt wird, muss die Meningokokken Impfung alle drei Jahre wiederholt werden.

Es soll weiterhin eine engmaschige Messung der LDH Werte als ein Parameter für die intravasale Hämolyse bei den mit Eculizumab behandelten Patienten, stattfinden. Hier kann gegebenenfalls eine Verkürzung des Zeitintervalls, oder eine Anpassung der Dosis notwendig sein (Fachinformation Soliris September 2015).

3.3 Stammzelltransplantation

Die einzige kurative Therapie der PNH ist die allogene Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation. Die Indikation für eine allogene Transplantation sollte sehr eng gestellt werden. Die Knochenmarktransplantation assoziierte Krankheits- und Sterberate, die in älteren Studien erhoben wurde, liegen bei 50-60% (Röth A. et al., 2009). Diese Eingrenzungen werden hauptsächlich durch die hohe Rate der Transplantatabstoßungen und Infektionskomplikationen festgelegt (Matos-Fernandez N. A. et al., 2009).

Momentan beschränkt sich die Transplantationsindikation auf schwere Krankheitsverläufe, wie zum Beispiel eine schwere und nicht beeinflussbare hämolytische Anämie, wiederkehrende, ausgeprägte und lebensbedrohliche Thrombosen, eine schwere aplastische Anämie mit Übergang zu einem myelodysplastischen Syndrom oder eine Leukämie (Röth A. et al., 2009; Schubert J. et al., 2013; Schubert J. et al., 2015).

4 Fragestellung

Die Effektivität der Langzeittherapie mit Eculizumab bei PNH Patienten wurde in klinischen Studien gezeigt. Es existierten zum Zeitpunkt des Beginns der Promotion jedoch nur wenige Langzeitdaten über die Konsequenzen einer chronischen intravasalen Hämolyse bei PNH Patienten. Um die Auswirkungen im zeitlichen Verlauf besser abschätzen zu können, führten wir in der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen eine retrospektive Studie durch. Hierbei wurden retrospektive Daten von PNH Patienten in Hinsicht auf das Vorkommen einer intravasalen Hämolyse, das Vorliegen einer Anämie, dem Transfusionsbedarf und den Eisenwerten im Blut ausgewertet. Diese Patienten wurden dauerhaft mit Eculizumab behandelt.

Neben dem allgemeinen Therapieverlauf wurden vor allem die einzelnen Hämolyseparameter ausgewertet. Somit sollten das detaillierte Ansprechen der Patienten, die Wirksamkeit und die Sicherheit der Anwendung des Medikamentes bei langfristiger Therapie untersucht werden.

5 Patienten und Methoden

5.1 Patienten

In dieser retrospektiven Studie wurden alle Patienten aufgenommen, bei denen in der Klinik für Hämatologie des Essener Universitätsklinikums zwischen den Jahren 1979 und 2010 die Diagnose der PNH mithilfe der Durchflusszytometrie gestellt worden war.

Von den insgesamt 51 PNH Patienten, erhielten 32 Patienten Eculizumab. Einige Patienten hatten bereits in der TRIUMPH Studie (n=7) und in der SHEPHERD Studie (n=4) teilgenommen.

Die Kriterien für die Eculizumab Behandlung waren eine symptomatische Hämolyse mit einem PNH-Klon über 10% und einer Hämolyse mit einem erhöhten LDH Wert. Alle Eculizumab behandelten Patienten bekamen zwei Wochen zuvor eine Impfung gegen *Neisseria meningitidis*, die alle drei Jahre darauf folgend wiederholt wurde. Zu Behandlungsbeginn mit Eculizumab lag bei keinem Patienten eine Infektion vor. Bei keinem Patienten musste während der Therapie eine Knochenmarktransplantation durchgeführt werden.

5.2 Eculizumab Therapie

Die Eculizumab Behandlung begann mit einer intravenösen Gabe als Bolus von 600 mg Eculizumab. Diese Behandlung wiederholte sich einmal wöchentlich für die Dauer von 4 Wochen, gefolgt von einer Dosierung von 900 mg alle 2 Wochen. Die Behandlungszeit am Patienten betrug etwa 25-35 Minuten mit einer 60-minütigen Nachbeobachtung. Der Median für die Therapiedauer lag bei 29 Monaten (Intervall 1-70 Monaten).

5.3 Auswertung der einzelnen Parameter

Um den Effekt einer terminalen Inhibition des Komplementsystems durch Eculizumab zu beurteilen, wurden folgende Parameter ausgewertet:

- LDH
- Haptoglobin
- Hämopectin

- Bilirubin
- Hämoglobin
- Transfusionsbedarf
- Eisenparameter im Serum
- Retikulozyten und Retikulozytenproduktionsindex (RPI)

Der RPI, auch als korrigierte Retikulozyten Anzahl bezeichnet, wird bewertet, da die absolute Retikulozytenzahl bei Anämiepatienten fehlleitend ist. Er wird berechnet aus der Retikulozytenzahl und dem Hämatokrit.

Der RPI wurde wie folgt berechnet:

$$\text{RPI} = \text{tatsächlicher Hämatokrit} \times \text{Retikulozyten \%} / \text{Korrelationsfaktor (Tage)} \times 0,45$$

(ideale Hämatokrit)

Hämatokrit-Korrelationsfaktor: 0,45-1 Tag;

0,35-1,5 Tage;

0,25-2 Tage;

0,15-2,5 Tage.

Der Normwert bei einem gesunden Patienten liegt bei 1. Ein RPI < 2 zeigt eine Anämie mit verminderter oder ungenügender Produktion von Retikulozyten an. Ein RPI > 2 wurde mit einer Anämie mit einer ausreichenden Produktion von Retikulozyten assoziiert.

Der Hämoglobin Spiegel wurde gemessen und in g/dl angegeben. Es wurden die Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate 12 Monate vor Therapiebeginn und unter der Therapie beurteilt. Zusätzlich zur hämatologischen Beurteilung wurden der monospezifische direkte Coombs-Test und die Immunfixationen herangezogen.

5.4 Beurteilung der Eculizumab Therapie

Das Ansprechen auf die Eculizumab Therapie wurde eingeteilt in Abhängigkeit der Veränderungen der hämatologischen Parameter (Risitano A. M. et al., 2009):

- a. "Optimales hämatologisches Ansprechen": Hämoglobinspiegel von ≥ 10 g/dl und kein Transfusionsbedarf
- b. "Sehr gutes hämatologisches Ansprechen": Hämoglobinspiegel von ≥ 8 g/dl

und kein Transfusionsbedarf

- c. "Gutes hämatologisches Ansprechen": Patienten, deren Transfusionsbedarf um 50% reduziert wurde, mit einer weiteren Notwendigkeit von Bluttransfusionen

5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren von suspendierten Einzelzellen, in dem die Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit an einem fokussierten Lichtstrahl vorbeifließen. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Morphologie und einer spezifischen Fluoreszenzfärbung charakteristische Lichtsignale aus. Die Anregung erfolgt über einen Laser und das emittierte Licht wird über Detektionsfilter und einen Photomultiplier gemessen. Zugleich kann man im Zytometer mit dem gestreuten Licht spontane Emissionen im farbigen Lichtspektrum messen. Man verwendet Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zelle binden und ermittelt das Maß an fluoreszierendem Licht. Durch den Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und damit die Informationsdichte erhöht werden.

Es ist möglich in einer Messung verschiedene Marker zu detektieren und mit fluoreszierenden Verbindungen verschiedene Zelleigenschaften zu messen. So können fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper sichtbar gemacht werden. Zellbestandteile, wie die DNA, können mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen direkt nachgewiesen und funktionelle Zelleigenschaften untersucht werden.

Zu einer der häufigsten Anwendungen zählt die Detektion von fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern, die die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene detektieren.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von PNH Patienten besteht in der semiquantitativen Erfassung der Expressionsmuster von CD55 und CD59 auf Erythrozyten, von CD14 und CD48 auf Monozyten und von CD24 und CD66b auf Granulozyten. Dabei wird die Expression verschiedener GPI-verankerter Proteinen auf der Oberfläche aller Blutzellen bestimmt. Der Nachweis von Zellen mit verminderter oder fehlender Expression kann Hinweis sein für das mögliche Vorliegen einer PNH.

Es wurde peripheres EDTA-Blut von PNH Patienten gewonnen. Für den Nachweis

wurden klinisch erprobte Kits von REDQUANT (Biocytex, Marseille, Frankreich) und von CELLQUANT (Biocytex, Marseille, Frankreich) verwendet, um die CD55 und CD59 Expression auf der Oberfläche von Erythrozyten und Granulozyten gemäß den Herstellerangaben nachzuweisen (Oelschlaegel U. et al., 2001). Darüber hinaus wurde FLAER kombiniert mit einer "Multiparameter Durchflusszytometrie" (CD45, CD33 und CD14) parallel für die Erkennung der GPI-defizienten PNH-Klone (Granulozyten) benutzt (Richards S. J. et al., 2000).

5.6 Direkter monospezifische Coombs-Test (DAT)

Der monospezifische Coombs-Test ist eine empfindliche Methode zum Nachweis von Antikörpern oder Komplement auf der Erythrozytenoberfläche. Bei den Antikörpern handelt es sich um monoklonale IgG-Antikörper, die bei verschiedenen Erkrankungen eine Bindung mit der Erythrozytenmembran eingehen.

Um solche mit Antikörpern beladene Erythrozyten, nachweisen zu können, werden die Erythrozyten aus dem zu untersuchenden Blut mit Coombs-Serum (Antihumanglobulin) inkubiert. Wenn im untersuchten Blut Antikörper gegen Erythrozyten vorhanden sind und diese entsprechend an den Erythrozyten gebunden vorliegen, verklumpen die rote Blutkörperchen als Agglutinationsprodukt aus und der Test ist als positiv zu bewerten. Bei der PNH dient der Test zum Nachweis von Komplement auf Erythrozyten und fällt in der Regel negativ aus.

5.7 Immunfixationsanalyse

Die Immunfixationsanalyse wurden auf einem Sebia System mit Hydragel 9 IF ausgeführt, gemäß der Anleitung der Hersteller (Sebia Elektrophorese, Norcross, GA, USA).

5.8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden mithilfe von statistischen beschreibenden Standardwerten analysiert, hierfür kam die SPSS Software von Windows Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) zur Anwendung. Es wurde der Vergleich jeweils zwischen klinischen und Laborwerten durchgeführt, in dem der gepaarte Wilcoxon-Test oder Student's t-Test verwendet wurde, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

6 Ergebnisse

6.1 Patientendaten

Für den Zeitraum von 2004 bis 2010 wurden insgesamt 51 Patienten mit PNH behandelt. Von diesen 51 Patienten wurden 32 PNH Patienten mit Eculizumab behandelt und ausgewertet. Die detaillierten Daten aller 32 mit Eculizumab behandelten Patienten, sind in der Tabelle 1 im Anhang aufgeführt. Der Median der Krankheitsdauer von der Erstdiagnose der PNH bis zu Beginn der Eculizumab Behandlung lag bei 9 Jahren (Wertebereich: 0,7-22 Jahre). Der Median der Eculizumab Therapiedauer lag bei 29 Monate (Wertebereich: 1-70 Monate).

6.1.1 Geschlechterverteilung

Von 32 Patienten, die in diese Studie aufgenommen wurden, waren 15 Frauen (46,9%) und 17 Männer (53,1%).

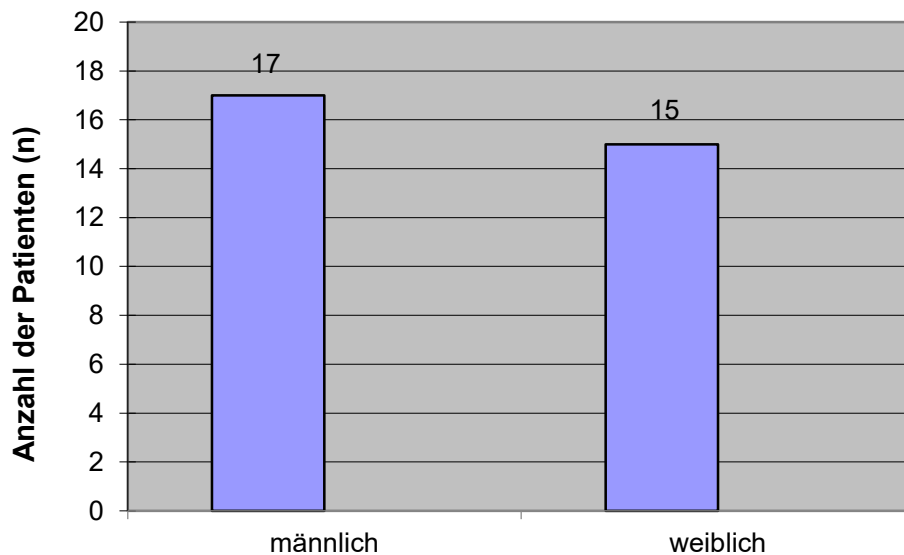


Abb. 5: Geschlechterverteilung der mit Eculizumab therapierten und untersuchten PNH Patienten, (n=32).

6.1.2 Altersverteilung

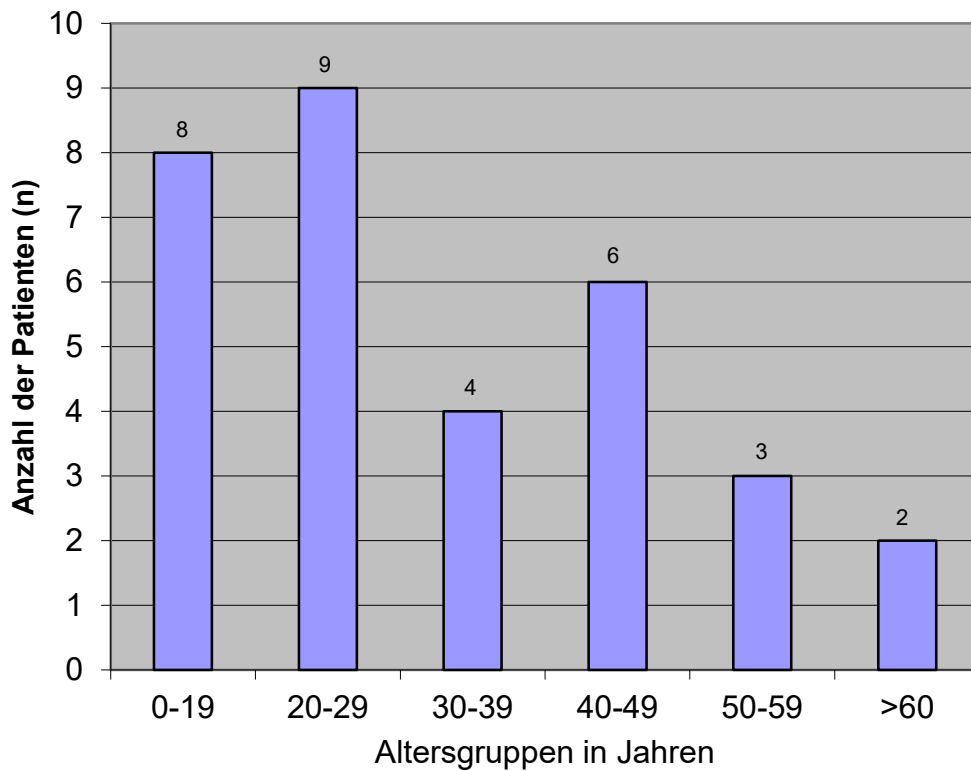


Abb. 6: Altersverteilung der mit Eculizumab behandelten Patienten, (n=32).

Der jüngste PNH Patient war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 11 Jahre alt und der älteste 80 Jahre (Median 26,5 Jahre). Einige Patienten berichteten über eine Zeitspanne vom Auftreten der ersten Symptome bis zur endgültigen Diagnosestellung der PNH von bis zu acht Jahren.

6.2.1 Dauer und Art der Therapie

Von den 32 Patienten, die in unserer Klinik behandelt waren, wurden 25 Patienten wegen einer symptomatischen hämolytischen PNH mit dem Medikament Eculizumab kontinuierlich behandelt.

Bei 7 Patienten war die Eculizumab Therapie abgebrochen worden.

11 Patienten haben im Anschluss eine Knochenmarktransplantation (KMT) erhalten.

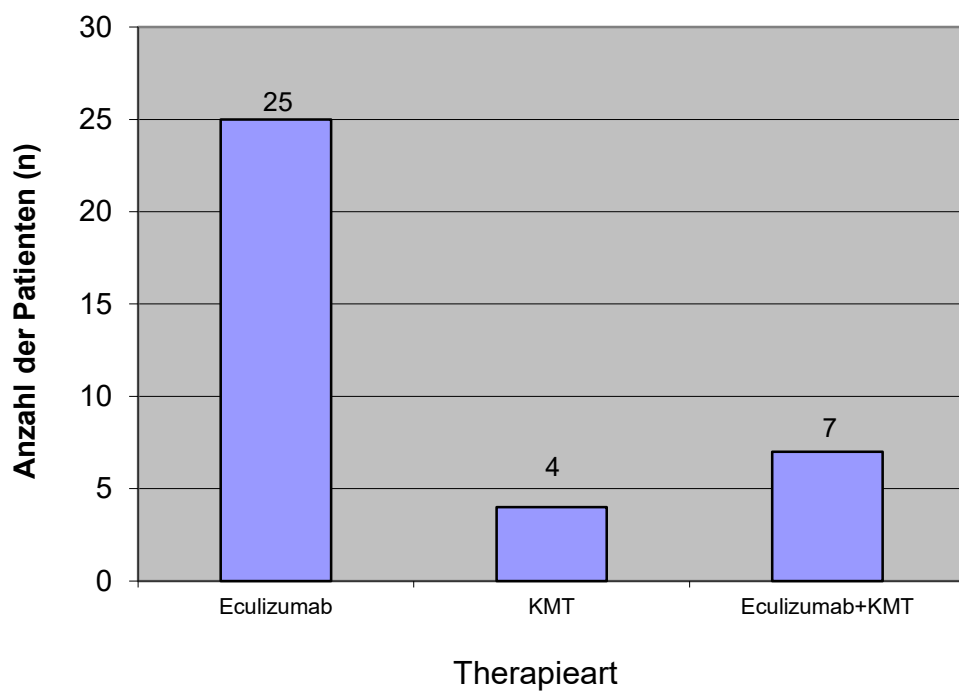


Abb. 7: Therapieart.

