

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med Steinhoff

---

**Praktikabilität der Bestimmung von  
Ciclosporin A aus Trockenblut  
im ambulanten Bereich**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Anna Rohfleisch  
aus Filderstadt

Lübeck 2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med Jan Kramer

2. Berichtstatterin/Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.05.2016

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
1.1 Entwicklung der Nierentransplantation	1
1.2 Ciclosporin A	2
1.2.1 Historie	2
1.2.2 Wirkmechanismus	3
1.2.3 Pharmakokinetik	4
1.3 Therapeutisches <i>drug monitoring</i> für Ciclosporin A	5
1.3.1 Grundlagen	5
1.3.2 Laborchemische Messmethoden	6
1.4 Trockenblutproben	8
1.5 Fragestellung	9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Material	11
2.2 Methoden	12
2.2.1 Studiendesign und Ethik	12
2.2.2 Studienteilnehmer	13
2.2.3 Fallzahlberechnung	14
2.2.4 Laborchemische Methoden	14
2.2.5 Statistische Methoden zur Auswertung der Ciclosporin A-Spiegel	15
2.2.6 Füllung der <i>dried blood spots</i>	19
2.2.7 Erhebung der Fragen	19
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1 Studienteilnehmer	21
3.2 Validation der LCMS-Analyse zur quantitativen Bestimmung von Ciclosporin A aus Trockenblutproben	23
3.2.1 Prüfung auf Normalverteilung	23
3.2.2 Darstellung der Ergebnisse im Bland-Altman Plot	26

3.2.3 Darstellung der Ergebnisse mittels Passing-Bablok Regression	31
3.3 Fragebogenauswertung	35
3.3.1 Geschlecht	36
3.3.2 Alter	36
3.3.3 Vergangene Zeit seit der Nierentransplantation	37
3.3.4 Blutzuckermessung	37
3.3.5 Quickwertmessung	39
3.3.6 Anleitung	39
3.3.7 Probleme	40
3.3.8 <i>Dried blood spots</i> als Zukunftsmethode	40
3.3.9 Bevorzugte Methode	41
3.3.10 Zeitersparnis	42
3.3.11 Versand	43
3.3.12 Zeitaufwand	43
3.3.13 Umweg	43
3.3.14 Zusammenhang zwischen Patientenalter und bevorzugter Methode	43
3.3.15 Zusammenhang zwischen der Zeit seit der ersten Nierentrans- plantation und der bevorzugten Methode	44
3.3.16 Vorteile aus Sicht des Patienten	45
3.3.17 Nachteile aus Sicht des Patienten	45
3.3.18 Verbesserungsvorschläge aus Sicht des Patienten	45
3.4 Füllung der dried blood spots	45
<b>4. Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1 Hintergrund der Studie	47
4.2 Bewertung der Ergebnisse der klinischen Studie	48
4.2.1 Bewertung der Studienergebnisse für den Methodenvergleich	48
4.2.2 Bewertung der Studienergebnisse für die Fragebogenauswertung	51
4.2.3 Bewertung der Kapillarblutentnahme	53
4.3 Ausblick	54
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>

<b>7. Anhang</b>	<b>V</b>
Anhang 1: Votum der Ethikkommission	V
Anhang 2: Patientenaufklärung	VI
Anhang 3: Einverständniserklärung	VIII
Anhang 4: Anleitung zur Kapillarblutentnahme	IX
Anhang 5: Protokoll zur Kapillarblutentnahme	X
Anhang 6: Fragebogen	XI
<b>8. Danksagung</b>	<b>XIV</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>XV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AUC	<i>area under the curve</i>
C <sub>0</sub>	Talspiegel
C <sub>2</sub>	Bergspiegel
CNI	Calcineurin-Inhibitor
CsA	Ciclosporin A
DBS	<i>dried blood spot</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i> )
LCMS	<i>Liquid chromatography</i> -Tandem-Massenspektrometrie
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
RM	Referenzmethode
s.	siehe
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TDM	Therapeutisches <i>drug monitoring</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VM	Vergleichsmethode
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Entwicklung der Nierentransplantation**

Die erste langfristig erfolgreiche Nierentransplantation gelang Joseph E. Murray mit seiner Arbeitsgruppe am 23. Dezember 1954. Es handelte sich um eine Lebendspende von Ronald Herrick für seinen eineiigen Zwillingsbruder Richard, der noch 8 Jahre mit dem Transplantat lebte. Durch die isogene Transplantation kam es zu keiner Abstoßungsreaktion [1], [2]. Allerdings führten weitere Versuche, die mit allogenen Spenderorganen stattfanden, zu Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen, so dass immunologische Mechanismen als Ursache angenommen wurden [3], [4]. Um die Nierentransplantation einer breiteren Patientengruppe zugänglich zu machen, wurden verschiedene Methoden der Immunsuppression erprobt. In den späten 50er Jahren wurde die präoperative Behandlung mit Röntgenstrahlung zur Immunsuppression versucht. Diese erwies sich allerdings als wenig erfolgreich, denn nur einer von zwölf Patienten überlebte. Mit der Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung von 6-Mercaptopurin und seinem weniger toxischen Metaboliten Azathioprin gelang um 1960 ein großer Fortschritt. In Kombination mit Steroiden konnte ein Ein-Jahres-Überleben des Transplantates von etwa 50% erzielt werden [4], [5]. Im Jahr 1976 gelang durch Ciclosporin der Durchbruch in der Transplantationsmedizin. Als Dreifachkombinationstherapie mit Azathioprin und Steroiden konnte das Ein-Jahres-Überleben des Nierentransplantates auf 85 bis 95% angehoben werden. In den folgenden Jahren wurden weitere Immunsuppressiva, wie Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Sirolimus, Everolimus und monoklonale Antikörper entdeckt [4], [5]. Die Fünf-Jahres-Transplantatfunktionsrate nach Nierentransplantation betrug 2013 nach Lebendspende 87,5% und 70,9% nach postmortaler Organspende [6].

Heute ist die Nierentransplantation der Goldstandard zur Behandlung von Patienten mit einer chronisch terminalen Niereninsuffizienz. Im Jahr 2013 erhielten in Deutschland 2272 Patienten ein Nierentransplantat. Rund 8000 Menschen warteten auf ein Spenderorgan, wobei die durchschnittliche Wartezeit auf eine Nierentransplantation fünf bis sechs Jahre betrug [6].

Die Alternativtherapie zur Transplantation ist die Dialyse, allerdings sind die Überlebenschancen und die Lebensqualität nach erfolgreicher Transplantation besser

als unter chronischer Dialysebehandlung. Für ein verbessertes Patienten- und Transplantatüberleben sollte die Transplantation so früh wie möglich nach Diagnosestellung stattfinden. Ebenso ist eine intensive und interdisziplinäre Nachsorge maßgebend für ein gutes Langzeitergebnis [7], [8].

### **1.2 Ciclosporin A**

#### 1.2.1 Historie

Seit 1957 wurde in den Laboren der Firma Sandoz in Basel nach einem Medikament zur Immunsuppression gesucht. Stähelin und sein Team entwickelten dafür einen Hämagglutininintest mit dem die immunsuppressive und zytotoxische Wirkung einer Substanz getestet werden konnte. Im Jahr 1971 wurde ein Stoffwechselprodukt des Pilzes *Tolypocladium inflatum* Gams geprüft und zeigte immunsuppressive Aktivität bei geringer Zytotoxizität. Dieses Stoffwechselprodukt wurde Ciclosporin A genannt. Seine Wirkung wurde durch weitere Experimente, unter anderem Haut- und Knochenmarkstransplantationen bei Mäusen, bestätigt. Allerdings stellte die geringe Wasserlöslichkeit von Ciclosporin A bei der Erforschung ein Hindernis dar, da die Aufnahme des Wirkstoffes ins Blut dadurch erschwert war. Um eine bessere Bioverfügbarkeit zu erzielen, führten Stähelin und Borel Selbstversuche durch. Dabei stellte sich heraus, dass eine ölhaltige Mischung erhöhte Ciclosporin A-Blutspiegel erzielte [9], [10].

Nur vier Jahre nach der Entdeckung von Ciclosporin A begann die klinische Testphase. Im Jahr 1976 hielt Borel einen Vortrag über die Wirkung von Ciclosporin A und weckte damit das Interesse vieler Forscher und Ärzte. Unter anderen wurde Sir Roy Calne in Cambridge auf das Immunsuppressivum aufmerksam und begann das Medikament seinen nierentransplantierten Patienten zu verabreichen. Seine Ergebnisse wurden im Dezember 1978 im *Lancet* veröffentlicht [11]. Es zeigte sich, dass Ciclosporin A im menschlichen Organismus die gleiche immunsuppressive Wirkung hat, die schon in den Tierversuchen nachgewiesen werden konnte. Selbst die stärkste aufgetretene Abstoßungsreaktion war noch moderat und zeigte eine Immunreaktion, die leicht mit Steroiden behandelbar war. Allerdings konnten drei Nebenwirkungen ausgemacht werden: leichte Vermehrung der Gesichtshaarung, Leber- und Nierentoxizität. Letztere stellte

bei einer Nierentransplantation eine besondere Herausforderung dar. Keiner der sieben von Calne behandelten Nierentransplantierten konnte unter der Behandlung mit Ciclosporin A eine normale Nierenfunktion aufweisen, jedoch konnten fünf der Patienten ohne Symptome einer Niereninsuffizienz nach Hause entlassen werden. Calne vermutete einen direkten toxischen Effekt auf das renale Tubulussystem oder dessen Blutversorgung. Wobei seiner Meinung nach jeder Patient verschieden auf das Immunsuppressivum reagiere und die Nebenwirkungen auch dosisabhängig seien [9], [11].

Mit der Zulassung von Ciclosporin A unter dem Namen „*Sandimmun*“ Anfang der 80er Jahre konnte das Transplantatüberleben im ersten Jahr von 50% auf über 80% angehoben werden. Die Mortalität sank und die Steroiddosis konnte reduziert werden. Außerdem verbesserten sich die operativen Techniken. Ciclosporin gehörte mit Kortison und Azathioprin im Rahmen einer Dreifachkombination zur Standardtherapie nach Nierentransplantation [12]. Zudem konnten nun auch Transplantationstechniken anderer Organe entwickelt werden [4].

Unter der Therapie mit „*Sandimmun*“ zeigten sich jedoch stark schwankende Wirkspiegel, die durch Resorptionsstörungen erklärt werden konnten. Um den damit verbundenen Beeinträchtigungen von Wirksamkeit und Verträglichkeit entgegenzuwirken, wurde Mitte der 90er Jahre eine Mikroemulsion entwickelt, die unter dem Namen „*Neoral*“ auf den Markt kam. Diese neue Darreichungsform führte zu einer höheren Bioverfügbarkeit und weniger Abstoßungsreaktionen [13]. Bis heute spielt Ciclosporin A eine bedeutende Rolle in der Vorbeugung von Abstoßungsreaktionen. Weiterhin wird es auch zur Therapie ausgewählter Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder schwerste Psoriasis eingesetzt [4], [14], [15].

### 1.2.2 Wirkmechanismus

Ciclosporin A ist ein Calcineurin-Inhibitor, dessen immunsuppressive Wirkung auf der Hemmung der T-Zell-Aktivierung beruht [14].

Der T-Zell-Rezeptor wird durch Kontakt mit dem Spenderantigen, das vom *major histocompatibility complex* (MHC)-Rezeptor präsentiert wird, aktiviert. Dadurch wird eine kalziumabhängige intrazelluläre Signalkette ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung des Calcineurins steht. Dies führt zu Dephosphorylierung des *nu-*

*clear factor* (NFAT) und damit zu dessen Translokation in den Zellkern. Dort ermöglicht der NFAT die Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, Interferon (IFN)- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ .

Ciclosporin A bindet im Zytoplasma der T-Lymphozyten an Immunophilin. Dieser Immunophilin-Ciclosporin-Komplex bindet an Calcineurin und verhindert dessen Aktivierung und damit auch die Translokation von NFAT und die Zytokingentranskription. Somit hemmt Ciclosporin A die Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten [4], [16].

Ciclosporin A hat allerdings auch eine Reihe von Nebenwirkungen, wobei die meisten dosisabhängig sind. Eine der entscheidendsten Nebenwirkungen ist die Nephrotoxizität. Sie kommt teilweise durch Vasokonstriktion des Vas afferens zustande, wodurch der renale Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate gesenkt werden. Diese Effekte sind durch Reduzierung der Ciclosporin A Dosis reversibel. Langfristig verursacht Ciclosporin A aber auch nicht reversible Schäden, wie interstitielle Fibrose und tubuläre Arteriopathie [4].

Eine andere häufige Folge der Einnahme von Ciclosporin A ist der Bluthochdruck, der sich sekundär durch die renale Vasokonstriktion ergibt. Neurotoxische Effekte sind eher selten. Es kann aber, vor allem im Zusammenhang mit niedrigen Magnesiumspiegeln im Serum, zu Kopfschmerzen oder Tremor kommen. Außerdem können Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie oder Hyperkaliämie auftreten. Gingivahyperplasie und Hypertrichosis sind ebenfalls Ciclosporin A typische Nebenwirkungen. Weiter besteht durch die immunsuppressive Wirkung bei den Patienten ein erhöhtes Malignomrisiko mit vor allem erhöhter Gefahr maligner Lymphome [4], [14].

### 1.2.3 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik des Calcineurin-Inhibitors (CNI) Ciclosporin A unterliegt starker inter- und intraindividuellem Schwankungen. Die orale Bioverfügbarkeit von Ciclosporin A, sprich der bei oraler Aufnahme in die systemische Zirkulation gelangende Anteil, beträgt je nach Zubereitungsform zwischen 20 und 50%. Die maximale Plasmakonzentration wird nach 1,5 bis 2 Stunden erreicht, die Plasmahalbwertszeit beträgt 7-14 Stunden. Ciclosporin A verteilt sich sehr stark außerhalb

des vaskulären Kompartiments und wird über intestinales und hepatisches Cytochrom P450-3A metabolisiert. Die intestinale Resorption erfolgt über P-Glycoprotein. Sowohl Cytochrom P450-3A und das P-Glycoprotein zeigen Polymorphismen, die die Enzymaktivität signifikant beeinflussen können. Darüberhinaus können andere Medikamente und Xenobiotika die Enzymaktivität induzieren oder inhibieren [14], [17], [18].

### 1.3 Therapeutisches *drug monitoring* für Ciclosporin A

#### 1.3.1 Grundlagen

Therapeutisches *drug monitoring* (TDM) für Ciclosporin A aus venösem Blut ist eine Routineanalytik in der labormedizinischen Diagnostik. Ciclosporin A hat eine geringe therapeutische Breite und eine stark variable Pharmakokinetik. Außerdem besteht eine relativ schlechte Korrelation zwischen Dosis und Effekt. Deshalb wird Ciclosporin A zu den „*critical dose*“ Pharmaka gezählt und regelmäßige Blutspiegelmessungen sind notwendig [19]. Es ist erforderlich die Dosierung zu individualisieren und zu überwachen, um damit das Risiko einer unzureichenden Immunsuppression mit Folge einer akuten Abstoßung oder das Risiko einer Überimmunsuppression mit der Gefahr der Sepsis und die Entwicklung der Ciclosporin A-Toxizität zu reduzieren [20].

Hariharan et al. zeigten in einer von 1988 bis 1996 durchgeführten Arbeit, dass das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten von akuten Abstoßungsreaktionen beeinflusst wird und diese somit möglichst vermieden werden sollten. Für Transplantate ohne akute Abstoßungsreaktion ergab sich eine nahezu doppelt so lange Halbwertszeit wie für Transplantate mit akuten Abstoßungen. Durch die Reduktion akuter Abstoßungen stellte sich eine geringere Rate an Transplantatversagen aufgrund chronischer Abstoßung ein [21].

Die individuelle Bioverfügbarkeit lässt sich anhand der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve des Medikaments im Blut darstellen (area under the curve, AUC) [14]. Dies ist aufwendig und routinemäßig wird nur der Talspiegel ( $C_0$ ), das heißt die Blutkonzentration 12 Stunden nach der letzten Einnahme von Ciclosporin A, bestimmt [22].

Im Jahr 1999 verglichen Mahalati et al. in einer prospektiven Studie die Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen und die Ciclosporin A-Toxizität bei nierentransplantierten Patienten mit der  $AUC_{0-4}$  von Ciclosporin A. Dabei ergab sich eine schlechte Korrelation für den Talspiegel ( $C_0$ ) mit der  $AUC_{0-12}$  und der  $AUC_{0-4}$ . Die  $C_0$ -Spiegel unterschieden sich bei Patienten mit und ohne akuter Abstoßung nicht signifikant, wohingegen die  $AUC_{0-4}$  bei Patienten mit Abstoßung signifikant niedriger war. Auch für die Nephrotoxizität erwies sich die  $AUC_{0-4}$  als besserer Prädiktor [23].

Halloran et al. untersuchten die Korrelation zwischen den Ciclosporin A-Blutkonzentrationen zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten und der Calcineurin-Phosphatase-Hemmung. Dabei ergaben sich die maximale Hemmung und die maximale Konzentration zwei Stunden nach Einnahme von Ciclosporin A [24].

Auch in weiteren Studien konnten diese Ergebnisse reproduziert und eine hohe Korrelation des Bergspiegels ( $C_2$ ), das heißt zwei Stunden nach der Einnahme des Ciclosporins A, zur  $AUC_{0-4}$  ( $r^2 > 0,8$ ) demonstriert werden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass das  $C_2$ -Monitoring die renale Funktion und die Blutdruckeinstellung verbessern kann, indem eine Überdosierung von Ciclosporin A leichter erkannt wird. Außerdem wurde eine hohe Prädiktion für akute Abstoßungen nachgewiesen. Daraus ergibt sich der  $C_2$ -Spiegel als zuverlässiger Surrogatmarker zur Dosisoptimierung von Ciclosporin A, der zu einer besseren klinischen Wirksamkeit und Verträglichkeit führt [25], [26].

Ungeachtet dessen wird derzeit, vor allem aus Gründen der Praktikabilität, der  $C_0$ -Spiegel zur Dosisüberwachung genutzt. Die intraindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik zum Messzeitpunkt  $C_2$  ist stärker als zum Zeitpunkt  $C_0$ . Daher ist die Einhaltung der Abnahmezeit essenziell. Die Blutentnahme sollte in einem Zeitraum von höchstens plus/minus 15 Minuten um den  $C_2$ -Zeitpunkt erfolgen. Dies erfordert zusätzliche organisatorische Maßnahmen für das Klinikpersonal [20], [22].

### 1.3.2 Laborchemische Messmethoden

Die Messung des Ciclosporin A-Spiegels im Blut kann sowohl immunchemisch als auch chromatographisch erfolgen.

Bei den immunchemischen Verfahren werden Antikörper verwendet, die das Cic-

losporin A als Antigen binden. Allerdings kann es bei diesen Tests zu Kreuzreaktionen mit nicht wirksamen Metaboliten des Ciclosporin A kommen, so dass die Ciclosporin A-Konzentration in der Probe höher gemessen wird, als sie eigentlich ist [27]–[29].

Steimer zeigte in einer Vergleichsstudie mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) eine Abweichung zwischen 9 und 57% [28]. Bei McBride et al. lag diese zwischen 0-31% für erwachsene Nierentransplantierte und 9-40% bei Kindern [29].

Im Gegensatz dazu sind die chromatographischen Verfahren spezifischer. Zunächst bestand diese Methode aus HPLC und UV-Detektion. Dabei werden die Analyten zuerst chromatographisch aufgetrennt. Anschließend werden die Peakflächen/-höhen mit Hilfe der UV-Detektion quantitativ ausgewertet. So können außer der Muttersubstanz auch die Metabolite gemessen werden.

Ende der 90er Jahre wurde mit der Kopplung von Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) eine weniger aufwändige Methode entwickelt. Die Sensitivität sowie die Selektivität wurden durch den Einsatz von Triple-Quadrupol-Geräten verbessert. Üblich ist die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit einer Elektrospray-Ionisation (ESI). Das heißt die Vernebelung der flüssigen Probe erfolgt in ein Hochspannungsfeld hinein. Dafür werden die Analyten in einer mobilen Phase durch eine Metallkapillare geleitet. An dieser ist eine Spannung angelegt. Der Austritt aus der Kapillare erfolgt sowohl für den Analyten als auch für das Lösungsmittel als Aerosol. Durch die Verdampfung der Lösungsmittel bleiben die Analyten in ionisierter Form über. Diese werden in einem Magnetfeld beschleunigt und in das Massenspektrometer geleitet. Im ersten Quadrupol werden die Ionen aufgrund ihrer Masse/Ladung extrahiert. Im zweiten Quadrupol erfolgt die Fragmentierung der Analytionen. Diese sogenannten Tochterionen werden im dritten Quadrupol selektiert und anschließend mit einem Photomultiplier oder anderen Detektoren quantifiziert [30], [31].

