

Aus der Medizinischen Klinik,
mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pharmakodynamisches Monitoring stabiler nierentransplantierte Patienten bei der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von Calcineurin-Inhibitoren auf Everolimus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Beth

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. K. Budde
2. PD Dr. med. M. Giessing
3. PD Dr. med. A. Pascher

Datum der Promotion: 18. November 2011

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	4
2	<i>Einleitung</i>	7
2.1	Nierentransplantation	7
2.1.1	Historischer Rückblick	7
2.1.2	Aktueller Stand	8
2.1.3	Indikationen	8
2.1.4	Akute und chronische Abstoßungsreaktionen	8
2.1.5	Immunologische Betrachtung der Abstoßung	10
2.2	Immunsuppressive Medikamente	13
2.3	Pharmakodynamisches Monitoring	18
2.4	Fragestellung und Zielsetzung	20
3	<i>Material</i>	22
3.1	Studienkonzept	22
3.2	Patienten und Probanden	22
3.3	Pharmaka	24
3.4	Studienablauf	25
3.5	Parameter	26
3.5.1	Allgemeine Parameter.....	26
3.5.2	Klinische Parameter	26
3.5.3	Pharmakokinetische Parameter.....	27
3.5.4	Pharmakodynamische Parameter	28
3.6	Reagenzien	29
3.7	Verbrauchsmaterialien	30
3.8	Software	30
3.9	Geräte	31
3.10	Puffer und Lösungen	31

4	<i>Pharmakodynamischen Methoden</i>	35
4.1	Durchflusszytometrie	35
4.2	Assay zum Nachweis der intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF-α in CD3⁺ Lymphozyten	37
4.3	Assay zur Markierung der Oberflächenmoleküle CD3, CD25 und CD71	38
4.4	Assay zum Nachweis der Proliferation der Lymphozyten	39
4.5	Statistische Auswertung der Messdaten	40
5	<i>Ergebnisse</i>	42
5.1	Überblick über die Studienpopulation	42
5.2	Medikation	43
5.2.1	Calcineurin-Inhibitor: Ciclosporin A	43
5.2.2	Calcineurin-Inhibitor: Tacrolimus	44
5.2.3	mTOR-Inhibitor: Everolimus	45
5.3	Pharmakokinetische/Pharmakodynamische Messungen von EC-MPS	48
5.3.1	Pharmakokinetik von MPA und MPAG	48
5.3.2	Pharmakodynamische Messungen der IMPDH-Aktivität	54
5.3.3	Korrelationsanalysen	58
5.4	IL-2 und TNF-α Expression in CD3⁺ Lymphozyten	60
5.4.1	Anteil IL-2 ⁺ und TNF- α ⁺ T-Lymphozyten unter dem Einfluss der CNI- Medikation	60
5.4.2	Korrelationsanalysen	62
5.5	Lymphozyten-Proliferationsrate	65
5.5.1	Lymphozytenproliferationsrate unter dem Einfluss der CNI-Medikation	65
5.6	CD25 bzw. CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten	67
5.6.1	CD25 bzw. CD71 Expression auf CD3 ⁺ Lymphozyten unter dem Einfluss der CNI-Medikation.....	67
5.6.2	Korrelationsanalysen	69
5.7	Klinische Parameter	72
5.7.1	Nierenfunktion	72
5.7.2	Fettstoffwechsel	74
5.7.3	Entzündungsparameter.....	78
5.7.4	Anämie.....	79
5.8	Komplikationen/Nebenwirkungen	80

6	<i>Diskussion</i>	83
6.1	Pharmakokinetik CN-Inhibitor: Ciclosporin A/Tacrolimus versus mTOR-Inhibitor: Everolimus	83
6.2	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von EC-MPS.....	85
6.3	Pharmakodynamik Ciclosporin A versus Tacrolimus	88
6.3.1	IL-2 und TNF- α Expression in CD 3 ⁺ Zellen	88
6.3.2	Lymphozyten-Proliferationsrate	89
6.3.3	CD25 und CD71 Expression auf CD3 ⁺ Lymphozyten	90
6.4	Pharmakodynamik CNI + EC-MPS versus mTOR + EC-MPS.....	90
6.4.1	IL-2 und TNF- α Expression in CD 3 ⁺ Zellen	90
6.4.2	Lymphozyten-Proliferationsrate	93
6.4.3	CD25 und CD71 Expression auf CD3 ⁺ Lymphozyten	94
6.5	Nierenfunktion	96
6.6	Fettstoffwechsel.....	99
6.7	Entzündungsparameter.....	102
6.8	Anämie	103
6.9	Komplikationen/Nebenwirkungen	104
7	<i>Zusammenfassung</i>	106
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	109
9	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	122
10	<i>Danksagung</i>	125
11	<i>Lebenslauf</i>	126
12	<i>Erklärung</i>	128

2 Einleitung

2.1 Nierentransplantation

2.1.1 Historischer Rückblick

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation beim Menschen wurde 1954 am Brigham Hospital, Boston, USA durchgeführt. Die Chirurgen John Merrill, Hartwell Harrison und David Hume übertrugen unter der Leitung von Joseph Murray eine Niere zwischen einem homozygoten Zwillingenpaar. Dem Empfänger wurde somit ein dialysefreies und immunsuppressionsfreies Überleben von 9 Jahren ermöglicht, bevor er an den Folgen eines Herzinfarktes verstarb (1). Murray schlussfolgerte aus der erfolgreichen Transplantation, dass zwischen homozygoten Zwillingen keine immunologischen Barrieren bestehen. Die Arbeitsgruppe um Murray konnte die Transplantationen zwischen eineiigen Zwillingenpaaren erfolgreich wiederholen (2). In der Folge wurde der Kreis der Spender und Empfänger erweitert. Transplantationen wurden nun auch zwischen nicht genetisch identischen Individuen durchgeführt, die jedoch zu Abstoßungsreaktionen führten. Die immunologischen Grundlagen der Abstoßung fremden Gewebes beschrieb bereits im Jahr 1942 der Zoologe Brian Medawar (3). Es wurde offensichtlich, dass Mittel zur Unterdrückung einer Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus gefunden werden mussten. Mittels einer radioaktiven Ganzkörperbestrahlung versuchte man die Immunabwehr auszuschalten. Diese Technik von Murray wurde an elf Patienten mit Nierenversagen angewandt (4). Diese Bestrahlung war jedoch nicht frei von erheblichen Nebenwirkungen. Zehn der elf Patienten verstarben an fulminanten Infektionen. Erst durch den medikamentösen Einsatz von Azathioprin 1961 und später in Kombination mit Steroiden, wurde eine Transplantation auch zwischen nicht unmittelbar Verwandten möglich (3, 5).

Diese Kombination bildete in den Jahren 1962 bis 1982 die Basis der immunsuppressiven Behandlung. Die nächste grundlegende Veränderung in der Entwicklung der Immunsuppression war die Entdeckung des Pilzmetaboliten Ciclosporin A. Diese Substanz wurde von Roy Calne beschrieben und 1978 zum ersten Mal in der Klinik angewandt. Ciclosporin A wirkt im Gegensatz zu Azathioprin und Steroiden spezifischer auf T-Lymphozyten und weist eine höhere Effektivität auf. Mit der Einführung von Ciclosporin A konnten sowohl die Rejektionsraten als auch die Rate an schweren Infektionen gesenkt werden. In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Immunsuppressiva entwickelt, wie monoklonale Antikörper, Tacrolimus, Mycophenolat mofetil (MMF), Sirolimus/Everolimus oder spezifische Antikörperpräparate (3).

In Deutschland wurde im November 1963 in Berlin die erste Leichennierentransplantation durch Wilhelm Brosig und Reinhard Nagel durchgeführt. Die 21-jährige Empfängerin verstarb jedoch am 6. postoperativen Tag im Rahmen einer Transplantatruptur.

2.1.2 Aktueller Stand

2010 wurden in Deutschland laut Deutscher Stiftung Organtransplantation (DSO) 2973 Nieren transplantiert. Damit stellt die Nierentransplantation die am häufigsten durchgeführte Organtransplantation in Deutschland dar. Der Anteil der Transplantationen in Folge einer Organspende nach dem Tod betrug mit 2272 Spenden, 76,4 %. Der Anteil der Transplantationen nach einer Lebendspende betrug 22,4 % (665 Lebendspenden). Die Charité Berlin führte mit 210 Nieren die meisten Transplantationen (ohne Lebendspende) durch (6).

2.1.3 Indikationen

Die Indikation zur Nierentransplantation ist das chronische terminale Nierenversagen und eine bestehende Dialysepflichtigkeit. Es gibt verschiedene Ursachen, die zu einer Niereninsuffizienz führen. Im Jahr 2010 gehörten der Diabetes mellitus mit Nierenkomplikation (18,7 %), die autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nieren (15,5 %) sowie Glomerulonephritiden (15,0 %) zu den häufigsten Ursachen, die eine Nierentransplantation erforderten (6). Die Nierentransplantation stellt für Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz das beste Verfahren der Nierenersatztherapie dar. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine erfolgreich durchgeführte Transplantation nicht nur die Lebensqualität der Patienten verbessert, sondern auch die Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur chronischen Dialysebehandlung verlängert wird (7, 8).