Mit Eculizumab wurden 25 Patienten behandelt, 4 Patienten unterzogen sich einer Knochenmarktransplantation (KMT) und 7 Patienten haben beides erhalten.

6.2.2 Ansprechen auf die Eculizumab Therapie

Von den 29 Patienten zeigten 19 (66%) keinen oder einen stark verringerten Transfusionsbedarf nach der Eculizumab Behandlung.

Basierend auf den Hämoglobingehalt und der Abhängigkeit von Bluttransfusionen wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt:

1. "Optimales hämatologisches Ansprechen": Hämoglobin Wert von ≥ 10 g/dl und kein Transfusionsbedarf. Zu der Gruppe mit einem optimalen Ansprechen auf die Eculizumab Therapie gehörten 11 Patienten (38%).
2. "Sehr gutes hämatologisches Ansprechen": Hämoglobin Wert von ≥ 8 g/dl und kein Transfusionsbedarf , hierzu zählten 8 Patienten (28%).
3. "Gutes hämatologisches Ansprechen": Patienten, deren Transfusionsbedarf um 50% reduziert wurde mit weiterer Notwendigkeit von Bluttransfusionen, hierunter fallen 10 Patienten (34%).

Nach dieser Einteilung konnten insgesamt 29 Patientendaten einbezogen werden, die ausreichend Daten für eine weitere Auswertung lieferten.

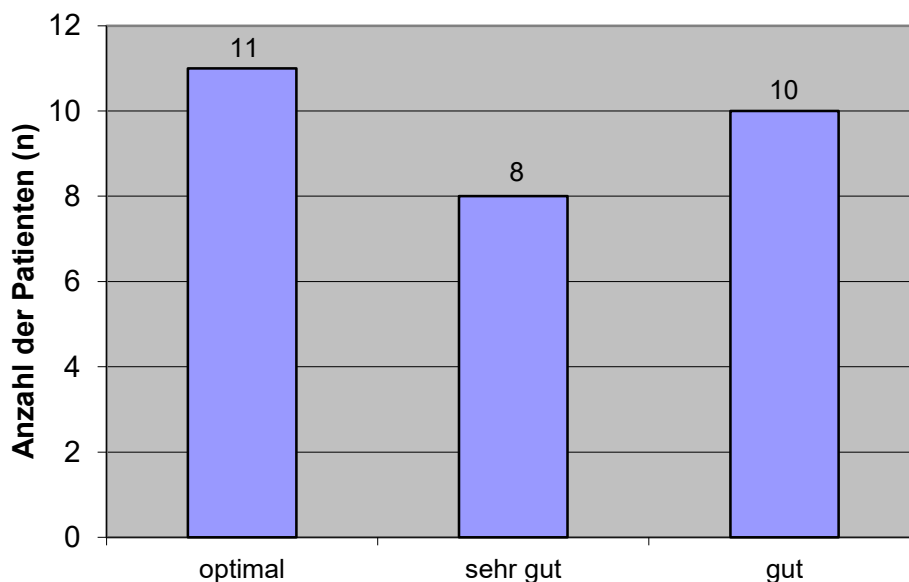


Abb. 8: Ansprechen der Patienten entsprechend des Hämoglobin Wertes und Transfusionsbedarf.

Das Ansprechen auf die Eculizumab Therapie bezogen auf den Altersmedian von 27 Jahren, konnte ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt werden, definiert nach Hämoglobingehalt und Transfusionsbedarf der Patienten unter der Therapie in optimales, sehr gutes und gutes Ansprechen.

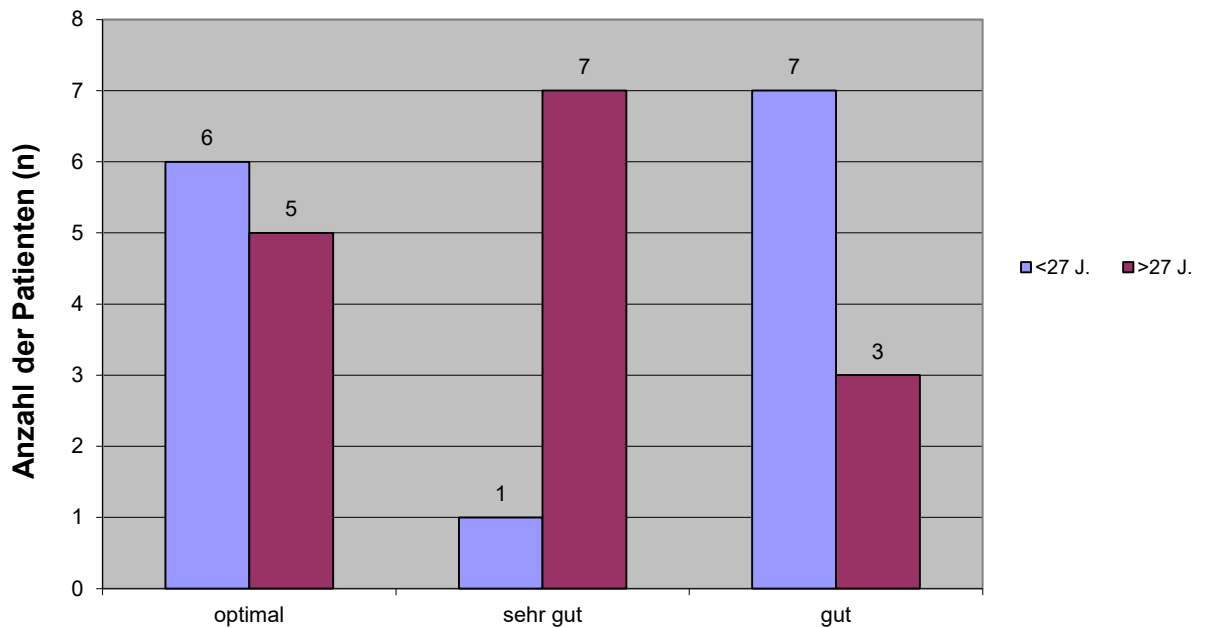


Abb. 9: Das Ansprechen der Patienten auf die Eculizumab Therapie nach dem Alter.

In der Gruppe des "optimalen hämatologischen Ansprechens" verhielt sich die Anzahl der unter 27-jährigen mit 6 Patienten (21%) fast gleich mit der Anzahl der über 27-jährigen Patienten (17%).

In der zweiten Gruppe des "sehr guten hämatologischen Ansprechens" war nur ein Patient (3%) unter 27 Jahre, hingegen 7 Patienten (25%) über 27 Jahre alt.

In der Gruppe der "guten hämatologischen Ansprache" fielen die Patienten, bei denen der Transfusionsbedarf um 50% reduziert wurde mit weiterer Notwendigkeit von Bluttransfusionen. Hierunter fallen insgesamt 10 Patienten, wobei 7 Patienten (24%) unter 27 Jahre und 3 Patienten (10%) über 27 Jahre alt waren.

6.2.3 Behandlungsverlauf

Die Behandlung mit Eculizumab wurde bei 7 Patienten (21,9%) abgebrochen. Bei drei Patienten kam es zu hämatologischen Komplikationen (n=3, 9%). Bei 2 Patienten wurde eine PNH assoziierte hämatologische Erkrankung diagnostiziert (MDS (n=1) OMF (n=1)), ein Patient hatte ein Rezidiv einer schweren Aplastischen Anämie. Diese Umstände führten dazu, dass die Eculizumab Therapie beendet wurde, ohne dass eine hämolytische Krise stattgefunden hat (definiert durch einen Hämoglobin Wert von unter 5 g/dl oder durch seine Reduktion über 4 g/dl in ≤ 1 Woche). Bei einer Patientin wurde die Eculizumab Therapie während der Schwangerschaft pausiert und hiernach fortgesetzt. Eine Patientin entschied selbst, die Eculizumab Behandlung zu beenden, um sich einer Knochenmarktransplantation zu unterziehen. Zwei Patienten starben, ein Patient an einer Sepsis, nach Komplikationen im Zusammenhang mit einer eingeklemmten Hernie und der andere Patienten an einer *Mucor*-Infektion, im Rahmen einer Knochenmarktransplantation.

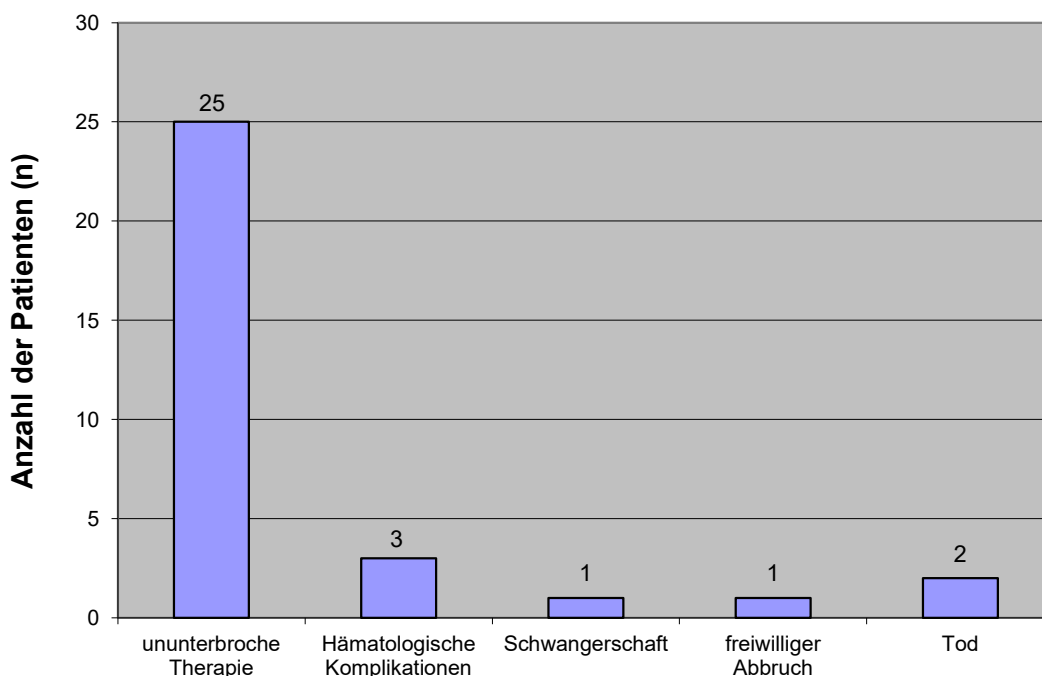


Abb. 10: Verteilung der Patienten, die sich durchgehend der Eculizumab Therapie unterzogen haben, oder diese abgebrochen haben wegen andere Erkrankungen, wegen Schwangerschaft, freiwillig, Tod.

6.2.4 Thromboembolische Komplikationen

Thromboembolische Ereignisse kamen bei 9 Patienten (28%) der 32 mit Eculizumab behandelten Patienten vor.

Am häufigsten kamen hierbei tiefe Beinvenenthrombosen bei 7 Patienten (22%) vor. Ein Patient (3%) hatte einen Myokardinfarkt, ein Patient erlitt sowohl tiefe Venenthrombose, als auch an einem Myokardinfarkt. Bei einem Patienten kam es zu einer Lungenembolie. Keine thromboembolische Ereignisse hatten 23 Patienten (72%).

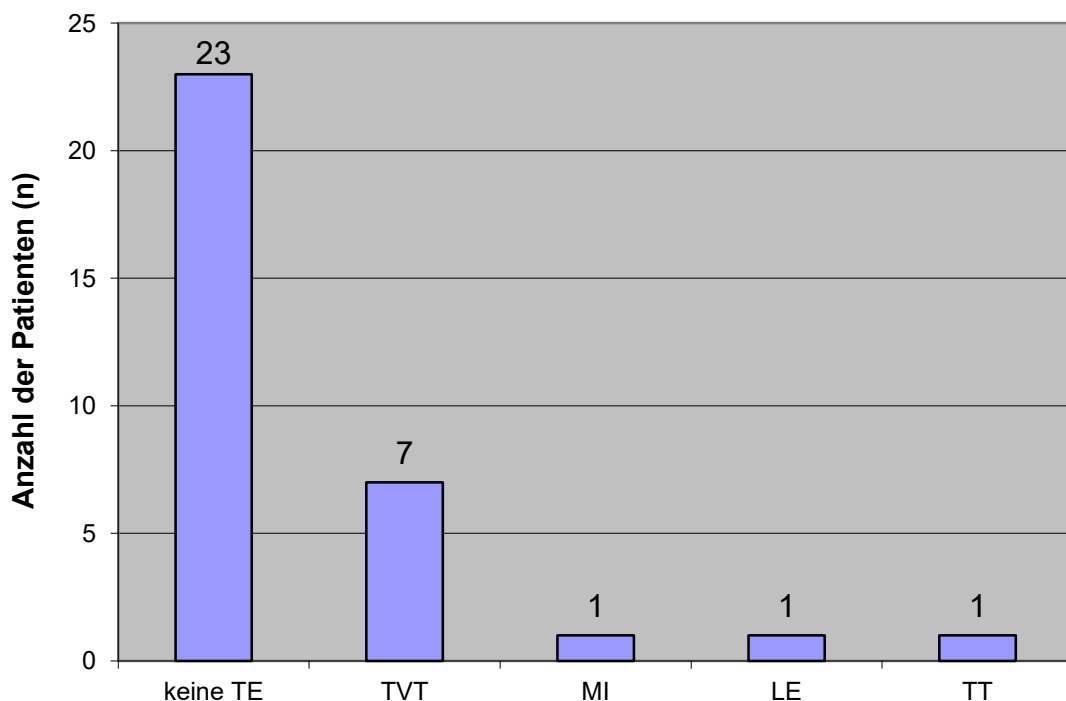


Abb. 11: Thromboembolische Ereignisse bei PNH Patienten (n=32) die während der Eculizumab Therapie aufgetreten sind. TE: thromboembolischen Ereignisse, TVT: tiefe Venenthrombose, MI: Myokardinfarkt, LE: Lungenembolie, TT: thrombotischer Tumor

6.2.5 Nebenwirkungen von Eculizumab

Generell war die Eculizumab Therapie gut und ohne relevante Komplikationen verträglich. Die am häufigsten vorkommenden Nebenwirkungen des Medikamentes waren Kopfschmerzen, die nur nach der ersten bzw. der zweiten Infusion auftraten.

Die schwerwiegendsten Komplikationen bei der PNH, wie thromboembolische Ereignisse, traten unter der Behandlung mit Eculizumab bei den untersuchten Patienten nur vereinzelt auf. Eculizumab als terminaler Komplementinhibitor führt zu einer Komplementdeaktivierung, durch den, in Abhängigkeit von individuellen Faktoren, das Risiko für eine invasive Meningokokkeninfektion ansteigt. In unserer Kohorte wurden weder nachgewiesene noch klinisch verdächtige Meningokokkeninfektionen beobachtet.

Es gab kein gehäuftes Auftreten von viralen oder anderen bakteriellen Infektionen während der chronischen Eculizumab Therapie. Es wurde auch keine Fälle mit unklarem Fieber registriert.

Neun (28%) der 32 mit Eculizumab behandelten Patienten hatten in ihrer Vorgeschichte eine mit Immunsuppressiva behandelte aplastische Anämie.

6.3 Veränderung der Hämolyseparameter unter Eculizumab Therapie

6.3.1 LDH Wert

Bei 30 Patienten wurde der Laktat-Dehydrogenase Wert (LDH) regelmäßig gemessen und ausgewertet. Die Bestimmung des LDH Wertes erfolgte vom ersten Tag der Eculizumab Therapie bis Ende 2010. Bei allen 30 Patienten sank der LDH Wert während der Eculizumab Therapie um 85 %. Vor der Behandlung betrug der Median 1911 U/l (Wertebereich 275,5-3360 U/l) und unter der Behandlung betrug der Median 270,5 U/l (Wertebereich: 143-940 U/l) ($p < 0,01$; Normbereich: 100-247 U/l).