Dieses als Liquidchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LCMS) bezeichnete Verfahren stellt heute die Referenzmethode zur Bestimmung von Immunsuppressiva dar. Im Gegensatz zu der spezifischeren LCMS sind die Immunoassays aber weniger aufwändig und kostengünstiger [31], [32].

#### 1.4 Trockenblutproben

Die Probengewinnung durch Trockenblut wurde erstmals 1963 von Robert Guthrie beschrieben. Er setzte die Methode als Screeningtest für Phenylketonurie bei Neugeborenen ein und auch heute noch wird diese Methode als Standardverfahren bei Neugeborenen-Screenings eingesetzt [32].

Die technischen Weiterentwicklungen führten dazu, dass immer mehr Methoden, für die nur ein geringeres Probenvolumen erforderlich ist, publiziert wurden. Mit der Etablierung dieser Mikromethoden wurden auch erste Ansätze zur Bestimmung von Medikamenten aus dem Kapillarblut in der Praxis erprobt [33], [34].

Die kapillare Blutentnahme stellt eine Alternative zur venösen Vollblutentnahme der Messung von Ciclosporin A dar. Dessen Validität wurde von mehreren Autoren publiziert. Im Vergleich zur Entnahme aus dem Ohrläppchen bietet sich die Entnahme aus der Fingerbeere zur eigenständigen Entnahme durch den Patienten an. Zudem wird die Bestimmung des C<sub>2</sub>-Spiegels erleichtert [35], [36].

Erstmals kombinierten 1987 Lampe et al. die Kapillarblutentnahme (*dried blood spot*) mit der Trockenblutprobe zur Bestimmung von Ciclosporin A. Dabei wurden 20 µl Kapillarblut auf ein Filterpapier gegeben und anschließend das Ciclosporin A mit einer Tris/Tween-Lösung vom Filterpapier extrahiert. Die Quantifizierung fand mittels Radioimmunoassay statt und zeigte eine gute Korrelation zur venösen Entnahme [37].

Wilhelm et al. führten 2012 eine ähnliche Methode durch. Das Präzipitationsreagenz bestand hier jedoch aus ZnSO<sub>4</sub>-Lösung, Ciclosporin D und Ascomycin. Die Quantifizierung fand mittels LCMS statt. Die Äquivalenz der beiden Messungen konnte mit Hilfe eines Korrekturfaktors, der den Hämatokrit miteinbezieht, nachgewiesen werden [31].

In anderen medizinischen Bereichen wurde bereits die Praktikabilität von selbstständig abgenommenen *dried blood spots* untersucht. Jager et al. zeigten die Durchführbarkeit der Tamoxifen-Bestimmung aus selbstständig abgenommenen und per Post versandten *dried blood spots* bei Brustkrebspatienten [38]. Sakhi et al. beschrieben die Machbarkeit im Rahmen von epidemiologischen Studien [39].

### 1.5 Fragestellung

Patienten, die eine Organtransplantation erhalten haben, müssen ihr Leben lang Medikamente zur Immunsuppression einnehmen. Da diese eine sehr geringe therapeutische Breite haben, ist eine regelmäßige Messung der Immunsuppressiva im Blut erforderlich. An Hand der gemessenen Konzentrationen kann die Dosierung individuell angepasst werden um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Im Rahmen einer Nierentransplantation können unter der Therapie mit Ciclosporin A sowohl toxische Effekte auf Grund von Überdosierungen als auch Abstoßungsreaktionen durch eine unzureichende Immunsuppression in der Folge von zu niedrigen Wirkstoffkonzentrationen auftreten.

In der ambulanten Therapie mit Ciclosporin A ist die Bestimmung von Talspiegeln aus venösem Blut Teil der Routinenachsorge nierentransplanteder Patienten, jedoch wird die Lebensqualität der Patienten durch häufige Arztbesuche beeinträchtigt.

Eine weniger einschränkende Methode ist die selbstständige Blutentnahme durch den Patienten. Hierzu eignet sich die Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere. Die Probe kann auf ein spezielles Filterpapier aufgebracht, per Post versandt und anschließend mittels LCMS quantifiziert werden.

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe entwickelten und validierten Wilhelm et al. eine Methode zur Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren mittels LCMS aus Trockenblutproben. Es wurde eine vereinfachte Probenentnahme aus der Fingerbeere mit der herkömmlichen venösen Probenentnahme verglichen. Die Kapillarblutentnahme fand in einem kontrollierten stationären Umfeld statt und wurde von einer *study nurse* durchgeführt.

Ziel dieser Studie ist nun die Überprüfung der Durchführbarkeit des Transfers des etablierten Messverfahrens in den ambulanten Versorgungsbereich. Dazu sollen Patienten geschult werden die Probengewinnung aus Kapillarblut im häuslichen Umfeld selbst durchzuführen, damit diese Proben dann per Postversand in das Labor verschickt werden können.

Diese Art der kapillären Blutentnahme könnte eine Erleichterung im *monitoring* transplanteder Patienten mit sich bringen. Dem Patient würde der regelmäßige Arztbesuch zur venösen Blutentnahme erspart bleiben. Dieser Vorgang ist häufig mit einem hohen zeitlichen Aufwand für den Patienten und Transportkosten verbunden. Für den betreuenden Arzt könnte die Nachsorge nach Transplantationen

ebenfalls erleichtert werden, da der aktuelle Blutspiegel des Immunsuppressivums dem Arzt bereits vorliegen könnte, wenn der Patient den Spezialisten in der Nachsorge aufsucht. Aktuell erfolgt die venöse Blutentnahme, wenn der Patient den Nephrologen aufsucht und die Werte liegen erst vor, wenn der Patient den Arzt wieder verlassen hat. Dies bedeutet, dass mit dem Patienten häufig telefonische Absprachen zur nötigen Dosisanpassung erfolgen müssen und der Patient diese Änderungen nur mündlich und nicht schriftlich erhält. Zudem ist eine zusätzliche Erhöhung der diagnostischen Sicherheit im Rahmen der häuslichen kapillären Blutentnahme sowohl durch eine Steigerung der Frequenz der Blutspiegelkontrolle als auch durch die zukünftige Durchführung eines Tal- und Bergspiegels denkbar. Beides ist in der heutigen Routine nicht üblich oder nur mit erhöhtem logistischem und zeitlichem Aufwand möglich.

Im Fokus dieser Studie steht die Übertragung der bereits etablierten Methode an Hand der Ciclosporin A Bestimmung in die ambulante Patientenversorgung. Dabei sollen sowohl die Patientenzufriedenheit als auch die logistischen Herausforderungen überprüft werden.

Als Ziel steht zum einen die Vermeidung der häufigen venösen Blutentnahmen und der zahlreichen Ambulanztermine für den Patienten im Vordergrund. Auch eine zeitliche Ersparnis für den Patienten durch die Durchführung im häuslichen Umfeld wird angestrebt. Zum anderen soll eine Verbesserung des Ciclosporin A-Monitorings durch die Kontrolle von sowohl Tal- als auch Bergspiegeln erzielt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Acetonitril HPLC ultragradient	(Baker, Griesheim, Germany)
Ameisensäure	(Merck, Darmstadt, Germany)
Ammoniumacetat	(Merck, Darmstadt, Germany)
Architect Cyclosporin Reagenz Kit (1L75)	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Architect Tacrolimus Reagenz Kit (1L77)	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Architect System i2000 SR	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Ascomycin	(Recipe, München, Germany)
Briefumschläge, herkömmlich	
Cyclosporin D	(Recipe, München, Germany)
Eppendorfpipette 10 – 100 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipettenspitzen 100 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipette 100 – 1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Eppendorfpipettenspitzen 1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Germany)
Ethanol	(Merck, Darmstadt, Germany)
Waters Nova Pack C18 2,1 x 10 mm	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Autosampler Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Pumpe Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
LC Säulenofen Alliance 2795	(Waters, Eschborn, Germany)
Lochstanze 10 mm	(E-Top)
Lochstanze 5 mm	(E-Top)
Massenspektrometer Quattro Micro	(Waters, Eschborn, Germany)
Methanol LCMS Grade	(Baker, Griesheim, Germany)
Monovette EDTA 2 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Propanol, 2-	(Merck, Darmstadt, Germany)
Proteinsaver™ 903 Card	(Whatman, Maidstone, U. K.)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Reaktionsgefäß 2,0ml	(Sarstedt, Nürnberg, Germany)
Safty Lanzetten 1,5 mm	(HTL-Strefa, Ozorkow, Poland)
Software MassLynx 4.1	(Waters, Eschborn, Germany)
Heizthermomixer MHR 23	(DITABIS, Pforzheim, Germany)

Transplant-Vorbehandlungsröhrchen	(Abbott, Wiesbaden, Germany)
Vortexer REAX 2000	(Heidolph, Schwabach, Germany)
96-Well-Microtiterplatten	(Waters, Eschborn, Germany)
Zentrifuge EBA12	(Hettich, Tuttlingen, Germany)
Zinksulfat-Heptahydrat	(Merck, Darmstadt, Germany)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studiendesign und Ethik

Um die Praktikabilität der Bestimmung von Ciclosporin A aus Trockenblut im ambulanten Bereich zu überprüfen, wurde bei der Ethikkommission der Universität Lübeck eine klinische Studie beantragt und von dieser genehmigt (s. Anhang 1). Hierfür wurden eine Patientenaufklärung, sowie eine Einverständniserklärung des Patienten (s. Anhang 2 und 3) gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki 2008 erarbeitet [40].

Die vorliegende klinische Studie ist eine *proof-of-concept* Studie im Hinblick auf die Praktikabilität im häuslichen Umfeld.

Teilnehmer der Studie sollten nierentransplantierte Patienten werden, die mit Ciclosporin A im interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck behandelt werden. Es sollten mindestens 31 Patienten einbezogen werden.

Die Studie umfasste jeweils vier Termine pro Patient. Der erste fand während eines Routinetermins zur Transplantationsnachsorge in den Räumlichkeiten der nephrologischen Poliklinik statt und schulte die Patienten einmalig in der Handhabung der Punktion der Fingerbeere zur Gewinnung einer Kapillarblutprobe. Bereits hierbei führte der Patient die Punktion zur kapillären Blutentnahme selbstständig durch. Außerdem erhielten die Patienten auch eine schriftliche Anleitung für die spätere vollständig alleinige Durchführung in ihrem häuslichen Umfeld (s. Anhang 4).

Die Patienten wurden dann mit dem nötigen Material für die selbstständige kapilläre Blutentnahme im häuslichen Umfeld versorgt. Die vorgepackten Umschläge für je eine Tal- und eine Bergspiegelentnahme enthielten jeweils zwei Filterkärtchen, vier Lanzetten, vier Tupfer, zwei Pflaster, eine Anleitung (s. Anhang 4), einen

Briefumschlag mit „Porto zahlt Empfänger“-Beschriftung sowie zwei Entnahmeprotokolle (s. Anhang 5).

Die nächsten zwei Termine fanden im häuslichen Umfeld des Patienten statt. Hier entnahm der Patient selbst je zwei Kapillarblutproben: Die erste Kapillarblutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (Talspiegel). Eine zweite Kapillarblutentnahme fand zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme (Bergspiegel) statt. Diese Proben wurden dann am gleichen Tag durch den Patienten per Post ins Labor geschickt.

Beim nächsten Termin in der Poliklinik, der innerhalb von 48 h nach der häuslichen Kapillarblutentnahme lag, erfolgte unabhängig von der Studie eine venöse Talspiegelkontrolle per Immunchemie im Rahmen der Routineversorgung. Dieser Wert diente zur orientierenden (da zeitlich leicht versetzten Abnahme bei gleicher Medikamentendosis) Überprüfung der Ergebnisse, der im häuslichen Umfeld gewonnenen Kapillarblutprobe.

An einem vierten Termin führte der Patient die Kapillarblutentnahmen ebenfalls selbst, jedoch in der Poliklinik unter Aufsicht, durch und zeitgleich wurden venöse Proben entnommen, aus der der Ciclosporin A-Spiegel mittels LCMS bestimmt wurde.

In einem anonymisierten Fragebogen (s. Anhang 6) wurden die Erfahrungen des Patienten mit der Kapillarblutprobenentnahme abgefragt. Dieser Fragebogen wurde vom Patienten nach Abschluss der drei Blutentnahmen ausgefüllt.

### 2.2.2 Studienteilnehmer

An der Studie nahmen 40 Nierentransplantierte teil, die mit Ciclosporin A im interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck behandelt wurden. Die Patienten waren alle volljährig und konnten Ihr Einverständnis selbstständig geben.

Falls ein Wechsel des Immunsuppressivums oder eine Rückkehr an die Dialyse notwendig waren, wurden diese Patienten aus der Studie ausgeschlossen.

### 2.2.3 Fallzahlberechnung

Die Fallzahlberechnung erfolgte nach dem Vorbild der Studie von L. Wilhelm, die durch Herrn Dr. rer. pol. Reinhard Vonthein, Institut für Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck, fachlich beraten wurde [31].

### 2.2.4 Laborchemische Methoden

#### 2.2.4.1 Chromatographische Methoden

Die chromatographischen Methoden wurden vom Medizinischen Versorgungszentrums (MVZ) Dr. Kramer und Kollegen (Laborärztliche Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Rationalisierung, LADR GmbH, Lauenburger Str. 67, 21502 Geesthacht) durchgeführt.

#### Venöses Blut

Die Probenvorbereitung für die chromatographische Bestimmung von Ciclosporin A aus venösem Blut entspricht der Routineanalytik des MVZ Dr. Kramer und Kollegen. Die Methode wurde dort entwickelt und validiert.

Dabei werden 200 µl EDTA-Blut, Kalibratoren oder Kontrollen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dann werden 500 µl Präzipitationsreagenz, bestehend unter anderem aus ZnSO<sub>4</sub>-Lösung, Ciclosporin D und Ascomycin, hinzugefügt. Anschließend wird diese Mixtur mittels Vortexmischer geschüttelt und gemischt und nachfolgend zentrifugiert. Danach wird der Überstand sofort in Glasröhrchen überführt und die aufgearbeitete Probe in die LCMS injiziert.

#### Trockenblut

Die Probenvorbereitung für die chromatographische Bestimmung des Ciclosporin A aus Kapillarblut wurde nach der von Wilhelm et al. optimierten Methode durchgeführt und entspricht einer Weiterentwicklung der bestehenden Routinemethode aus venösem Blut [31].

Die *dried blood spots* wurden mit einer Lochstanze manuell ausgestanzt. Der Innendurchmesser betrug 10 mm. Der ausgestanzte *dried blood spot* wurde dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit der oben genannten Präzipitationsreagenz gemischt.

Anschließend wurde die Lösung mittels Vortexmischer geschüttelt und gemischt, in der Folge nochmals auf einem Thermomixer geschüttelt und zum Abschluss zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sofort in eine 96-Well-Microtiterplatte überführt und in die LCMS injiziert.

### 2.2.4.2 Immunchemische Methoden

Die immunchemischen Methoden wurden durch das Zentrallabor, Bereich Klinische Chemie, des UKSH Campus Lübeck durchgeführt.

Die Probenvorbereitung zur immunchemischen Bestimmung von Ciclosporin A entsprach den Standardarbeitsanweisungen Ciclosporin des Labors [41].

### 2.2.5 Statistische Methoden zur Auswertung der Ciclosporin A-Spiegel

Für die statistische Auswertung des Vergleichs der Ciclosporin A-Spiegel im Trockenblut und im venösen Blut wurde das Programm MedCalc verwendet. Es sollte die Äquivalenz der beiden Messmethoden überprüft werden.

In die Analyse wurden beim Vergleich von *dried blood spots* und venöser LCMS nur die Proben des dritten Termins, die in der Klinik und somit zeitgleich abgenommen worden sind, einbezogen. Bei den venösen Messungen per Immunchemie handelt es sich um Proben, die in der Klinik einen Tag nach der ambulanten Kapillarblutentnahme stattgefunden haben.

In Untergruppenanalysen wurden die verschiedenen Messmethoden sowie die Messzeitpunkte getrennt betrachtet (s. Tab.1).

**Tabelle 1: Codierung der Studiengruppen nach Entnahmezeitpunkt, Vergleichsmethode (VM) und Referenzmethode (RM)**

VM		IC	DBS	DBS
RM		LCMS venös	LCMS venös	IC
Bezeichnung	Zeitpunkt C <sub>0</sub>	IC <sub>0</sub>	DBS <sub>0</sub>	ICDBS <sub>0</sub>
	Zeitpunkt C <sub>2</sub>	IC <sub>2</sub>	DBS <sub>2</sub>	ICDBS <sub>2</sub>

IC: Immunchemie, DBS: *dried blood spot*, LCMS: *Liquidchromatography*-Tandem- Massenspektrometrie, C<sub>0</sub>: Talspiegel, C<sub>2</sub>: Bergspiegel

Nach Beratung durch das Institut für Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck erfolgte eine Analyse der Daten im Normal Plot, Bland-Altman Plot und

einer Passing-Bablok Regression. Hierbei wurden die Methoden und Messzeitpunkte unabhängig untersucht.

### 2.2.5.1 Normalverteilung

Die Normalverteilung wurde anhand der graphischen Darstellung mittels Normal-Plot untersucht. Da sich in höheren Konzentrationsbereichen des Ciclosporins A eine stärkere Abweichung zeigte, wurden die Werte zusätzlich logarithmiert dargestellt.

### 2.2.5.2 Bland-Altman Plot

Zur graphischen Beurteilung der Übereinstimmung der Messmethoden wurde der Bland-Altman Plot gewählt. Diese Darstellung hat sich als Verfahren der Wahl zur Auswertung von Methodenvergleichsdaten gefestigt. Hierbei wird die Differenz der jeweiligen Wertepaare aus Referenz- und Vergleichsmethode gegen den Mittelwert dieser beiden Messungen aufgetragen. Somit wird die Streuung der Differenzen der einzelnen Wertepaare dargestellt. Aus diesen Differenzen wird der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Im Diagramm wird der Mittelwert der Differenzen und ein Kontrollbereich der  $\pm 1,96$  fachen Standardabweichung dargestellt. Bei einer hinreichend symmetrischen Verteilung der Differenzen liegen 95% der Werte im Bereich  $MW \pm 1,96 \times SD$ . Diese Grenzen werden als Übereinstimmungsgrenzen (*limits of agreement*) bezeichnet [42].

Da im Bereich höherer Ciclosporin A Konzentrationen größere Differenzen auftreten, wurde durch logarithmische Transformation der Messwerte eine gleichförmigere Darstellung über den gesamten Messbereich erreicht. Um die Daten interpretieren zu können, wurden diese durch Anwendung der Exponentialfunktion  $100 \cdot ((\exp(x) - 1))$  auf die Originalskala rücktransformiert und prozentual dargestellt [42].

Erstmals wurde der Bland-Altman Plot 1968 von den beiden medizinischen Statistiker Martin Bland und Douglas Altman beschrieben. Bis dahin waren bei Methoden- oder Gerätevergleichen die Angabe von Korrelationskoeffizienten und die Regressionsanalyse üblich. Anhand des Plots lässt sich beurteilen, ob die Messdifferenzen konzentrationsabhängig sind und ebenso ist es möglich starke Abweichungen der Messdifferenzen von einer Normalverteilung zu erkennen [43].

### 2.2.5.3 Passing-Bablok Regression

Als zusätzliche Auswertung wurde die Passing-Bablok Regression gewählt. Hierfür wurden die Wertepaare in einem X/Y-Diagramm gegeneinander aufgetragen. Dabei wurde auf der X-Achse die Referenzmethode und auf der Y-Achse die Vergleichsmethode dargestellt.

Das Regressionsmodell nach Passing und Bablok ist eine nichtparametrische Form der Regression. Sie wurde zur Quantifizierung der Übereinstimmung zwischen zwei Messverfahren entwickelt und trifft keine Annahmen über die Verteilung der Messwerte und deren Fehler, geht bei den Messfehlern in beiden Methoden aber von einer gleichen Verteilung mit einem konstanten Verhältnis der beiden Varianzen, nicht aber unbedingt von einer Normalverteilung aus. Zudem geht sie von einer willkürlichen Probenverteilung aus und ist unempfindlich gegenüber Ausreißern. Im Gegensatz zum T-Test ist die Passing-Bablok Regression auch für den Vergleich zweier statistisch abhängiger Messungen ohne Normalverteilung geeignet [44], [45], [46].

Die Anforderungen für die Anwendung der Passing-Bablok Regression sind kontinuierlich verteilte Messungen mit möglichst großem Wertebereich und eine lineare Beziehung zwischen den beiden Messmethoden.