2.1.4 Akute und chronische Abstoßungsreaktionen

Hauptursachen für Transplantatversagen sind (nach wie vor) die akute Abstoßung des Transplantates, die chronische Dysfunktion der Nieren sowie der vorzeitige Tod des Empfängers.

2009 funktionierten in Deutschland nach 1 Jahr noch ca. 95 % der Lebendnierentransplantate bzw. 85-88 % der Transplantate nach postmortaler Spende. Nach 5 Jahren arbeiten noch etwas mehr als 84 % der Nieren nach einer Lebendspende und 70 % der Nieren nach postmortaler Spende (siehe Abbildung 1). Somit bestehen nach einer Lebendspende höhere Erfolgsaussichten.

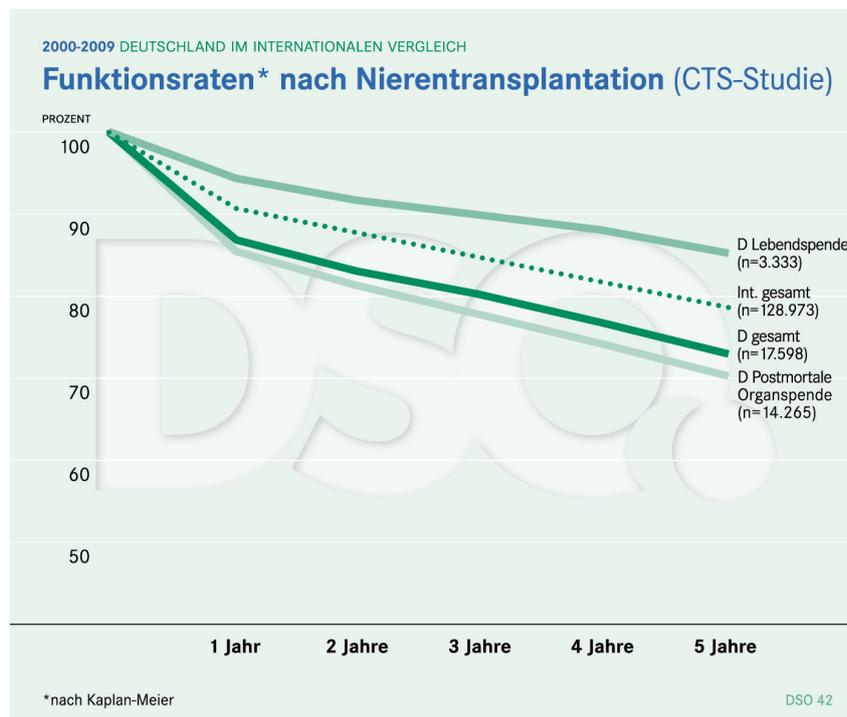


Abb. 1: Fünf-Jahres-Transplantatfunktionsraten nach Lebend-Nierentransplantation und postmortalen Organspende in Deutschland. Daten von Deutsche Stiftung Organtransplantation (6).

Die akute Abstoßung ist noch immer ein Hauptproblem in der Initialphase nach Transplantation. Bei rund 15-30 % aller nierentransplantierten Patienten tritt eine akute Transplantatabstoßung auf (9). Sie stellt nicht nur eine unmittelbare Gefahr für das neue Organ dar. Man geht davon aus, dass eine schwere akute Rejektion, die nicht erfolgreich behandelt werden kann, mit einer ungünstigen Langzeitprognose assoziiert ist (10).

Die akute Transplantatabstoßung ist eine immunologische Reaktion des Empfängers, die innerhalb von Tagen bis Wochen, aber auch noch Jahre nach erfolgter Transplantation auftreten kann, z. B. bei individuell nicht ausreichender Immunsuppression. Hauptsymptome sind unter anderem Fieber, akuter Rückgang der Diurese, Ödeme, akute Gewichtszunahme, rascher Kreatininanstieg von über 25 %, Erhöhung des arteriellen Blutdrucks sowie ein vergrößertes, druckdolentes Transplantat. Beweisend ist allein die Transplantatbiopsie (9, 11).

Die chronische Nierentransplantatabstoßung kann in einem Zeitraum von Monaten bis Jahren auftreten. Diese Form der Abstoßung ist häufig assoziiert mit rezidivierenden akuten oder subakuten Abstoßungsreaktionen und dem Auftreten von donorspezifischen HLA-Antikörpern (12). Nicht immunologische Gründe für eine chronische Transplantatdysfunktion sind ein erhöhtes Alter des Spenders (13). Weiterhin werden mögliche Faktoren wie sekundäre Veränderungen

durch Hypertonus und Hyperlipidämie des Empfängers (14) oder eine reduzierte Nephronmasse diskutiert. Hauptsymptome einer chronischen Dysfunktion der Niere sind ein progredienter Anstieg der Kreatininwerte über Monate, Proteinurie und ein erhöhter arterieller Druck (9).

2.1.5 Immunologische Betrachtung der Abstoßung

Bei der Transplantation allogener Organe stellt die Immunantwort von Lymphozyten des Empfängers gegen die Fremdantigene des Spenders ein Problem dar. Die Immunantwort auf ein fremdes Organ ist dabei ca. 100 Mal intensiver als auf gewohnte Umweltantigene (9).

Bei der Immunantwort zwischen genetisch nicht verwandten Individuen kommt es neben der Initiierung der unspezifischen Immunantwort (Aktivierung des Komplementsystems, Aktivierung von mononukleären Phagozyten und neutrophilen Granulozyten) zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort. Träger der spezifischen zellulären Immunantwort sind neben den B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten. Anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, den sog. T-Zell-Rezeptoren, werden T-Lymphozyten in verschiedene Gruppen eingeteilt. Hierbei werden T-Lymphozyten mit einem CD4 positiven Oberflächenprotein als T-Helfer-Zellen (dem wichtigsten Initiator der Effektorantwort) und T-Lymphozyten mit einem CD8 positiven Oberflächenprotein als zytotoxische T-Zellen (die wichtigsten Effektoren der akuten Abstoßung) differenziert. Bei spezifischen zellulären Immunantwort reagieren nun vor allem T-Lymphozyten mit ihren CD4 oder CD8 Oberflächenproteinen auf fremde HLA-Klasse II bzw. HLA-Klasse I Moleküle des Spenders (15, 16). Diese fremden Antigene werden in den sekundären lymphatischen Organen, von antigenpräsentierenden Zellen (APZ), v. a. den dendritischen Zellen über MHC-Klasse II Moleküle, präsentiert. Die APZ können sowohl vom Spender als auch vom Empfänger stammen. Die APZ, die vom Spender stammen, bewirken eine *direkte Aktivierung* von CD4-positiven Zellen des Empfängers. APZ des Empfängers, bewirken hingegen eine *indirekte Aktivierung* von CD4-positiven Zellen. Neben diesem ersten Erkennungssignal (T-Zellrezeptor und Antigen) benötigen T-Zellen zur vollständigen Aktivierung ein zweites Signal, das auch als kostimulatorisches Signal bezeichnet wird und antigenunspezifisch ist (17). Kostimulatorische Ligandenpaare sind z. B. CD40/CD40L (18). Hierbei ist CD40 auf den APZ vorhanden und bindet den CD40-Liganden auf den T-Zellen. Ein weiteres kostimulatorisches Ligandenpaar sind das CD28 Molekül der T-Zelle und der B7 Ligand der APZ. Es unterstützt die weitere Aktivierung der Immunantwort. Fehlt jedoch das zweite Signal, findet keine vollständige

T-Zell-Aktivierung statt, sondern es kommt zur eine T-Zell-Anergie, d.h. die T-Zelle bleibt für das entsprechende Antigen unempfindlich (19-21).

Wird die T-Zelle nun durch beide Signale vollständig aktiviert, werden mindestens drei Signaltransduktionswege induziert: (siehe Abbildung 2):

- Protein-Kinase C (PKC)-Weg
- Calcineurin-Weg
- Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Weg (MAP-Kinase)

Durch die vollständige Aktivierung der T-Zelle wird durch Thyrosinphosphorylierung die Bildung von Inositol 1,4,5 Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. Die Folge ist ein Anstieg an intrazellulärem Calcium und die Aktivierung der Proteinkinase C. Calcium bewirkt die Aktivierung von Calcineurin (*Calcineurin-Weg*), einer Phosphatase, die in allen Zellen des Organismus, wenn auch in unterschiedlicher Mengen, vorhanden ist. Über Calcineurin wird durch Dephosphorylierung der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) aktiviert. Durch die Translokation in den Zellkern und die Bindung an die Promotorregion von bestimmten Genen der DNA, initiiert NFAT dort die Transkription von IL-2 sowie anderen Zytokinen wie IL-4, IL-5 (22). Die Bildung der Proteinkinase C (*Protein-Kinase C-Weg*) führt wiederum zur Aktivierung von NF-κB, ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der die mRNA-Stabilität von Zytokinen reguliert.