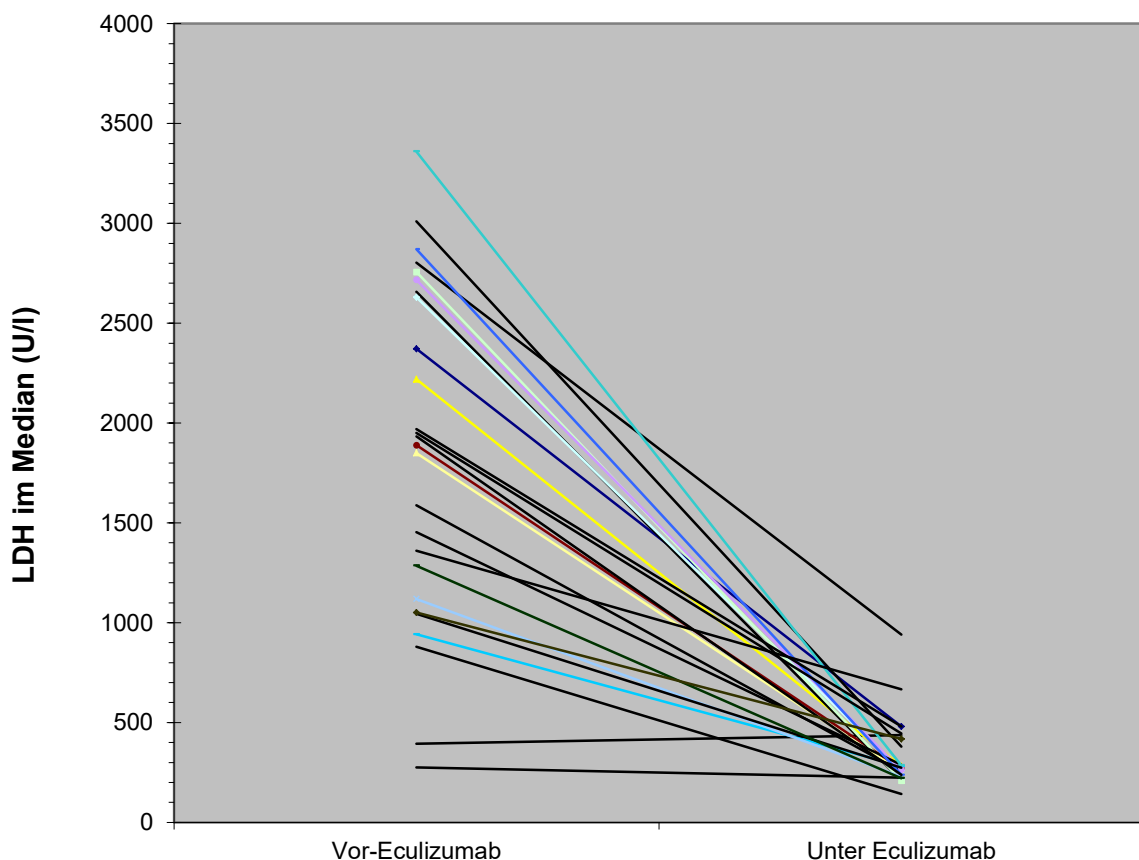


Abb. 12: LDH Werte im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=30).

6.3.2 Hämoglobin

Hämoglobin ist ein wichtiger Parameter für die Feststellung des Anämiegrades. In der Gruppe der Patienten, die optimal auf die Therapie reagierten, erhöhte sich der Hämoglobin Wert im Median von 9,4 auf 11,0 g/dl.

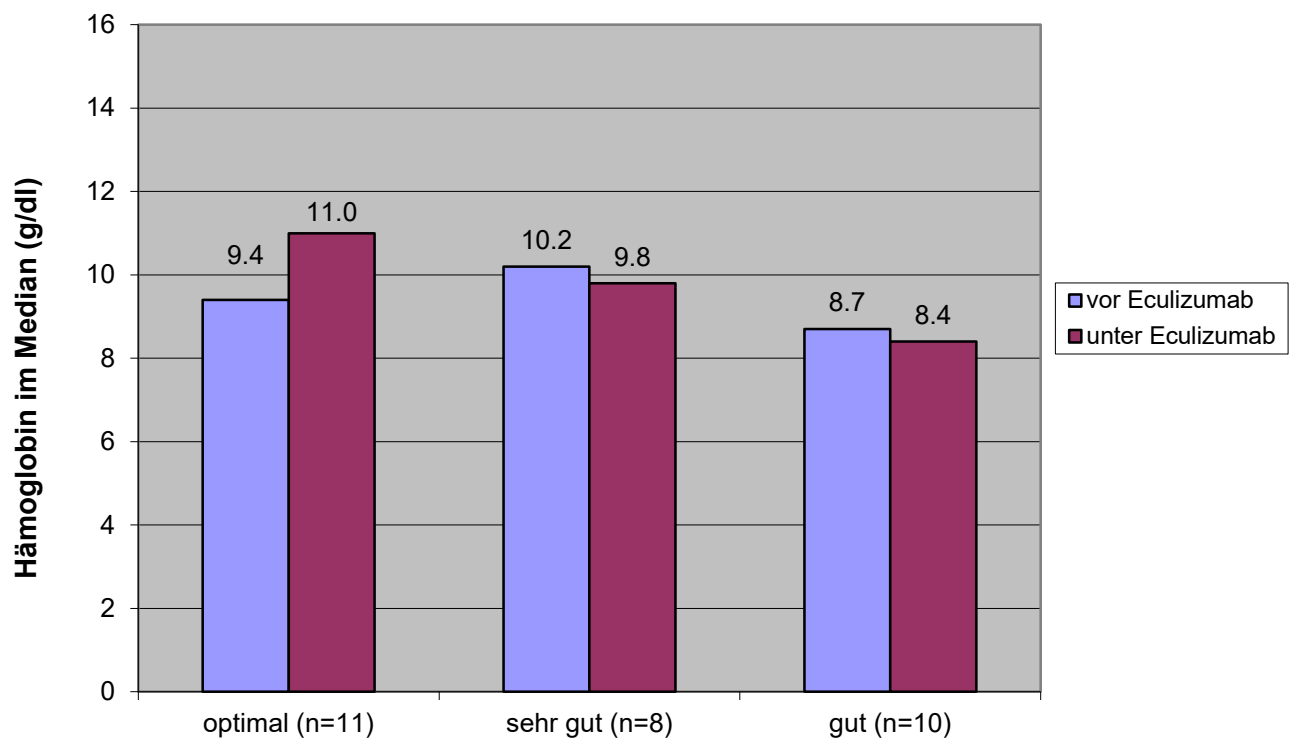


Abb. 13: Hämoglobin Wert im Median gemessen vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=29).

6.3.3 Transfusionsbedarf

Es wurde der Bedarf für Bluttransfusionen bei den mit Eculizumab behandelten PNH Patienten im Median von 9 Erythrozytenkonzentrate /Jahr (Wertebereich: 0-40) vor der Therapie auf 2 Erythrozytenkonzentrate/Jahr (Wertebereich: 0-62) unter der Therapie mit Eculizumab reduziert ($p=0,14$). Wie bereits beschrieben, wurden 32 Patienten nach dem Hämoglobingehalt und der Abhängigkeit von Bluttransfusionen in drei Gruppen eingeteilt. Bei Patienten mit einem optimalen Ansprechen (optimal, $n=11$) konnte der Bedarf für Bluttransfusionen eingestellt werden (im Median 6 auf 0 Einheiten/Jahr; $p=0,007$). Bei Patienten mit einem sehr guten Ansprechen auf das Medikament (sehr gut, $n=8$) reduzierte sich der Wert von 8 auf 3 Einheiten/Jahr. Bei Patienten mit einer guten Antwort (gut, $n=10$) beobachteten wir sogar eine Zunahme des Bluttransfusionsbedarfs von 12 Einheiten/Jahr vor der Eculizumab Therapie auf 34 Einheiten/Jahr unter der Eculizumab Behandlung.

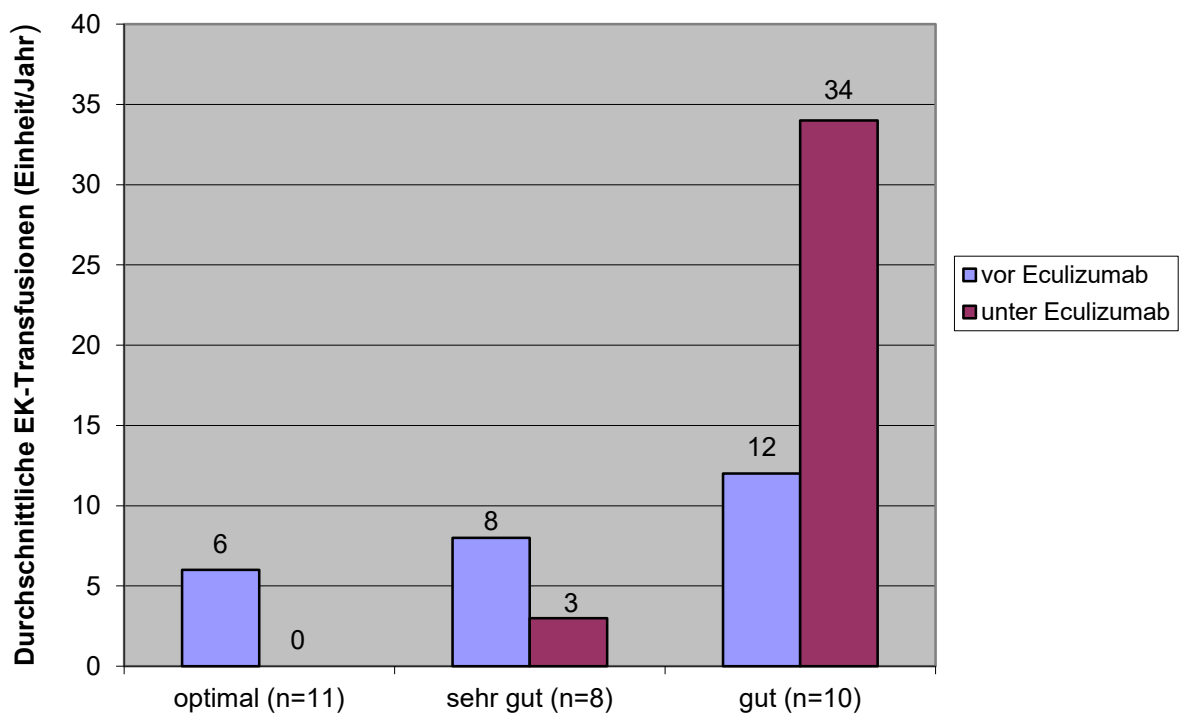


Abb. 14: Pro Jahr verabreichte EKs vor und unter der Eculizumab Therapie in Abhängigkeit von der Ansprache auf das Medikament.

6.3.4 Haptoglobin

Der Haptoglobin Wert wurde bei 18 behandelten Patienten vor und während der Therapie gemessen. Die Mehrzahl der mit Eculizumab behandelten Patienten erreichten keine Normalisierung des Haptoglobin Wertes. Unter der Therapie nur vier von 12 PNH Patienten (12,5%) erreichten eine Normalisierung des Haptoglobin Wertes als bestes Ansprechen. Die meisten Haptoglobin Werte blieben vor und während der Therapie unverändert erniedrigt, mit einem Median 0,06 g/l (Normbereich: 0,3-2,0 g/l).

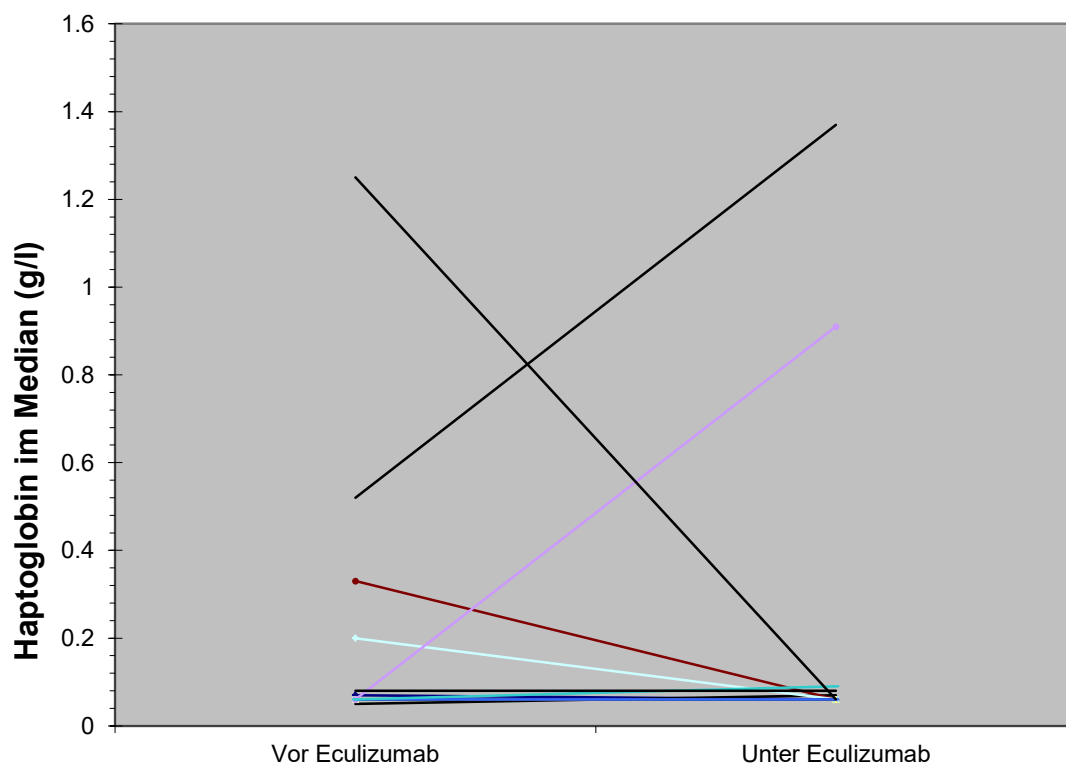


Abb. 15: Haptoglobin Wert im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=18).

6.3.5 Hämopexin

Der Hämopexin Wert wurde bei 12 behandelten Patienten vor und während der Therapie gemessen. Der Median des Hämopexin Werts stieg von 0,07 g/l vor der Behandlung auf 0,58 g/l während der Eculizumab Therapie ($p < 0,01$; Normbereich: 0,5-1,15 g/l).

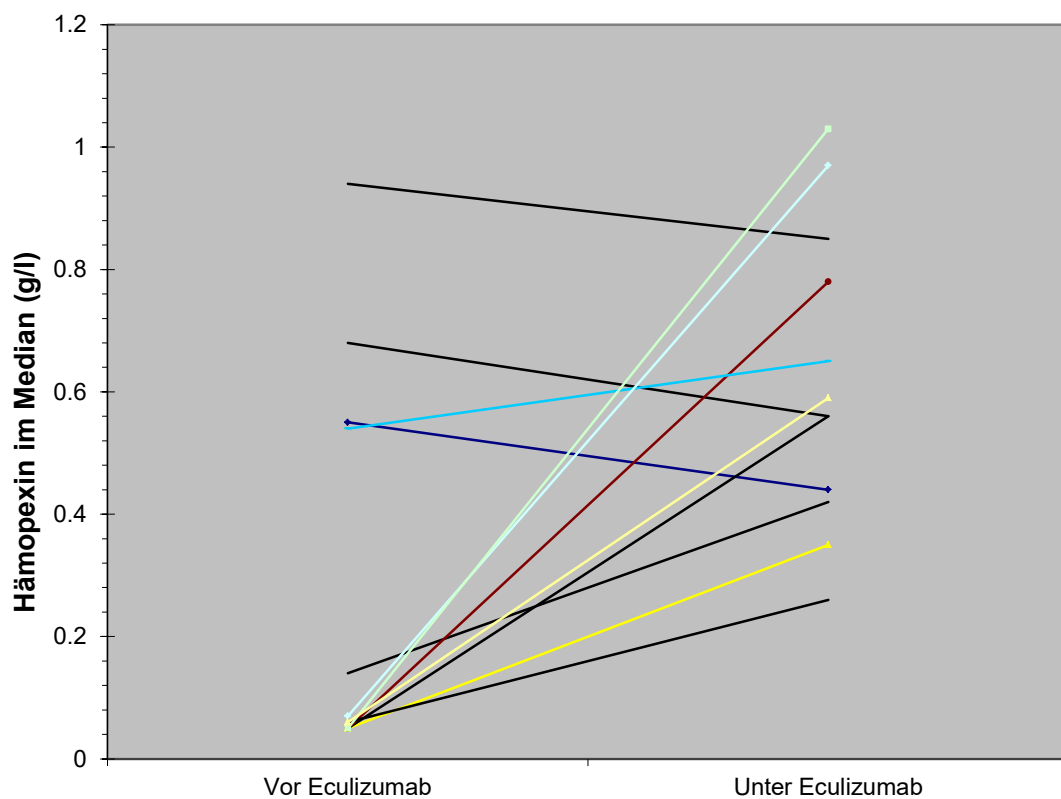


Abb. 16: Hämopexin Wert im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=12).

6.3.6 Bilirubin

Die Bilirubin Werte wurde bei 30 Patienten gemessen. Sie verringerten sich leicht von einem Median von 2,1 mg/dl vor der Eculizumab Therapie auf einen Median von 1,85 mg/dl unter der Therapie (p=0,5; Normbereich: 0,3-1,2 mg/dl).