Die Passing-Bablok Regression errechnet die Gleichung der Regressionsgeraden aus zwei Datensätzen. Das Ergebnis wird in einem Punktediagramm inklusive der Regressionsgeraden dargestellt, die die Visualisierung der gemessenen Daten und die offensichtliche Übereinstimmung der berechneten Regressions- mit der Identitätsgeraden zeigt [46].

### 2.2.5.4 Kalibrierung mit Daten aus vorheriger Studie

Die graphische Darstellung der Passing-Bablok Regression erfolgt durch eine Gerade. Die Kalibrierung ergibt sich aus der Gleichung dieser Geraden:

$$C_{\text{kap}} = (\beta_1 * C_{\text{venös}}) + \beta_0,$$

wobei  $\beta_1$  die Steigung,  $\beta_0$  den Achsenabschnitt,  $C_{\text{kap}}$  die Konzentration im Kapillarblut und  $C_{\text{venös}}$  die Konzentration im venösen Blut entweder per LCMS oder per Immunchemie gemessen, darstellt. Umgestellt lautet die Formel:

$$C_{\text{venös}} = (1/\beta_1) * (C_{\text{kap}} - \beta_0).$$

Die jeweiligen Werte für Steigung und der Achsenabschnitt wurden aus dem Datensatz der Vorstudie von Wilhelm et al. übernommen und sind in Tabelle 2 dargestellt. Anhand dieser Formel wurden die Kapillarwerte aus diesem Datensatz in venöse umgerechnet. Die berechneten venösen Werte wurden anschließend mit den tatsächlichen venösen Werten verglichen. Tabelle 3 erklärt die Namenscodierung der jeweiligen Gruppen.

**Tabelle 2: Achsenabschnitt und Steigung zur graphischen Darstellung des Passing-Bablok Regression aus dem Datensatz von Wilhelm et al.**

Gruppe	Achsenabschnitt	Steigung
DBS <sub>0</sub>	-3,36	1,270
DBS <sub>2</sub>	-173	1,481
ICDBS <sub>0</sub>	-2,19	1,227
ICDBS <sub>2</sub>	4,40	1,006

**Tabelle 3: Codierung der Studiengruppen nach Entnahmezeitpunkt, errechnetem Wert und Referenzmethode (RM)**

Errechnet aus		DBS	DBS
RM		LCMS venös	IC
Bezeichnung	Zeitpunkt C <sub>0</sub>	DBS <sub>0</sub> kal	ICDBS <sub>0</sub> kal
	Zeitpunkt C <sub>2</sub>	DBS <sub>2</sub> kal	ICDBS <sub>2</sub> kal

IC: Immunchemie, DBS: *dried blood spot*, LCMS: *Liquidchromatography-Tandem-Massenspektrometrie*, C<sub>0</sub>: Talspiegel, C<sub>2</sub>: Bergspiegel

#### 2.2.5.5 Normierung mit dem Hämatokrit

Da die Äquivalenz der beiden Messmethoden bei Wilhelm et al. nach Normierung mit dem Hämatokrit nachgewiesen werden konnte, wurden die Messwerte der LCMS-Analyse aus den *dried blood spots* auch in diesem Datensatz normiert. Dazu wurde der Faktor  $F_{HK}$  von Wilhelm et al. übernommen. Dieser wurde aus dem Quotient der Hämatokritwerte der venösen Blutprobe des Patienten ( $Hk_i$ ) und des Kalibrators ( $Hk_k$ ) berechnet und mit den Messwerten der LCMS aus den *dried blood spots* multipliziert:

$$F_{HK} = Hk_i / Hk_k$$

$$Hk_k = (\text{Fläche}_k - \text{Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}$$

### 2.2.6 Füllung der *dried blood spots*

Zur Abschätzung der Füllung der *dried blood spots* wurde das Bildbearbeitungsprogramm GIMP (*GNU Image Manipulation Program*) 2.6 verwendet.

Aus den eingescannten *dried blood spots* wurden die einzelnen mit Blut gefüllten Kreise mit der elliptischen Auswahl in der Größe 91 x 91 ausgeschnitten (s. Abb. 1a). Anschließend wurde der Schwellenwert auf 210 verändert, um ein möglichst genaues schwarz-weiß Abbild (s. Abb. 1b) des Kreises zu bekommen. Mithilfe des Histogrammes dieser Abbildung ließ sich über die Pixelanzahl der prozentuale Anteil der Füllung ablesen.



**Abbildung 1:** a) Originalkreis aus *dried blood spots*, b) Kreis mit verändertem Schwellenwert

### 2.2.7 Erhebung der Fragen

Um die Erfahrungen des Patienten mit der Kapillarblutentnahme zu erheben, wurde ein anonymisierter Fragebogen erstellt (s. Anhang 6).

In diesem wurden das Geschlecht, das Alter und das Datum der Nierentransplantation abgefragt. Außerdem wurde gefragt, ob der Patient Diabetes mellitus habe und seinen Blutzucker messe oder ob er seinen Quickwert selbst messe und somit die Kapillarblutprobe schon beherrsche.

Ebenso wurde gefragt, wie sich der Patient zur Kapillarblutprobe angeleitet gefühlt habe, ob es Probleme bei der Entnahme gab, ob der Patient sich vorstellen könne dieses Verfahren in Zukunft zu nutzen und welche Methode er bevorzuge.

Zur Überprüfung des Zeitaufwandes wurden die Zeitersparnis durch die selbstständige Kapillarblutentnahme und der Zeitaufwand durch den Versand mit der Post abgefragt.

Zum Schluss gab es noch einen Freitextbereich, in dem der Patient die für ihn relevanten Vor- und Nachteile sowie Verbesserungsvorschläge auflisten konnte.

Der Fragebogen wurde vom Patienten nach Abschluss der drei Blutentnahmen ausgefüllt oder, falls es zu einem Studienausschluss durch Medikamentenwechsel oder Transplantatversagen kam, zu einem früheren Zeitpunkt.

Zur statistischen Auswertung des Fragebogens wurden die Programme *IBM SPSS Statistics 21* und *R* verwendet. Nach Beratung durch das Institut für Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck erfolgte zusätzlich zur deskriptiven Beschreibung die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen bevorzugter Methode und Geschlecht mittels Mosaikplot sowie eines Zusammenhangs zwischen bevorzugter Methode und Alter beziehungsweise dem Zeitraum, der seit der Nierentransplantation vergangen war per binär-logistischer Regression.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Studienteilnehmer**

An der Studie, die am interdisziplinären Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck durchgeführt wurde, nahmen 40 nierentransplantierte Patienten teil. Die Studie fand im Zeitraum von Dezember 2011 bis Oktober 2012 statt. 45 Patienten waren gefragt worden, ob sie teilnehmen möchten. Davon lehnten vier aus Angst vor dem Stich mit der Lanzette ab und eine Person sah für sich keinen Nutzen in einer eigenständigen Ciclosporin A Bestimmung.

Von den 40 geschulten Patienten gaben 33 mindestens eine Blutprobe ab. Sieben Patienten haben keine Blutprobe abgegeben. Von diesen hatten zwei keinen weiteren Termin im Studienzeitraum, ein Patient erlitt ein Transplantatversagen und kehrte an die Dialyse zurück, ein weiterer Patient hatte aufgrund seiner starken Sehschwäche technische Probleme mit der Kapillarblutentnahme und drei Patienten hatten die selbstständige Entnahme vergessen.

Von 28 Patienten gab es mindesten zwei Blutproben. Fünf Patienten führten keine zweite Entnahme durch, da ein Patient den Aufwand als zu groß empfand, zwei Patienten keinen weiteren Termin im Studienzeitraum mehr und ein Patient mehrere stationäre Aufenthalte im Studienzeitraum hatten. Eine Probe ging verloren.

Drei Blutproben gab es von 21 Patienten. Die sieben Patienten, die keine dritte Probe mehr abgegeben hatten, gaben folgende Gründe an: Sechs Patienten hatten keinen weiteren Termin mehr im Studienzeitraum und bei einem Patienten wurde eine Medikamentenumstellung auf Tacrolimus vollzogen (s. Abb. 2).

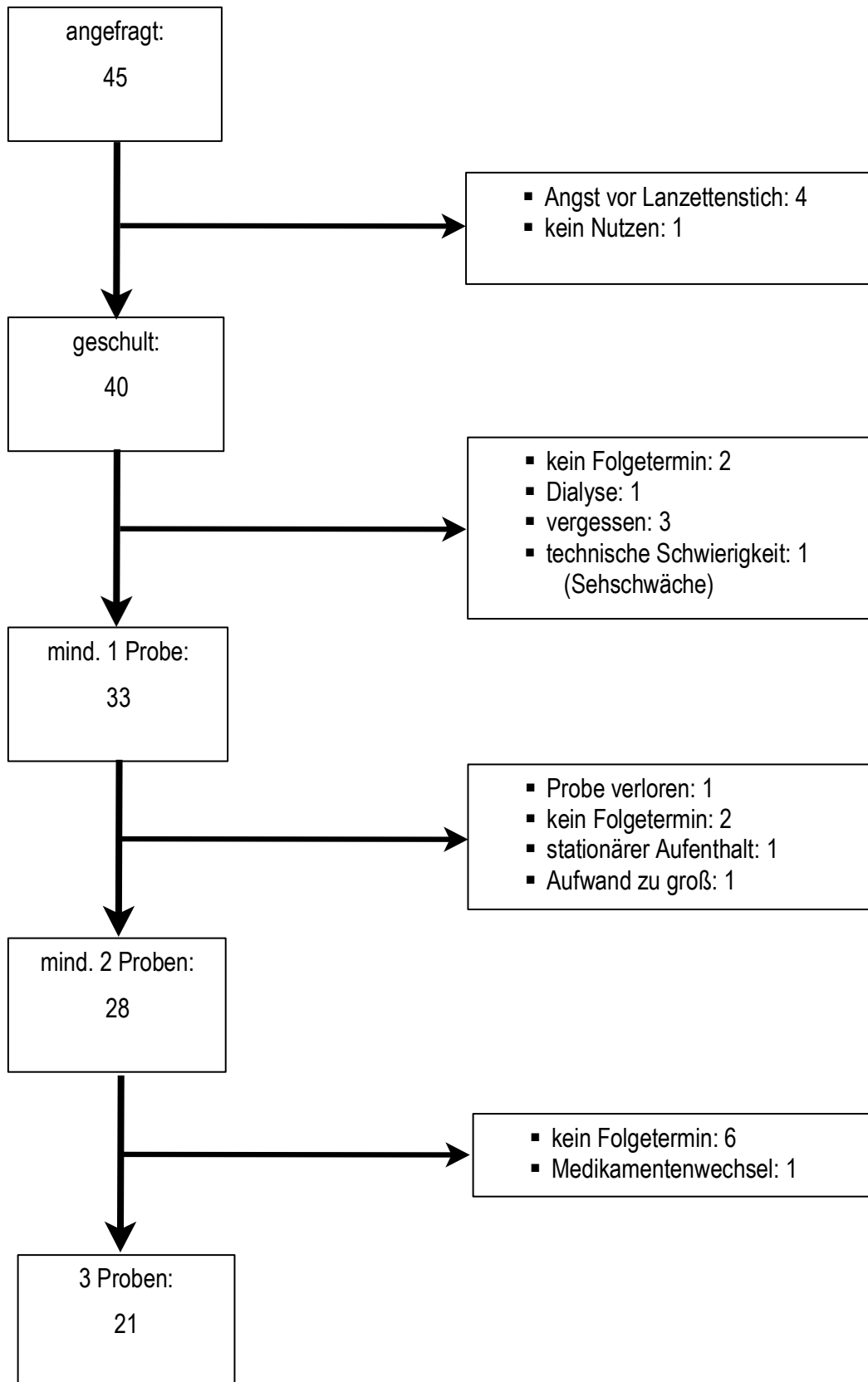


Abbildung 2: Flussdiagramm Studienteilnehmer

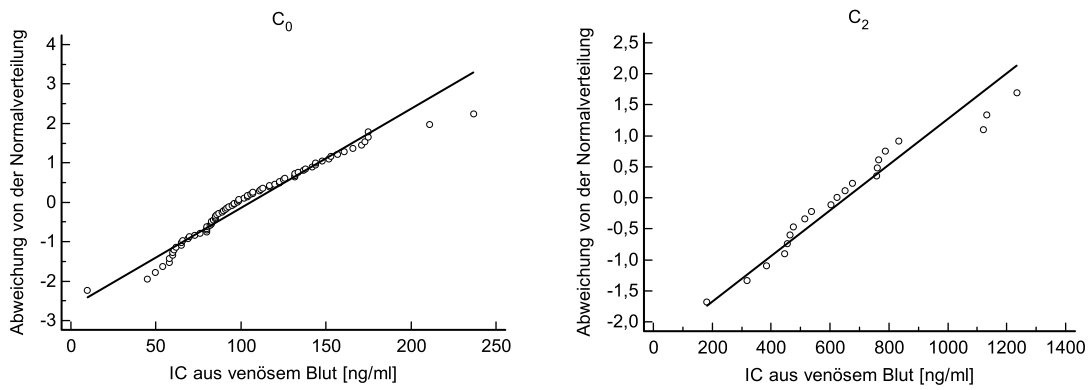
### **3.2 Validation der LCMS-Analyse zur quantitativen Bestimmung von Ciclosporin A aus Trockenblutproben**

#### 3.2.1 Prüfung auf Normalverteilung

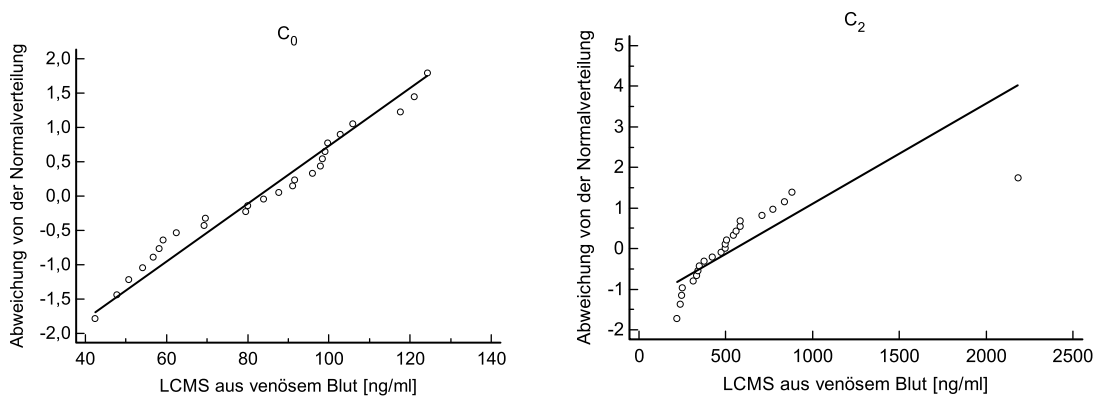
Zur Beurteilung der Daten auf Normalverteilung wurden diese als Normal Plot graphisch dargestellt. Dabei wurde die Ciclosporin A Konzentration der jeweiligen Messmethode auf der X-Achse dargestellt und die Abweichung von der Normalverteilung auf der Y-Achse. Die Gerade stellt die Normalverteilung dar.

Durch die graphische Darstellung (s. Abb. 3) ist keine eindeutige Aussage über die Normalverteilung möglich, da in höheren Konzentrationsbereichen eine stärkere Abweichung vorliegt. Daher wurde zusätzlich die Darstellung der logarithmierten Werte gewählt (s. Abb. 4). Diese zeigt eine Normalverteilung für die relativen Abweichungen der jeweiligen Ciclosporin A Tal ( $C_0$ )- und Bergspiegel ( $C_2$ ).

a) Immunchemie (venös): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )



b) LCMS (venös): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )



c) LCMS (DBS): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )

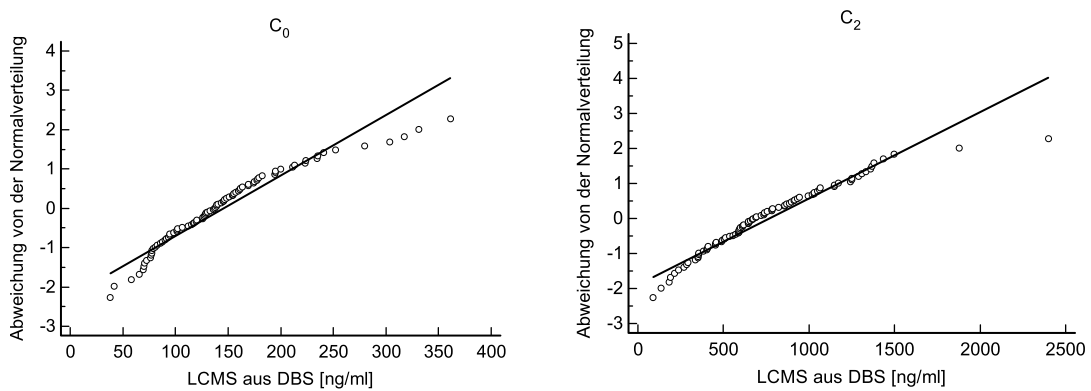
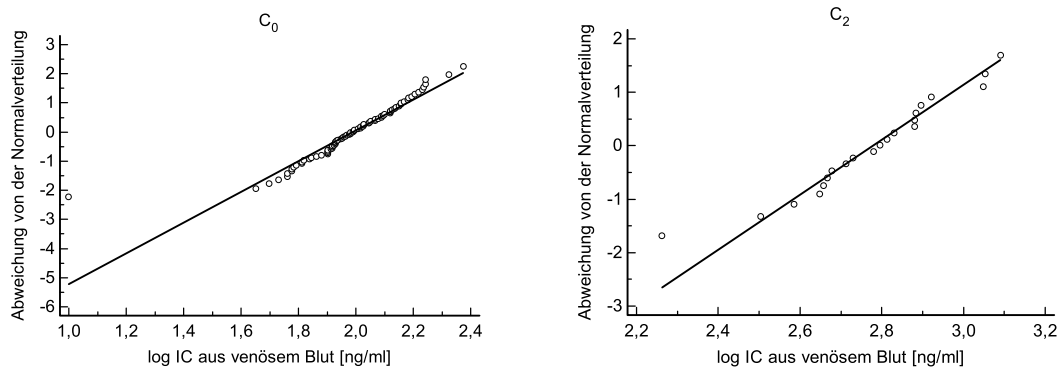
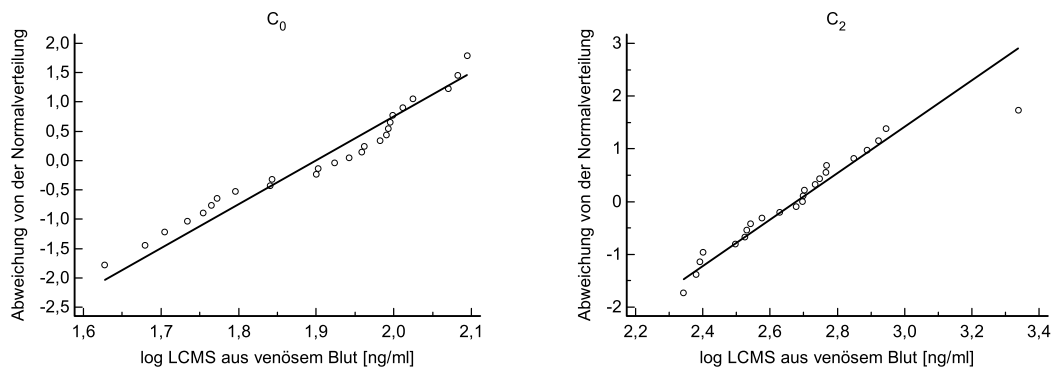


Abbildung 3: Normal Plot der CsA Konzentrationen a) Immunchemie aus venösem Blut, Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ ), b) LCMS aus venösem Blut, Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ ), c) LCMS aus DBS, Tal ( $C_0$ )- und Bergspiegel ( $C_2$ )

a) log Immunchemie (venös): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )



b) log LCMS (venös): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )



c) log LCMS (DBS): Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )

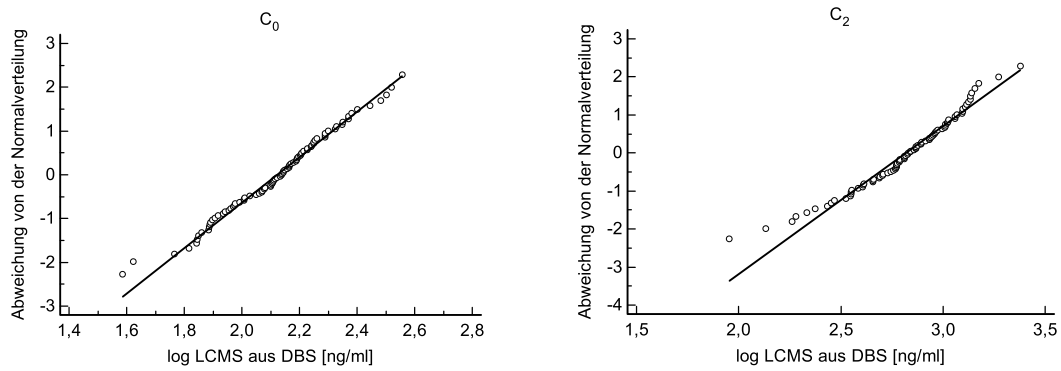


Abbildung 4: Normal Plot der logarithmierten CsA Konzentrationen a) Immunchemie aus venösem Blut, Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ ), b) LCMS aus venösem Blut, Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ ), c) LCMS aus DBS, Tal ( $C_0$ ) - und Bergspiegel ( $C_2$ )

### 3.2.2 Darstellung der Ergebnisse im Bland-Altman Plot

Zur graphischen Beurteilung der Übereinstimmung der Messmethoden wurde der Bland-Altman Plot gewählt. Hierbei sind auf der X-Achse die Mittelwerte der jeweiligen Wertepaare der Referenz- und Vergleichsmethode aufgetragen und auf der Y-Achse die Differenz dieser beiden Methoden.