Durch die Aktivierung von *MAP-Kinasen* in T-Zellen, z.B. der Extracellular Signal Regulated-Kinase (ERK) kommt es zur Phosphorylierung an den Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ELK (ets-like-protein), die sich an die DNA binden und zur Transkription von AP-1 (Activating protein 1) führt. Dieser bewirkt die Induktion von IL-2 und somit die Proliferation von T-Zellen (23).

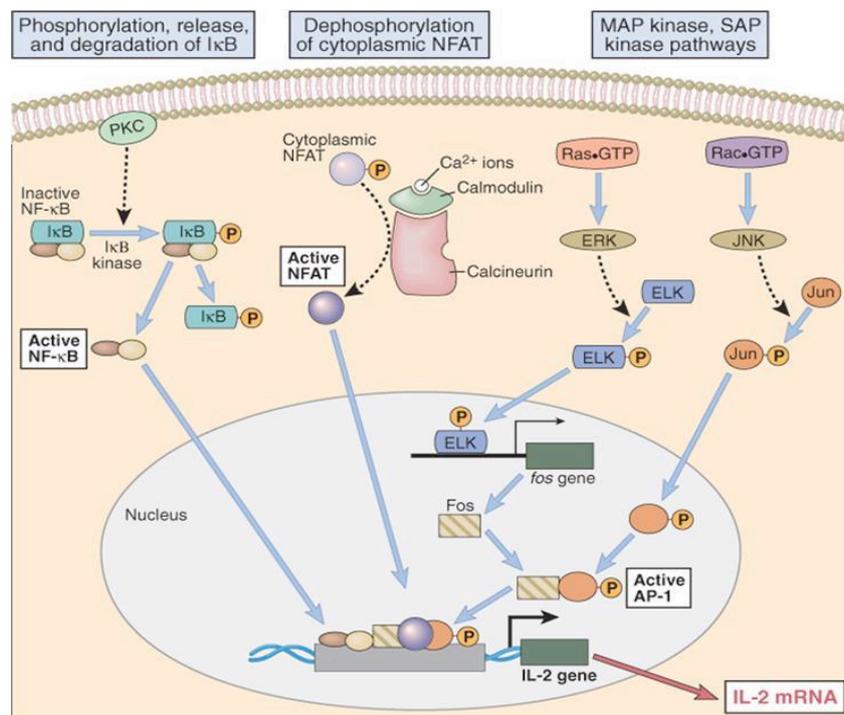


Abb. 2: Intrazelluläre Signalwege nach T-Zellaktivierung (148).

Wird eine CD4-positive Zelle aktiviert, werden IL-2, Zytokine wie IL-4, IL-10 sowie Interferon- γ , gebildet. Interleukin 2 ist ein Zellwachstumsfaktor, der autokrin wirkt, in dem es die Expression von Zellzyklus-Proteinen induziert (24). Damit sich IL-2 effektiver binden und wirken kann, ist die gleichzeitige Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25), die mit der β - und γ -Kette, den IL-2 Rezeptor bildet, notwendig. Zytokine, wie IL-2 bewirken wiederum die Bildung reifer Effektorzellen, wie T- und B- Zellen, natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen, die die Immunantwort erhalten. Interleukine aktivieren u.a. den „Target-of-rapamycin- (TOR) Proteinkomplex“, der die Zellproliferation reguliert. Interferon- γ induziert die MHC-Antigenexpression, die die Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen erhöht und zusammen mit TNF- α Makrophagen aktiviert (25).

Werden CD8-positive Zellen aktiviert, wird die Bildung von Zytotoxinen wie Perforin und Granzyme stimuliert. Perforine bilden hierbei Poren in der Zielzelle aus, durch die die Granzyme, sogenannte Proteasen, eindringen können und die Apoptose der Zielzelle auslösen (21).

Die immer bessere Kenntnis über den Ablauf der Immunreaktion bei Abstoßungen, schafft die Grundlage für die Entwicklung neuer Immunsuppressiva mit unterschiedlichen Angriffspunkten in dieser Kaskade.

2.2 Immunsuppressive Medikamente

Werden allogene Organen transplantiert, erfordert dies eine lebenslange immunsuppressive Therapie. Die immunsuppressive Therapie wird nach den Prinzipien der evidenzbasierten Medizin durchgeführt, d.h. die Wirksamkeit und Sicherheit der verschiedenen Immunsuppressiva wurde durch eine Vielzahl klinischer Studien geprüft (26).

Aufgrund des immunologischen Risikos soll durch Anwendung einer initial intensivierten Immunsuppression die akute Abstoßung des Organs verhindert werden. In der Postadaptionsphase, d.h. nach dem 12. Monat der Transplantation, liegen weniger Studien zur immunsuppressiven Therapie vor. Hier geht es vor allem um die Adaptierung der Immunsuppression und im weiteren Verlauf um die Reduzierung auf eine niedrige Erhaltungstherapie (27).

Das langfristige Ziel der Transplantationsmedizin sollte neben der Reduktion von akuten Transplantatabstoßungen auch die Reduktion des chronischen Transplantatversagens sein. Ferner soll das Spektrum an Nebenwirkungen, wie Toxizität (Nephrotoxizität), Tumorinduktion, Infektionsneigungen, Komorbidität und metabolische Probleme so gering wie möglich gehalten werden. Eine große Bedeutung nimmt die Sicherung und Stabilisierung des Langzeitverlaufs ein (26).

Die Medizin ist nach wie vor auf der Suche nach neuen Substanzklassen, die nicht nur die akute Rejektion sondern auch die chronische Organdysfunktion positiv beeinflussen. Heute steht der Medizin eine Vielzahl an Arzneistoffen unterschiedlicher Substanzklassen mit verschiedenen Wirkmechanismen zur Verfügung. Dadurch werden u. a. erste Versuche ermöglicht, immunsuppressive Therapien individuell an den Patienten anzupassen. Diese individualisierte Therapiestrategie berücksichtigt die Vorerkrankungen und Risikofaktoren des Patienten, mit dem Ziel, die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie zu minimieren.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über aktuelle Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin:

Glukokortikoide

Methylprednisolon, Urbason®	Hemmung der Zytokinproduktion, Hemmung von Entzündungsmediatoren sowie Reduktion der Lymphozytenproliferation, Apoptose von immunologischen Zellen
Prednisolon, Decortin H®	

Niedermolekulare Substanzen

Ciclosporin A, Sandimmun optoral®	Bindung an Cyclophilin, Komplex hemmt Calcineurin-Phosphatase und die T-Zell-Aktivierung
Tacrolimus, Prograf®	Bindung an FKBP12, Komplex hemmt die Calcineurin-Phosphatase und die T-Zell-Aktivierung
Sirolimus, Rapamune® Everolimus, Certican®	Bindung an FKBP12, Komplex hemmt mammalian target of rapamycin (mTOR) sowie die induzierte T-Zell-Proliferation
Mycophenolat mofetil, Cellcept® Enteric-coated mycophenolate mofetil, Myfortic®	Hemmung der Purinnukleotid-Synthese über IMPDH sowie die T- und B-Zell Proliferation
Leflunomid, Arava®	Hemmung der Pyrimidin-Synthese und dadurch die T- und B-Zell Proliferation
Azathioprin, Imurek®	Interferiert als Antimetabolit mit DNA-Synthese, antiproliferativ

Depletierende Antikörper

Polyklonales Antilymphozyten- Globulin, Thymoglobulin®	Bindung an Membranproteine von T-Lymphozyten, Lyse der T-Zellen
Muromomab, Orthoclone OKT3®	Bindung an CD3-Oberflächenmolekül, Lyse von CD-3 positiven Lymphozyten
Alemtzumab, MabCampath®	Bindung an CD52-Oberflächenmolekül Lyse von B- und T-Lymphozyten
Rituximab, MabThera®	Bindung an CD20-Oberflächenmolekül, Lyse von B-Lymphozyten

Nicht-depletierende Antikörper

Basiliximab, Simulect®	Bindung an IL-2 Rezeptor aktivierter T-Lymphozyten, Hemmung der IL-2 induzierten T-Zell Proliferation
Daclizumab, Zenapax®	
LEA29Y (Belatecept)-noch nicht zugelassen Fusionsprotein	Bindung an B7 von T-Zellen, Blockade des kostimulatorischen Signals 2

Tab. 1: Klassifikation von Immunsuppressiva mit beispielhaften Handelsnamen und Wirkungsweise (27, 28).

Die Vielzahl der auf dem Markt befindlichen immunsuppressiven Medikamente, erlaubt die Ausweitung der Anzahl möglicher immunsuppressiver Therapiekombinationen. Weltweit wird derzeit direkt nach der Transplantation meist als initiale Therapie eine Kombination bestehend aus: Calcineurin-Inhibitor (Ciclosporin A oder Tacrolimus), Mycophenolsäure (MPA) und einem Glukokortikoid (Prednisolon oder Methylprednisolon) angewendet (27).