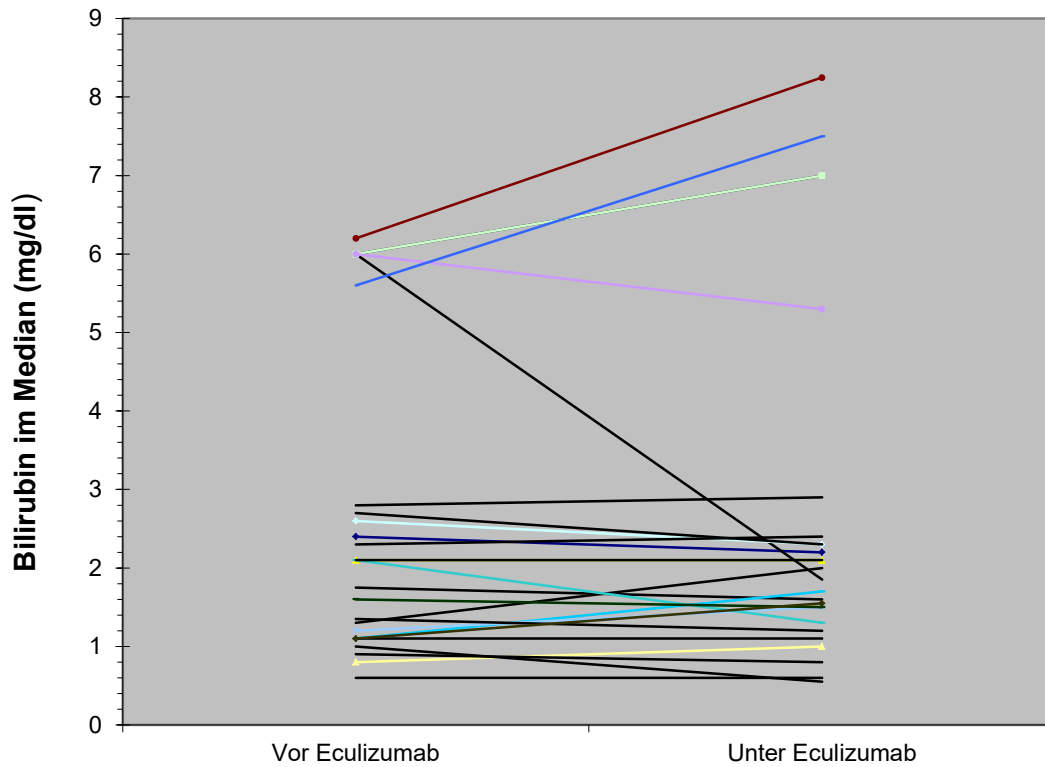


Abb. 17: Bilirubin Wert im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=30).

6.3.7 Erythropoetin

Bei 14 Patienten wurde während der Behandlung mit Eculizumab ein erhöhter Erythropoetin Wert mit einem Median von 84,5 U/l (Wertebereich: 31-1009 U/l) gemessen (Normbereich: 2,6-18,5 U/l).

6.3.8 Retikulozyten

Die Retikulozytenzahl, gemessen bei 17 behandelten Patienten, sank während der Behandlung mit Eculizumab. Der Median vor der Behandlung betrug 170/nl (Wertebereich: 69-355/nl) und fiel auf einen Median von 120/nl (Wertebereich: 21-450/nl) während der Behandlung (p<0,021; Normbereich: 22-76/nl).

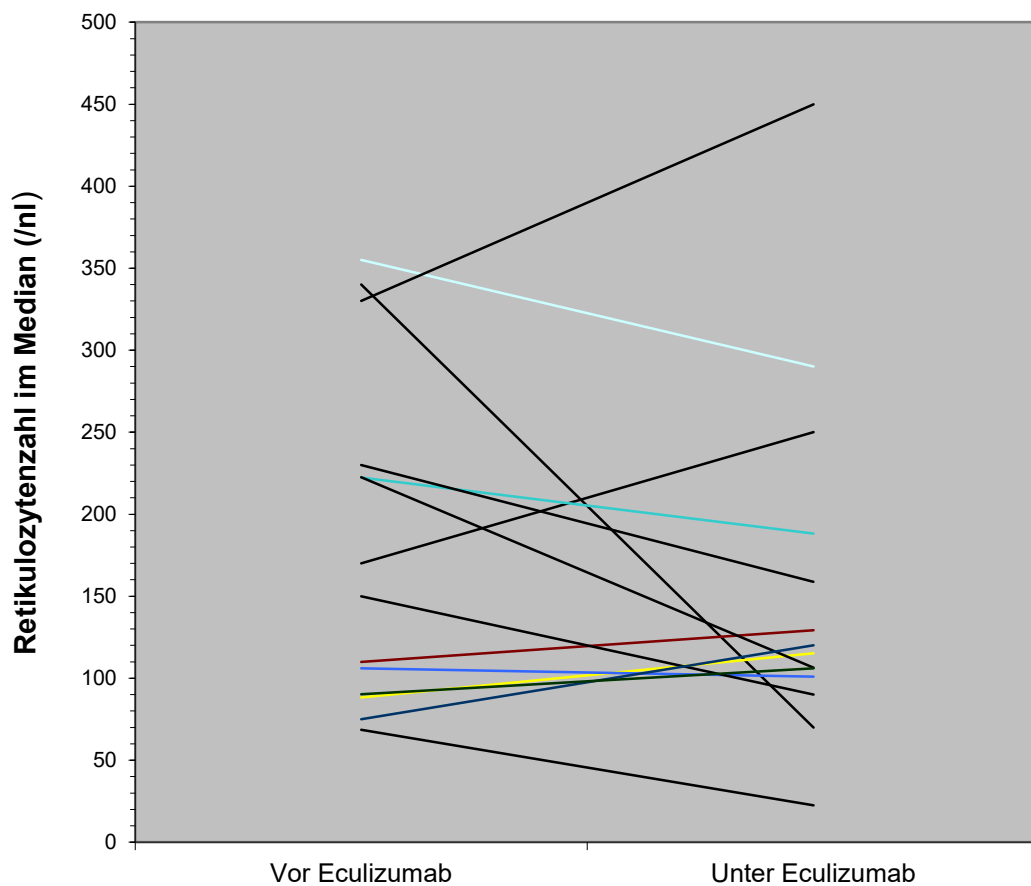


Abb. 18: Absolute Retikulozytenzahl vor und unter der Behandlung, (n=17).

6.3.9 Retikulozytenproduktionsindex

Bei allen 32 Patienten konnte der Retikulozytenproduktionsindex (RPI) erhoben werden. Der Bedarf an Bluttransfusionen bei Patienten mit einem hohen $RPI > 2$ ($n=14$) nahm während der Eculizumab Therapie deutlich ab (von einem Median von 15 Einheiten/Jahr auf einen Median von 0 Einheit/Jahr). Patienten mit einem $RPI < 2$ ($n=18$) zeigen ein geringeres Ansprechen auf die Eculizumab Behandlung bei einem weiterhin bestehendem Bedarf an Bluttransfusionen. Bei diesen Patienten konnte der Bedarf für Bluttransfusionen ebenfalls reduziert werden, aber nicht so ausgeprägt, wie bei Patienten mit $RPI > 2$ (von einem Median von 7 Einheiten/Jahr auf ein Median von 2,5 Einheiten/Jahr).

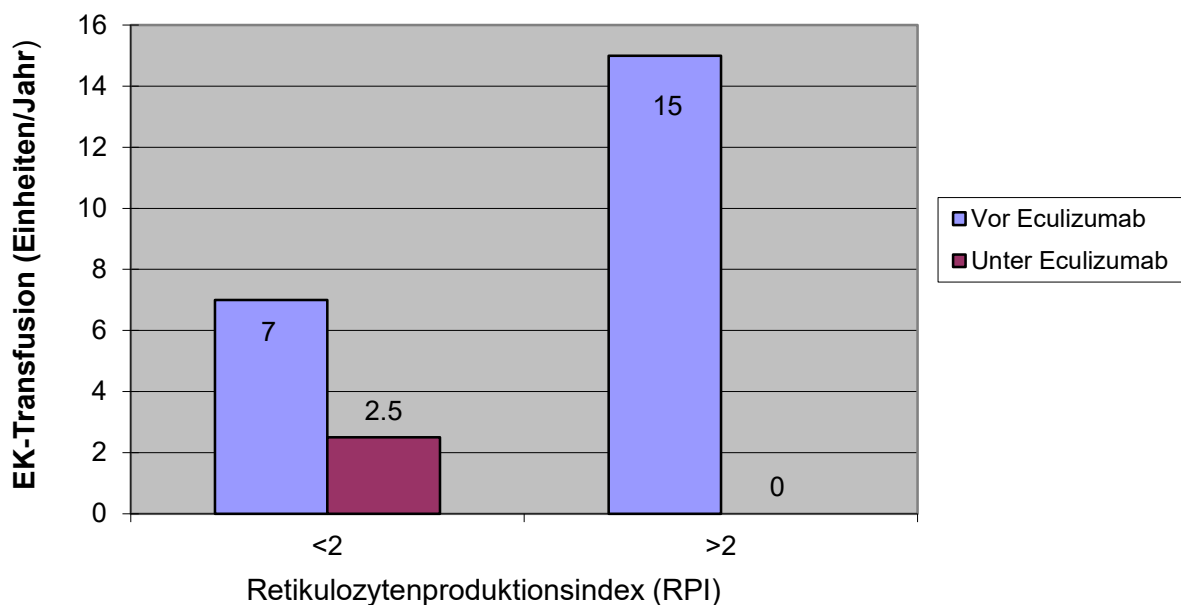


Abb. 19: Die Anzahl des EKs in den RPI-Gruppen vor und unter der Eculizumab Therapie.

6.3.10 Ferritin

Der Ferritin Wert als Zeichen der Eisenhomöostase wurde bei 28 behandelten Patienten vor und während der Behandlung gemessen. Wir konnten den Anstieg des Ferritin Wertes im Median, als Parameter des Eisenspeichers bei den mit Eculizumab behandelten Patienten feststellen. Der Ferritin Wert erhöhte sich signifikant von einem Median von 55 µg/l (Wertbereich: 16-5455 µg/l) vor der Eculizumab Behandlung auf einen Median von 191 µg/l (Wertbereiche: 44,5-3490 µg/l) während der Behandlung (p=0,001; Normbereich: 20-290 µg/l) zusammen mit einer hohen Transferin Sättigung (Median: 49,55%, Wertbereich: 10,4-105,8%). Eine Akute-Phase-Reaktion, als ein möglicher Grund für den Anstieg des Ferritin Wertes, wurde durch die Kontrolle des C-reaktiven Proteins (CRP) ausgeschlossen.

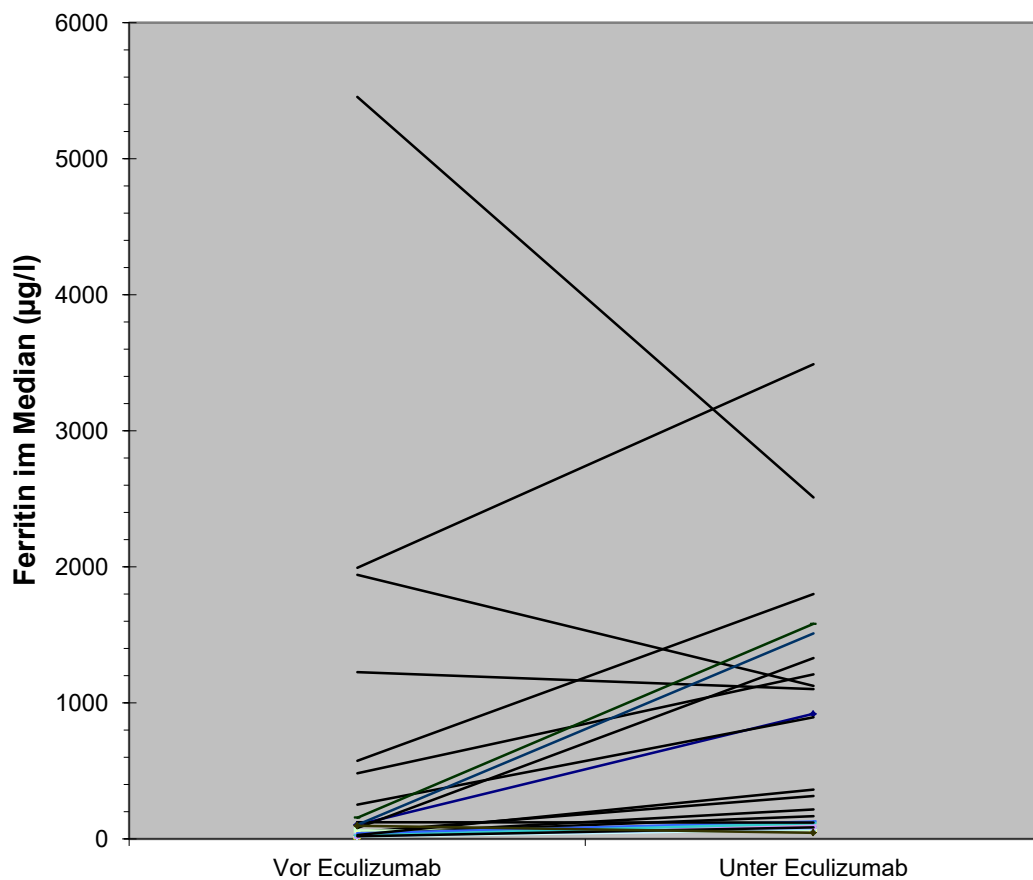


Abb. 20: Ferritin Werte im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=28).

Bei einem Patienten stellten wir einen ausgeprägten Anstieg des Ferritin Wertes unter der Eculizumab Behandlung fest. Die Werte sind in der Abb. 21 dargestellt. Die Eculizumab Therapie (Tag 0) führte zu einer Normalisierung des LDH Spiegels von einem Median von 3357 U/l zu einem Medianwert von 275 U/l. Parallel hierzu kam es zu einer Erhöhung des Ferritin Wertes von 86 µg/l auf 1205 µg/l (Median: 191 µg/l).



Abb 21: LDH Werte und Ferritin Werte von einem mit Eculizumab behandelten PNH Patienten. Start der Eculizumab Therapie Tag 0.

Bei der Auswertung der Ferritin Werte wurden die Patienten in drei Gruppen nach ihrem Bedarf für Erythrozytenkonzentrate vor und unter der Eculizumab Therapie eingeteilt (<1 EKs Einheiten/Jahr n=12; 1-8 EKs pro Jahr n=9 und >8 EKs pro Jahr n=7). Die Zunahme der Ferritin Werte erfolgte in allen drei

Gruppen, am deutlichsten jedoch in der Patientengruppe, die über acht EKs-Einheiten pro Jahr benötigten. Ein dauerhafter Bedarf für Transfusionen ging einher mit einem Anstieg der Ferritin Werte unter der kombinierten Eculizumab Behandlung mit Bluttransfusion. Bei Patienten in der Gruppe mit einem optimalen hämatologischen Ansprechen, die während der Therapie keinen Bluttransfusion Bedarf hatten, fanden wir ebenfalls eine Zunahme der Ferritin Werte von 33 µg/l auf 83 µg/l im Median (p=0,015). Patienten mit einer geringeren hämatologischen Ansprache (über 8 EKs-Bedarf unter der Therapie) zeigten eine signifikante Zunahme des Ferritin Wertes von 251 µg/l auf 1510 µg/l im Median (p=0,018).

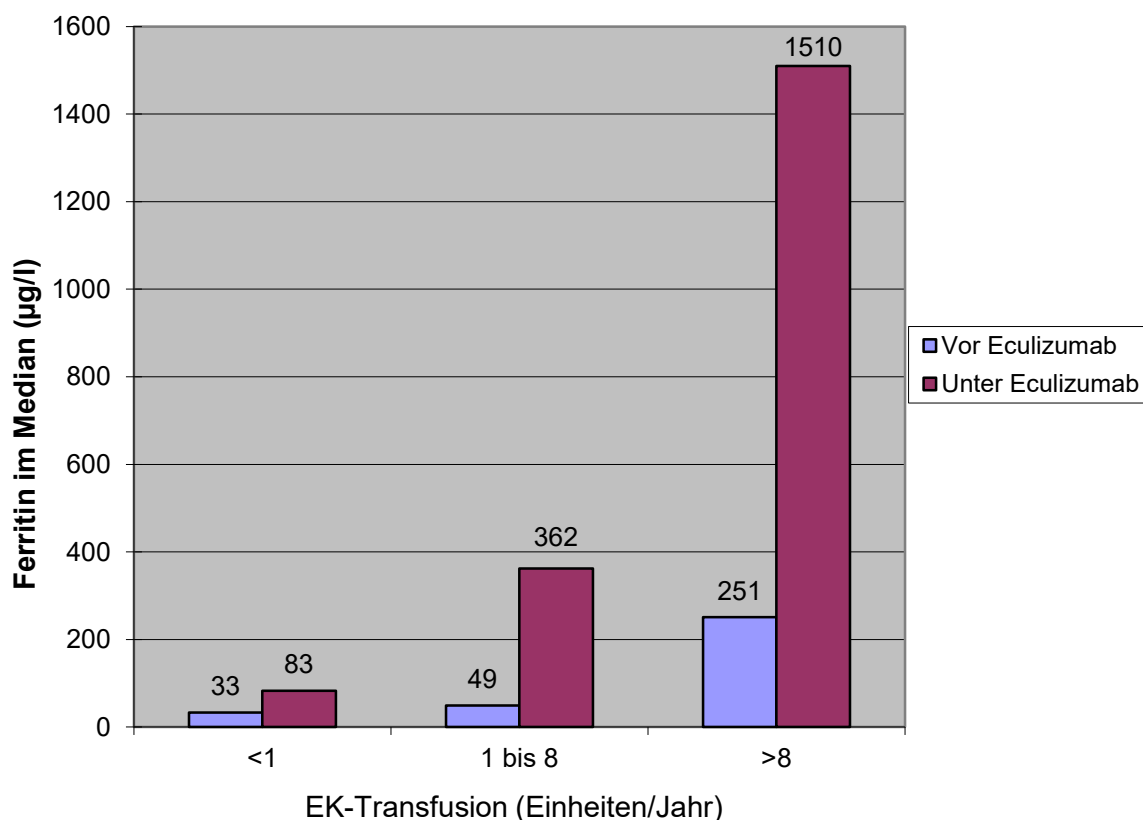


Abb. 22: Ferritin Wert in Bezug auf den Transfusionsbedarf vor und während der Therapie. <1 keine EKs, 1-8 EKs/Jahr, > 8 über acht EKs/ Jahr.