Da im Bereich höherer Ciclosporin A Konzentrationen größere Differenzen auftreten, wurde die Darstellung mit den logarithmierten Daten gewählt. Es wurde der natürlich Logarithmus verwendet, so dass die Differenz in etwa in Prozent abzulesen ist (s. Abb. 5).

Zur genauen Ermittlung des Mittelwertes aller Differenzen, der Standardabweichung und des Bereiches der Übereinstimmungsgrenzen ( $\pm 1,96$  fache Standardabweichung) wurden die logarithmierten Werte mittels Exponentialfunktion rücktransformiert. Diese sind in Tabelle 4 dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 4: Mittelwerte (MW) der Differenzen, Standardabweichungen (SD) der Differenzen und Übereinstimmungsgrenzen zur graphischen Darstellung der Bland-Altman Plots in Abb.5 nach Rücktransformation durch Exponentialfunktion**

Gruppe	Anzahl der Fälle	MW der Differenzen	SD der Differenzen	Übereinstimmungsgrenzen ( $\pm 1,96$ fache SD)
DBS <sub>0</sub>	22	-18,5%	10,3%	-32,8 - -1,2%
DBS <sub>2</sub>	23	-15,1%	17,8%	-38,4 - 16,9%
IC <sub>0</sub>	23	-8,7%	9,7%	-24,0 - 9,5%
IC <sub>2</sub>	3	-16,8%	15,0%	-36,8 - 9,4%
ICDBS <sub>0</sub>	75	-12,2%	20,2%	-38,8 - 26,0%
ICDBS <sub>2</sub>	21	-2,7%	27,1%	-39,2 - 55,9%
DBS <sub>0</sub> Hk	20	-18,7%	10,2%	-32,8 - -1,6%
DBS <sub>2</sub> Hk	20	-18,6%	16,0%	-39,1 - 8,7%
DBS <sub>0</sub> kal	22	-10,6%	10,1%	-25,9 - 7,9%
DBS <sub>2</sub> kal	23	-9,4%	16,1%	-32,4 - 21,2%
ICDBS <sub>0</sub> kal	75	-4,8%	20,1%	-33,5 - 36,2%
ICDBS <sub>2</sub> kal	21	-2,0%	27,6%	-39,3 - 58,1%

IC: Immunchemie, DBS: *dried blood spot*, LCMS: *Liquidchromatography-Tandem-Massenspektrometrie*, DBS<sub>0</sub> und DBS<sub>2</sub> für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, IC<sub>0</sub> und IC<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus venösem Blut, ICDBS<sub>0</sub> und ICDBS<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus DBS, DBS<sub>0</sub>Hk und DBS<sub>2</sub>Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut, DBS<sub>0</sub>kal und DBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus LCMS aus venösem Blut, ICDBS<sub>0</sub>kal und ICDBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus Immunchemie

Bei der Analyse der C<sub>0</sub>-Spiegel für die LCMS aus *dried blood spots* gegenüber der aus venösem Blut (DBS<sub>0</sub>) lag ein Wertepaar oberhalb der Übereinstimmungsgrenze und eines unterhalb dieser. In der Gruppe DBS<sub>2</sub> lag ein Wert oberhalb der Übereinstimmungsgrenze.

Für die Analyse der Immunchemie versus der LCMS aus venösem Blut lagen sowohl für die C<sub>0</sub>- (IC<sub>0</sub>) als auch für die C<sub>2</sub>-Spiegel (IC<sub>2</sub>) alle Werte innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen.

In der Analyse der C<sub>0</sub>-Spiegel der Immunchemie gegenüber der LCMS aus *dried blood spots* (ICDBS<sub>0</sub>) befanden sich zwei Wertepaare oberhalb und eines unter-

halb der Übereinstimmungsgrenzen. In der Gruppe ICDBS<sub>2</sub> lag ein Wert oberhalb der Übereinstimmungsgrenze.

Die Analyse der Hämatokrit normierten LCMS aus *dried blood spots* versus der LCMS aus venösem Blut zeigte weder bei den C<sub>0</sub>- (DBS<sub>0</sub>Hk) noch bei den C<sub>2</sub>-Spiegeln Messwerte außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen.

Der Bland-Altman Plot für die C<sub>0</sub>-Spiegel der kalibrierten LCMS-Analysen aus *dried blood spots* und LCMS aus venösem Blut (DBS<sub>0</sub>kal) ergab ein Wertepaar ober- und eines unterhalb der Übereinstimmungsgrenzen. In der Gruppe DBS<sub>2</sub>kal lag ein Wert oberhalb der Übereinstimmungsgrenze.

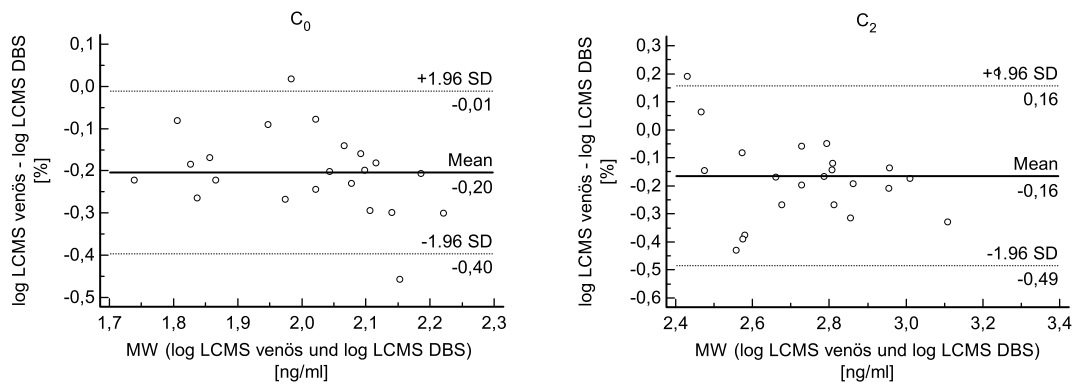
Bei der Analyse der C<sub>0</sub>-Spiegel für die Immunchemie gegenüber der kalibrierten LCMS aus *dried blood spots* (ICDBS<sub>0</sub>kal) lagen je zwei Wertepaare ober- und unterhalb der Übereinstimmungsgrenzen. Die Gruppe ICDBS<sub>2</sub>kal zeigte einen Messwert oberhalb der Übereinstimmungsgrenze.

Die prozentualen Differenzen der Mittelwerte lagen mit Werten von -18,7% (DBS<sub>0</sub>Hk) bis -2,0% (ICDBS<sub>2</sub>kal) für alle Gruppen im negativen Bereich. Die Standardabweichungen lagen mit Werten zwischen 27,6% (ICDBS<sub>2</sub>kal) und 9,7% (IC<sub>0</sub>) in einer ähnlichen Größenordnung.

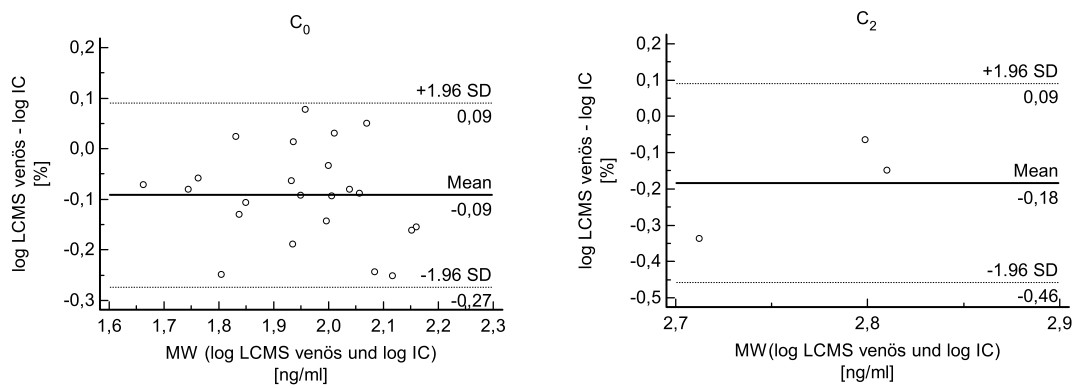
95% aller auf Grundlage der gemessenen Daten berechneten Übereinstimmungsgrenzen beinhalten die wahre Abweichung der beiden Messmethoden. Für den Vergleich der Talspiegel der mittels LCMS gemessenen venösen Werte und der *dried blood spots* bedeutet dies zum Beispiel, dass eine Messung aus *dried blood spots* einen höheren Wert als eine Messung aus venösen Proben ergeben wird. Die Höhe dieser Abweichung liegt mit einer hinreichenden Wahrscheinlichkeit zwischen 1,2% und 32,8%.

Für den Vergleich der Bergspiegel der mittels LCMS gemessenen venösen Werte und der *dried blood spots* bedeutet dies, dass eine Messung aus *dried blood spots* mit einer hinreichenden Wahrscheinlichkeit einen Wert liefert, der bis zu 38,4% größer beziehungsweise bis zu 16,9% kleiner als der aus venösen Proben gemessene Wert ist.

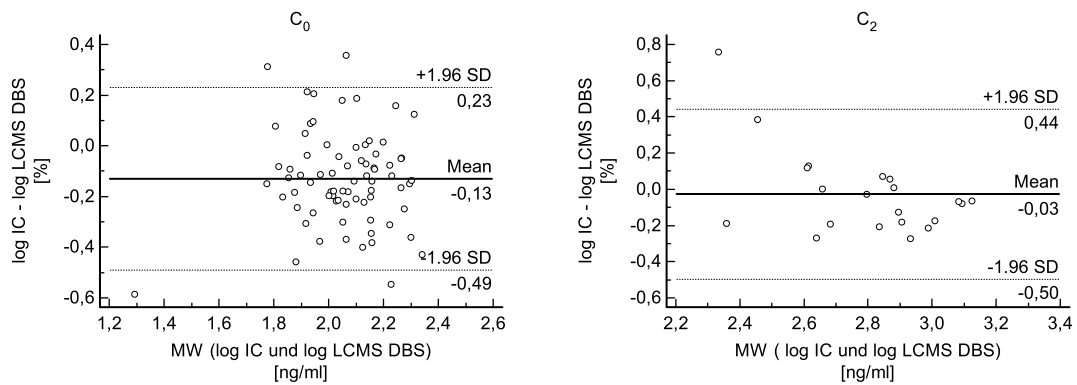
a) LCMS (venös) vs. LCMS DBS: Tal- und Bergspiegel



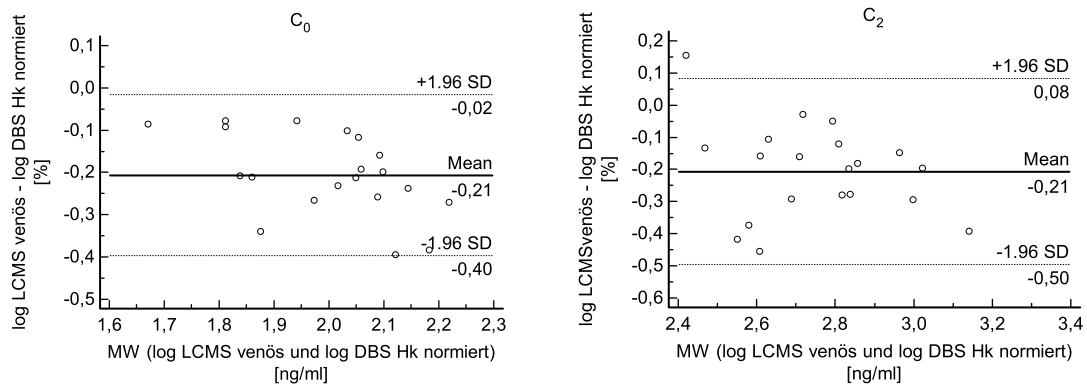
b) IC (venös) vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



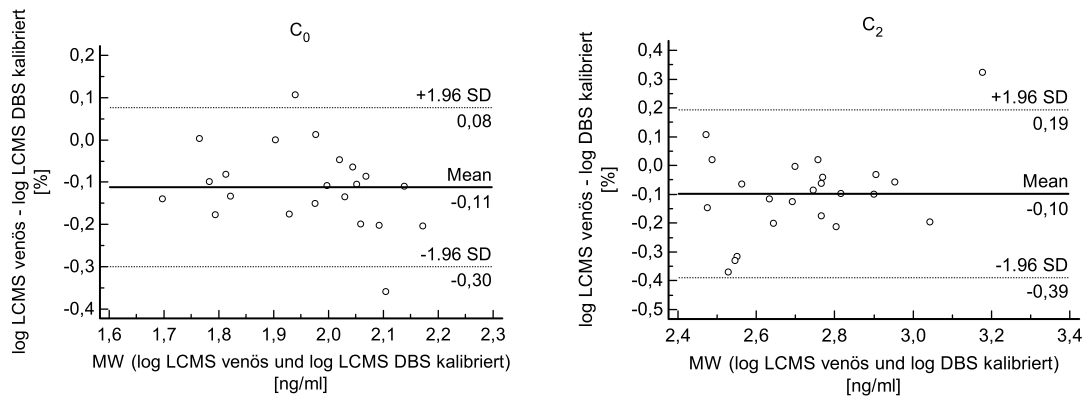
c) LCMS (DBS) vs. IC (venös): Tal- und Bergspiegel



d) LCMS (DBS) Hk normiert vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



e) LCMS (DBS) kalibriert vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



f) LCMS (DBS) kalibriert vs. IC (venös): Tal- und Bergspiegel

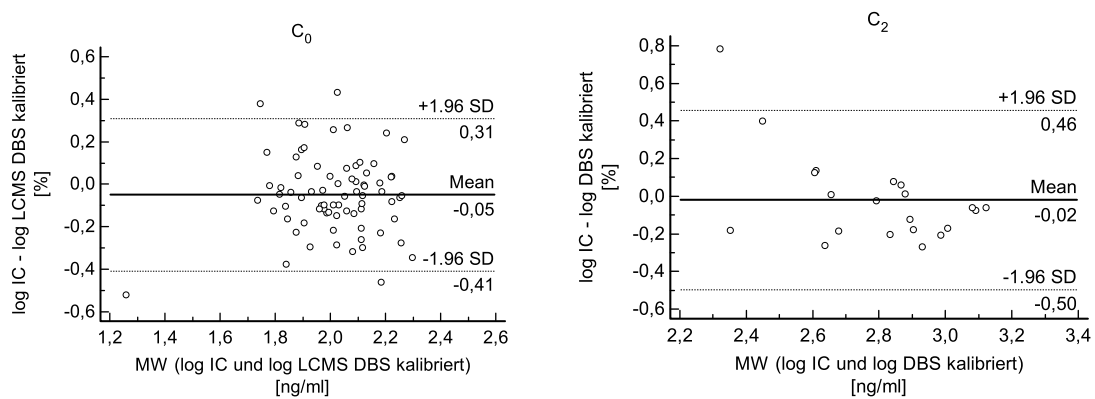


Abbildung 5 (Seite 29-30): Bland-Altman Plot für die Analyse von Ciclosporin A mit Mittelwert (durchgezogene Linie) und 1,96fache Standardabweichung (gestrichelte Linie). a) DBS<sub>0</sub> und DBS<sub>2</sub> für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b) IC<sub>0</sub> und IC<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus venösem Blut, c) ICDBS<sub>0</sub> und ICDBS<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus DBS, d) DBS<sub>0</sub>Hk und DBS<sub>2</sub>Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut, e) DBS<sub>0</sub>kal und DBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus LCMS aus venösem Blut, f) ICDBS<sub>0</sub>kal und ICDBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus Immunchemie

### 3.2.3 Darstellung der Ergebnisse mittels Passing-Bablok Regression

Als zusätzliche Auswertung wurde die Passing-Bablok Regression gewählt. Hierfür wurden die Wertepaare in einem X/Y-Diagramm gegeneinander aufgetragen. Dabei wurde auf der X-Achse die Referenzmethode und auf der Y-Achse die Vergleichsmethode dargestellt (s. Abb. 6).

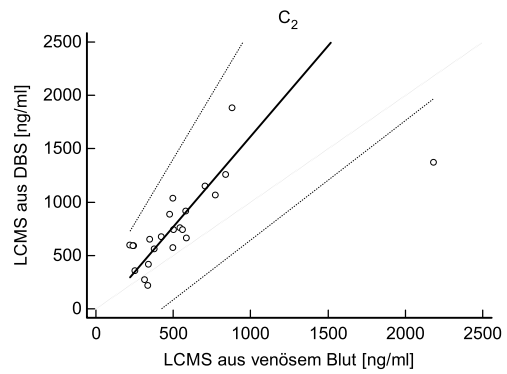
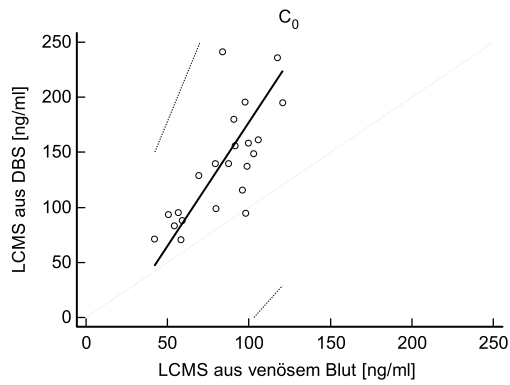
Tabelle 5 zeigt die Geradengleichung und das 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 5: Achsenabschnitt (a) und Steigung (b) sowie das 95%-Konfidenzintervall (KI) zur graphischen Darstellung der Passing-Bablok Regression in Abb.6

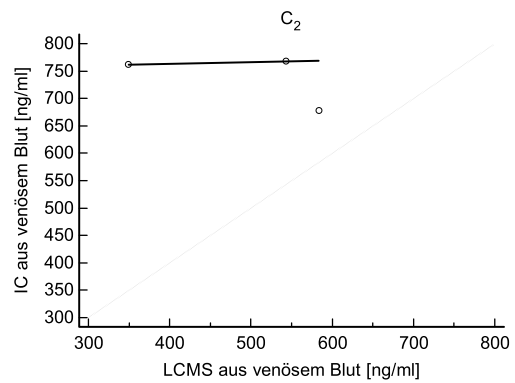
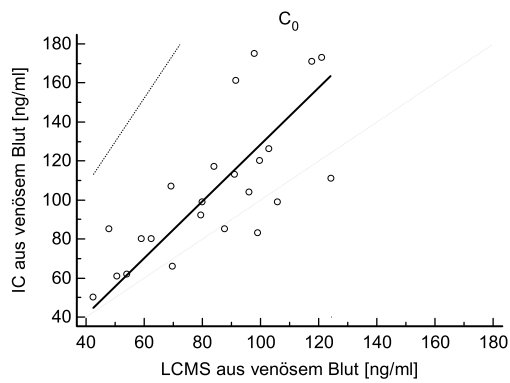
Gruppe	Anzahl der Fälle	Achsenabschnitt a ( $\pm$ 95%KI)	Steigung b ( $\pm$ 95%KI)
DBS <sub>0</sub>	22	-47,79 (-169,23 – 4,16)	2,25 (1,64 – 3,64)
DBS <sub>2</sub>	23	-81,06 (-481,97 – 194,86)	1,69 (1,12 – 2,43)
IC <sub>0</sub>	23	-16,75 (-84,67 – 18,81)	1,45 (1,00 – 2,22)
IC <sub>2</sub>	3	750,21	0,03
ICDBS <sub>0</sub>	75	-27,33 (-84,55 – 10,92)	1,66 (1,25 – 2,34)
ICDBS <sub>2</sub>	21	-358,93 (-953,50 – -111,05)	1,67 (1,27 – 2,74)
DBS <sub>0</sub> Hk	20	-66,73 (-189,02 – -10,94)	2,41 (1,78 – 3,98)
DBS <sub>2</sub> Hk	20	-110,00 (-608,59 – 145,74)	1,78 (1,29 – 2,89)
DBS <sub>0</sub> kal	22	-34,50 (-108,64 – 5,11)	1,76 (1,24 – 2,63)
DBS <sub>2</sub> kal	23	-75,74 (-181,69 – 282,68)	1,11 (0,68 – 1,58)
ICDBS <sub>0</sub> kal	75	-11,90 (-55,19 – 20,11)	1,25 (0,95 – 1,76)
ICDBS <sub>2</sub> kal	21	-361,16 (-952,19 – -114,76)	1,66 (1,26 – 2,73)