Im Folgenden sollen die Immunsuppressiva genauer dargestellt werden, die Gegenstand der Studie sind.

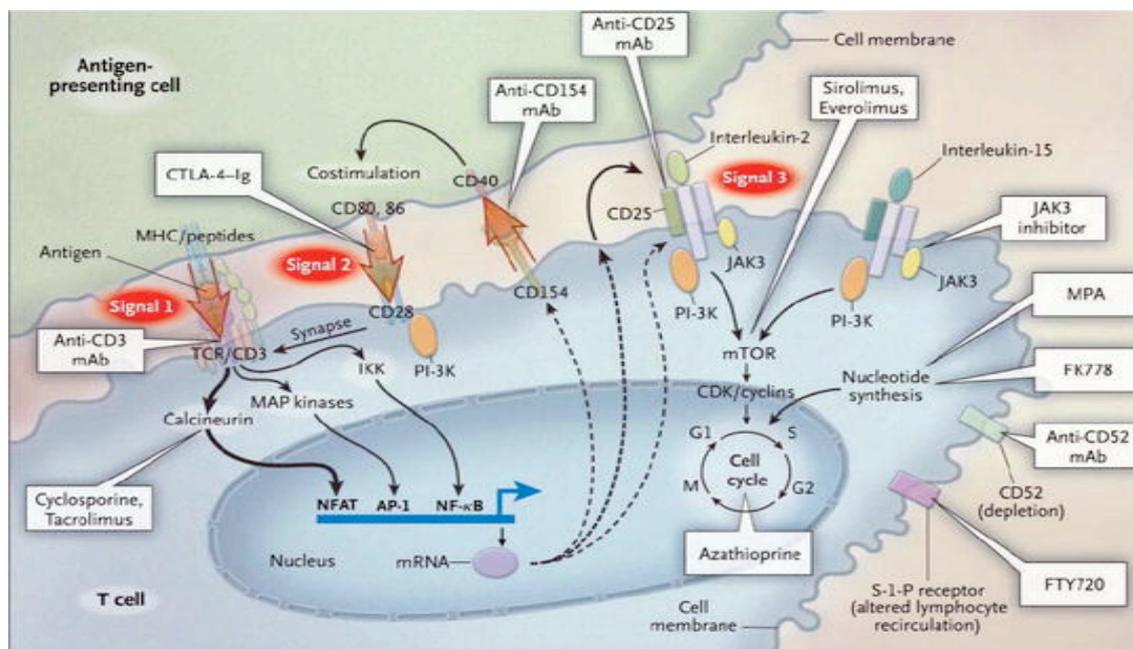


Abb. 3: Übersicht über den Wirkmechanismus verschiedener Immunsuppressiva (28).

Glukokortikoide (Prednisolon, Methylprednisolon)

Glukokortikoide sind ein essentieller Bestandteil der immunsuppressiven Therapie in der Initialphase nach Nierentransplantation. Kortikosteroide bewirken eine Reduktion der Lymphozytenproliferation, hemmen die Zytokinproduktion sowie Entzündungsmediatoren und induzieren die Apoptose von immunologischen Zellen. Aufgrund des umfangreichen Nebenwirkungsprofils einer langen Steroidtherapie, wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Wundheilungsstörungen, wird in vielen Zentren ein Steroidentzug angestrebt (29).

Calcineurin-Inhibitoren (Ciclosporin A, Tacrolimus)

Die Calcineurin-Inhibitoren (CNI), wie Ciclosporin (CyA) und Tacrolimus (Tac) bilden einen Komplex mit einem Immunophilin. Ciclosporin A bindet hierbei an Cyclophilin, Tacrolimus an „FK-506-binding-protein 12“ (FKB12). Diese Komplexe binden und inhibieren Calcineurin (siehe Abbildung 3). Der Tacrolimus/FKB12-Komplex besitzt dabei eine höhere Affinität zu Calcineurin als der Ciclosporin A/Cyclophilin-Komplex (28). Die Folge ist die Inaktivierung des NFAT und damit eine reduzierte Produktion von IL-2 sowie die anschließende Inhibierung der

IL-2 vermittelten T-Zell-Aktivierung. Durch die unterdrückte T-Zell-Aktivierung wird folglich die T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation gehemmt. Ciclosporin A und Tacrolimus werden in der Leber durch das Cytochrom P450 3A4 und 3A5-Isoenzyme metabolisiert. Daraus ergibt sich eine Vielzahl von Interaktionen mit anderen Pharmaka. Interaktionen, die die Wirkung beider Medikamente beeinflussen, sind aufgrund der geringen therapeutischen Breite von klinischer Bedeutung. Sie machen, zusammen mit der Variabilität der Bioverfügbarkeit, ein umfangreiches Monitoring erforderlich (30). Für Ciclosporin A konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass sich hier vor allem die Spiegelmessung 2 Stunden nach der morgendlichen Einnahme (C2) eignet. Sie stellt eine gute Annäherung an C_{max} dar und korreliert gut mit der AUC (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) (31).

Ciclosporin A und Tacrolimus haben ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum. Eine häufige Nebenwirkung beider Medikamente ist die Nephrotoxizität, die klinisch relevant und oft dosislimitierend ist. Weitere Nebenwirkungen sind Neurotoxizität und arterielle Hypertonie (27). Unter Ciclosporin A finden sich häufiger Hypercholesterinämien, unter Tacrolimus ist der diabetogene Effekt hervorzuheben (28). Das durchschnittliche kardiovaskuläre Risiko ist jedoch unter Tacrolimus günstiger (32, 33). Weiterhin können unter der Therapie von Ciclosporin A eine Gingivahyperplasie sowie Hirsutismus auftreten (27). Bei Tacrolimus kommt es hingegen häufiger zu Haarausfall und Tremor.

Mycophenolat Motefil / Mycophenolat-Natrium

Mycophenolat Motefil (MMF) / Mycophenolat-Natrium (EC-MPS) werden heute meist in Kombination mit einem Calcineurin-Inhibitor angewandt. Seit der Einführung im Jahr 1995 hat MMF zunehmend Azathioprin in der Nierentransplantation abgelöst. Klinische Studien haben gezeigt, dass MMF die Häufigkeit akuter Rejektionsepisoden im Vgl. mit Azathioprin signifikant senken konnte. Die Hauptnebenwirkungen sind gastrointestinaler (Bauchschmerzen, Übelkeit, Diarrhoe, Gastritis) und hämatologischer (Leukopenie, Anämie) Natur (27). Das mikroverkapselte dunn-darmlösliche EC-MPS ist dem MMF nach Nierentransplantation therapeutisch gleichwertig (34). MMF setzt nach oraler Verabreichung und anschließender Resorption im Magen die aktive Substanz Mycophenolsäure (MPA) frei. Die magensaftresistente Beschichtung von EC-MPS bewirkt eine verzögerte Freisetzung von MPA im Dünndarm. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf von MPA ist durch zwei Spitzenspiegel gekennzeichnet. Der erste Peak tritt 0,6-0,9 h (MMF), bzw. 1,5-2 h (EC-MPS) nach Einnahme auf. Durch Metabolisierung von MPA entsteht MPAG, das über die

Galle wieder in den Darm gelangt und im Darm anschließend deglucuronidiert werden kann. Das so entstandene MPA wird schnell resorbiert und dem Kreislauf wieder zugeführt. Dies zeigt sich in einen zweiten, weit geringeren Anstieg, ca. 6-12h nach Einnahme (35). MPA ist ein Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das Schlüsselenzym in der de novo Purinnukleotid-Synthese. Es katalysiert die irreversible Umwandlung von Inosin-Monophosphat in XMP-Monophosphat. Aus dieser Vorstufe entstehen die für die RNA oder DNA-Synthese benötigten Purinnukleotide Guanosin-Triphosphat bzw. Deoxyguanosin-Triphosphat. T- und B-Lymphozyten können die Purinnukleotide nur auf dem de-novo Weg bereitstellen während andere Zellen den Salvage Pathway benutzen. Daher hemmt MPA relativ spezifisch die Lymphozytenproliferation. Die IMPDH existiert in zwei Isoformen, der IMPDH Typ I und IMPDH Typ II. IMPDH Typ I wird vor allem in ruhenden Lymphozyten exprimiert sowie in den meisten anderen Zellarten. Eine vermehrte Expression von IMPDH Typ II findet vor allem in aktivierten Lymphozyten statt (36).