6.4 Entwicklung der PNH-Klonggröße unter Eculizumab Therapie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde bei 15 Patienten die Entwicklung des prozentuellen Anteils der Granulozyten, die einen Mangel an GPI-verankerten komplementregulatorischen Protein CD59 aufwiesen, vor und während der Eculizumab Therapie gemessen. Es wurden keine signifikante Veränderungen des Anteils der PNH-Granulozyten unter Therapie festgestellt. Vor der Therapie betrug der Wert 92,06%, unter der Therapie 92,73%.

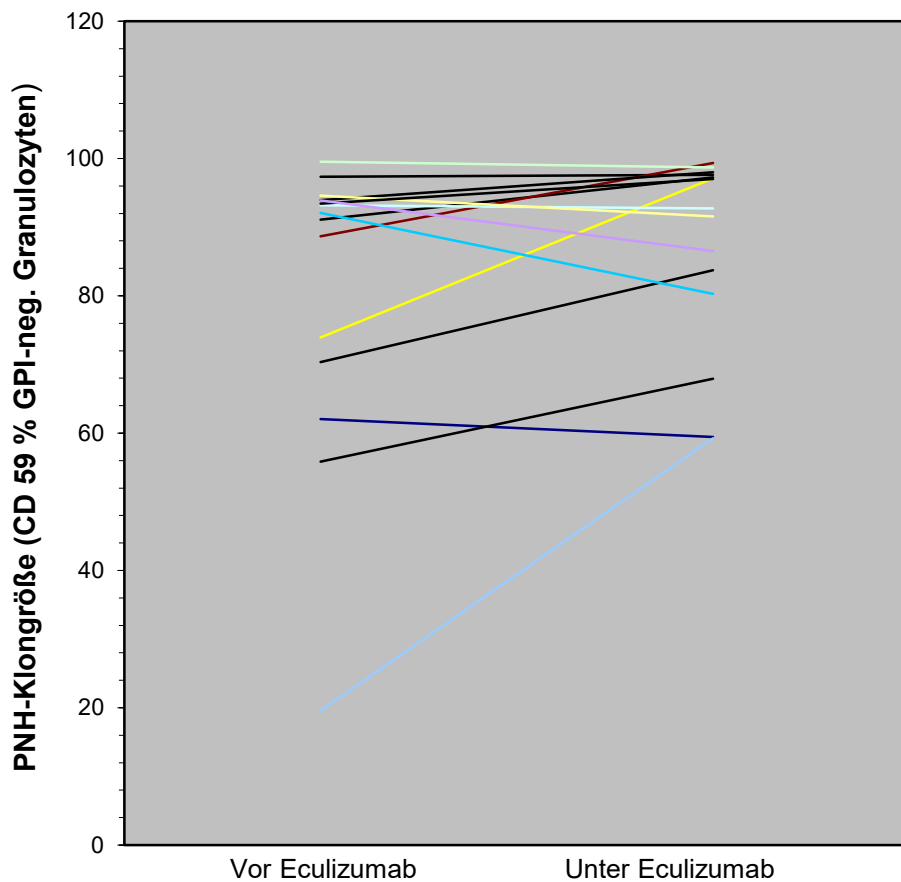


Abb. 23: Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter Eculizumab Therapie, (n=15).

6.5 Coombs-Test

Der Coombs-Test wurde bei 21 Patienten während der Eculizumab Therapie durchgeführt. Der Test konnte bei 17 von 21 Patienten in variablen Ausmaß C3d auf der Oberfläche der Erythrozyten nachweisen. Bei vier Patienten konnte C3d nicht nachgewiesen werden. Die Stärke des monospezifischen Coombs-Tests zeigte im Verlauf der Therapie deutliche Schwankungen.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von 32 Patienten ausgewertet, die aufgrund einer diagnostizierten PNH mit dem Medikament Eculizumab in den Jahren 2004 bis 2010 behandelt wurden. Der Median der Eculizumab Therapiedauer war 29 Monate (Wertebereich: 1-70 Monate).

Ziel dieser retrospektiven Auswertung war es, durch die im Vergleich zu den bislang durch geführten Studien längeren Untersuchungszeiträumen weitere Erkenntnisse hinsichtlich des Ansprechens und der Verträglichkeit von Eculizumab zu gewinnen, die bei den bisherigen Untersuchungen nicht offensichtlich wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit mehreren Studien, dass bei allen Patienten Eculizumab sehr gut verträglich war und zu deutlich verbesserten Hämolyse Parametern führte (Hillmen P. et al., 2004 und 2006; Brodsky R. A. et al., 2008; Röth A. et al., 2009).

Damit bestätigt diese Untersuchung die Erkenntnis, dass Eculizumab derzeit als Therapie der Wahl für die Behandlung der symptomatischen PNH eingesetzt werden sollte.

Die größere Patientenzahl und die längeren Beobachtungszeiträume führten zu ähnlichen Ergebnissen, verglichen mit den beiden bisher umfangreichsten Patientenstudien TRIUMPH und SHERPERD (Hillmen P. et al., 2004 und 2006; Brodsky R. A. et al., 2008).

Seit Mitte der siebziger Jahre wurden in der Klinik für Hämatologie der Universität Essen insgesamt 51 Patienten mit PNH diagnostiziert. Da es sich bei der PNH um eine äußerst seltene Erkrankung handelt, stimmt die Inzidenz mit den Werten aus der Literatur überein (Kliche K. O. et al., 1990; Hill A. et al., 2010). Allerdings wird diese Erkrankung auch oft übersehen oder erst später erkannt (Späth-Schwalbe E. et al., 1995). Während in den meisten Studien Frauen und Männer ungefähr gleich häufig von der Erkrankung betroffen waren (Forman K. et al., 1984; Tudela M. et al., 1993; Weber U., 1998), zeigt sich in anderen Studien ein überwiegender Anteil an Frauen (Socié G. et al., 1996; Dacie J. V. et al., 1972). In unsere Studie waren 17 Patienten (53,1%) männlich und 15 (46,9%) weiblich.

Bezüglich der Altersverteilung waren unsere Patienten zu Beginn der Eculizumab Therapie mit einem Median von 26,5 Jahren deutlich jünger, als die PNH Patienten in anderen Studien (Späth-Schwalbe E. et al., 1995; Hillmen P. et al., 1995; Tudela M. et al. 1993; Dunn P. et al., 1991).

Dies kann an der Tatsache liegen, dass bei der vorliegenden Untersuchung in unserer Klinik auch zum Teil Jugendliche mit in die Untersuchung einbezogen werden konnten. Dies wird ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Socié 1996 beschrieben, in der 21% der Patienten zwischen 6 bis 21 Jahren alt waren. Eine familiäre Häufung konnte durch uns nicht festgestellt werden und kam auch in anderen Studien nicht vor (Lee G. R., 1993).

Bei der Erstdiagnose wiesen neun (28%) der 32 Patienten thromboembolische Ereignisse unterschiedlichen Schweregrades in der medizinischen Vorgeschichte auf.

Eine ähnlich Anzahl wird auch in anderen Studien beschrieben (Socié G. et al., 1996; Forman K. et al., 1984).

Unter der Eculizumab Therapie traten in unserer Studie keine neuen thromboembolischen Komplikationen auf.

Während des Untersuchungszeitraumes traten unter der Eculizumab Therapie bei unseren Patienten keine gravierenden Infektionen auf, wie auch in anderen vorhergegangenen Studien beschrieben (Thompson M. J. et al., 2006; Pettigrew H. D. et al., 2009).

Dies kann an den zwischenzeitlich verbesserten Prophylaxemaßnahmen gegen Meningokokkeninfektionen liegen. Obwohl das Medikament einen funktionellen Komplementdefekt generiert, wurden keine Infektionen, z. B. durch Meningokokken beobachtet. Dennoch ist das Risiko für eine mit der Behandlung assoziierten Infektion mit bekapselten Bakterien bei Patienten mit erworbenem Defekt des terminalen Komplementsystems erhöht (Pettigrew H. D. et al., 2009).

Das eingeführte Risikomanagement umfasst mehrere Punkte und beinhaltet die Vergabe eines Notfallausweises für den Patienten, die Durchführung einer termingerechten Impfung jedes dritte Jahr mit einem tetravalenten Konjugatimpfstoff, der Aufklärung der Patienten über erste Anzeichen und Symptome einer Meningokokken-Infektion und einem rechtzeitigen Einsetzen der Stand-by Therapie mit einem Antibiotikum (750mg Ciprofloxacin). Diese Punkte

sollen zu einer sicheren und nebenwirkungsärmeren Eculizumab Therapie führen. Ein wichtiger Faktor für die Anfälligkeit gegenüber Meningokokken Infektionen ist dabei das Alter der Patienten (Thompson M .J. et al., 2006).

Es kam bei unserer Untersuchung unter der Eculizumab Therapie zu einer deutlich verringerten Symptomatik, in Hinsicht auf die mit einer Hämolyse einhergehenden Begleiterscheinungen, wie Anämie, Müdigkeit, Transfusionsbedarf und thromboembolische Komplikationen (Hillmen P. et al., 2006; Brodsky R. A. et al., 2008; Schubert J. et al., 2008; Risitano A. M. et al., 2008; Schubert J. et al., 2015).

Bei der Auswertung der LDH Werte im Serum bei der TRIUMPH Studie kam es unter der Eculizumab Therapie zu einer Reduktion des LDH Wertes um 85,8%.

Diese verringerten sich in unserer Untersuchung im Median bei allen behandelten Patienten während der Untersuchung von 1911 U/l (Wertebereich: 275,5-3360 U/l) um durchschnittlich 86% ($p < 0,01$; Normbereich: 100-247 U/l) auf 270,5 U/l im Median (Wertebereich: 143-940 U/l). Eculizumab blockiert somit wirksam die intravasale Hämolyse.

Die Arbeitsgruppe um Hillmen beschrieb 2006 eine Stabilisierung des Hämoglobin Wertes mit einer Verbesserung der Symptomen der Anämie in der mit Eculizumab behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

Bei unsere Untersuchung verbesserten sich die Werte des Hämoglobins nur in der Gruppe der optimalen Antwort.

Die TRIUMPH Studie beschreibt eine komplette Unabhängigkeit von Transfusionen bei 51% der Patienten unter Eculizumab, im Vergleich dazu erreichte kein Patient der Placebogruppe (0 von 44) eine Stabilisierung des Hämoglobin Wertes ohne Transfusion. Die Autoren berichten weiter über einen kompletten Verzicht auf Erythrozytenkonzentrat (EK) Substitution in der Eculizumab Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, die im Durchschnitt weiterhin 10 Einheiten im selben Zeitraum benötigte.

Bei unserer Untersuchung konnte bei 66% der mit Eculizumab behandelten Patienten eine deutliche Reduktion der Substitution mit Erythrozytenkonzentraten erreicht werden.

Der Bedarf an Bluttransfusionen konnten während der Behandlung mit Eculizumab im Median von 14 Einheiten/Jahr (Wertebereich: 0-40) vor Beginn der Therapie

auf einen Median von 2 Einheiten/Jahr (Wertebereich: 0-64) unter der Therapie mit Eculizumab verringert werden ($p=0,14$).

In unserer Datenanalyse zeigt sich bei einem Großteil der Patienten ein starker Rückgang des Bedarfs an Bluttransfusionen, im Median um eine Reduktion von 5 Einheiten pro Jahr. In der Gruppe mit 11 Patienten (38%) mit optimalem Ansprechen auf die Behandlung, bestand unter der Therapie überhaupt kein Bedarf mehr an Transfusionen (im Median 6 auf 0 Konserven/Jahr; $p=0,007$).

In der Gruppe des sehr gutem Ansprechens mit 8 Patienten (28%), war die Notwendigkeit an Bluttransfusionen stark reduziert.

Allerdings war der Bedarf an Transfusionen in der Gruppe mit gutem Ansprechen (10 Patienten, 34%) im Median um 22 Konserven/Jahr erhöht. Dieses lässt sich damit erklären, dass sich bei drei Patienten dieser Gruppe eine Verschlechterung der Knochenmarkfunktion einstellte, so dass die Patienten jeweils 30 Konserven/Jahr bzw. 28 Konserven/Jahr mehr erhielten.

Die anderen drei Patienten der Gruppe mit gutem Ansprechen zeigten mit Steigerungen von einer Konserve/Jahr, 5 Konserven/Jahr und 6 Konserven/Jahr einen gering höheren Bedarf an Transfusionen. Somit war der erhöhte Bedarf an Transfusionen nur bei sechs der 29 Patienten ersichtlich (21%), während der Großteil der Patienten (79%) einen deutlich verringerten Bedarf zeigte.

Unsere Studie zeigte übereinstimmend mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Parker, dass aufgrund der heterogenen Eigenschaften der PNH die Behandlung mit Eculizumab nicht für alle Patienten eine nachweisliche Verbesserung der Blutparameter mit sich bringt. Diese Beobachtungen zeigen nachhaltig, dass die Therapie mit Eculizumab den Bedarf an Transfusionen senkt, dennoch eine weitere Unterstützung mit Folsäure und Vitamin B12 während der Eculizumab Behandlung sinnvoll ist, da es hierdurch zu einer kompensatorisch gesteigerten Erythropoese im Knochenmark kommt (Parker C. J. et al., 2005 und 2009; Röth A. et al., 2009).

Obwohl die Eculizumab Therapie offensichtlich die intravasale Hämolyse praktisch komplett inhibiert, stellen sich bei den von uns untersuchten Patienten keine normalen Hämoglobin Werte ein. Dies gilt auch für die Patienten, die sehr gut auf das Medikament angesprochen hatten (optimales und sehr gutes Ansprechen).

Von den 29 Patienten, deren Daten in unsere Untersuchung ausgewertet wurden, zeigten nur 10 Patienten (34%) einen Hämoglobin Wert unter 8 g/dl und einen erhöhten Transfusionsbedarf von im Median 12 Konserven/Jahr auf 34 Konserven/Jahr (Gruppe: gutes Ansprechen auf Eculizumab). Die in dieser Patientengruppe verringerte Wirkung von Eculizumab lässt sich mit den zusätzlichen hämatologischen Erkrankungen in der Vorgeschichte der Patienten in Verbindung bringen (z. B. Myelodysplastisches Syndrom (MDS), Osteomyelofibrose (OMF) oder Rückfall der aplastischen Anämie).

Der Hämopexin Wert wurde bei 12 behandelten Patienten durchgehend vor und während der Therapie mit Eculizumab gemessen. Der Median des Hämopexin Wertes stieg von 0,07 g/l vor der Behandlung auf 0,58 g/l während der Eculizumab Behandlung ($p < 0,01$; Normbereich: 0,5-1,15 g/l).

Die Bilirubin Werte und die Anzahl der Retikulozyten blieben erhöht und die Haptoglobin Werte erniedrigt.

Bei unserer Untersuchung wurde die Bilirubin Werte bei 30 Patienten gemessen. Sie verringerten sich leicht von einem Median von 2,1 mg/dl vor der Eculizumab Therapie auf einen Median von 1,85 mg/dl unter der Therapie ($p = 0,5$; Normbereich: 0,3-1,2 mg/dl).

Die Retikulozytenzahl wurde bei 17 Patienten vor und während der Behandlung mit Eculizumab gemessen. Der Median vor der Behandlung betrug 170/nl (Wertebereich: 69-355/nl) und reduzierte sich auf einen Median von 120/nl (Wertebereich: 21-450/nl) während der Behandlung ($p < 0,021$; Normbereich: 22-76/nl).

Der Haptoglobin Wert normalisierte sich nur bei 4 von 12 PNH Patienten (12,5%). Die meisten Haptoglobin Werte blieben vor und während der Therapie unverändert erniedrigt mit einem Median von 0,06 g/l (Normbereich: 0,3-2,0 g/l).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weiterhin eine geringe extravaskuläre Hämolyse vorliegt. Die intravaskuläre Hämolyse wird bei den behandelten PNH Patienten durch die Eculizumab Therapie blockiert, sie führt aber gleichzeitig zu einer Zunahme der extravaskulären Hämolyse (Rosse W. F. et al., 2004; Risitano A. M. et al., 2009; Ristiano A. M. et al., 2008).

Die Hemmung der intravaskulären Hämolyse führt zu einem Anstieg der PNH typischen Erythrozyten, die mit defekten Oberflächenproteinen des Komplementsystems beladen sind (Schubert J. et al., 2008 und 2015).

Die beobachtete fortgesetzte Hämolyse könnte zu einem Teil im Zusammenhang mit dem Komplementprotein C3 stehen, das PNH Erythrozyten bindet, weil Eculizumab erst den Ablauf der terminalen Komplementkaskade hemmt und nicht bereits den anfänglichen Ablauf der Komplementstrecke (Parker C. J. et al., 2000). Das Fehlen der GPI-verankerten CD55 Proteins, welche den Zerfall von C3-Konvertasen beider Aktivierungswege beschleunigt und deshalb als "Decay accelerating factor" (DAF) bezeichnet wird, bindet bevorzugt C3 an der Erythrozyten Membran. Dieses neu beobachtete Phänomen kann bei zukünftigen Behandlungen und Untersuchungen mit Hilfe des leicht durchzuführenden monospezifischen Coombs-Tests überprüft werden (Nicholson-Weller A. et al., 1983).