IC: Immunchemie, DBS: *dried blood spot*, LCMS: *Liquidchromatography-Tandem- Massenspektrometrie*, DBS<sub>0</sub> und DBS<sub>2</sub> für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, IC<sub>0</sub> und IC<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus venösem Blut, ICDBS<sub>0</sub> und ICDBS<sub>2</sub> für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus DBS, DBS<sub>0</sub>Hk und DBS<sub>2</sub>Hk für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut, DBS<sub>0</sub>kal und DBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus LCMS aus venösem Blut, ICDBS<sub>0</sub>kal und ICDBS<sub>2</sub>kal für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus Immunchemie

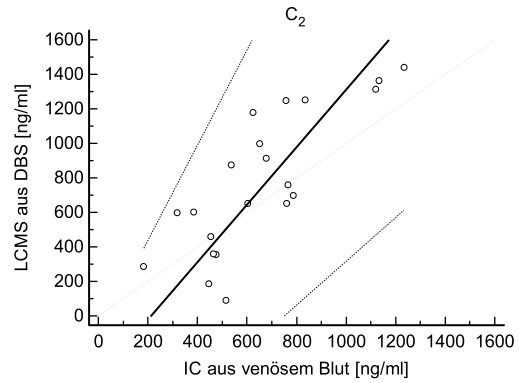
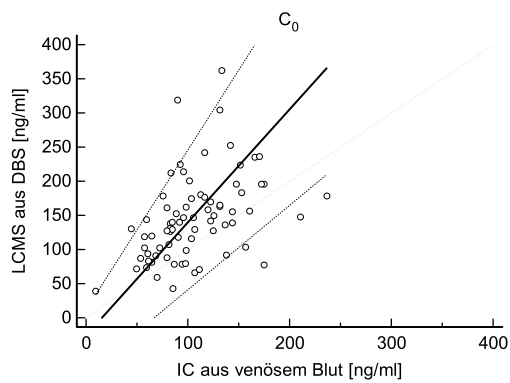
a) LCMS (DBS) vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



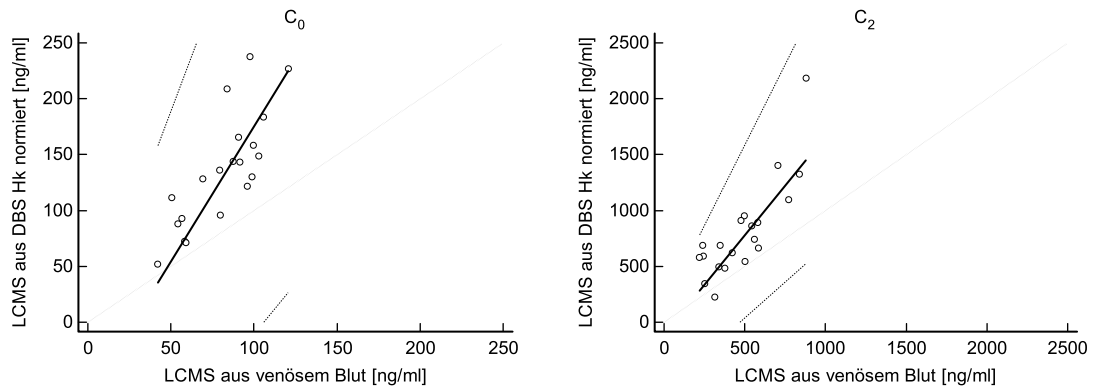
b) IC (venös) vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



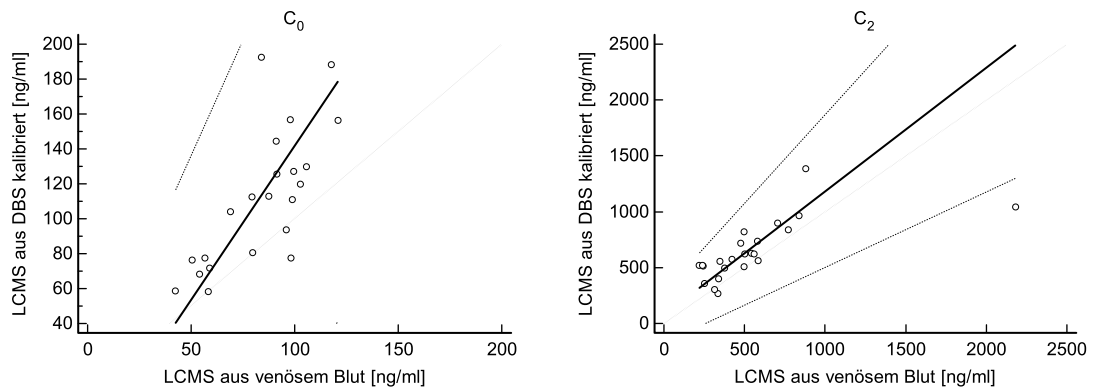
c) LCMS (DBS) vs. IC (venös): Tal- und Bergspiegel



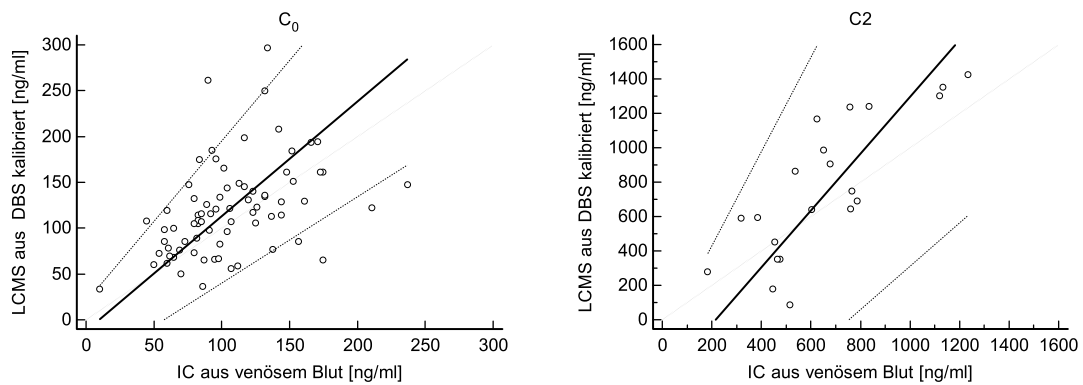
d) LCMS (DBS) Hk normiert vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



e) LCMS (DBS) kalibriert vs. LCMS (venös): Tal- und Bergspiegel



f) LCMS (DBS) kalibriert vs. IC (venös): Tal- und Bergspiegel



**Abbildung 6 (Seite 33-34):** Passing-Bablok Regression für die Analyse von Ciclosporin A. a)  $DBS_0$  und  $DBS_2$  für die Methoden LCMS aus DBS versus LCMS aus venösem Blut, b)  $IC_0$  und  $IC_2$  für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus venösem Blut, c)  $ICDBS_0$  und  $ICDBS_2$  für die Methoden Immunchemie aus venösem Blut versus LCMS aus DBS, d)  $DBS_0Hk$  und  $DBS_2Hk$  für die Methoden LCMS aus DBS nach Normierung über den Hämatokrit versus LCMS aus venösem Blut, e)  $DBS_0kal$  und  $DBS_2kal$  für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus LCMS aus venösem Blut, f)  $ICDBS_0kal$  und  $ICDBS_2kal$  für die Methoden LCMS aus DBS nach Kalibrierung versus Immunchemie

Die Passing-Bablok Regression errechnet die Gleichung der Regressionsgeraden aus zwei Datensätzen. Das Ergebnis wird in einem Punktediagramm inklusive der Regressionsgeraden dargestellt, die die Visualisierung der gemessenen Daten und die offensichtliche Übereinstimmung der berechneten Regressions- mit der Identitätsgeraden zeigt.

Die Regressionsgeradengleichung ( $y=a+bx$ ) zeigt, ob die Messergebnisse der beiden Methoden sich durch einen konstanten Wert (Achsenabschnitt  $a$ ) und/oder durch eine proportionale Differenz (Steigung  $b$ ) unterscheiden.

Die 95%-Konfidenzintervalle für Achsenabschnitt und Steigung zeigen dabei an, ob die Werte sich von „null“ (Achsenabschnitt) bzw. „eins“ (Steigung) nur durch Zufall unterscheiden. Wenn also das 95%-Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt den Wert „null“ enthält, kann davon ausgegangen werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem erhaltenen Achsenabschnittswert und dem Wert „null“ gibt und es keine konstante Differenz zwischen den beiden Methoden gibt. Dementsprechend kann angenommen werden, dass wenn das 95%-Konfidenzintervall für die Steigung den Wert „eins“ enthält, es keine proportionale Differenz zwischen den beiden Methoden gibt. In diesem Fall kann also angenommen werden, dass  $x = y$  ist und es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Methoden gibt und diese damit austauschbar sind.

Da in den vorliegenden Daten bei  $DBS_0$ ,  $DBS_2$ ,  $ICDBS_0$ ,  $DBS_2Hk$ ,  $DBS_0kal$ ,  $DBS_2kal$ ,  $ICDBS_0kal$  im 95%-Konfidenzintervall der Wert „null“ enthalten ist, kann hier davon ausgegangen werden, dass kein konstanter Fehler vorliegt. Allerdings beinhaltet das 95%-Konfidenzintervall der Steigung nur in  $DBS_2kal$  und  $ICDBS_0kal$  den Wert „eins“. Bei den anderen Gruppen ist also von einem proportionalen Fehler auszugehen.

### **3.3 Fragebogenauswertung**

Insgesamt wurde von 24 Patienten ein Fragebogen ausgefüllt. Darunter waren die 21 Patienten, die den Fragebogen im Anschluss an die dritte Kapillarblutentnahme beantworteten und zusätzlich noch ein Patient, der auf Tacrolimus umgestellt wurde und zwei Patienten mit zwei abgegebenen Proben, die keine venöse Blutentnahme mehr im Studienzeitraum vorgesehen hatten.

Bei einem Fragebogen fehlte die Angabe zum Alter, bei drei die Angabe zur Quickmessung, ein Patient machte keine Angabe darüber, ob er sich die kapilläre Messung in Zukunft vorstellen könnte, sechs äußerten sich nicht welche Methode bevorzugt wird, zwei gaben keine Auskunft darüber, ob Zeit eingespart wurde, acht gaben keine Auskunft, wie viel Zeit eingespart wurde, in einem Fragebogen fehlte die Angabe, ob der Postversand praktisch war, in vier wie viel Zeitaufwand mit dem Versand verbunden war.

### 3.3.1 Geschlecht

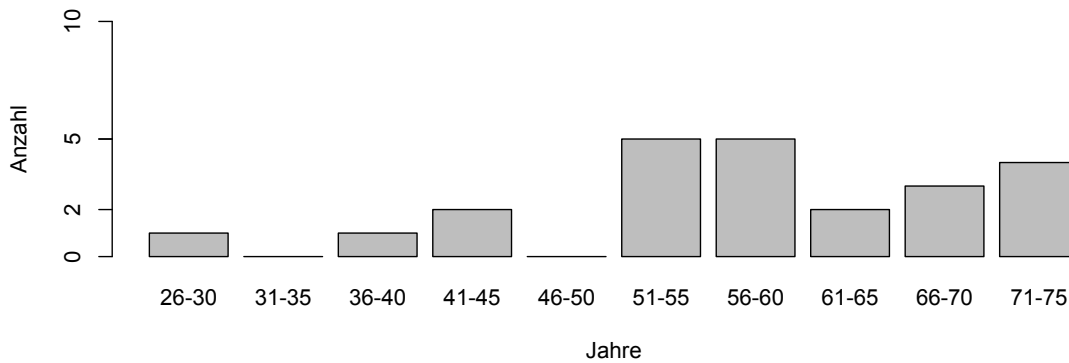
Unter den Patienten waren acht Frauen und 16 Männer. Dies ergibt 33% weibliche Patienten und 67% männliche Patienten.

Die Probandenpopulation entspricht der Patientenpopulation des Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck im Zeitraum von 2010 bis 2013. Hier waren die Patienten zu 35% weiblich und zu 65% männlich.

### 3.3.2 Alter

Die Patienten waren im Alter von 30 bis 75 Jahren. Der Durchschnitt lag bei 57,7 Jahren mit einer Standardabweichung von 12,1 Jahren. Auch der Median lag bei 57 Jahren (s. Abb. 7).

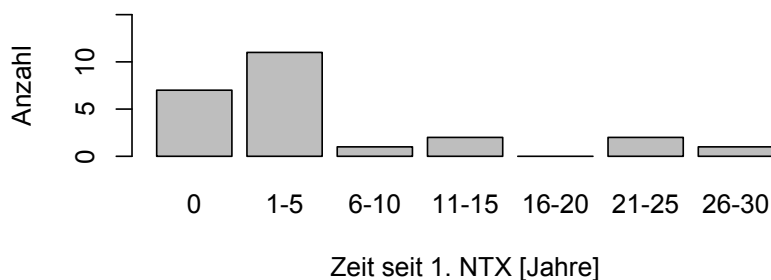
Verglichen mit der Patientenpopulation des Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck im Zeitraum von 2010 bis 2013 ergibt sich auch hier eine Ähnlichkeit. Die Patienten im Transplantationszentrum waren im Schnitt 52,9 Jahre. Das Alter lag hier zwischen 17 und 80 Jahren.



**Abbildung 7: Säulendiagramm Altersverteilung**

### 3.3.3 Vergangene Zeit seit der Nierentransplantation

Im Schnitt waren die Patienten seit 5,4 Jahren nierentransplantiert. Die jüngsten Transplantationen lagen noch kein Jahr zurück, die älteste war vor 26 Jahren erfolgt. Der Median lag bei 1,5 Jahren (s. Abb. 8). Zwei Patienten waren schon zum zweiten Mal, vor 14 und vor einem Jahr, nierentransplantiert und einer zum dritten Mal, wobei diese Transplantation vor acht Jahren durchgeführt worden war.



**Abbildung 8: Säulendiagramm zur vergangenen Zeit seit der ersten Nierentransplantation (NTX)**

### 3.3.4 Blutzuckermessung

Unter den 24 Patienten war nur einer, der seinen Blutzucker selbst misst. Dies entspricht einem Anteil von 4%. Daraus ergibt sich ein Konfidenzintervall von 0,2 bis 17,1% (s. Tab. 6, Abb. 9).

## Ergebnisse

**Tabelle 6: Ja- und Nein-Antworten mit 95% Konfidenzintervall (KI) auf die Fragen a) – g) zur graphischen Darstellung in Abb. 9**

Frage	Ja (±95% KI)	Nein (±95% KI)
a) Messen Sie Ihren Blutzucker selbst?	0,042 (0,002 – 0,171)	0,958 (0,829 – 0,998)
b) Messen Sie Ihren Quickwert selbst?	0,095 (0,016 – 0,266)	0,905 (0,734 – 0,984)
c) Gab es Probleme bei der Kapillarblutentnahme?	0,083 (0,014 – 0,236)	0,917 (0,764 – 0,986)
d) Haben Sie durch die Kapillarblutentnahme im Vergleich zur Blutentnahme in einer Praxis Zeit gespart?	0,636 (0,428 – 0,814)	0,364 (0,186 – 0,572)
e) War der Versand mit der Post praktisch für Sie?	0,975 (0,822 – 0,997)	0,025 (0,003 – 0,178)
f) Konnten Sie den Brief auf dem Weg zu einer anderen Besorgung/Tätigkeit nebenbei einstecken?	0,667 (0,468 – 0,831)	0,333 (0,169 – 0,532)
Frage	DBS (±95% KI)	venös (±95% KI)
g) Welche Methode zur Bestimmung von Ciclosporin A bevorzugen Sie?	0,722 (0,495 – 0,890)	0,278 (0,110 – 0,505)

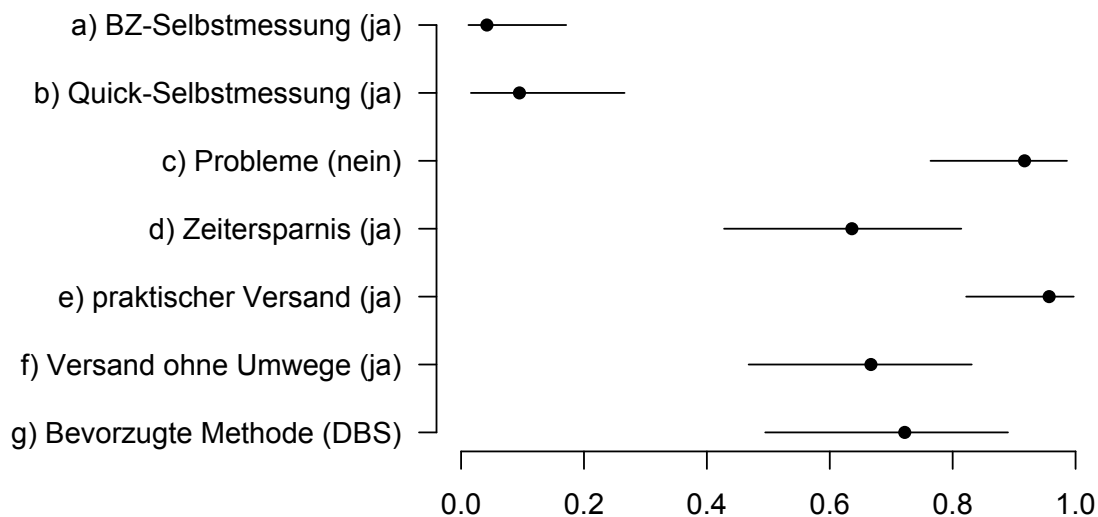


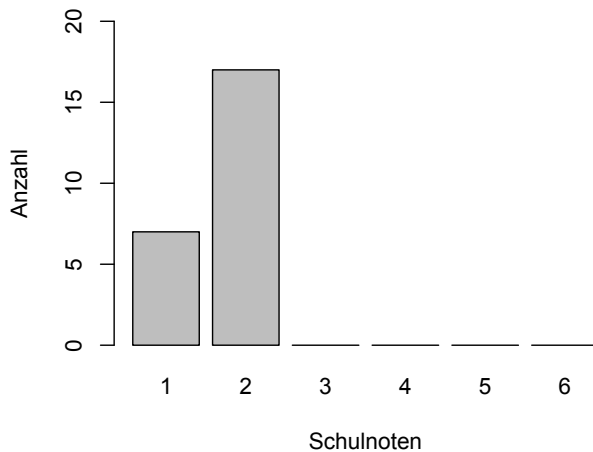
Abbildung 9: Fehlerbalken mit Mittelwert und  $\pm 95\%$  Konfidenzintervall für die Fragen a) Messen Sie Ihren Blutzucker selbst? b) Messen Sie Ihren Quickwert selbst?, c) Gab es Probleme bei der Kapillarblutentnahme?, d) Konnten Sie den Brief auf dem Weg zu einer anderen Besorgung/Tätigkeit nebenbei einstecken?, e) Haben Sie durch die Kapillarblutentnahme im Vergleich zur Blutentnahme in einer Praxis Zeit gespart?, f) War der Versand mit der Post praktisch für Sie?, g) Welche Methode zur Bestimmung von Ciclosporin A bevorzugen Sie?

### 3.3.5 Quickwertmessung

Von den 24 Patienten beantworteten 21 die Frage nach der selbstständigen Quickwert-Messung. Unter diesen bestimmten zwei ihren Quickwert selbst. Dies entspricht 10%. Daraus ergibt sich ein Konfidenzintervall zwischen 1,6 und 26,6% (s. Tab. 6, Abb.9).

### 3.3.6 Anleitung

Auf der Schulnotenskala empfanden sieben (29%) Patienten die Anleitung zur Kapillarblutentnahme als „sehr gut“, 17 (71%) als „gut“. Niemand hatte „befriedigend“, „ausreichend“, „mangelhaft“ oder „ungenügend“ angegeben (s. Abb. 10).