TOR-Inhibitoren (Everolimus, Sirolimus)

Die Wirkstoffe Everolimus und Sirolimus gehören zu den mTOR-Inhibitoren. Everolimus ist ein Derivat des Sirolimus. Es besitzt eine zusätzliche 2-Hydroxyethyl-Gruppe an Position 40 des Sirolimus-Moleküls. Damit konnten die immunsuppressiven Eigenschaften erhalten, die pharmakokinetischen Eigenschaften jedoch gezielt geändert werden (wie verkürzte Halbwertszeiten von 62 Stunden auf 31,5 Stunden). Sirolimus und Everolimus binden sich an das FKBP12 (28). Der gebildete Komplex inhibiert dann eine Serin/-Threonin-Kinase, das mTOR-Protein („mammalian target of rapamycin“) (siehe Abbildung 3). Das Protein ist als zentraler Regulator der Zellproliferation und kontrolliert direkt und indirekt die Initiierung der Translation, Transkription, Proteinstabilität und die Apoptose (37). Somit kommt es zu einer ausgeprägten Lymphozytenproliferationshemmung, ohne Einfluss auf die IL-2 Synthese von T- und B-Zellen zu nehmen. Die Effekte der mTOR-Inhibitoren sind nicht nur lymphozytenspezifisch, sondern betreffen alle proliferierenden Zellen, auch die mesenchymalen Zellen (38) Somit scheinen die mTOR-Inhibitoren nicht nur eine immunsuppressive, sondern auch eine Anti-Tumor-Wirkung zu haben. Zu den wichtigsten Nebenwirkungen der mTOR-Inhibitoren zählen Hyperlipidämie, Thrombozytopenie, Wundheilungsstörungen, Infektionen und die Entwicklung von Lymphozelen (39). mTOR-Inhibitoren stellen eine Substanzklasse dar, die sich mit anderen zurzeit verfügbaren Immunsuppressiva kombinieren lässt. Anfänglich dachte man, dass die Kombination von Sirolimus

mit Ciclosporin A und Steroiden eine sehr potente synergetische Therapie darstellt (40,41). Da Sirolimus und Everolimus wie die CNI durch das Cytochrom P450, insbesondere dem Isoenzym 3A4 metabolisiert werden, führte die ähnliche Metabolisierung von CNI und mTOR- Inhibitoren jedoch zu einem erhöhtem Risiko an CNI -assoziierten Nebenwirkungen, insbesondere der Nephrotoxizität (42). Die mTOR- Inhibitoren haben selbst keinen negativen Effekt auf die Nierenfunktion oder den Blutdruck. Das eröffnet die Suche nach anderen Therapieschemata, insbesondere in Hinblick auf eine CNI-freie Therapie. Entweder wird vollständig auf den Einsatz von CNI verzichtet oder es wird eine mehr oder weniger frühzeitige Elimination der CNI vorgenommen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass nach initialer Konversion von Sirolimus und CyA eine Sirolimus basierte, CNI-freie Therapie, einer Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Ciclosporin A überlegen ist. Patienten, bei denen Ciclosporin A nach 3 Monaten abgesetzt wurde, zeigten nach 6 Monaten eine signifikant höhere Kreatinin-Clearance als die Patienten, die nach 3 Monaten eine geringe Dosis Ciclosporin A in Kombination mit Sirolimus erhielten (65 ml/min vs. 57 ml/min, $p=0,027$) (43). Eine weitere randomisierte Studie (44) zeigte, dass ein Wechsel der immunsuppressiven Therapie von Ciclosporin A zu einer Sirolimus basierten Therapie zu einer signifikanten Verbesserung der GFR (glomeruläre Filtrationsrate) führt. Eine mögliche Konsequenz aus diesen Konversionsstudien ist ein Protokoll zum Wechsel der Immunsuppression von einem Calcineurin-Inhibitor zu einem mTOR-Inhibitor, entweder bei Entstehen einer CNI-Unverträglichkeit oder zur Prophylaxe einer CNI-assoziierten Nebenwirkung, wie die Nephrotoxizität.

2.3 Pharmakodynamisches Monitoring

Immunsuppressive Medikamente haben eine enge therapeutische Breite. Bei zu hoher Dosierung treten starke unerwünschte Nebenwirkungen auf, die für den Empfänger des Transplantats gravierende Folgen haben können. Bei zu niedriger Dosierung droht eine Abstoßung des Transplantats. Aufgrund der großen intra- und interindividuellen Variabilität der Blutspiegel sowie der toxischen Nebenwirkungen der Medikation, wird die Bestimmung der Blut- und Plasmakonzentrationen, das pharmakokinetischen Monitoring, von immunsuppressiven Medikamenten empfohlen. Die Pharmakokinetik (PK) ist die vorrangige Methode, um die Medikamentenaufnahme, -verteilung, -Exkretion und -Interaktion zu messen. Interaktionen zwischen den verschiedenen Medikamenten und interindividuelle Unterschiede der Organspender und -empfänger begrenzen

jedoch den Einsatz des PK-Monitorings (45). Da trotz gleicher Medikamentenspiegel unterschiedliche interindividuelle Wirkungen und Nebenwirkungen auftreten können, kann die Wirkungsweise von Immunsuppressiva nur unzureichend durch die Pharmakokinetik beschrieben werden. Mit Hilfe der Pharmakodynamik (PD) wird versucht, die Wirkung von immunsuppressiven Medikamenten *in vivo*, z.B. auf immunologische Zellen, zu bestimmen. Die Messung der Lymphozytenfunktion stellt dabei einen geeigneten Parameter dar, um immunsuppressive Effekte verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Wirkungsweisen zu messen.

Für die pharmakodynamischen Messungen eignet sich vor allem Vollblut. Das hat einige Vorteile gegenüber dem Gebrauch von isolierten, gereinigten Lymphozyten. Im Vollblut bleibt die „natürliche“ Umgebung der Lymphozyten weitestgehend erhalten. Daher werden im Vergleich zur Isolationstechnik deutlich geringere Mengen an Blutvolumina benötigt (46). Zum anderen kann bei der Aufarbeitung durch die Manipulation der Lymphozyten sowie einer Exposition gegenüber Luftsauerstoff, es zur einer Induktion von DNA-Schäden kommen, die die Variabilität der Messungen verstärken kann. Zum immunsuppressiven PD-Monitoring eignen sich z.B. diejenigen Medikamente, die einen Effekt auf die Proliferationsrate, die Zytokinsynthese (wie IL-2, TNF- α) und die Expression von Aktivierungsmarkern (wie CD25 und CD71) von T-Zellen haben. Diese PD-Marker sind jedoch nicht medikamentenspezifisch. Sie sind vielmehr das Resultat einer in Lymphozyten stattfindenden spezifischen intrazellulären biochemischen Kaskade, die durch die Anwendung einer kombinierten Pharmakotherapie, in Gang gesetzt wird und vermutlich für die Abstoßung des Transplantates verantwortlich ist (47). Um die Lymphozytenproliferation zu stimulieren, kann als Mitogen Concanavalin A (ConA) verwendet werden. Auch lassen sich mit ConA die Oberflächenantigene CD25 und CD71 exprimieren (45). ConA bewirkt weiterhin in T-Lymphozyten die Freisetzung von intrazellulärem Calcium (48) und durch die Bindung an den CD2-Rezeptor die Aktivierung der Protein-Kinase C (49). Zur Stimulation der intrazellulären Synthese der Zytokine IL-2 und TNF- α können die Mitogene Ionomycin und Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) verwendet werden (44). Beide sind in der Lage, T-Zellen durch einen kalziumabhängigen Stoffwechselweg zu aktivieren. Werden Ionomycin und PMA kombiniert angewendet, so wird unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors die Aktivierung der T-Zellen bewirkt (50).

Zu den medikamentenspezifischen Assays zählen z. B. die Messung der IMPDH-Aktivität für MPA (51) oder die Messung der Calcineurin-Aktivität für Ciclosporin A (52). Als Nachteil dieser spezifischen PD-Marker bzw. ihrer Assays gilt (mit Ausnahme der IMPDH), dass sie

technisch sehr anspruchsvoll sind und sich ihre Ergebnisse nur schwer reproduzieren lassen. Weiterhin spiegeln sie nur den Effekt eines Medikamentes wider, während die meisten immunsuppressiven Therapieschemata jedoch aus einer Kombination verschiedener Pharmaka bestehen (47).

2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Primäres Ziel dieser Pilotstudie war die genaue Analyse der pharmakologischen (PK und PD) Parameter nach Umstellung von CNI (CyA oder Tac) basierter Therapie auf einen mTOR-Inhibitor (Everolimus) bei nierentransplantierten Patienten.

Zum einen wurden hierbei die Medikamentenspiegel von Everolimus und MPA im Blut, die im Tagesverlauf gemessen wurden, beobachtet. Neben der Pharmakokinetik (PK) sollte auch die Pharmakodynamik (PD) vor und nach Umstellung untersucht werden. Die Messung der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation nach der Therapieumstellung von CyA zu Everolimus stand hierbei im Zentrum der Arbeit. Zusätzlich sollte die Aktivität der IMPDH durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen werden, um neue Erkenntnisse über die IMPDH-Aktivität unter Kombination von mTOR und EC-MPS zu erhalten, die für die zukünftige Behandlung von Patienten nach Organtransplantationen von Bedeutung sein können. Weiterhin wurde die Verträglichkeit der Kombinationstherapie aus EC-MPS und Everolimus sowie die Auswirkung auf die Funktion des transplantierten Organs untersucht.