Ohne Eculizumab werden die PNH Erythrozyten primär intravaskulär lysiert. Durch die Eculizumab Behandlung werden C3 gebundene Erythrozyten extravaskulär in der Milz oder in der Leber abgebaut. Wenn eine extravaskuläre Hämolyse klinisch relevante Ausmaße zeigt, könnten in diesem Fall eine Therapie mit Kortikosteroiden oder eine Splenektomie eine mögliche Behandlungsoption darstellen (Risitano A. M. et al., 2009; Risitano A. M. et al., 2008). Jedoch muss dies weiterhin eine individuelle Therapieentscheidung für jeden PNH Patienten bleiben und die Wirksamkeit sollte kritisch bewertet werden, um langfristige Nebenwirkungen und Komplikationen der Steroid Behandlung zu vermeiden.

Für das periodische Screening der extravaskulären Hämolyse während der Eculizumab Behandlung wird der monospezifische Coombs-Test empfohlen.

Der bedeutende Eisenverlust über die Urinausscheidung in Sinne einer Häm siderinurie, kommt bei PNH Patienten aufgrund der intravaskuläre Hämolyse, sogar beim Fehlen einer Hämoglobinurie, gehäuft vor (Kelly R. J. et al., 2009).

Deshalb kommt es bei PNH Patienten trotz Bluttransfusionen selten zu einer Eisenüberlagerung. Die Substitution von Eisen wird empfohlen, auch wenn beschrieben wurde, dass es zu einer hämolytische Veränderung der PNH führen kann (Gruppo R. A. et al., 2009).

Während der Behandlung der PNH mit Eculizumab gibt es keinen weiteren Eisenverlust über den Urin, weil die intravasale Hämolyse durch das Medikament blockiert wird. Wie wir in unsere Patientengruppe zeigen konnten, veränderten sich die Eisen Parameter während der Eculizumab Therapie. Wir beobachteten einen kontinuierlichen Anstieg des Ferritin Wertes im Median von ursprünglich 55 µg/l vor Beginn der Therapie auf im Median 191µg/l unter der Eculizumab Behandlung.

Dieser Anstieg war stärker ausgeprägt bei den PNH Patienten, die Bluttransfusionen brauchten, konnte aber auch im geringeren Ausmaß bei den Patienten festgestellt werden, die keine Transfusion erhielten.

Bei unserer Auswertung des Ferritin Wertes wurden die Patienten in drei Gruppen nach ihrem Bluttransfusionsbedarf vor und während der Eculizumab Therapie eingeteilt (<1 EKs Einheiten/Jahr n=12; 1-8 EKs pro Jahr n=9 und >8 EKs pro Jahr n=7). Die Zunahme des Ferritinspiegels erfolgte in allen Untergruppen, am deutlichsten jedoch in der Patientengruppe, die über acht EKs-Einheiten pro Jahr erhalten hatten. Ein dauerhafter Bedarf nach Transfusionen ging mit einem Anstieg des Ferritinspiegels während der kombinierten Eculizumab Therapie mit Bluttransfusionen einher. Bei Patienten in der Gruppe mit einem optimalen hämatologischen Ansprechen, die während der Therapie keinen Bluttransfusions-Bedarf hatten, fanden wir einen starken Anstieg des Ferritinspiegels von einem Median von 33 µg/l auf 83 µg/l. Patienten mit einem geringen hämatologischen Ansprechen zeigten eine signifikante Zunahme des Ferritinspiegels, von einem Median 251 µg/l auf 1510 µg/l.

Die Notwendigkeit für Bluttransfusionen bei PNH Patienten unter der Eculizumab Therapie reflektiert die zugrunde liegende Knochenmarkinsuffizienz und trägt aktiv zu einer Eisenüberlagerung bei. Der Ferritin Spiegel steigt nach Beginn der Behandlung, daher sollte die Gabe von Eisen Medikamente unter Eculizumab nicht standardmäßig fortgesetzt werden, sondern neu bewertet werden (Parker J. C. et al., 2005; Röth A. et al., 2009).

Interessanterweise beschreibt die Arbeitsgruppe um Kelly 2009 eine Abnahme der PNH-Klongröße während der Eculizumab Therapie. Es wurde spekuliert, dass eine Verringerung der Immunselektion zugunsten der PNH-Klone auf lange Zeit vorkommen würde (Kelly R. J. et al., 2009).

Eine positive Immunfixation von IgG-Kappa ist in diesem Zusammenhang nie in der Literatur beschrieben worden. Im Vergleich zu anderen therapeutischen Antikörpern, wird Eculizumab dem Patienten dauerhaft verabreicht. Der Serumspiegel kann mit Hilfe des Immunfixationstestes kontinuierlich nachgewiesen werden.

Durch die Therapie mit Eculizumab konnte erstmals zielgerichtet und effizient ein Weg gefunden werden, die Ursache der PNH direkt zu behandeln. Vor Einführung des Medikamentes wurde die PNH standardmäßig mit Bluttransfusionen und durch die Therapie der Begleitsymptome behandelt. Die älteren Therapiemethoden waren beschränkt und risikoreich, so dass die Mehrzahl der Patienten in Folge der Therapie verstorben (Dacie J. V. et al., 1972; Socié G. et al., 1996; de Latour R. P. et al., 2008).

Die intravaskuläre Hämolyse wird durch Eculizumab effektiv blockiert, was an der Normalisierung des LDH Wertes zu sehen ist, und führt gleichzeitig zu einer Verbesserung der typischen, mit der Krankheit eingehenden Symptome, wie Müdigkeit, transfusionsbedürftige Anämie und thromboembolische Ereignisse (Hillmen P. et al., 2006; Schubert J. et al., 2008; Hillmen P. et al., 2007).

Patienten, bei denen die Therapie angeschlagen hat, berichten über eine enorme Zunahme der Lebensqualität.

Bei den von uns untersuchten Patienten kam es allgemein zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität. Nebenwirkungen, wie leichte bis mittelstarke Kopfschmerzen, wurden von mehreren Patienten berichtet, wie auch schon in vorhergegangenen Studien beschrieben (Hill A. et al., 2005; Rother R. P. et al., 2005).

Bei einem Patient unserer Studie war die Verbesserung der Eculizumab Therapie optimal. Dieser Patient stellt den wünschenswerten Verlauf der Behandlung der PNH mit Eculizumab dar.

Bisher ist nicht klar, warum dieser Patient auf die Eculizumab Therapie am besten angesprochen hat, und dies bei anderen Patienten mit einer ähnlichen Voraussetzung nicht im gleichen Ausmaß der Fall war. Möglicherweise spielen hier zahlreiche individuelle Faktoren wie das Alter, vorhandene Begleiterkrankungen oder die medizinische Vorgeschichte eine Rolle.

Hier empfiehlt es sich, weitere Parameter im Rahmen fortführender Studien zu untersuchen.

Die Verbesserung des Hämoglobin Wertes unter der Eculizumab Therapie ist ein Ergebnis der Hemmung der zuvor existierenden intravasalen Hämolyse. Das Vorliegen einer Knochenmarkinsuffizienz schränkt die Behandlungsreaktion ein.

Auch die bei PNH Patienten oftmals feststellbare Retikulozytose konnte bei dem Großteil unserer Patienten bei der Erstdiagnose festgestellt werden (Kliche K. O. et al., 1990; Röth A. et al., 2009). Im Verlauf der Eculizumab Therapie nahm der Anteil der Patienten mit einer Retikulozytose jedoch ab. Der Median der Retikulozytenzahl vor der Behandlung betrug 170/nl und fiel auf einen Median von 120/nl während der Behandlung ($p < 0,021$).

Die Bestimmung des Retikulozytenproduktionsindex (RPI) ist für die Bewertung der Wirksamkeit der Erythropoese ein wichtiger Wert, um den Schweregrad der Knochenmarkinsuffizienz zu ermitteln (Röth A. et al., 2011).

In unserer Studie bestimmten wir daher den Bedarf an Bluttransfusionen vor und unter der Eculizumab Behandlung. Patienten mit einem geringen $RPI < 2$ ($n=18$) sprachen eher schlecht auf die Eculizumab Behandlung an und wiesen mit einer Reduktion von 64% einen verringerten Bedarf an Bluttransfusionen auf, während die Gruppe der Patienten mit einem höheren $RPI > 2$ Wert ($n=14$) keine Bluttransfusionen mehr benötigen. Daraus ergibt sich, dass eine Bestimmung des RPI vor einer Therapie mit Eculizumab helfen kann, den Grad der therapeutischen Wirkung vorauszusagen und ggf. die Therapie entsprechend angepasst werden kann z. B. durch die zusätzliche immunsuppressive Therapie.

Die Aplastische Anämie oder MDS werden nicht durch die Eculizumab Therapie beeinflusst und sollten daher über die Gabe von Immunsuppressiva oder eine Knochenmarktransplantation behandelt werden.

Durch die Möglichkeit der Eculizumab Therapie ergibt sich ein neuer Behandlungsansatz und ein deutlich verbesserter Verlauf der PNH durch eine Reduktion der Hämolyse, einer Verbesserung der Dysfunktion der glatter Muskulatur und einer Verringerung thromboembolischer Ereignisse.

Die Behandlung führt zu einer deutlich verbesserten Symptomatik, jedoch sollten die Patienten zuvor einer Knochenmarkuntersuchung, bzw. einer Bestimmung des RPI's unterzogen werden. Die Behandlung mit Eculizumab sollte individuell mit

Folsäure und Vitamin B12 ergänzt werden. Eine begleitende Gabe von Antibiotikum wird zwingend empfohlen.

Trotz einer langfristigen Kontrolle können unerwartete Komplikationen bei diesem therapeutischen Ansatz auch weiterhin entstehen. Aufgrund dieser potentiellen Komplikationen wird empfohlen, die Eculizumab Therapie bei PNH Patienten in spezialisierten Zentren durchzuführen. Das ist in diesem Fall besonders wichtig, da eine Modifikation im Bereich des Komplementsystems als therapeutische Strategie auch in anderen Komplementsystem-abhängigen-Krankheiten eine Rolle spielen kann, wie zum Beispiel bei dem atypische Hämolytisch-Urämische Syndrom (aHUS), bei Antikörper-vermittelten-Transplantat-Abstoßungsreaktionen und bei der autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) vom Kältetyp (Nürnberger J. et al., 2009; Gruppo R. A. et al., 2009; Locke J. E. et al., 2009; Röth A. et al., 2009).

8 Zusammenfassung

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene, erworbene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen. PNH Erythrozyten zeigen aufgrund des Fehlens GPI-verankerter komplementregulierender Oberflächenproteine eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Komplement und der so vermittelten Hämolyse. Der monoklonale Antikörper Eculizumab, der gegen die Konvertase C5 gerichtet ist, kann die terminale Komplementkaskade blockieren. In zwei umfangreichen Studien konnte Eculizumab seine Wirksamkeit und Verträglichkeit zeigen. Die vorliegende retrospektive Studie sollte weiterführende Daten über die bisherigen klinischen Untersuchungen liefern, die über die bereits publizierten Ergebnisse hinaus gehen.

Hierzu wurden retrospektiv Patientendaten von 32 PNH Patienten ausgewertet, die zwischen den Jahren 2004 und 2010 mit einer medianen Therapiedauer von 29 Monaten in der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen mit Eculizumab therapiert wurden. Um die Wirkung des Medikaments zu beurteilen wurden mehrere verschiedene Hämolyseparameter, der Bedarf an Bluttransfusionen und die Ferritin Werte ausgewertet.

Wie in den bereits veröffentlichten Studien war das Medikament auch bei den von uns untersuchten Patienten weiterhin sehr gut verträglich. Es traten unter der Eculizumab Therapie keine neuen thromboembolischen Komplikationen oder Infektionen auf. Die Hämolyseparameter verbesserten sich bei der Mehrzahl der Patienten signifikant, dies zeigte sich beispielsweise durch einen Abfall der LDH Werte durchschnittlich um 86% und der Transfusionsbedarf für Erythrozytenkonzentrate nahm ab, oder konnten ganz eingestellt werden. Eculizumab ist demnach das wirksamste Therapeutikum in der Behandlung der PNH.

Übereinstimmend mit bisherigen Studien zeigte unsere Arbeit, dass Eculizumab als Goldstandard Therapeutikum bei der PNH anzusehen ist. Allerdings sollte dieses Medikament in spezialisierten Zentren verabreicht werden, um je nach medizinischer Vorgeschichte oder möglichen neuen Komplikationen die Therapie entsprechend anpassen zu können.

9 Literatur

1. Brodsky R. A., Young N. S., Antonioli E., Risitano A. M., Schrezenmeier H., Schubert J., et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008; 111:1840-47.
2. Clark D. A., Butler S. A., Braren V., Hartmann R. C., Jenkins D. E., Jr. The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1981; 57:83-89.
3. Cohen A. M., Shabtai F., Lewinski U., Klein B., Djaldetti M. Two abnormal clones in the bone marrow cells of a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Genet*. 1979; 16:178–182.
4. Dacie J. V., Lewis S. M. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology and nature of disease. *Ser Haematol*. 3; 1972; 3-23.
5. De Latour R. P., Mary J. Y, Salanoubat C., Terriou L., Etienne G., Mohty M., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112:3099-106.
6. Delles C., Klingbeil A. U., Schneider M., et al. The role of nitric oxide in the regulation of glomerular haemodynamics in humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:1392-1397.
7. DeZern A. E., Brodsky R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a complement-mediated hemolytic anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015; 29:479-494.
8. Dunn P. O., Shih L. Y., Liaw S. J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: analysis of 40 cases. *J Formosan Med Assoc*. 1991; 90:831-835.

9. Fachinformation Soliris®. 2015.
10. Forman K., Sokol R. J., Hewitt S., Stamps B. K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. A clinicopathological study of 26 cases. *Acta haemat.* 1984; 71:217-226.
11. Frickhofen N., Heimpel H., Kaltwasser J. P., Schrezenmeier H. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood.* 2003; 101:1236-1242.
12. Gabbai F. B. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16:10-13.
13. Gruppo R. A., Rother R. P. Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009; 360:544-546.
14. Hall C., Richards S., Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood.* 2003; 102(10):3587-3591.
15. Hartmann R. C., Auditore J. V. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. I Clinical studies. *Am J Med.* 1959; 27:389-400.
16. Hegenbart U., Niederwieser D., Forman S., Holler E., Leiblein S., Johnston L., et al. Hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors after minimal conditioning as a curative treatment modality for severe paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9(11):689-697.
17. Hill A., Richards S. J., Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2007; 137:181-192.

18. Hill A., Rother R. P., Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2005; 90:40.
19. Hill A., Rother R. P., Arnold L., Kelly R., Cullen M. J., Richards S. J., et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica*; 2010; 95:567-73.
20. Hill A., Rother R. P., Wang X., Morris S. M., Quinn-Senger K., Kelly R., et al. Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2010; 149:414-25.
21. Hill A., Kelly R. J., Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2013; 121(25):4985-96.
22. Hillmen P., Elebute M., Kelly R., Urbano-Ispizua A., Hill A., Rother R. P., et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 2010; 85:553-59.
23. Hillmen P., Lewis S. M., Bessler M., Luzzatto L., Dacie J. V., Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333:1253-58.
24. Hillmen P., Muus P., Dührsen U., Risitano A. M., Schubert J., Luzzatto L., et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007; 110:4123-28.
25. Hillmen P., Young N. S., Schubert J., Brodsky R. A., Socie G., Muus P., et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355:1233-43.

26. Hoekstra J., Leebeek F. W., Plessier A., Raffa S., Darwish M. S., Heller J., Hadengue A., Chagneau C., Elias E., Primignani M., Garcia-Pagan J. C., Valla D. C., Janssen H. L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. *J Hepatol.* 2009; 51:696-706.
27. Holguin M. H., Fredrick L. R., Bernshaw N. J., Wilcox L. A., Parker C. J. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 1989; 84:7-17.
28. Holguin M. H., Martin C. B., Bernshaw N. J., Parker C. J. Analysis of the effects of activation of the alternative pathway of complement on erythrocytes with an isolated deficiency of decay accelerating factor. *J Immunol.* 1992; 148:498-502.
29. Holguin M. H., Wilcox L. A., Bernshaw N. J., Rosse W., Parker C. J. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 1989; 84:1387.
30. Hugel B., Socie G., Vu T., et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood.* 1999; 93:3451-6.
31. Kelly R. J., Hill A., Mitchell L. D., Richards S. J., Arnold L. M., Valters G. L., et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood.* 2011; 117:6786-92.
32. Kelly R., Richards S., Arnold L., Valters G., Cullen M., Hill A., et al. A spontaneous reduction of clone size in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated with eculizumab for greater than 12 months. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2009; 114:1992.

33. Kliche K. O., Schneider W. Das Chamäleon der Hämatologie: Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. *Onkolog Forum* 2. 1990; 1-12.
34. Lee G. R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Wintrobe's clinical hematology*. 1993; 1232-44.
35. Locke J. E., Magro C. M., Singer A. L., Segev D. L., Haas M., Hillel A. T., et al. The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2009; 9:231-35.
36. Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of proximal nocturnal hemoglobinuria. *F1000 Res*. 2016; 5:209.
37. Masterson W. J., Doering T. L., Hart G. W., Englund P. T. A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell*. 1989; 56(5):793-800.
38. Mathieu D., Rahmouni A., Villeneuve P., Anglade M. C., Rochant H., Vasile N. Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 85:3283-3288.
39. Matos-Fernandez N. A, Abou Mourad Y. R, Caceres W, Kharfan-Dabaja M. A. Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15:656-661.
40. Meri S., Morgan B. P., Davies A., Daniels R. H., Olavesen M. G., Waldmann H., Lachmann P. J. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990; 71:1-9.

41. Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*. 1993; 259(5099):1318-1320.
42. Miyata T., Yamada N., Iida Y., Nishimura J., Takeda J., Kitani T., Kinoshita T. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1994; 330:249.
43. Mukhina G. L., Buckley J. T., Barber J. P., Jones R. J., Brodsky R. A. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2001; 115:476-482.
44. Nair R. K., Khaira A, Sharme A., Mahajan S., Dinda A. K. Spectrum of renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: report of three cases and a brief review on the literature. *Int Urol Nephrol*. 2008; 40(2):471-5.
45. Nath K. A., Vercellotti G. M., Grande J. P., et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: Suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int*. 2001; 59:106-117.
46. Nicholson-Weller A., March I. P., Rosenfeld S. I., Austen K. F. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:5066-70.
47. Nicholson-Weller A., Spicer D. B., Austen K. F. Deficiency of the complement regulatory protein, "decay-accelerating-factor", on membranes of granulocytes, monocytes and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1985; 312,1091-1097.

48. Nishimura J., Kanakura Y., Ware R. E., et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine*. 2004; 83:193-207.
49. Nürnberger J., Philipp T., Witzke O., Opazo S. A., Vester U., Baba H. A., et al. Eculizumab for atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009; 360:542-44.
50. Oelschlaegel U., Besson I., Arnoulet C., Sainty D., Nowak R., Naumann R., et al. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol*. 2001; 23:81-90.
51. Olson J. S., Foley E. W., Rogge C., Tsai A. L., Doyle M. P., Lemon D. D. NO scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 685-697.
52. Ostendorf P. C., Schubert J., Schmidt R. E. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. *Hämatologie-Onkologie*. Ostendorf und Seeber. 1997; Urban und Schwarzenberg-Verlag München.
53. Parker C. J. Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet*. 2009; 373(9665):759-767.
54. Parker, C. J. Hemolysis in PNH. In *PNH and the GPI-linked proteins*. N. S. Young and J. Moss, Acad Press. San Diego, California, USA. 2000; 49-100.
55. Parker C. J., Omine M., Richards S., Nishimura J., Bessler M., Ware R., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106:3699-709.

56. Pettigrew H. D., Teuber S. S., Gershwin M. E. Clinical significance of complement deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173:108-23.
57. Richards S. J, Rawstron A. C, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry.* 2000; 42:223-233.
58. Piedras J., Lopez-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycoposphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry.* 2000; 42:234-238.
59. Pillemer L., Blum L., Lepow I. H., et al.: The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science.* 1954; 120:279-285.
60. Risitano A. M., Marando L., Seneca E., Rotoli B. Hemoglobin normalization after splenectomy in a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patient treated by eculizumab. *Blood.* 2008; 112:449-51.
61. Risitano A. M., Notaro R., Marando L., Serio B., Ranaldi D., Seneca E., et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood.* 2009; 113:4094-100.
62. Rosse W. F., Hillmen P., Schreiber A. D. Immune-mediated hemolytic anemia. *Hematology.* 2004; 48-62.
63. Rosse W. F., Nishimura J. Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present state and future problems. *Int J Hematol.* 2003; 77:113-20.
64. Rotoli B., Luzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol.* 1989; 26:201-207.

65. Röth A., Dührsen U., Schrezenmeier H., Schubert J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Dtsch Med Wochenschr.* 2009; 134:404-09.
66. Röth A, Hock C, Konik A, Christoph S, Dührsen U. Chronic treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients with eculizumab: safety, efficacy, and unexpected laboratory phenomena. *Int J Hematol.* 2011; 93:704-14.
67. Röth A., Hüttmann A., Rother R. P., Dührsen U., Philipp T. Long-term efficacy of the complement inhibitor eculizumab in cold agglutinin disease. *Blood.* 2009; 113:3885-86.
68. Röth A., Peine S., Dührsen U. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria turning Coombs-positive. *Int J Hematol.* 2010; 91:159-60.
69. Röth A., Schubert J., Hock C., Christoph S., Dührsen U. Effect of reducing intravascular hemolysis on ferritin homeostasis in eculizumab treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Blood.* 2008; 112:3437.
70. Rother R. P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; 293:1653-62.
71. Saso R., Marsh J., Cevreska L., Szer J., Gale R. P., Rowlings P. A., Passweg J. R., Nugent M. L., Luzzatto L., Horowitz M. M., Gordon-Smith E. C. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1999; 104:392-396.
72. Schlaich M. P., Schmitt D., Ott C., et al. Basal nitric oxide synthase activity is a major determinant of glomerular hemodynamics in humans. *J Hypertens.* 2008; 26:110-116.

73. Schneider R., Raff U., Vornberger N., et al. L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 2003; 64:216-225.
74. Schrezenmeier H., Bettelheim P., Panse J., Schubert J., Höchsmann B., Röth A., Nebe T. Empfehlungen zur Diagnostik der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie: deutsch-österreichischer Konsensus. *J Lab Med.* 2011; 35(6):315-327
75. Schrezenmeier H., Herstenstein B., Wagner B., Raghavachar A., Heimpel H. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidyl-inositol anchored proteins. *Exp Hematol.* 1995; 23:81-87.
76. Schubert J., Hillmen P., Röth A., Young N.S., Elebute M. O., Szer J., et al. Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2008; 142:263-72.
77. Schubert J., Röth A, Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease. *Europ J Haematol.* 2015; 94, 464-473.
78. Schubert J., Röth A., Bettelheim P., Stüssi G., Brümmendorf T. H., Schrezenmeier H. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH). Leitlinie, Stand Februar 2013.
79. Schubert J., Vogt H. G., Zielinska-Skowronek M., Freund M., Kaltwasser J. P., Hoelzer D., Schmidt R. E.: Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxymal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood.* 1994; 83:2323-2328.

80. Socié G., et al: Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet*. 1996; 348:573-77.
81. Socié G., Rosenfeld S., Frickhofen N., Glukman E. Tichelli A: Late clonal diseases of treated aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000; 37:91-101.
82. Späth-Schwalbe E., Schrezenmeier H., Heimpel H. PNH. Klinische Erfahrungen bei 40 Patienten in einem Zeitraum über 25 Jahre. *Dtsch med Wschr*. 1995; 120:1027-1033.
83. Strübing P. Paroxysmale Hämoglobinurie. *Dtsch med Wschr*. 1882; 8:1-14.
84. Sutherland D. R., Kuek N., Davidson J., Barth D., Chang H., Yeo E., et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007; 72:167-77.
85. Takahashi M., Takeda J., Hirose S., Hyman R., Inoue N., Miyata T., Ueda E., Kitani T., Medof M. E., Kinoshita T. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med*. 1993; 177:517-521.
86. Thomas T. C., Rollins S. A., Rother R. P., Giannoni M. A., Hartman S. L., Elliott E., et al. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol*. 1996; 33:1389-401.
87. Thompson M. J., Ninis N., Perera R., Mayon-White R., Phillips C., Bailey L., et al. Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet*. 2006; 367:397-403.

88. Tichelli A., Gratwohl A., Nissen C., Speck B.: Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk Lymph.* 1994; 12:167-175.

Tudela M., Jarque I., Pérez-Sirvent M. L., Palau J., Sanz M. A. Perfil clinica y evolutivo de la hemoglobinuria paroxística nocturna. *Sangre* 1993; 38:301-307.

89. Valla D., Dhumeaux D., Babany G., Hillon P., Rueff B., Rochant H., Benhamou J. P. Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal BuddChiari syndrome. *Gastroenterology.* 1987; 93:569-575.

90. Ware R. E., Hall S. E., Rosse W. F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 1991; 325:91-96.

91. Weber U. Paroxsymale nächtliche Hämoglobinurie. *Med Klin.* 1989; 84:40-42.

92. Yamada N., Miyata T., Maeda K., Kitani T., Takeda J., Kinoshita T. Somatic mutations of the PIG-A gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1995; 85:885.

93. Yamashina M., Ueda E., Kinoshita T., Takami T., Ojima A., Ono H., et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1990; 323:1184-89.

10 Abkürzungsverzeichnis

AA	:	Aplastische Anämie
AIHA	:	Autoimmunhämolytische Anämie
aHUS	:	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
CAD	:	cold agglutinin disease
DAF	:	decay accelerating factor
DAT	:	Direkter Antiglobulin Test (Coombs-Test)
DD	:	Differentialdiagnose
EDTA	:	Ethylendiamintetraessigsäure
EK/PRBC	:	Erythrozytenkonzentrat
GPI	:	Glykosylphosphatidylinositol
HAM-Test	:	Säure-Hämolyse Test nach HAM
Hb	:	Hämoglobin
HENPAS	:	hereditary erythroblastic multinuclearity with a positive acidified serum test
HFE	:	Hämochromatose
Hk	:	Hämatokrit
IPIG	:	International PNH Interest Group
KG	:	Körpergewicht
KMT	:	Knochenmarktransplantation
LDH	:	Laktatdehydrogenase
LE	:	Lungenembolie
m	:	männlich
MAC	:	Membranangriffskomplex
MDS	:	Myelodysplastisches Syndrom
MI	:	Myokardinfarkt
MIRL	:	Membrane-Inhibitor of reactive lysis
n.b.	:	nicht bestimmt
NO	:	Stickstoffmonoxid

NO ₃	:	Nitrat
OMF	:	Osteomyelofibrose
PIG	:	Phosphatidyl-Inositol-Glykan
PIG-A-Gen	:	Phosphatidylinositolglykan-A-Gen
PNH	:	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PNH-sc	:	Subklinische PNH
RPI	:	Retikulozyteproduktionsindex
TVT	:	Tiefe Venenthrombose
w	:	weiblich

Tabelle 1: Basisdaten der PNH-Patienten

Nr.	Alter	Geschlecht	AA	Thrombosen	Krankheits- dauer (Jahre)	Therapie- dauer (Monate)	Neutrophile (/nl) median (range) normal range: 1,7-6,5		Thrombozyten (/nl) median (range) normal range: 140-320		Hämatologische Antwort	Eculizumab
							Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab		
1	42	w		LE	18	7	2,2 (1,2-2,8)	1,9 (0,4-2,4)	116(79-145)	42 (4-91)	gut	abgebrochen
2	26	m	AA		1,5	12	0,7 (0,4-1,1)	0,6 (0,2-1,4)	63 (2-95)	106,5 (82-154)	gut	fortlaufend
3	39	m			3,2	23		1,7(1,6-1,7)	85 (72-104)	102 (72-121)	sehr gut	fortlaufend
4	21	m			1,7	12					gut	abgebrochen
5	29	m			5,2	36	1,1(0,6-3,2)	2,4 (2,0-3,1)	132 (11-164)	130 (123-144)	optimal	fortlaufend
6	19	w			9	24	2,4 (1,2-4,0)	1,7 (1,2-5,2)	168 (123-210)	128 (94-193)	gut	abgebrochen
7	49	m			9	57				186 (172-252)	sehr gut	fortlaufend
8	54	m	AA		11	30		1,5 (1,3-1,6)		80,5 (74-87)		fortlaufend
9	23	m	AA		9,5	65	1,4 (0,8-2,1)	1,4 (0,7-2,7)	82 (61-134)	115 (59-188)	gut	fortlaufend
10	27	m			9	70	3,1 (3-3,3)	2,8 (2,2-3,7)	145 (133-151)	142 (115-215)	sehr gut	fortlaufend
11	27	w			15	41		4,1 (3,0-5,2)		325 (288-333)	optimal	fortlaufend
12	20	w			6,6	43	1,6 (1,5-1,7)	2,3 (1,4-3,4)	131 (55-175)	200 (158-228)	optimal	fortlaufend
13	55	w			2,5	10	1,8 (1,3-4,1)	1,5(1,0-2,0)	204 (158-238)	172 (158-198)	sehr gut	fortlaufend
14	53	m		TVT	13,5	14		5,0 (3,4-8,6)	298(289-306)	246 (167-383)	optimal	fortlaufend
15	35	w			3,5	30				34 (16-100)	gut	fortlaufend
16	55	w		TVT	5	63	4,4 (4,2-4,8)	2,1 (1,1-3,8)	274 (273-314)	238 (181-302)	optimal	fortlaufend
17	27	m			15	39	1,8 (1,2-2,6)	2,0 (1,3-2,9)	181 (153-240)	146,5 (96-216)	optimal	fortlaufend
18	37	m	AA		21,5	39		2,0 (1,1-3,4)	167 (150-192)	164,5 (132-197)	sehr gut	fortlaufend
19	49	w	AA		9	31		3,0 (2,5-4,5)	187 (179-194)	185 (170-196)	optimal	fortlaufend
20	20	w	AA		0,7	5	3,0 (3,0-3,0)	2,6 (0,4-3,3)	86 (84-87)	75 (55-106)	gut	fortlaufend
21	83	m	AA		5,5	29		2,5 (1,6-7,6)	75(54-134)	114 (102-147)	sehr gut	fortlaufend
22	44	m		TVT, MI	9,5	44	9,4 (7,1-11,8)	4,6 (1,4-10,0)	144 (128-161)	125,5 (73-235)	sehr gut	abgebrochen
				Thrombotischer Tumor								
23	20	m	AA	des re Herzens	11	6	7,8 (7,8-7,8)	1,5 (0,0-5,8)	166 (23-305)	23 (5-128)	gut	fortlaufend
24	45	w		TVT, Portthrombose	22	24	2,2 (2,2-2,2)	2,2 (0,8-6,5)	195 (195-195)	275 (176-368)	sehr gut	fortlaufend
25	42	w	AA		10,5	3		2,7 (2,7-2,7)		141 (141-141)		fortlaufend
26	60	w			3	22		2,1 (1,6-2,5)	259(256-261)	210 (191-276)	optimal	fortlaufend
27	50	m			11	45	1,9 (1,9-1,9)	2,0 (1,5-2,7)	131(130-131)	120,5 (89-141)	optimal	fortlaufend
28	51	w		TVT	9	1	7,2(6,4-8,0)	5,6 (5,0-8,4)	339 (317-361)	327,5 (313-343)		fortlaufend
29	78	m		TVT	2,4	12	1,8 (1,7-3,3)	1,3 (1,2-1,6)	293(248-330)	180 (178-224)	gut	abgebrochen
30	23	w			1,8	17	6,0 (5,3-8,7)	3,1 (1,8-4,5)	193 (149-236)	206,5 (135-248)	optimal	abgebrochen
31	27	m			7,5	70	2,7 (2,0-3,6)	2,8 (1,7-5,3)	197 (170-213)	184 (116-246)	optimal	fortlaufend
32	20	w		TVT	4,5	29		1,3 (0,9-1,9)		57 (30-144)	gut	fortlaufend
Median (Bereich)	38 (11-80)				9 (0,7-22)	29 (1-70)	2,2	2,1	167	142		

AA: Aplastische Anämie; MI: Myokardinfarkt; LE: Lungenembolie; Alter ist zum Start der Eculizumab Therapie angegeben; TVT: tiefe Venenthrombose

Tabelle 2.1. Hämolytische Parameter bei PNH-Patienten vor und während der Eculizumab Therapie