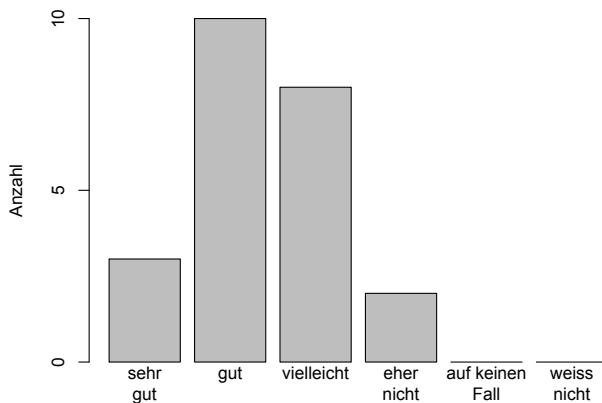
**Abbildung 10: Säulendiagramm für die Bewertung der Anleitung zur Kapillarblutentnahme. 1=„sehr gut“, 2=„gut“, 3=„befriedigend“, 4=„ausreichend“, 5=„mangelhaft“, 6=„ungenügend“**

### 3.3.7 Probleme

Zwei (8%) Patienten gaben Probleme bei der Kapillarblutentnahme an. Das Konfidenzintervall lag zwischen 1,4 und 23,6% (s. Tab. 6, Abb. 9). 22 (92%) gaben an, keine Probleme gehabt zu haben. Falls ein Problem angegeben wurde, war dies eine unzureichende Blutung.

### 3.3.8 *Dried blood spots* als Zukunftsmethode

Auf die Frage, ob sich der Patient vorstellen kann in Zukunft seinen Ciclosporin A Wert per Kapillarblutentnahme zu bestimmen, gab ein Patient keine Antwort. Unter den verbliebenen 23 Patienten beantworteten drei (13%) Patienten diese Frage mit „sehr gut“, zehn (44%) Patienten gaben „gut“ an. Acht (35%) Patienten konnten sich „vielleicht“ vorstellen die Kapillarblutentnahme in Zukunft zu nutzen, zwei (9%) Patienten „eher nicht“. Niemand entschied sich für die Antwortmöglichkeiten „auf keinen Fall“ oder „weiss nicht“ (s. Abb. 11).



**Abbildung 11: Säulendiagramm zur Frage, ob die selbstständige Kapillarblutentnahme für den Patienten in Zukunft vorstellbar sei**

### 3.3.9 Bevorzugte Methode

Die Frage, welche Methode der Patient bevorzuge, beantworteten sechs Patienten nicht. Von den anderen 18 gaben fünf (28%) an die venöse Blutentnahme in der Klinik zu bevorzugen. 13 (72%) Patienten zogen die selbstständige Kapillarblutentnahme vor. Das Konfidenzintervall für die *dried blood spots* liegt hier zwischen 50 und 89% (s. Tab. 6, Abb. 9).

Auf die gesamte Patientenzahl von 24 bezogen ergeben sich folgende Prozentwerte: 21% bevorzugen die venöse Entnahme, 54% die kapilläre und 25% machten keine Angabe.

Die bevorzugte Methode des jeweiligen Geschlechts ist in Abb. 12 dargestellt. Bei den Frauen machten 25% keine Angabe. Die anderen bevorzugten die kapilläre Entnahme. Keine weibliche Patientin zog die venöse Entnahme vor. Bei den männlichen Patienten machten ebenfalls 25% keine Angabe. 44% bevorzugten die kapilläre und 31% die venöse Entnahme.

		Geschlecht	
		weiblich	männlich
Bevorzugte Methode	unbekannt 25% (2)	unbekannt 25% (4)	
	kapillar 75% (6)	venös 31% (5)	
		kapillar 44% (7)	

Abbildung 12: Mosaikplot Geschlecht versus bevorzugte Methode

### 3.3.10 Zeitersparnis

Auf die Frage, ob durch die selbstständige Kapillarblutentnahme im Vergleich mit einer venösen Entnahme in einer Praxis Zeit gespart werden konnte, antworteten 14 (58%) Patienten mit „ja“ und acht (33%) Patienten mit „nein“ (s. Tab. 6, Abb. 9). Zwei machten keine Angabe.

Falls eine Zeitersparnis angegeben worden war, lag diese im Schnitt bei 36 Minuten. Die geringste Angabe lag bei null Minuten, die größte bei 180 Minuten (s. Abb. 13).

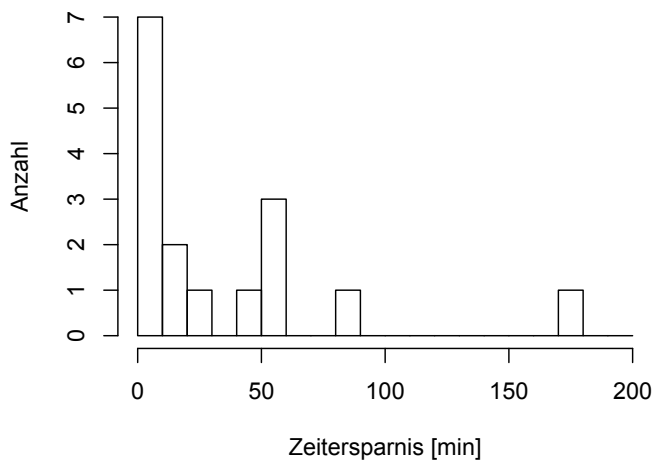


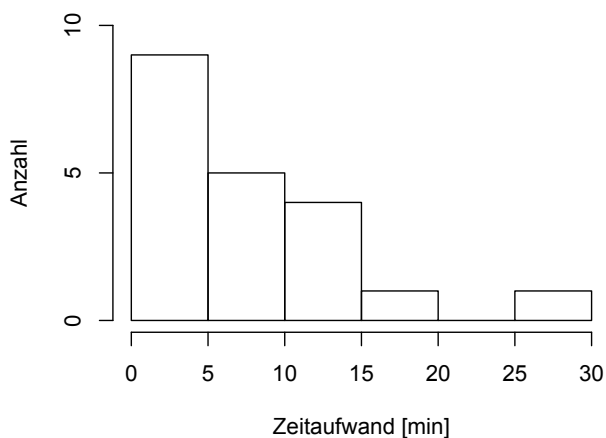
Abbildung 13: Histogramm der Zeitersparnis durch die selbstständige Kapillarblutentnahme im Vergleich zur venösen Blutentnahme in einer Arztpraxis. Hinweis: die rechten Grenzen sind in den jeweiligen Intervallen enthalten

### 3.3.11 Versand

Für 22 (96%) Patienten war der Versand mit der Post praktisch. Ein (4%) Patient empfand dies nicht so und ein Patient machte keine Angabe (s. Tab. 6, Abb. 9).

### 3.3.12 Zeitaufwand

Der durchschnittliche Zeitaufwand für das Packen des Briefes und den Weg zur Post betrug 9 Minuten. Die geringste Angabe lag bei null Minuten, die höchste bei 30 Minuten (s. Abb. 14).



**Abbildung 14: Histogramm des Zeitaufwandes durch das Packen des Briefes und den Weg zur Post. Hinweis: die rechten Grenzen sind in den jeweiligen Intervallen enthalten**

### 3.3.13 Umweg

Für 16 (67%) Patienten war es möglich den Brief auf dem Weg zu einer anderen Besorgung einzuwerfen. Für acht (33%) war dagegen ein Umweg nötig (s. Tab. 6, Abb. 9).

### 3.3.14 Zusammenhang zwischen Patientenalter und bevorzugter Methode

Die graphische Auswertung des Zusammenhangs zwischen dem Patientenalter und der bevorzugten Methode mittels binär-logistischer Regression zeigt, dass der Wendepunkt zum Vorzug der venösen Entnahme bei ca. 70 Jahren liegt (s. Abb. 15).

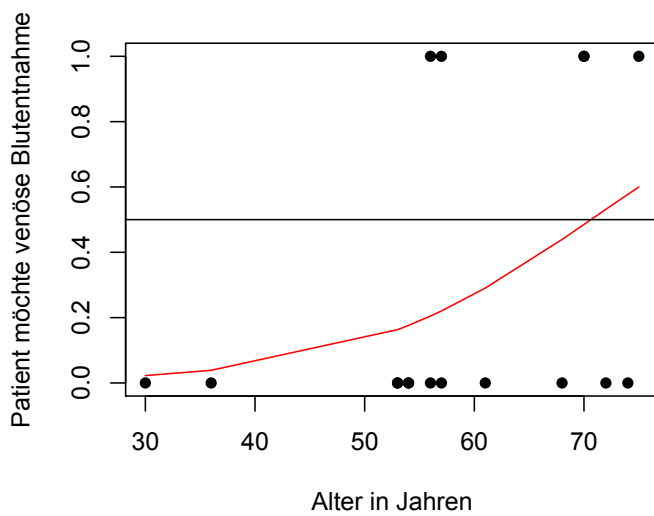


Abbildung 15: Binär-logistische Regression zum Zusammenhang zwischen Patientenalter und bevorzugter Methode

### 3.3.15 Zusammenhang zwischen der Zeit seit der ersten Nierentransplantation und der bevorzugten Methode

Die graphische Auswertung des Zusammenhangs zwischen der Zeit seit der ersten Nierentransplantation und der bevorzugten Methode per binär-logistischer Regression zeigt, dass der Wendepunkt zum Vorzug der venösen Entnahme bei ca. 11 Jahren, die seit der ersten Nierentransplantation vergangen sind, liegt (s. Abb. 16).

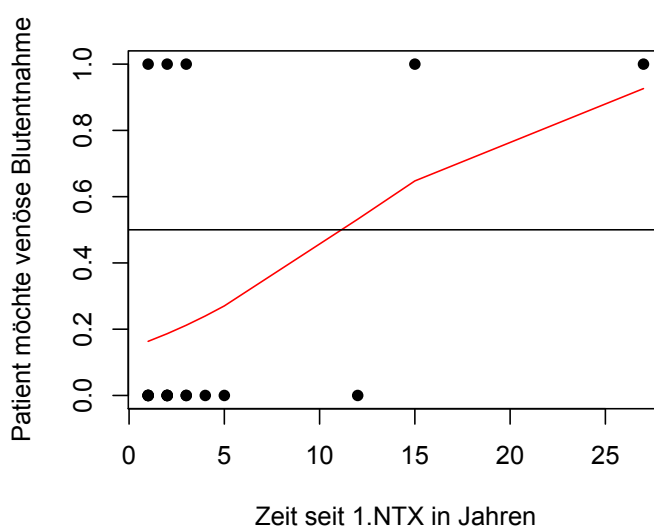


Abbildung 16: Binär-logistische Regression zum Zusammenhang zwischen der Zeit seit der 1. NTX und der bevorzugten Methode

### 3.3.16 Vorteile aus Sicht des Patienten

Auf die Frage, welche Vorteile sich für den Patienten aus dem Verfahren ergeben, nannten zehn Patienten die Zeitersparnis, dadurch, dass die Fahrtzeit zum Arzt und die Wartezeit beim Arzt weg fielen und die Blutentnahme von zu Hause aus möglich sei. Eine Patientin gab zusätzlich an, dass durch die Kapillarblutentnahme eine Schonung ihrer Venen möglich sei.

Fünf Patienten gaben an keinen Vorteil in dem Verfahren zu sehen und sieben machten keine Angabe.

### 3.3.17 Nachteile aus Sicht des Patienten

Auf die Nachfrage zu Nachteilen, die das Kapillarblutverfahren mit sich bringt, gaben zwölf Patienten keinen Nachteil an, ein Patient nannte die weite Entfernung zur Post und ein Patient bemängelte das dadurch entfallende kompetente und hilfreiche Arztgespräch. Neun Patienten machten keine Angabe.

### 3.3.18 Verbesserungsvorschläge aus Sicht des Patienten

Als Verbesserungsvorschläge nannten acht Patienten, dass sie keine hätten. Zwei Patienten wünschten sich bessere Lanzetten, da diese schmerzhaft seien und nicht genug Blut käme. Der Vorschlag lautete größere Lanzetten zu nutzen. Außerdem sei das Abnehmen der Schutzkappe kompliziert und schwierig. Ein Patient wünschte sich zusätzlich größere und besser klebende Pflaster.

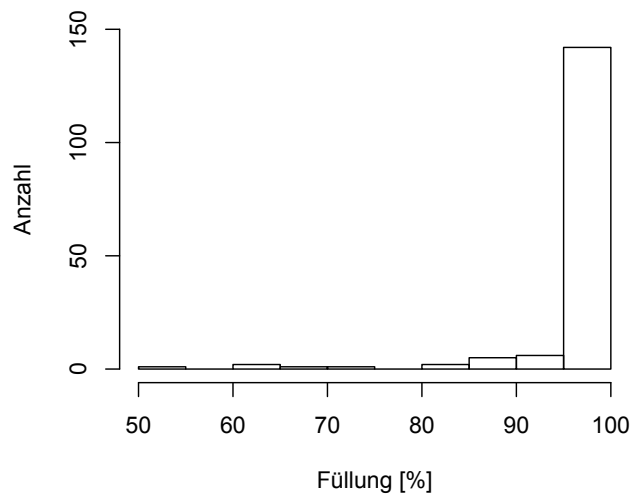
13 Patienten machten keine Angabe.

## **3.4 Füllung der *dried blood spots***

Die Auswertung der Füllung der *dried blood spots* im Histogramm (s. Abb. 17) ergibt, dass 89% der Kärtchen im vorgegebenen Bereich zu 95-100% mit Kapillarblut gefüllt waren. 4% lagen im Bereich zwischen 90 bis 94%-Füllung. 7% waren zu weniger als 90% befüllt.

## Ergebnisse

---



**Abbildung 17: Histogramm Füllung der *dried blood spots*. Hinweis: die rechten Grenzen sind in den jeweiligen Intervallen enthalten**

## 4. Diskussion

### 4.1 Hintergrund der Studie

Patienten, die eine Organtransplantation erhalten haben, müssen so lange das Transplantat funktioniert, sprich oftmals für viele Jahre, in manchen Fällen sogar ihr Leben lang, Medikamente zur Immunsuppression einnehmen. Da diese eine sehr geringe therapeutische Breite haben, ist eine regelmäßige Messung der Immunsuppressiva im Blut erforderlich. An Hand der gemessenen Konzentrationen kann die Dosierung individuell angepasst werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Im Rahmen einer Nierentransplantation können unter der Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren, zum Beispiel Ciclosporin A, sowohl toxische Effekte auf Grund von Überdosierungen als auch Abstoßungsreaktionen durch eine unzureichende Immunsuppression in der Folge von zu niedrigen Wirkstoffkonzentrationen auftreten.

In der ambulanten Therapie mit Ciclosporin A ist die Bestimmung von Talspiegeln aus venösem Blut Teil der Routinenachsorge nierentransplantierte Patienten. Jedoch wird die Lebensqualität der Patienten durch häufige Arztbesuche eingeschränkt.

Eine weniger einschränkende Methode könnte die selbstständige Blutentnahme durch den Patienten sein. Hierzu eignet sich die Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere. Die Probe kann auf ein spezielles Filterpapier aufgebracht und als *dried blood spot* per Post versandt werden.

*Dried blood spots* stellen eine gute Methode zum therapeutischen *drug monitoring* dar, da sie viele Vorteile im Vergleich zur bisherigen venösen Probenentnahme aufweisen. Die kapillare Entnahme kann zu Hause stattfinden und ein invasives Vorgehen ist dabei nicht notwendig. Zudem kann die Spiegelbestimmung zu jedem beliebigen Zeitpunkt durchgeführt werden und die Testergebnisse liegen idealerweise schon vor, wenn der Patient in die Sprechstunde kommt.

Mehrere Studien zum Vergleich von Kapillarblut, *dried blood spots* und venösem Blut wurden bisher publiziert, jedoch stand dabei meist nicht die Praktikabilität für den Patienten im Vordergrund [31], [37], [47]–[49].

Obwohl es in den letzten Jahren vermehrt Veröffentlichungen zu dem Thema gab, ist die Methode der *dried blood spots* noch nicht in die Praxis umgesetzt worden.

Dies könnte unter anderem daran liegen, dass noch Zweifel an der Zuverlässigkeit der Methode bestehen. Zudem stehen bisher nur wenigen Laboren validierte analytische Methoden zur Verfügung.

*Dried blood spots* mit Kapillarblut wären ebenfalls nützlich zur Ermittlung der AUC. Durch therapeutisches *drug monitoring* soll die Wirksamkeit verbessert, Überdosierung und damit verbundene Nebenwirkungen verhindert und Interaktionen oder unerwartete pharmakokinetische Einflüsse aufgedeckt werden. Die AUC, welche auf der Basis eines kompletten pharmakokinetischen Profils basiert, ist die beste Möglichkeit zur Messung der Exposition eines Medikamentes. Die Untersuchung des kompletten pharmakokinetischen Profils benötigt jedoch die Erfassung vieler Blutproben und ist somit teuer, zeitaufwändig und unbequem, besonders für ambulante Patienten. Diese Nachteile führen dazu, dass die AUC in der Routine nicht durchgeführt wird. Gewöhnlich werden Talspiegel genutzt um die Exposition abzuschätzen, da sie eine moderate Korrelation mit der AUC zeigen [50].

Das therapeutische *drug monitoring* ist für Patienten mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen kann die Anfahrt zur Ambulanz lang sein und der Termin für die Talspiegelentnahme muss entweder sehr früh oder sehr spät vereinbart werden. Zum anderen sind die Venen durch häufige Blutentnahmen strapaziert und auch der Blutverlust über den gesamten Zeitraum gesehen, ist nicht unerheblich. Ferner gibt es für die Transplantationsambulanzen einige Herausforderungen zu meistern. Zu einem bestimmten Zeitpunkt muss mehreren Patienten Blut abgenommen werden, so dass ausreichend geschultes Personal vorhanden sein muss. Da die Bestimmung von Ciclosporin A aus *dried blood spots* eine Möglichkeit darstellt diese Probleme zu umgehen, ist für klinisch praktizierende Ärzte von großem Interesse.

## 4.2 Bewertung der Ergebnisse der klinischen Studie

### 4.2.1 Bewertung der Studienergebnisse für den Methodenvergleich

Als Methode zum Vergleich der beiden Verfahren wurde nach aktuellem Goldstandard der Bland-Altman-Plot und die Passing-Bablok Regression gewählt.

In die Analyse wurden beim Vergleich von *dried blood spots* und venöser LCMS nur die Proben, die zeitgleich abgenommen worden sind, einbezogen. Bei den

venösen Messungen per Immunchemie handelt es sich um Proben, die einen Tag nach der ambulanten Kapillarblutentnahme entnommen wurden.

In der Vorstudie von Wilhelm et al. [31] wurde eine Methode entwickelt die Ciclosporin A-Konzentration aus Trockenblutproben zu bestimmen und anschließend mit der Bestimmung mittels LCMS verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Messwerte der Vergleichsmethode bis 23,3% höher als die der Referenzmethode waren. Eine Normierung durch den Hämatokrit ergab Differenzen bis 7,3% und führte zu einer Methodenäquivalenz mit der Referenzmethode.

In dieser Studie wurden in den *dried blood spots* bis zu 18,5% höhere Werte, nach Normierung durch Hämatokrit bis zu 18,7% und nach Kalibrierung bis zu 10,6% gemessen. Es fällt auf, dass der Vergleich mit der Immunchemie geringere Differenzen im Mittelwert ergibt. Hier lagen die Messwerte der *dried blood spots* um 2,7% bis 12,2% und nach Kalibrierung um 2,0% bis 4,8% höher.

Auch in anderen Studien wurden relativ höhere Ciclosporin A-Konzentrationen in Kapillarblut als in venösem Blut nachgewiesen.

Leichtle et al. [36] verglichen die Ciclosporin A-Konzentration von Leber- und Nierentransplantierten aus venösem Blut mit der Ciclosporin A-Konzentration aus EDTA-stabilisiertem Kapillarblut und *dried blood spots*.  $C_0$  und  $C_2$ -Zeitpunkt wurden dabei getrennt betrachtet. Hierbei konnte zwar eine signifikante Korrelation sowohl des Kapillarblutes als auch der *dried blood spots* nachgewiesen werden. In den *dried blood spots* wurden jedoch für die  $C_0$  und die  $C_2$ -Proben ebenfalls höhere Ciclosporin A Level gemessen.

Man könnte annehmen, die Ciclosporin A-Spiegel seien im kapillären Blut niedriger, da der längere Zeitraum des Prozesses des Postversandes die Konzentration reduziert. Zur Stabilität der Ciclosporin A-Konzentration in *dried blood spots* macht die Literatur verschiedene Angaben. Wilhelm et al. [31] konnten in der Vorstudie allerdings eine Stabilität bei Raumtemperatur für mindestens 96 Stunden nachweisen.