Weiterhin sollten in diesem Zusammenhang folgende Hypothesen überprüft werden:

- Nach Absetzen der nephrotoxischen CNI kommt es zu einer Verbesserung der Nierenfunktion
- Die CNI-freie Everolimus-basierte Therapie ist langfristig gut verträglich
- Die Umstellung von CNI auf mTOR führt zu Veränderungen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik.

Im Rahmen einer nicht randomisierte, offenen, monozentrischen Pilotstudie sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt die Konversion von CNI auf Everolimus, zu Veränderungen der pharmakokinetischen Parameter (AUC, C_{max} .) der Wirkstoffe EC-MPS und Everolimus?
- Hat die Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI auf Everolimus Einfluss auf die pharmakodynamischen Parameter, wie T-Zell-Aktivierung und

T-Zell-Proliferation während der Behandlung mit CNI und besonders nach dem Absetzen von CNI?

- Zeigt sich unter der CNI-freien immunsuppressiven Therapie eine signifikant bessere Nierenfunktion (Serum-Kreatinin, Kreatinin-Clearance) als unter der Kombinationstherapie EC-MPS plus CyA/Tac?
- Welchen Einfluss haben die CNI-freie Immuntherapie und die Kombinationstherapie mit CNI auf die Nierenfunktion und den Fettstoffwechsel?
- Explorativ erfasst werden sollen außerdem, auftretende Nebenwirkungen hinsichtlich der Art und des Schweregrades, insbesondere mit Augenmerk auf die Infektionen.
- Welche Auswirkung hat die Kombinationstherapie von EC-MPS und Everolimus nach einem Jahr auf die Transplantatfunktion in Bezug auf die akute Abstoßung, Transplantatversagen oder Tod?

3 Material

3.1 Studienkonzept

Bei der vorliegenden Studie (MyRad/CyA-PK) handelt es sich um eine nicht randomisierte, offene, pharmakokinetische Studie in 2 Zentren. Die vorliegende Untersuchung beschreibt die Ergebnisse, die in 13 stabilen nierentransplantierten Patienten beobachtet wurden, die am Zentrum für Nephrologie der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, eingeschlossen wurden.

Der Prüfplan, die Probandeninformation und die Einverständniserklärung wurden im Jahre 2004, gemäß den überarbeiteten Richtlinien der Declaration of Helsinki, erstellt. Die Ethikkommission der Charité Berlin stimmte der Durchführung der Studie und Substudie zu.

Die Patienten erhielten zur primären immunsuppressiven Medikation entweder Ciclosporin A (n=8) oder Tacrolimus (n=5) jeweils in Kombination mit Mycophenolate-natrium (EC-MPS) und/oder Steroiden. Die MyRad- Studie bestand aus 3 Phasen:

In Phase I und II wurde die Dosis des Calcineurin-Inhibitors schrittweise um jeweils 50 % und 25 % der Ausgangsdosis reduziert. Gleichzeitig wurde Everolimus mit in das Therapieschema aufgenommen. Die Dosis richtete sich individuell nach dem gemessenen Everolimus Blutspiegel. Ciclosporin A bzw. Tacrolimus wurden schrittweise über 1 Monat durch Everolimus ersetzt, so dass in Phase III die immunsuppressive Therapie aus EC-MPS und Everolimus (und Kortikosteroiden) bestand. Dieses Schema wurde für weitere 11 Monate fortgeführt, um die klinische Sicherheit und Wirkung der Behandlung zu untersuchen. Während der verschiedenen Phasen wurden u. a. pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter, Vitalparameter und laborchemische Parameter gemessen.

3.2 Patienten und Probanden

In die Substudie wurden Patienten im Alter von 18-75 Jahren des Zentrums für Nephrologie, der Charité – Universitätsmedizin, Campus Mitte, eingeschlossen. Die Patienten wurden erst nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung behandelt.

Es galten nachfolgende Kriterien zur Teil- bzw. Nichtteilnahme an der Substudie:

Einschlusskriterien

- Stabile Transplantatfunktion mit einem Serum-Kreatinin <2,5 mg/dl

- Patienten mit einem Nierentransplantat seit mindestens 6 Monaten aber nicht länger als 5 Jahren
- seit mindestens einem Monat vor Studienbeginn bestehende immunsuppressive Therapie aus Ciclosporin A/Tacrolimus und EC-MPS mit oder ohne Kortikosteroiden
- Frauen im gebärfähigen Alter mit einem negativen Serum Schwangerschaftstest vor Studieneinschluss

Ausschlusskriterien

- Bekannte Überempfindlichkeit gegenüber EC-MPS oder Everolimus
- Schwere Abstoßungsreaktion (nach BANFF Kriterien) innerhalb von 3 Monaten vor Studieneinschluss
- Änderung der immunsuppressiven Therapie innerhalb der letzten 3 Monate aus immunologischen Gründen
- Thrombozytopenie, absolute Neutrophilenzahl $<1,500 /\text{mm}^3$, Leukozytopenie, Hämoglobinwert $<9,0 \text{ g/dl}$ bei Studieneinschluss
- Proteinurie ($>1 \text{ g/d}$) bei Studieneinschluss
- Einnahme von nicht zugelassenen Medikamenten 2 Wochen bei Studieneinschluss
- Einnahme von Medikamenten mit bekannter Wechselwirkung mit Ciclosporin A/Tac und/oder Everolimus
- Maligne Vorgeschichte innerhalb der letzten 5 Jahre, ausgenommen die Entfernung von Plattenepithel- oder Basalzellkarzinom der Haut
- Klinisch signifikante Infektion, die eine Dauertherapie benötigt
- Schwere Diarrhoen, aktive Ulkuserkrankung, unkontrollierter Diabetes mellitus
- HIV positiv
- Alkohol- oder Drogenabhängigkeit

Zur Messung der pharmakokinetischen (PK) und pharmakodynamischen (PD) Profile trafen die Patienten vor Einnahme der immunsuppressiven Medikation in die Charité Berlin, Campus Mitte, ein. Vor den Blutentnahmen für die PK und PD-Messungen blieben die Patienten mindestens 10 Stunden nüchtern. Die erste Nahrungsaufnahme konnte mindestens 2 Stunden nach der ersten Blutentnahme wieder erfolgen. Die Patienten verließen am Tag der Messung, 12 Stunden nach Abnahme der letzten Blutprobe, das Krankenhaus.

Als Vergleichsgruppe wurden Daten 13 gesunder Probanden ohne bestehende immunsuppressive Therapie, herangezogen. Die Daten der Kontrollgruppe wurden im Rahmen der PD-Messungen erhoben.

3.3 Pharmaka

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Pharmaka verwendet:

Ciclosporin A (Sandimun®Optoral), Novartis Pharma, wurde in Tablettenform mit jeweils 10 mg; 25 mg; 50 mg; oder 100 mg mit einer Dosis von 80-320 mg/d vor der Einführung von Everolimus appliziert. Mit Einführung von Everolimus wurde die Dosis um jeweils 50 % und 25 % der Ausgangsdosis reduziert.

Tacrolimus (Prograf®), Astellas Pharma, wurden in Tablettenform mit jeweils 0,5 mg, 1 mg; 5 mg mit einer Tagesdosis von 3 – 6 mg/d vor Einführung von Everolimus verabreicht. Mit Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema wurde die Dosis um jeweils 50 % und 25 % der Ausgangsdosis reduziert.

Everolimus (Certican®), Novartis Pharma, wurde in Form von Tabletten oral verabreicht. Verwendet wurden Tabletten mit jeweils: 0,25 mg; 0,5 mg; 75 mg. Abhängig vom Blutspiegel wurden Dosen von 0,75 mg; 1,5 mg oder 2,25 mg verabreicht.

Enteric-coated Mycophenolate Sodium (Myfortic®), Novartis Pharma, wurde in Tablettenform mit jeweils 180 mg oder 360 mg Wirkstoff oral verabreicht. Die Tagesmindestdosis betrug in dieser Studie über 720 mg/d.