Nr.	LDH (U/l), median (Bereich) (Normbereich: 100-247)		Bilirubin (mg/dl), median (Bereich) (Normbereich: 0,3-1,2)		Haptoglobin (g/l), median (Bereich) (Normbereich: 0,3-2,0)		Hemopexin (g/l), median (Bereich) (Normbereich: 0,5-1,15)	
	Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab
1	2372 (1952-3541)	480 (389-1277)	2,4 (1,7-3,0)	2,2 (1,4-2,8)	0,07 (0,06-0,07)	0,06 (0,06-0,06)	0,05 (0,05-0,05)	0,44 (0,37-0,53)
2	394 (352-1627)	438 (358-762)	1,3 (0,9-1,8)	2,0 (1,3-2,8)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	0,68 (0,68-0,68)	0,56 (0,56-0,56)
3	2219 (1826-2490)	281 (203-2200)	2,1 (1,77-6,13)	2,1 (1,39-5,2)	n.e.	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,70 (0,69-0,71)
4	2804 (2804-2804)	940 (217-1244)	6,0 (6,0-6,0)	1,9 (1,0-8,4)	n.e.	n.e.	n.e.	0,37 (0,36-0,41)
5	3010 (2132-3730)	380 (342-1259)	1,8 (1,3-3,1)	1,6 (1,1-3,1)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	0,05 (0,05-0,05)	0,35 (0,34-0,39)
6	1889 (1484-3332)	267 (214-476)	6,2 (4,1-10,8)	8,3 (4,2-14,0)	0,06 (0,06-0,10)	0,06 (0,06-0,09)	0,14 (0,14-0,14)	0,42 (0,35-0,48)
7	2658 (2658-2658)	209 (156-378)	6,0 (6,0-6,0)	7,0 (0,4-9,5)	n.e.	1,36 (1,36-1,36)	n.e.	0,36 (0,33-0,41)
8	n.e.	380 (366-394)	n.e.	2,0 (1,7-2,2)	n.e.	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,78 (0,77-0,79)
9	942 (417-1342)	282 (204-888)	1,1 (0,6-1,8)	1,7 (0,8-3,8)	0,05 (0,02-0,06)	0,07 (0,01-0,39)	n.e.	0,82 (0,76-0,93)
10	2630 (2514-2965)	259 (199-1780)	2,6 (2,6-2,7)	2,3 (1,4-3,8)	n.e.	0,06 (0,06-0,2)	n.e.	0,59 (0,54-0,61)
11	2756 (2756-2756)	209 (166-378)	6,0 (6,0-6,0)	7,0 (0,2-9,5)	n.e.	1,03 (1,03-1,03)	n.e.	0,36 (0,33-0,41)
12	1850 (775-2630)	253 (214-565)	0,8 (0,5-1,2)	1,0 (0,8-1,6)	0,33 (0,06-0,6)	0,06 (0,06-0,22)	n.e.	0,62 (0,59-0,72)
13	1119 (413-1540)	229 (188-310)	1,2 (0,7-2,8)	1,5 (0,9-2,2)	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,13 (0,05-0,3)	n.e.
14	1589 (1522-1655)	254 (208-606)	2,8 (2,3-3,3)	2,9 (0,9-5,1)	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,14 (0,14-0,14)	n.e.
15	2717 (2717-2717)	263 (94-698)	6,0 (6,0-6,0)	5,3 (2,8-9,5)	n.e.	n.e.	n.e.	0,36 (0,33-0,41)
16	1453 (1197-1865)	288 (240-563)	0,6 (0,6-0,7)	0,6 (0,1-0,9)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,48)	n.e.	0,82 (0,65-0,94)
17	2870 (2007-4870)	238 (184-421)	5,6 (4,1-9,0)	7,5 (4,2-18,2)	0,20 (0,2-0,2)	0,06 (0,01-0,08)	n.e.	0,36 (0,33-0,41)
18	3360 (2996-3917)	285 (240-659)	2,1 (1,6-2,7)	1,3 (0,8-2,0)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,1)	0,05 (0,05-0,05)	0,56 (0,22-0,68)
19	1933 (1870-2000)	238 (213-333)	2,3 (1,9-2,5)	2,4 (1,5-2,9)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,1)	0,05 (0,05-0,05)	0,78 (0,72-0,84)
20	1951 (1875-2027)	445 (301-1383)	1,4 (1,3-1,4)	1,2 (0,8-1,5)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	0,26 (0,22-0,43)
21	276 (204-490)	224 (183-449)	0,9 (0,6-2,3)	0,8 (0,5-1,3)	0,52 (0,06-1,46)	1,37 (1,14-1,86)	0,94 (0,83-0,95)	0,85 (0,79-0,93)
22	1360 (1044-1718)	667 (225-1633)	2,7 (2,2-3,4)	2,3 (0,7-5,2)	n.e.	0,06 (0,06-0,15)	n.e.	0,16 (0,05-1,05)
23	880 (431-2560)	143 (118-282)	2,1 (1,0-4,6)	2,1 (1,5-3,1)	0,06 (0,06-0,06)	0,91 (0,45-1,13)	0,54 (0,54-0,54)	0,65 (0,55-0,80)
24	1045 (516-2585)	274 (202-402)	1,1 (0,3-1,71)	1,1 (0,8-3,3)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	0,07 (0,07-0,07)	0,97 (0,97-0,97)
25	n.e.	211 (211-211)	n.e.	1,3 (1,3-1,3)	n.e.	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,75 (0,75-0,75)
26	1970 (1711-2229)	480 (376-683)	1,0 (0,8-1,2)	0,6 (0,4-0,9)	0,06 (0,06-0,06)	0,06 (0,06-0,66)	0,05 (0,05-0,05)	1,03 (0,69-1,06)
27	1286 (1254-1318)	221 (203-533)	1,6 (1,5-1,7)	1,5 (0,8-2,3)	n.e.	0,06 (0,06-0,1)	n.e.	0,54 (0,53-0,65)
28	1051 (1046-1055)	418 (346-550)	1,1 (1,1-1,1)	1,6 (0,9-2,3)	0,06 (0,06-0,06)	n.e.	0,28 (0,28-0,28)	n.e.
29	1001 (886-1049)	389 (260-696)	2,3 (2,2-2,4)	1,9 (1,3-2,5)	n.e.	0,06 (0,06-0,09)	n.e.	0,58 (0,38-0,67)
30	1880 (1535-2112)	356 (277-2018)	1,7 (1,3-2,35)	2,1 (0,6-3,5)	1,25 (0,1-5,0)	0,06 (0,06-0,1)	n.e.	0,51 (0,34-0,54)
31	2179 (1000-3491)	231 (173-650)	2,4 (1,26-3,6)	1,8 (1,2-2,89)	0,08 (0,08-0,08)	0,08 (0,06-1,01)	n.e.	0,90 (0,89-1,01)
32	2350 (1202-3750)	249 (214-488)	1,6 (0,6-2,1)	1,3 (0,16-2,0)	0,06 (0,06-0,06)	0,09 (0,09-0,09)	0,06 (0,06-0,06)	0,59 (0,59-0,59)
Median (Bereich)	1911 (276-3360)	271 (143-940)	2,1 (0,6-6,2)	1,85 (0,6-8,3)	0,06 (0,05-1,25)	0,06 (0,06-1,37)	0,07 (0,05-0,94)	0,58 (0,16-1,03)

LDH: Lactatdehydrogenase; n.e.: nicht erfasst

Tabelle 2.2. Hämolytische Parameter bei PNH-Patienten vor und während der Eculizumab Therapie

Nr.	Hämoglobin (g/dl), median (Bereich) (Normbereich: w:11,6-16,1, m: 13,7-17,2)				Reticulozyten (/nl), median (range) (Normbereich: 22-76)				RPI, Median (Bereich)		EKS (Einheit/Jahr)		Ferritin (µg/l), median (Bereich) (Normbereich: 20-290)			
	Pre-eculizumab	Eculizumab		Pre-eculizumab	Eculizumab		Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab	Pre-eculizumab	Eculizumab		
1	7,3	(4,9-8,6)	7,0	(5,6-7,9)	340	(190-480)	70	(60-210)	0,5	(0-2,1)	32	62	104	(62-217)	919	(292-1040)
2	7,0	(5,7-9,9)	7,2	(5,5-9,1)	88	(39,1-138,9)	115	(77,8-188,6)	1,3	(0,5-3)	2	2	1940	(1520-2360)	1125	(1010-1520)
3	8,6	(6,6-10,6)	9,8	(7,7-11,9)	n.e.		273	(271,7-273,7)	3,8	(3,7-3,8)			n.e.		213	(146-280)
4	n.e.		9,9	(7,4-13,2)	n.e.		n.e.		0,2	(0,0-4,2)	2	2	23	(23-23)	76	(73-100)
5	8,9	(7,4-9,7)	10,7	(7,9-13,2)	n.e.		253	(208,0-254,2)	3,8	(3,0-4,5)	25	0	30	(27-36)	216	(193-237)
6	8,6	(6,1-10,8)	8,2	(5,6-11,2)	225	(200-410)	n.e.		0,5	(0,0-2,6)	26	31	251	(143-312)	895	(503-1672)
7	n.e.		13,2	(10,5-16,2)	n.e.		n.e.		1,1	(1,1-1,5)	2	0	24	(24-24)	82	(73-646)
8	n.e.		9,8	(8,9-10,7)	n.e.		177	(162-192)	2,6	(2,4-2,7)			n.e.		1311	(962-1660)
9	9,4	(7,8-11,8)	9,4	(6,9-11,3)	110	(60-160)	129	(30-270)	1,5	(0,4-3,3)	14	12	573,5	(383-894)	1800	(767-2950)
10	8,8	(8,5-10,0)	9,7	(7,3-12,0)	355	(290-410)	290	(100-420)	3,3	(1,6-5,5)	24	2	49	(49-49)	316	(219-512)
11	n.e.		12,9	(10,5-14,1)	n.e.		33	(31-34)	0,5	(0,5-0,5)	4	0	22	(22-22)	82	(73-240)
12	9,9	(6,3-12,9)	10,8	(9,1-13,1)	170	(150-190)	250	(70-350)	3,3	(1,0-4,6)	24	0	16	(15-26)	67	(40-138)
13	10,6	(9,1-11,7)	10,5	(9,3-11,3)	106	(63-153)	101	(73-1319)	1,3	(0,8-1,8)	0	0	61	(28-84)	65	(37-92)
14	12,4	(12,2-12,6)	13,6	(11,9-15,7)	222	(208,5-236,2)	188	(85,9-353,7)	3,4	(1,7-5,7)	0	0	37	(37-37)	78	(48-328)
15	n.e.		10,4	(8,3-14,1)	n.e.		21	(11-74)	0,2	(0,1-0,7)	0	1	23	(23-23)	76	(73-134)
16	10,5	(8,6-12,3)	11,2	(6,6-13,7)	230	(170-290)	159	(50-260)	2,4	(0,7-4,1)	6	0	36	(34-52)	166	(47-284)
17	6,6	(5,1-10,5)	12,6	(8,8-14,6)	330	(280-390)	450	(170-650)	7,0	(2,8-11,7)	36	0	22	(11-27)	91	(65-245)
18	10,2	(8,6-11,9)	11,5	(8,4-12,4)	n.e.		226	(138,6-293,9)	3,4	(2,1-6,4)	25	4	80	(54-107)	1330	(207-1780)
19	9,5	(9,1-11,2)	10,4	(9,3-11,3)	n.e.		202	(167,9-250,6)	2,7	(2,3-3,6)	10	0	40	(38-42)	128	(49-156)
20	8,9	(8,1-9,6)	8,9	(7,3-10,7)	223	(207-238)	107	(72-148)	3,6	(2,6-4,6)	0	6	23,5	(23-24)	116	(48-229)
21	10,3	(7,8-12,2)	11,3	(9,5-12,5)	n.e.		64	(45-87)	0,9	(0,4-2,0)	8	3	5455	(1020-9540)	2510	(1480-6800)
22	9,2	(8,4-9,7)	9,2	(7,0-11,7)	150	(80-250)	90	(30-230)	1,3	(0,5-2,8)	36	10	1993	(1993-1993)	3490	(2460-5540)
23	11,3	(6,2-15,0)	9,5	(7,1-11,9)	69	(60-74)	23	(8,8-33,5)	0,1	(0,0-3,1)	14	44	482,5	(98-1620)	1210	(739-1710)
24	10,5	(6,7-12,8)	9,5	(6,4-12,9)	n.e.		152	(77-251)	2,1	(1,0-3,2)	4	3	1225	(502-1915)	1100	(229-2210)
25	n.e.		9,6	(9,6-9,6)	n.e.		90	(89,8-89,8)	1,2	(1,2-1,2)			n.e.		n.e.	
26	9,1	(9,0-9,2)	11,9	(9,3-12,5)	n.e.		50	(28-55)	0,7	(0,4-0,8)	6	0	123	(123-123)	119	(37-337)
27	11,0	(10,7-11,2)	12,4	(10,0-13,5)	75	(40-110)	120	(40-230)	1,8	(0,7-3,1)	4	0	18	(18-18)	84	(49-332)
28	9,8	(9,6-10,0)	9,6	(9,3-9,7)	90	(87,9-92,4)	106	(91-129)	1,3	(1,1-1,7)			30	(30-30)	n.e.	
29	8,8	(8,1-9,5)	8,6	(7,8-9,6)	100	(90-180)	70	(30-120)	0,8	(0,3-1,4)	10	38	104	(69-158)	1510	(1224-1870)
30	9,3	(7,5-10,8)	10,7	(8,8-11,7)	209	(151,9-387,3)	213	(149,7-305,7)	3,0	(2,2-4,0)	4	0	97	(97-97)	45	(22-66)
31	9,0	(7,9-10,8)	10,3	(7,1-12,1)	200	(24-260)	289	(10-670)	3,7	(0,9-8,9)	20	1	29	(10-51)	362	(56-642)
32	7,1	(3,6-8,5)	7,4	(5,0-11,6)	n.e.		177	(114,3-241,7)	1,6	(0,7-3,2)	40	36	156	(156-156)	1580	(299-3330)
Median (Bereich)	9,3	(6,6-12,4)	10,1	(7,0-13,6)	185	(69-355)	129	(21-450)	1,6	(0,1-7,0)	9 (0-40)	2 (0-62)	49	(16-5455)	215	(45-3490)

RPI: RetikulozytenProduktionsindex; EKs: Erythrozytenkonzentrate; n.e.: nicht erfasst

Patient	Vor Eculizumab (U/l)	Unter Eculizumab (U/l)
1.	2.372	480
2.	394	438
3.	2.219	281
4.	2.804	940
5.	3.010	380
6.	1.889	267
7.	2.658	209
8.	942	282
9.	2.630	259
10.	2.756	209
11.	1.850	253
12.	1.119	229
13.	1.589	254
14.	2.717	263
15.	1.453	288
16.	2.870	238
17.	3.360	285
18.	1.933	238
19.	1.951	445
20.	276	224
21.	1.360	667
22.	880	143
23.	1.045	274
24.	1.970	480
25.	1.286	221
26.	1.051	418
27.	1.001	389
28.	2.350	249
29.	1.880	356
30.	2.179	231
Median	1.911	271

Tabelle 3: LDH Werte im Median vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=30).

Patient	Vor Eculizumab (g/l)	Unter Eculizumab (g/l)
1.	0,07	0,06
2.	0,06	0,06
3.	0,06	0,06
4.	0,06	0,06
5.	0,05	0,07
6.	0,33	0,06
7.	0,06	0,06
8.	0,2	0,06
9.	0,06	0,06
10.	0,06	0,06
11.	0,06	0,06
12.	0,52	1,37
13.	0,06	0,91
14.	0,06	0,06
15.	0,06	0,06
16.	0,06	0,09
17.	1,25	0,06
18.	0,08	0,08
Median	0,06	0,06

Tabelle 4: Haptoglobin Wert im Median vor und unter der Therapie, (n=18).

Patient	Vor Eculizumab (g/l)	Unter Eculizumab (g/l)
1.	0,55	0,44
2.	0,68	0,56
3.	0,05	0,35
4.	0,14	0,42
5.	0,05	0,56
6.	0,05	0,78
7.	0,06	0,26
8.	0,94	0,85
9.	0,54	0,65
10.	0,07	0,97
11.	0,05	1,03
12.	0,06	0,59
Median	0,07	0,58

Tabelle 5: Hämopexin Wert im Median vor und unter der Therapie, (n=12).

Patienten	Vor Eculizumab (mg/dl)	Unter Eculizumab (mg/dl)
1.	2,4	2,2
2.	1,3	2,0
3.	2,1	2,1
4.	6,0	1,85
5.	1,75	1,6
6.	6,2	8,25
7.	6,0	7,0
8.	1,1	1,7
9.	2,6	2,3
10.	6,0	7,0
11.	0,8	1,0
12.	1,2	1,5
13.	2,8	2,9
14.	6,0	5,3
15.	0,6	0,6
16.	5,6	7,5
17.	2,1	1,3
18.	2,3	2,4
19.	1,35	1,2
20.	0,9	0,8
21.	2,7	2,3
22.	2,1	2,1
23.	1,1	1,1
24.	1,0	0,55
25.	1,6	1,5
26.	1,1	1,55
27.	2,3	1,85
28.	1,6	1,25
29.	1,73	2,1
30.	2,37	1,8
Median	2,1	1,85

Tabelle 6: Bilirubin Wert im Median vor und unter der Therapie, (n=30).

Patient	Vor Eculizumab (Anzahl/nl)	Unter Eculizumab (Anzahl/nl)
1.	340	70
2.	88	115
3.	110	129
4.	355	290
5.	170	250
6.	106	101
7.	222	188
8.	230	159
9.	330	450
10.	223	107
11.	150	90
12.	69	23
13.	75	120
14.	90	106
15.	100	70
16.	209	213
17.	200	289
Median	170	120

Tabelle 7: absolute Retikulozytenzahl vor und unter der Therapie, (n=17).

Patient	Vor Eculizumab	Unter Eculizumab
1 (2)	62,07	59,44
2 (5)	97,34	97,61
3 (9)	73,93	97,12
4 (13)	55,87	67,94
5 (16)	91,08	97,23
6 (17)	88,67	99,37
7 (18)	93,93	98,00
8 (19)	70,34	83,74
9 (20)	92,06	80,31
10 (21)	93,19	92,73
11 (23)	99,53	98,68
12 (24)	94,6	91,58
13 (26)	19,58	59,25
14 (31)	93,42	97,04
15 (32)	93,9	86,51
Median	92,06	92,73

Tabelle 8: Entwicklung der GPI-defizienten Granulozyten unter der Eculizumab Therapie, (n=15).

Patienten	Vor Eculizumab (µg/l)	Unter Eculizumab (µg/l)
1.	104	919
2.	1940	1125
3.	23	76
4.	30	216
5.	251	895
6.	24	82
7.	574	1800
8.	49	316
9.	22	82
10.	16	67
11.	61	65
12.	37	78
13.	23	76
14.	36	166
15.	22	91
16.	80	1330
17.	40	128
18.	24	116
19.	5455	2510
20.	1993	3490
21.	483	1210
22.	1225	1100
23.	123	119
24.	18	84
25.	104	1510
26.	29	362
27.	156	1580
28.	97	45
Median	55	191

Tabelle 9: Ferritin Werte vor und unter der Eculizumab Therapie, (n=28).

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A Röth, für die Überlassung und die intensiven Betreuung mit diesem Dissertationsthema, sowie für seine vielen Anregungen und Hilfestellungen bei den Untersuchungen.

Darüber hinaus möchte ich hier Herrn Prof. Dr. med. U. Dührsen für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung diese Dissertation durchführen zu können.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.