Die höheren Konzentrationen in den *dried blood spots* könnten dadurch bedingt sein, dass das Ciclosporin A in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Diese würden bei unsachgemäßer Abnahme, zum Beispiel durch Quetschen des Fingers, beschädigt werden und das Ciclosporin A vermehrt freisetzen.

Wilhelm, AJ et al. [51] untersuchten die Ciclosporin A-Spiegel zum selben Zeitpunkt in venösem Blut und kapillären *dried blood spots* bei Stammzelltransplan-

tierten. Die Proben von 38 Patienten wurden quantifiziert und mittels Deming-Regression und Bland-Altman-Plot verglichen. Die Ergebnisse ergaben mit einem Bias von  $-3,6\mu\text{g/l}$  und einen 95%-Konfidenzintervall von  $-121,7\mu\text{g/l}$  bis  $114,6\mu\text{g/l}$  keinen signifikanten Unterschied der zwei Methoden.

In der vorliegenden Studie fallen die Differenzen im Mittelwert höher aus, so dass eine adäquate Methodenäquivalenz in Frage zu stellen ist. Zum Beispiel kann ein aus *dried blood spots* gemessener Wert von  $100\mu\text{g/l}$  im venösen Blut sowohl  $62\mu\text{g/l}$  als auch  $117\mu\text{g/l}$  betragen. Dies beinhaltet die gesamte relevante Spanne und die mittels Passing-Bablok geschätzte Spanne ist sogar noch größer. Die Berücksichtigung des Hämatokrits änderte dies nur unwesentlich.

Allerdings unterliegen die Konfidenzintervalle beim Vergleich von Immunchemie und LCMS, die beide in der Praxis etabliert sind, ähnlich großen Spannen. Dies zeigt sich zum einen im Vergleich der hier vorliegenden Daten, aber auch in den Werten der Vorstudie von Wilhelm et al. [31].

Um kapilläre und venöse Werte vergleichen zu können, ist eine methodenspezifischen Bewertung der Messwerte notwendig. Dies könnte in Form einer Kalibrierung erfolgen. Zur Kalibrierung wurde hier der Datensatz der Vorstudie zu Grunde gelegt. Damit konnte in der vorliegenden Studie eine gute Übereinstimmung gezeigt werden. Die Differenzen der Mittelwerte nach Kalibrierung sind deutlich geringer. Allerdings sollte ein umfangreicheres Probenkollektiv erhoben werden, um eine genauere Kalibrierung zu erreichen.

Auch Leichtle et al. kommen zu dem Schluss, dass ein Korrekturfaktor nötig ist, um die Vergleichbarkeit mit venösen Proben erhalten zu können [36].

Die Differenzen im Vergleich zu anderen Studien könnten auch durch Fehler in der Messmethode oder bei der Kapillarblutentnahme verursacht sein.

Die Patienten müssen gut zur Kapillarblutentnahme geschult werden, um Fehler zu minimieren. Potentielle Probleme durch die selbstständige Entnahme können durch nicht sachgemäße Platzierung des Blutes auf dem Filterpapier entstehen. Die gleichmäßige Absorption des Filterpapiers geht verloren, wenn das Blut gekleckert oder verschmiert wird oder wenn ein Tropfen Blut auf einen schon zuvor aufgetragenen Tropfen gebracht wird. Sowohl zu viel aufgetragenes Blut, als auch eine inkomplette Sättigung des Filterpapiers oder aber ein exzessives Quetschen des Fingers, so dass die Probe durch Gewebsflüssigkeit verdünnt wird, können zu Verfälschungen der Ciclosporin A-Konzentration führen. Auch der Hämatokrit kann

die Viskosität des Blutes und damit die Verteilung auf der Filterkarte beeinflussen [52].

### 4.2.2 Bewertung der Studienergebnisse für die Fragebogenauswertung

Bisher liegen Studien, die die Durchführbarkeit der Kapillarblutentnahme durch den Patienten im häuslichen Umfeld und den anschließenden Postversand der *dried blood spots* untersuchen, im Wesentlichen nur im internationalen Vergleich vor. Insbesondere Daten aus Deutschland stehen aktuell kaum zur Verfügung.

Jager et al. maßen die Tamoxifenkonzentration aus *dried blood spots* und zeigten, dass die Mehrheit der Patienten (86%) in der Lage war die Blutentnahme mittels *dried blood spot* selbst zu Hause durchzuführen und diese Methode im Vergleich zur venösen Entnahme bevorzugte (61%) [38].

In einer Studie von Fokkema et al. wurden die gemessenen Werte von HbA1c aus *dried blood spots* und venösem Blut verglichen und die Patientenzufriedenheit per Fragebogen untersucht. 83% der Patienten wünschten sich die *dried blood spot* - Methode als Möglichkeit für die Zukunft [53].

In der vorliegenden Studie konnte mit 72% ebenfalls eine deutliche Präferenz für die kapilläre Entnahme gezeigt werden. Eine geschlechtergetrennte Auswertung ergab, dass insbesondere Frauen die kapilläre Entnahme vorziehen. Außerdem kann aus der Darstellung des Zusammenhangs zwischen Alter und bevorzugter Methode angenommen werden, dass die kapilläre Entnahme vor allem von den Patienten unter 70 Jahren präferiert wird (s. Abb. 13). Eine ähnliche Abbildung (s. Abb. 14) stellt den Zusammenhang zwischen der Zeit seit der ersten Nierentransplantation und der bevorzugten Methode dar und lässt darauf schließen, dass überwiegend Patienten, die schon seit langen transplantiert sind und somit auch seit langem zur Blutentnahme ins Transplantationszentrum kommen, die venöse Entnahme bevorzugen. Dies könnte daran liegen, dass sie sich nicht mehr umgewöhnen möchten.

Der Großteil der Patienten würde die kapilläre Entnahme gerne auch in Zukunft nutzen. Dreizehn (57%) der Patienten können sich gut oder sehr gut vorstellen die kapilläre Blutentnahme in der Zukunft zu nutzen, acht (33%) waren sich noch unsicher und nur zwei (8%) waren eher nicht überzeugt.

Ein wesentliches Ziel der Studie war eine Zeitersparnis für den Patienten zu erreichen. Dieses Ziel konnte für 58,3% der Patienten erreicht werden. Allerdings scheint es hierbei zu Missverständnissen gekommen zu sein. Dies zeigt sich darin, dass zwei Patienten zwar bei Zeitersparnis „nein“ angekreuzt haben, jedoch eine Zeitangabe gemacht haben. Die Patienten mussten trotz der kapillaren Blutentnahme am nächsten Tag ins Transplantationszentrum zur routinemäßigen Blutentnahme und konnten die Zeitersparnis nur hypothetisch angeben, was wohl zu Unklarheiten geführt hat. Daher sollte diese Angabe unter einer exakteren Formulierung der Fragestellung überprüft werden.

Leider war der Rücklauf der Proben noch nicht optimal. Nur von 21 der ursprünglich 40 geschulten Patienten (52,5%) erhielten wir alle drei angestrebten Proben. Jedoch wurden zwei der Patienten auch wegen eines Medikamentenwechsels und Rückkehr an die Dialyse aus der weiteren Studie ausgeschlossen und bei vielen Patienten waren die Terminabstände sehr groß, so dass die Kapillarentnahme vermutlich in Vergessenheit geraten ist. Von immerhin 33 Patienten (83%) erhielten wir mindestens eine Probe und von 28 Patienten (70%) mindestens zwei Proben, so dass für zukünftige Studien bei verkürzten Terminabständen von besseren Rücklaufquoten ausgegangen werden kann.

Dies lassen auch andere Studien, die die Bereitschaft zur Teilnahme an epidemiologischen Studien mit kapillärer Blutentnahme und *dried blood spot*-Versand untersuchten, vermuten [39], [49], [54].

Sakhi et al. baten im Rahmen des norwegischen Brustkrebs Screening Programm 4597 Frauen von 50 – 69 Jahren selbstabgenommene *dried blood spots* zurückzusenden. 71% der Frauen schickten Proben zurück [39].

In einer Studie von Bhatti et al. [54] wurden 390 Frauen, die erst kürzlich zur Teilnahme an einer genetischen Brustkrebsstudie eingeladen worden waren und die venöse Blutabnahme in diesem Zusammenhang ablehnten, aufgefordert eine kapillare Blutentnahme mittels *dried blood spot* per Post zu versenden. Per Zufallsprinzip wurde der Hälfte der Frauen zwei Dollar als Motivation versprochen. 31% der Frauen schickten einen *dried blood spot* ein. Die zwei Dollar spielten nur eine geringe Rolle an der Entscheidung zur Teilnahme. Damit wurde eine geschätzte Teilnahme für die ursprüngliche Brustkrebsstudie von 68% errechnet und festgestellt, dass die Bereitschaft zur Teilnahme bei *dried blood spots* höher als bei venöser Entnahme (62%) wäre [54].

Auch Williams et al. untersuchten den Nutzen von *dried blood spots* in epidemiologischen Studien und erhielten 85% der *dried blood spots* zurück [49].

In der vorliegenden Studie empfanden 96% der Patienten den Versand mit der Post als praktisch und nur eine von den insgesamt 82 erhaltenen Proben (1%) ging verloren, so dass der Postversand als eine gut durchführbare Methode anzunehmen ist. Zudem sind *dried blood spots* sehr geeignet für den Postversand, da ein einfacher Briefumschlag genutzt werden kann.

### 4.2.3 Bewertung der Kapillarblutentnahme

Für eine gute Praktikabilität spricht, dass alle Patienten sich gut oder sehr gut angeleitet fühlten und der überwiegende Teil der *dried blood spot-Karten* ausreichend gefüllt war, so dass die Ciclosporin A-Konzentration gemessen werden konnte.

Probleme traten nur bei zwei Patienten (8%) auf, wobei es sich in beiden Fällen um nicht ausreichende Blutmengen handelte.

Diese Ergebnisse werden auch durch andere Studien bestätigt. Bei Sakhi et al. waren 93% der Proben korrekt gepackt und versendet, 92% konnten zur Bestimmung von einem Biomarker verwendet werden und 74% waren regelrecht ausgefüllt. Es zeigte sich, dass Frauen mit höherem Bildungsniveau und gesünderem Lebensstil eher bereit waren an der Studie teilzunehmen und die *dried blood spot*-Befüllung eher korrekt ausführten [39].

Bei Williams et al. waren 99% der Proben geeignet um mindestens einen Wert daraus zu bestimmen [49].

In der Studie von Leichtle et al. betrachteten sich alle Patienten als ausreichend informiert und bewältigten die Entnahmeprozedur sehr gut, wie sich an dem hohen Anteil der brauchbaren Proben (83%) zeigt. Die Hauptprobleme waren inadäquate Probenvolumina [36].

Ein Vorteil von *dried blood spots* mit Kapillarblut sind die geringeren Kosten. Ein direkter Vergleich der Kosten ist schwierig, aber würde höchstwahrscheinlich einen großen Unterschied zeigen. Im Gegensatz zur Venenpunktion wird für die Kapillarblutentnahme kein geschultes Personal benötigt und die Patienten müssten nicht so häufig zum Arzt fahren. Vom ökonomischen Standpunkt her kann die

selbstständige Entnahme dementsprechend Ausgaben für geschultes Personal sowie die Anfahrtkosten ersparen.

Ebenso sind der Versand sowie die Aufbewahrung der *dried blood spots* einfacher. Die *dried blood spots* nehmen weniger Platz in Anspruch als venöse Proben und müssen nicht speziell gelagert werden.

Zudem könnten auch Proben von Bewohnern ländlicher Regionen einfacher beschafft werden und die Ergebnisse wären schon vorhanden, wenn der Patient zum Arzt kommt.

Ein Nachteil wäre das geringe Probenvolumen, so dass die Messung verschiedener Parameter limitiert ist. Ebenso erschwerend wäre, dass die Patienten die Anweisungen exakt befolgen müssen und fehlerhafte Handhabung zu Messfehlern führen kann.

Daher sollte die selbstständige Probenentnahme auf höchst standardisierte Weise erfolgen und die genaue Anleitung und äquivalentes Training der Patienten wären unabdingbar.

### **4.3 Ausblick**

Die Bestimmung von Medikamentenspiegeln durch *dried blood spots* gewinnt aufgrund der einfachen und patientenfreundlichen Handhabung, der Durchführbarkeit zu Hause und des einfacheren Transports an Popularität.

Ebenso spielt die Angst vor den Schmerzen bei der venösen Blutentnahme, die bei der kapillären Entnahme durch einen kleinen „Pieks“ entfallen, eine große Rolle. Dies zeigt sich auch im Erfolg von Theranos, dem von Elizabeth Holmes gegründeten Unternehmen zur „Aufmischung“ des Marktes für Labortests [55].

Durch die *dried blood spot*-Technik könnte die Logistik für klinische Studien vereinfacht werden, da kein Personal für venöse Blutentnahmen notwendig ist und die Proben bei Raumtemperatur transportiert und aufbewahrt werden können. Des Weiteren sind die *dried blood spots* für das therapeutische *drug monitoring* interessant, da die Patienten die Entnahme zu Hause durchführen und per Post ans Labor senden können. Dadurch könnten die Ergebnisse beim Arztbesuch schon vorliegen. Die klinische Umsetzung ist jedoch nur möglich, wenn die Zielgruppe fähig und willig ist die *dried blood spots* selbst zu Hause durchzuführen. Einige Studien haben dies untersucht und zeigen, dass die Mehrheit der eingeschlosse-

nen Patienten (83-95%) in der Lage war zumindest eine geeignete Probe abzugeben. Ebenso zeigten die Untersuchungen, dass die Patienten die kapilläre Entnahme der venösen vorziehen (51-83%).

Damit die Methode der *dried blood spots* in die Routinediagnostik aufgenommen werden kann, sind noch weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig. Auch der Vergleich der Messmethoden sollte nochmals mit größeren Datenmengen kritisch überprüft und eine geeignete Kalibrierung gefunden werden.

In der Zukunft könnte die Methode aber vor allem für jüngere, berufstätige Patienten eine große Verbesserung der Lebensqualität bringen.

### 5. Zusammenfassung

Patienten, die eine Organtransplantation erhalten haben, müssen Medikamente zur Immunsuppression, zum Beispiel Ciclosporin A einnehmen. Da diese eine sehr geringe therapeutische Breite haben, ist eine regelmäßige Messung der Immunsuppressiva im Blut erforderlich. In der ambulanten Therapie mit Ciclosporin A ist die Bestimmung von Talspiegeln aus venösem Blut Teil der Routinenachsorge nierentransplantierte Patienten, jedoch wird die Lebensqualität der Patienten durch häufige Arztbesuche beeinträchtigt. Eine weniger einschränkende Methode ist die selbstständige Blutentnahme durch den Patienten. Hierzu eignet sich die Entnahme von Kapillarblut aus der Fingerbeere. Die Probe kann auf ein spezielles Filterpapier aufgebracht, per Post versandt und anschließend mittels LCMS quantifiziert werden. Im Fokus der vorliegenden Studie stand, die bereits von Wilhelm et al. etablierte Methode zur Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren aus Trockenblut an Hand der Ciclosporin A-Bestimmung in die ambulante Patientenversorgung zu übertragen und sowohl die Patientenzufriedenheit als auch die logistischen Herausforderungen zu überprüfen.

Hierfür wurden 40 Patienten angeleitet die Kapillarblutentnahme selbstständig zu Hause durchzuführen und die *dried blood spots* anschließend per Post ans Labor zu versenden. Zudem wurde ein anonymisierter Fragebogen entwickelt, der die Machbarkeit für den Patienten sowie dessen Zufriedenheit feststellen sollte.

Von 53% der eingeschlossenen Patienten konnten alle drei geplanten Blutuntersuchungen durchgeführt werden. Von 83% gab es zumindest eine Probe.

Die technische Aufbereitung der Trockenblutproben gelang bei 98% der eingesandten Proben. Die Patienten fühlten sich zu 71% gut und zu 29% sehr gut angeleitet. 72% bevorzugten die selbstständige Kapillarblutentnahme, 28% die venöse Blutentnahme in der Klinik. 93% der *dried blood spots* waren über 90% befüllt.

Die Werte der aus *dried blood spots* gemessenen Proben lagen bis zu 18,5% höher als die aus venösem Blut, nach Kalibrierung bis zu 10,6%. Dieses Resultat spiegelt sich auch in vorherigen Studien zu diesem Thema wider.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Patienten sich mehrheitlich positiv äußerten und der Großteil die kapilläre Entnahme bevorzugte. Damit aber die Methode der *dried blood spots* in die Routinediagnostik aufgenommen werden kann, sind noch weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Krämer B: Allgemeine Einführung – Historische Entwicklung. In: G. Kirchner, B. Krämer, H. Schlitt, B. Banas, M. Fischereeder, M. Hornung, A. Obed, M. N. Scherer, and C. Zülke (Hrsg.): Immunsuppression nach Nierentransplantation. 1. Aufl. 12-13, UNI-MED (2007)
- [2] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160, 277–282 (1956)
- [3] Murray JE, Merrill JP, Harrison JH: Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* 148, 343-59 (1958)
- [4] Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA: Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 23–46 (2005)
- [5] Murray JE, Tilney NL, Wilson RE: Renal Transplantation: A Twenty-five Year Experience. *Ann Surg* 184, 565-73 (1976)
- [6] [http://www.dso.de/uploads/tx\\_dsodl/2013\\_Jahresbericht.pdf](http://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/2013_Jahresbericht.pdf) (Tag des Zugriffs: 07.03.2014)
- [7] Schulz KH, Thaiss F: Langzeitüberleben bei chronischer Niereninsuffizienz. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 55, 543–551 (2012)
- [8] Schrem H, Barg-Hock H, Strassburg CP, Schwarz A, Klempnauer J: After-care for patients with transplanted organs. *Dtsch Arzteblatt Int* 106, 148–156 (2009)
- [9] Heusler K, Pletscher A: The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly* 131, 299–302 (2001)
- [10] Lack HW: *Tolypodadium Inflatum*-der weltberühmte Pilz aus dem Ötztal. *Kataloge des OÖ Landesmuseums* 164, 251-258 (2001)

- [11] Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2, 1323–1327 (1978)
- [12] Danovitch GM: Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney-Transplantation. In: Danovitch GM (Hrsg.): *Handbook of Kidney Transplantation*. 4. Aufl. 72-73, Lippincott Williams & Wilkins (2005)
- [13] Keown P, Niese D: Cyclosporine microemulsion increases drug exposure and reduces acute rejection without incremental toxicity in de novo renal transplantation. *Kidney Int* 54, 938–944 (1998)
- [14] Karow T, Lang-Roth R: Immunsuppressiva. In: Karow T, Lang-Roth R (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 19. Aufl., 861-869 (2011)
- [15] Novartis International AG: Novartis Annual Report 2012, [http://www.novartis.de/cs/www.novartis.de-wl10/downloads/ueber\\_novartis/novartis-annual-report-2012-de.pdf](http://www.novartis.de/cs/www.novartis.de-wl10/downloads/ueber_novartis/novartis-annual-report-2012-de.pdf) (Tag des Zugriffs: 20.08.2015 ) (2013)
- [16] Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13, 136–142 (1992)
- [17] Kuypers DR: Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring. *Ann Transplant* 13, 11–18 (2008)
- [18] Hesselink DA, Van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, De Bruin RW, Van Gelder T: Cyclosporine Interacts with Mycophenolic Acid by Inhibiting the Multidrug Resistance-Associated Protein 2. *Am J Transplant* 5, 987–994 (2005)
- [19] Nashan B, Armstrong VW, Budde K, Fricke L, Heemann U, Lück R, E Röthele E, Scheuermann EH, Suwelack B: Cyclosporin C2-Monitoring zur Optimierung der Immunsuppression nach Nierentransplantation–Empfehlungen anhand erster Erfahrungen in Deutschland. *Tx Med* 15, 15–24 (2003)
- [20] Oellerich M: Drug-Monitoring: Absorptionsprofile – individuelle Pharmakokinetik. In: Abendroth D, Broelsch CE, Heemann U, Hummel M, Land W, Lang H, Lison AE, Malagó M, Nadalin S, Nashan B, Oellerich M, Strüber M, Winkler M (Hrsg.): *Cyclosporin in der Transplantationsmedizin*. 1. Aufl., 62-70, Georg Thieme Verlag (2001)