3.4 Studienablauf

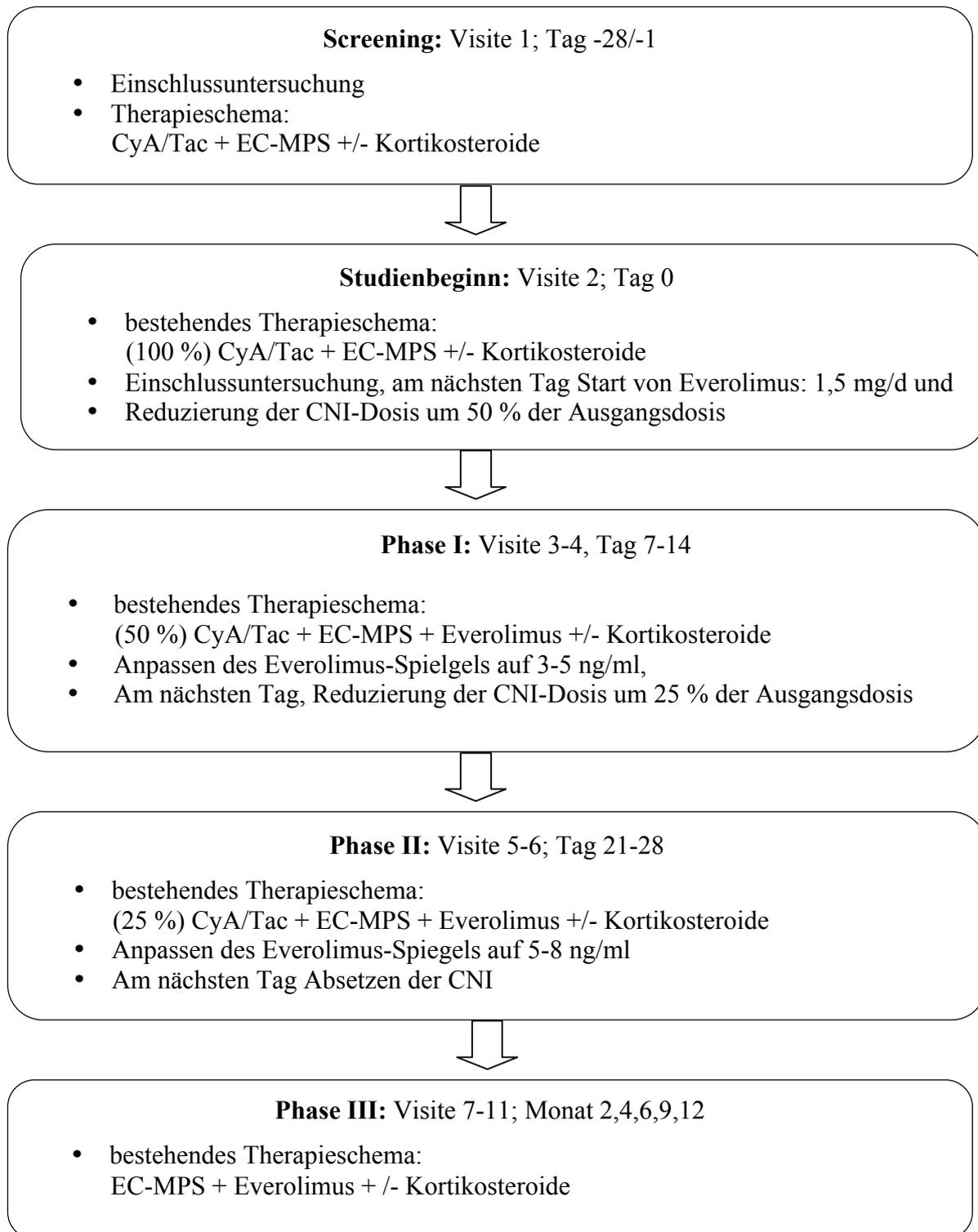


Abb. 4: Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac + EC-MPS auf Everolimus + EC-MPS.
Beobachtungszeitraum 12 Monate.

3.5 Parameter

Während der Studie wurden nachfolgende Parameter erhoben:

3.5.1 Allgemeine Parameter

Vor Beginn der Studie wurde für jeden Patienten eine Einschlussuntersuchung durchgeführt. Es wurden die Einschluss- und Ausschlusskriterien geprüft (siehe 3.2 Patienten und Probanden)

Zusätzlich wurden im Rahmen des Screenings nachfolgende Daten ermittelt:

- Demografische Daten (Geburtsdatum, Geschlecht, ethnische Abstammung)
- Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, Gewicht, Größe). Eine weitere Erhebung der Vitalparameter erfolgte zum Studienbeginn, nach Reduzierung der CNI um 50 % sowie 7 Tage nach Absetzen der CNI
- Krankengeschichte (Erkrankungen, Operationen)
- Informationen über die Transplantation (Datum der Transplantation, Grunderkrankung, Art der Spende, HLA-Mismatch, CMV-Status von Spender und Empfänger, Abstoßungen, Medikation)
- Allgemeine Medikation

3.5.2 Klinische Parameter

Laborchemische Parameter

Zur Bestimmung des *kleinen Labor* gehörten: Natrium, Kalium, Magnesium, Phosphat, Kreatinin, Albumin, Protein, Alkalische Phosphatase, AST, ALT, Harnstoff, C-reaktive Protein.

Bestimmung des kleinen Labor an den Visiten: 1, 4 und 5.

Wurde das *große Labor* bestimmt, wurden zusätzlich zum *kleinen Labor* Chlorid, Lipid Elektrophorese, Cholesterin, Triglyceride, HDL, LDL, Eisen, Ferritin, Transferrinsättigung, Testosteron, FSH, LH, PTH, Aldosteron, Plasma Osmolarität, Lp(a), pH-Wert, Bikarbonat gemessen.

Bestimmung des großen Labor an den Visiten: 2 sowie 6 – 11.

Hämatologie/Blutbild

Bestimmung von: Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozytenzahl (mit Differenzierung), Neutrophilen Granulozyten- Zahl und Thrombozytenzahl. Diese Parameter wurden an den Visiten: 1, 2, 4, 5, 6 sowie 7-11 ermittelt.

Urin

Sammelzeit 24 h. Bestimmung: des Volumens, Kreatinin, Protein, Albumin, Harnsäure, Phosphat, Natrium, Kalium, pH-Wert, Osmolarität, Bikarbonat, Magnesium, Enzyme wie β -NAG und GST an den Visiten 2 sowie 7-11.

3.5.3 Pharmakokinetische Parameter

Die Messungen erfolgten im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

Calcineurin-Inhibitoren

Ciclosporin A

Zur Bestimmung des CyA- Blutspiegels wurde den Patienten vor Medikamenteneinnahme (C0-Spiegel) und 2 Stunden nach der Ciclosporin A Einnahme venöses Blut entnommen (C2-Spiegel). Die Messungen erfolgten vor Einführung von Everolimus bei voller Dosis von Ciclosporin A sowie nach Reduzierung der Ciclosporin A/Tacrolimus Dosis um 50 % der Ausgangsdosis.

Tacrolimus

Zur Bestimmung des Tac- Blutspiegels wurde den Patienten vor Medikamenteneinnahme (Messung der Talspiegel: C0) venöses Blut entnommen. Die Messungen erfolgten vor Einführung von Everolimus bei voller Dosis von Ciclosporin A sowie nach Reduzierung der Ciclosporin A/Tacrolimus Dosis um 50 % der Ausgangsdosis.

Everolimus

Zur Analyse des pharmakokinetischen Profils von Everolimus wurden jeweils 2 ml venöses EDTA Blut benötigt. Die Blutentnahmen fanden 5 min vor der Medikamenteneinnahme (C0-Spiegel) sowie 2 Stunden nach Medikation (C2-Spiegel) statt. Die Messung erfolgte nach Reduzierung der Ciclosporin A/Tacrolimus Dosis um 50 % der Ausgangsdosis, sowie 7 Tage nach Absetzen der Ciclosporin A/Tacrolimus-Medikation.

EC-MPS

Zum pharmakokinetischen Profil von MPA gehörte die Analyse der MPA Plasma Konzentration. Die Blutentnahmen fanden 5min vor (C₀-Spiegel) sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9; 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme statt.

Die Messungen erfolgten vor Einführung von Everolimus bei voller Dosis von Ciclosporin A, nach Reduzierung der Ciclosporin A/Tacrolimus Dosis um 50 % der Ausgangsdosis sowie 7 Tage nach Absetzen des Medikamentes.

3.5.4 Pharmakodynamische Parameter

Die Messungen erfolgten im Nephrologischen Forschungslabor, der Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

Während der Studie wurden folgende, pharmakodynamische Parameter erhoben:

- Messung der intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF- α
- Messung der Oberflächenantigene CD25 bzw. CD71 auf CD 3⁺ T-Lymphozyten
- Messung der lymphozytären Proliferationsrate
- Messung der IMPDH-Aktivität Profil (0-12 h).

Die Messungen wurden zum Zeitpunkt C₀ (vor Medikamenteneinnahme)

- bei voller Ciclosporin A/Tacrolimus Dosis ohne Einnahme von Everolimus
- nach Reduzierung der Ciclosporin A/Tacrolimus-Dosis um 50 % der Ausgangsdosis,
- 7 Tage nach Ausschleichen der Ciclosporin A/Tacrolimus-Medikation,
- sowie 9-11 Monate nach Ausschleichen der Ciclosporin A/Tacrolimus-Medikation durchgeführt.

Um die *IMPDH-Aktivität* in mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu messen, wurde den Patienten 5 min vor der Medikamenteneinnahme (C₀-Spiegel) sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9; 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme Blut entnommen. Die IMPDH-Aktivität wurde vor Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema (100 % CNI), sowie 7 Tage nach Absetzen der Ciclosporin A/Tacrolimus-Medikation gemessen. Eine detaillierte Beschreibung, der in dieser Arbeit durchgeführten IMPDH-Aktivitätsmessung, findet sich in dem von Glander et al. (53) veröffentlichten Manuskript.