- [21] Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *New Engl J Med* 342, 605–612 (2000)
- [22] Schiff J, Cole E, Cantarovich M: Therapeutic Monitoring of Calcineurin Inhibitors for the Nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 374–384 (2007)
- [23] Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R: Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 68, 55–62 (1999)
- [24] Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J: The Temporal Profile of Calcineurin Inhibition By Cyclosporine in Vivo. *Transplantation* 68, 1356–1361 (1999)
- [25] Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E: Clinical validation studies of Neoral C2 monitoring: a review. *Transplantation* 73, 3-11 (2002)
- [26] Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K: Patient management by Neoral C2 monitoring: An international consensus statement. *Transplantation* 73, 12-18 (2002)
- [27] Mohammadpour N, Elyasi S, Vahdati N, Mohammadpour AH, Shamsara J: A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Iran J Basic Med Sci* 14, 485-498 (2011)
- [28] Steimer W: Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 45, 371–381 (1999)
- [29] McBride JH, Kim SS, Rodgerson DO, Reyes AF, Ota MK: Measurement of cyclosporine by liquid chromatography and three immunoassays in blood from liver, cardiac, and renal transplant recipients. *Clin Chem* 38, 2300–2306 (1992)
- [30] Korecka M, Shaw LM: Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice. *Ann Transpl* 14, 61–72 (2009)
- [31] Wilhelm L: Bestimmung von Calcineurininhibitoren aus Trockenblutproben bei Patienten nach Nierentransplantation. *Diss Lübeck* (2012)

- [32] Guthrie R, Susi A: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32, 338–343 (1963)
- [33] Alfazil AA: Stability of drugs and pesticides of forensic toxicological interest and their metabolites in biological samples. Diss Glasgow (2009)
- [34] Koal T, Burhenne H, Römling R, Svoboda M, Resch K, Kaefer V: Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 2995–3001 (2005)
- [35] Acott PD: Home fingerprick sampling for immunosuppressant drug monitoring in pediatric renal transplant patients. *Nat Clin Pract Nephrol* 2, 304–305 (2006)
- [36] Leichtle AB, Ceglarek U, Witzigmann H, Gäbel G, Thiery J, Fiedler GM: Potential of dried blood self-sampling for cyclosporine c2 monitoring in transplant outpatients. *J Transplant* 2010, Article ID 201918 (2010)
- [37] Lampe D, Scholz D, Prümke HJ, Blank W, Hüller H: Capillary blood, dried on filter paper, as sample for monitoring cyclosporin A concentrations. *Clin Chem* 33, 1643–1644 (1987)
- [38] Jager NGL, Rosing H, Linn SC, Schellens JHM, Beijnen JH: Dried blood spot self-sampling at home for the individualization of tamoxifen treatment: a feasibility study. *Bioanalysis and Clinical Pharmacology of Tamoxifen in Breast Cancer* (2014)
- [39] Sakhi AK, Bastani NE, Ellingjord-Dale M, Gundersen TE, Blomhoff R, Ursin G: Feasibility of self-sampled dried blood spot and saliva samples sent by mail in a population-based study. *BMC Cancer* 15 (2015)
- [40] Weltärztebund: Deklaration von Helsinki. [http://www.springer.com/cda/content/document/cda\\_downloaddocument/9783642131769-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1043837-p174005459](http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642131769-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1043837-p174005459) (Tag des Zugriffs: 20.08.2015) (2008)
- [41] Schröder G: Standardarbeitsanweisung Cyclosporin - UK S-H Campus Lübeck (2009)
- [42] Grouven U: Vergleich von Messmethoden. *Dtsch Med Wochenschr* 132, 69-73 (2007)

- [43] Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310 (1986)
- [44] Passing H, Bablok W: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Clin Chem Lab Med* 21, 709–720 (1983)
- [45] Passing H, Bablok W: Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. *Clin Chem Lab Med* 22, 431–445 (1984)
- [46] Bilic-Zulle L: Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem medica* 21, 49–52 (2011)
- [47] Hinchliffe E, Adaway JE, Keevil BG: Simultaneous measurement of cyclosporin A and tacrolimus from dried blood spots by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 883, 102–107 (2012)
- [48] Keevil BG: The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 44, 110–118 (2011)
- [49] Williams SR, McDade TW: The use of dried blood spot sampling in the national social life, health, and aging project. *Journals Gerontol Ser B Psychol Sci Soc Sci* 64, 131–136 (2009)
- [50] van Boekel GAJ, Donders ART, Hoogtanders KEJ, Havenith TRA, Hilbrands LB, Aarnoutse RE: Limited sampling strategy for prolonged-release tacrolimus in renal transplant patients by use of the dried blood spot technique. *Eur J Clin Pharmacol* 71, 1–6 (2015)
- [51] Wilhelm AJ, Den Burger JCG, Vos RM, Chahbouni A, Sinjewel A: Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877, 1595–1598 (2009)

- [52] Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadová KA, Mühl A, Heinze G, Sperl W, Bodamer OA: Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 373, 27–31 (2006)
- [53] Fokkema MR, Bakker AJ, de Boer F, Kooistra J, de Vries S, Wolthuis A: HbA1c measurements from dried blood spots: validation and patient satisfaction. *Clin Chem Lab Med* 47, 1259–1264 (2009)
- [54] Bhatti P, Kampa D, Alexander BH, McClure C, Ringer D, Doody MM, Sigurdson AJ: Blood spots as an alternative to whole blood collection and the effect of a small monetary incentive to increase participation in genetic association studies. *BMC Med Res Methodol* 9 (2009)
- [55] Roland L: Elizabeth Holmes – mit 31 Jahren jüngste Milliardärin. <http://www.faz.net/aktuell/wirtschaft/wirtschaftspolitik/elizabeth-holmes-ist-mit-31-jahren-juengste-milliardaerin-13461761.html> (Tag des Zugriffs: 06.08.2015) (2015)

## 7. Anhang

### Anhang 1: Votum der Ethikkommission



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
Dr. med. Nitschke  
Medizinische Klinik I

im Hause

nachrichtlich:  
Herrn Prof. Lehnert, Direktor der Medizinischen Klinik I

#### **Ethik-Kommission**

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Universität zu Lübeck  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann  
Tel.: +49 451 500 4639  
Fax: +49 451 500 3026  
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

**Aktenzeichen: 11-196**  
**Datum: 08. November 2011**

**Sitzung der Ethik-Kommission am 25. Oktober 2011 – Ihr Schreiben vom 31. Oktober 2011**  
**Antragsteller: Herr Dr. Nitschke / Herr Prof. Lehnert**  
**Titel: Praktikabilität der Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A) aus**  
**Trockenblut im ambulanten Bereich**

Sehr geehrter Herr Dr. Nitschke,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 31. Oktober 2011, in dem Sie den Hinweisen aus unserer Sitzung vom 25. Oktober 2010 nachkommen und die unklaren Sachverhalte aufklären..

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken gegen die Durchführung des o.g. Studienvorhabens.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich  
Ihr

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'H. Raspe'.

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Vorsitzender

## Anhang 2: Patientenaufklärung



*Im Focus das Leben*  
Universität zu Lübeck

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

**Interdisziplinäres  
Transplantationszentrum  
Medizinische Klinik I**

Direktor Prof. Dr. med. H. Lehnert

Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer  
OA Dr. med. M. Nitschke  
Tel.: +49 451 500 3297

Aufklärungsbogen zur Forschungsstudie 2011/2012

### **„Praktikabilität der Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A) aus Trockenblut im ambulanten Bereich“**

(Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer, Dr. med. M. Nitschke)

Liebe Patientin, Lieber Patient,

Sie sind nierentransplantiert und erhalten eine Immunsuppression mit Cyclosporin (z. Bsp. Sandimmun Optoral). Um Abstoßungsreaktionen und Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden, muss in regelmäßigen Abständen die Konzentration dieses Medikaments in Ihrem Körper gemessen werden. Um diese Konzentrationsbestimmung vorzunehmen, reichen schon einige Tropfen Blut, aufgefangen auf einem Blatt Filterpapier.

Im Rahmen einer Studie möchten wir nun untersuchen, ob es möglich ist, dass Patienten selbstständig zu Hause einige Blutstropfen aus der Fingerkuppe gewinnen und ihn auf einem Filterpapier mit der Post in ein Labor zur Analyse einsenden. Damit könnten für die Patienten häufige Fahrten zum Arzt und Wartezeiten vermieden werden.

Das Vorgehen dieser Art der Blutabnahme (auch Kapillarblutgewinnung genannt) könnte Ihnen von der Bestimmung des Blutzuckers her bekannt sein. Dabei erfolgt mit einer sehr kleinen Lanzette ein Stich in Ihre Fingerkuppe. Dieser Stich ist nicht schmerzhaft und sehr risikoarm. Sehr selten kann es zu einer meist geringfügigen lokalen Entzündung kommen.

Sie werden von uns jedoch detailliert angeleitet, wie die Kapillarblutgewinnung korrekt durchzuführen ist. Anschließend bitten wir Sie, über einen umschriebenen Zeitraum (z. B. 3–6 Wochen) zu insgesamt drei Terminen je zweimal, also insgesamt sechsmal, selbstständig bei Ihnen zu Hause oder in unserer Poliklinik einige Blutstropfen aus der Fingerkuppe zu gewinnen und diese auf einem Filterpapier auf unsere Kosten in ein Labor einzusenden.



Während dieses Zeitraums werden Sie von uns wie gewohnt im Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein betreut. Das heisst, während der Studie findet die von Ihnen selbstständig durchgeführte Blutabnahme zusätzlich zu den bisherigen Routineuntersuchungen statt und ersetzt diese nicht.

Die Nutzung Ihres Blutes zu Forschungszwecken ist mit keinem erhöhten Risiko für Sie verbunden.

Weiterhin möchten wir Sie darauf hinweisen, dass die Studie pseudoanonymisiert durchgeführt wird. Dies bedeutet, dass die Herkunft Ihres Blutes für Dritte nicht ersichtlich ist und auch die Ergebnisse anonymisiert dokumentiert werden.

Das entnommene Blut wird ausschließlich für die hier beschriebene Studie verwendet und verbleibt in einem zertifiziertem Labor des Studienleiters. Eine Weitergabe an Dritte außerhalb des Studienlabors oder der Universität zu Lübeck ist nicht vorgesehen. Sämtliches Material wird nach Beendigung der Studie vernichtet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck.

Tritt im Rahmen der Studiendurchführung unwahrscheinlicherweise ein Schaden auf, der den Studienteilnehmern durch das schuldhafte Verhalten eines Beschäftigten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) zugefügt wurde, haftet selbstverständlich die gesetzliche Haftpflichtversicherung des UKSH.

Falls Sie weitere Fragen zu unserer Studie haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung. Zudem möchten wir Sie darauf hinweisen, dass Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studie zurücktreten können.

Mit freundlichen Grüßen

Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer, Dr. med. Martin Nitschke, Frau Dr. Kodal, Frau Dr. Derad,  
Frau Dr. Machnik, Anna Rohfleisch (Doktorandin)  
Medizinische Klinik I, Interdisziplinäres Transplantationszentrum, UKSH, Campus Lübeck

## Anhang 3: Einverständniserklärung



*Im Focus das Leben*  
Universität zu Lübeck

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

**Interdisziplinäres  
Transplantationszentrum  
Medizinische Klinik I**

Direktor Prof. Dr. med. H. Lehnert

Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer  
OA Dr. med. M. Nitschke  
Tel.: +49 451 500 3297

Einverständniserklärung zur Forschungsstudie 2011/2012

**„Praktikabilität der Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A)  
aus Trockenblut im ambulanten Bereich“**

(Priv.-Doz. Dr. med. J. Kramer, Dr. med. M. Nitschke)

Name: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden.

Am \_\_\_\_\_ wurde ich von \_\_\_\_\_ ausführlich über das Ziel und den Verlauf der Studie, sowie Risiken der Behandlung aufgeklärt.

Ich bin damit einverstanden, dass von mir entnommenes Blut aus der Fingerkuppe zu Forschungszwecken verwendet wird. Mit Hilfe meines Blutes sollen Untersuchungen zur Praktikabilität und Zuverlässigkeit einer häuslichen (ambulanten) Eigenblutentnahme zur Medikamentenspiegelbestimmung durchgeführt werden.

Hiermit erkläre ich meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen.

\_\_\_\_\_  
Unterschrift aufklärender Arzt

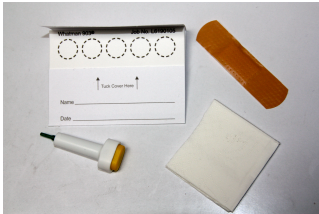
\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

## Anhang 4: Anleitung zur Kapillarblutentnahme

### Anleitung zur Kapillarblutentnahme



1. Material bereitlegen:
- Einmallanzette
  - Filterpapier
  - Tupfer
  - Pflaster



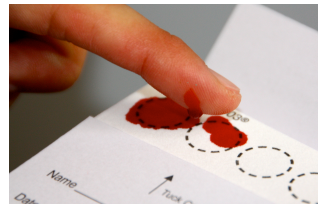
2. Hände waschen



3. Schutzkappe abdrehen



4. Lanzette an der seitlichen Fingerkuppe senkrecht zur Haut aufsetzen, Knopf drücken



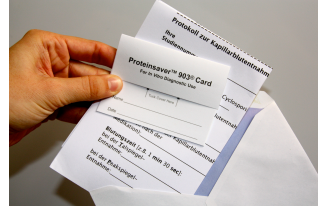
5. Blutstropfen auf das Filterpapier geben, bitte 2 Probenfelder vollständig ausfüllen, ca. 2 Stunden trocknen lassen



6. Einstichstelle mit Tupfer abwischen, einen Moment abdrücken und die Blutungszeit notieren



7. Die Einstichstelle anschliessend mit einem Pflaster schützen



8. Das Filterpapier und den ausgefüllten Protokollbogen in den Briefumschlag stecken



9. per Post ans Labor versenden

## Anhang 5: Protokoll zur Kapillarblutentnahme



*Im Focus das Leben*  
Universität zu Lübeck

### Protokoll zur Kapillarblutentnahme zu Hause

Ihre Studiennummer:

\_\_\_\_\_

Datum und Uhrzeit der letzten Cyclosporin-Einnahme:

\_\_\_\_\_

Datum und Uhrzeit der Kapillarblutentnahme Talspiegel (vor Medikation):

\_\_\_\_\_

Uhrzeit der Medikation:

\_\_\_\_\_

Datum und Uhrzeit der Kapillarblutentnahme Peakspiegel  
(2 Stunden nach der Medikation):

\_\_\_\_\_

**Blutungszeit** [z.B. 1 min 30 sec]:

bei der Talspiegelentnahme: \_\_\_\_\_

bei der Peakspiegelentnahme: \_\_\_\_\_

**Traten Probleme bei der Blutentnahme auf?**     Ja     Nein

Wenn ja, welche?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bei weitreichenden Problemen im Rahmen der Studie wenden Sie sich bitte umgehend telefonisch und vertrauensvoll an uns im Transplantationszentrum (Tel.: 0451-500-3297)!!!

## Anhang 6: Fragebogen



*Im Focus das Leben*  
Universität zu Lübeck

### Fragebogen zur Studie „ **Praktikabilität der Bestimmung von Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A) aus Trockenblut im ambulanten Bereich** “

Geschlecht:  weiblich  männlich

Alter: \_\_\_\_\_ Jahre

1. Wann war Ihre Nierentransplantation? (Bitte geben Sie ggfs. auch vorherige Transplantationen an)

\_\_\_\_\_

2. Haben Sie Diabetes mellitus/ Sind Sie zuckerkrank und müssen deshalb Ihren Blutzucker selbst messen?

Ja  Nein

3. Messen Sie Ihren Quickwert selbstständig?

Ja  Nein

4. Wie haben Sie sich zur Kapillarblutentnahme angeleitet gefühlt? (Schulnoten 1-6)

1 (sehr gut)  2 (gut)  3 (befriedigend)

4 (ausreichend)  5 (mangelhaft)  6 (ungenügend)

5. Gab es Probleme bei den Kapillarblutentnahmen?

Ja  Nein

Wenn ja, welche?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



6. Können Sie sich vorstellen, die ambulante Kapillarblutentnahme als Testverfahren in Zukunft zu nutzen?

sehr gut       gut       vielleicht       eher nicht

auf keinen Fall       weiss nicht

7. Welche Methode zur Bestimmung von Cyclosporin A (z. Bsp. Sandimmun Optoral) bevorzugen Sie?

venöse Blutentnahme in der Klinik       selbstständige Kapillarblutentnahme

8. Haben Sie durch die Kapillarblutentnahme im Vergleich zu einer Blutentnahme in einer Arztpraxis Zeit gespart?

Bitte berücksichtigen Sie hierbei nicht das Ausfüllen des Fragebogens, sondern nur die Zeit der Blutentnahme an sich.

Ja       Nein

Wenn ja: wieviel Zeit [in Minuten] haben Sie in etwa durch die Kapillarblutentnahme im Vergleich zur venösen Blutentnahme beim Arzt gespart?

\_\_\_\_\_

9. War der Versand mit der Post für Sie praktisch?

Ja       Nein

10. Welcher zusätzlicher Zeitaufwand [in min] war für Sie mit dem Postversand verbunden?

Bitte berücksichtigen Sie hierbei nicht die Zeit für die Kapillarblutentnahme an sich und auch nicht das Ausfüllen des Fragebogens, sondern geben Sie nur die Zeit zum Packen des Briefes plus den Weg zum Briefkasten an.

\_\_\_\_\_



11. Konnten Sie den Brief auf dem Weg zu einer anderen Besorgung/Tätigkeit nebenbei einstecken?

D.h. Sie mussten nicht extra einen Briefkasten aufsuchen, sondern haben den Brief ohne einen Umweg in Ihrem Tagesgeschäft in einen Briefkasten geworfen.

Ja       Nein

12. Welche Vorteile ergeben sich durch die ambulante Kapillarblutentnahme für Sie?

---

---

13. Welche Nachteile ergeben sich durch die ambulante Kapillarblutentnahme für Sie?

---

---

14. Haben Sie Verbesserungsvorschläge oder Anmerkungen?

---

---

---

---

### **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation niemals zustande gekommen wäre, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jan Kramer (Medizinische Klinik I, Universität zu Lübeck und LADR MVZ Dr. Kramer & Kollegen, Geesthacht) für die Vergabe und Unterstützung bei der Bearbeitung dieses spannenden Themas. Seine wertvollen Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die umfangreiche Betreuung und Unterstützung während des praktischen Teils der Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Martin Nitschke (UKSH Campus Lübeck, Medizinische Klinik I, Interdisziplinäres Transplantationszentrum). Vielen Dank für die jederzeit offene Tür sowie die vielseitigen Anregungen.

Dr. Lars Wilhelm (LADR MVZ Dr. Kramer & Kollegen, Geesthacht) danke ich für die Einführung in die Labortechniken und die gewissenhafte und zügige Durchführung der chromatographischen Analysen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Planung und Auswertung der Studiendaten danke ich Herrn Dr. Reinhard Vonthein vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Schwester Katarina für die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit, ihre kritischen Betrachtungen sowie ihre differenzierten Anmerkungen.

Zutiefst dankbar bin ich meinem Freund Christian für seine hilfreiche Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater für seinen Beistand beim Erarbeiten der statistischen Kenntnisse sowie meinen Eltern für die Ermöglichung meines bisherigen Lebensweges und ihr Vertrauen in mich.

## 9. Lebenslauf

### Persönliches

Name  
**Rohfleisch**

Vorname  
**Anna**

Geburtsdag  
**29. Juni 1984**

Geburtsort  
**Filderstadt**



### Bildung

2008 - 2015

**Universität zu Lübeck**  
Studium der Humanmedizin

2004 - 2007

**Akademie für Gesundheitsberufe Heidelberg,  
ehemals Schwesternschule der Universität  
Heidelberg**  
Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin

1994 - 2003

**Mörike Gymnasium, Ludwigsburg**  
Abitur

### Beruflicher Werdegang

seit 09/2015

**Johanniter Krankenhaus Geesthacht**  
Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin

2009 – 2014

**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,  
Campus Lübeck, Deutschland**  
Gesundheits- und Krankenpflegerin auf der chirurgischen  
Intensivstation

2007 – 2008

**Centre Hospitalier Universitaire Vaudois,  
Lausanne, Schweiz**  
Gesundheits- und Krankenpflegerin auf der Transplantati-  
onsstation und Allgemeinchirurgie

**Publikation**

2013

**Glucosurie rénale**

Rohfleisch, A, Nseir, G, Chehade, H, Guidoux, M, Venetz, JP, Barbey, F  
*Revue Médicale Suisse, Nr.9/2013, S. 636 - 640*

**Posterpräsentation**

2014

**Bestimmung der Ciclosporin A-Spiegel mittels LCMS aus Trockenblut von nierentransplantierten Patienten in der Ambulanz**

Rohfleisch, A, Wilhelm, L, Kramer, J, Nitschke, M  
*Kongress für Nephrologie, Berlin, 2014*