3.6 Reagenzien

	<u>Hersteller</u>
PerCP-conjugated Mouse Anti-human CD3 (IgG ₁)	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC-conjugated Mouse Anti-human CD25 (IgG _{1,k})	Becton Dickinson, Heidelberg
PE-conjugated Mouse Anti-human CD71 (Mouse IgG _{2a,k})	Becton Dickinson, Heidelberg
PE-conjugated rat Anti-human IL-2 (Rat IgG _{2a})	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC-mouse Anti-human TNF- α (IgG ₁)	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC-conjugated Mouse Anti-human PCNA (Mouse IgG _{2a,k})	Becton Dickinson, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Calbiochem
Aqua dest. (H ₂ O _{dest.})	
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Ethanol _{absolute} (EtOH)	J.T. Baker
Fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37 % stabilisiert mit 10-15 % MeOH)	J.T. Baker
Glutamin	Biochrom, Berlin
Brefeldin A, Golgi Plug	Becton Dickinson, Heidelberg
IntraPrep Reagenz 1	Beckman Coulter, Krefeld
IntraPrep Reagenz 2	Beckman Coulter, Krefeld
Ionomycin (IONO)	ICN Biomedicals, Eschwede
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt,
Methanol (MeOH)	J.T. Baker
Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ EDTA)	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline, PBS-Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	Biochrom, Berlin
Propidium Iodid (PI)	Sigma, Taufkirchen
RNase A	Sigma, Taufkirchen

RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Saponin	Sigma, Steinheim
Streptomycin	Biochrom, Berlin

3.7 Verbrauchsmaterialien

	<u>Hersteller</u>
12x75 mm Polypropylen Röhrchen mit Kappe, steril	Greiner, Frickenhausen
12x75 mm Polystyren Röhrchen mit Kappe, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
50ml Polystyren Röhrchen mit Schraubverschluss, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
15 ml Polystyren Röhrchen mit Schraubverschluss	Becton Dickinson, Heidelberg
24 Well Flachboden Zellkulturplatten mit Deckel	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutentnahmeröhrchen, Lithium-Heparin-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
10 µl Pipettenspitzen	Greiner Bio-One Filter Tips, Sarstedt
100 µl Pipettenspitzen	Greiner Bio-One Filter Tips, Sarstedt
1000 µl Pipettenspitzen	Greiner Bio-One Filter Tips, Sarstedt
Spritzflasche	

3.8 Software

	<u>Hersteller</u>
CellQuest Pro (4.02)	Becton Dickinson, Heidelberg
Excel	Microsoft Corporation
SPSS Statistics 16/18	IBM

3.9 Geräte

	<u>Hersteller</u>
FACS Calibur mit 488 nm Argon Ionen Laser	Becton Dickinson, Heidelberg
Accu-Jet, elektrische Pipettierhilfe	Sigma, Taufkirchen
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Brutschrank, Cell House 200	Heto Lab Equipment, Alerod, Denmark
Reinraumwerkbank, LaminAir	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf
Zentrifuge, Megafuge 2.0R	Heraeus, Hanau
Absaugpumpe	Heto

3.10 Puffer und Lösungen

Lysierungspuffer für Erythrozyten

Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 Liter Aqua dest. Der pH-Wert des Puffers beträgt 7,2.

NH ₄ Cl	5,76 g
KHCO ₃	0,69 g
Na ₂ EDTA	25,8mg
H ₂ O _{dest.}	auf 100 mg/l

Der Lysierungspuffer wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

Permeabilisierungspuffer

Die Mengenangaben beziehen sich auf 50 ml. Der pH-Wert des Puffers liegt zwischen 7,4-7,6.

PBS	49,5 ml
FCS	0,5 ml
Saponin	0,05 g

Der Puffer wurde mit obigen Mengenangaben angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Färbelösung für PCNA und DNA

Die Mengenangaben beziehen sich auf 124,5 µl.

Permeabilisierungspuffer	107 µl
RNAse A (DNAse frei)	10 µl (1:10 PBS Lösung; boiled; -70°C)
PI-Stammlösung	5 µl
FITC conjugated Mouse	
Anti-human PCNA Antikörper	2,5 µl

Die Färbelösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und dann möglichst vor direktem Licht geschützt.

Ionomycin (IONO)-Stammlösung (500 µg/ml)

Ionomycin

EtOH_{absolut}

Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20°C. Die Aliquots wurden nur einmalig verwendet.

Ionomycin Arbeitslösung (≈ 0,04 µg/ml)

Es wurden 10 µl der Ionomycin-Stammlösung zu 123 µl PBS-Lösung (steril) gegeben. Die Arbeitslösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und möglichst kurz dem Einfluss von Licht ausgesetzt.

PMA-Stammlösung (100 µg/ml)

PMA

DMSO (steril)

Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20°C. Die Aliquots wurden nur einmalig verwendet.

PMA-Arbeitslösung

Es wurden 10 µl der PMA-Stammlösung zu 1323 µl PBS-Lösung (steril) gegeben. Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und möglichst kurz dem Einfluss von Licht ausgesetzt.

Propidium Iodid (PI-Stammlösung) (1mg/ml)

Propidium Iodid

H₂O_{dest.}

Die Lagerung erfolgte bei 4°C lichtgeschützt. Auch während der Verwendung wurde die karzinogene Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

1%-ige PI-Lösung

PI-Stammlösung

PBS

PI-Stammlösung wurde 1:100 in PBS gelöst.

Die Lagerung erfolgte bei 4°C lichtgeschützt. Auch während der Verwendung der karzinogenen Lösung wurde auf Lichtschutz geachtet.

3 %-ige FCS-Lösung

FCS

PBS

Es wurden 3 % (v/v) FCS in PBS gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Antikörpermischung zur Markierung von Zelloberflächen-Antigenen

PerCP-conjugated Mouse Anti-human CD3 Antikörper

FITC-conjugated Mouse Anti-human CD25 Antikörper

PE-conjugated Mouse Anti-human CD71 Antikörper

3%-ige FCS

Zur Färbung von 400 µl verdünntem Blut (1:10 in RPMI) wurden jeweils 2 µl jedes Antikörpers in 100 µl der 3 %-igen FCS-Lösung gelöst. Die Herstellung der Lösung erfolgte kurz vor Gebrauch.

1 %-ige und 0,5 %-ige Formalinlösung

Formaldehyd (37 % stabilisiert mit 10-15 % MeOH)

PBS (steril, w/o Mg, Ca)

Es wurden 1 % bzw. 0,5 % Formaldehyd in PBS gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C lichtgeschützt.

Zellkulturnährmedium RPMI 1640

Penicillin	100 U/ml Endkonzentration im Medium
Streptomycin	100 µg/ml Endkonzentration im Medium
L- Glutamin	2 ml Endkonzentration im Medium

Das fertige Medium RPMI 1640 wurde mit obigen Nährmedien ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Concanavalin A-Stammlösung (1 mg/ml)

ConA wurde in dem Medium RPMI 1640 (+PEST, +Gln) zu 1mg/ml gelöst. Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20°C. Die Aliquots wurden nur einmalig verwendet.

GolgiPlug-Stammlösung (Brefeldin A)

Die Brefeldin A-Fertiglösung wurde zu 10 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei +4°C.

GolgiPlug-Arbeitslösung

Die GolgiPlug-Stammlösung wurde zur weiteren Verwendung im Verhältnis 1:10 mit PBS (steril) verdünnt.

RNase A

RNase	20 mg
H ₂ O _{dest}	200 µl
PBS	1800 µl

20 mg der RNase wurden in 200 µl H₂O_{dest.} gelöst und anschließend für 10 Minuten auf 99°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zugabe von 1800 µl PBS wurde die Lösung aliquotiert und anschließend bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4 Pharmakodynamischen Methoden

4.1 Durchflusszytometrie

Methodische Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können kumulativ an mehreren Tausend Suspensionszellen, Zellmorphologie und Fluoreszenzintensität gemessen werden.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden die Lichtstreuung und die Fluoreszenzen der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen in dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laser-Strahl passieren, gemessen. Wird das geradlinig verlaufende Laserlicht gestört, wird dies als „Event“ bezeichnet. Passieren nun die Zellen den Fokus des Lasers, wird die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) und die Lichtstreuung in einem Winkel von 90° als Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC) detektiert. FSC ist ein Maß für die Zellgröße. SSC ist ein Maß für die Granularität und die Dichte der einzelnen Zelle. Neben diesen vorgegebenen Parametern können durch die Messung der Intensität der Wellenlänge, Informationen über bestimmte Eigenschaften von Zellen gewonnen werden. Eine Möglichkeit ist die Markierung der Zellen mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern, die ein spezifisches Antigen in oder auf der Zelle erkennen. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in dem FACS Calibur von einem Argon-Laser mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt. Hiermit können die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und PerCP (Peridinin chlorophyll protein) angeregt werden. Kommen verschiedener Laser zum Einsatz, kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und damit die Informationsdichte erhöht werden. Theoretisch kann man gleichzeitig auf einer Zelle so viele Antigene bestimmen wie Fluoreszenzkanäle vorhanden sind.

Fluoreszenzkanal	Bedeutung	Emissionsmaximum (nm)		Messbare Zellparameter
FL-1H	Signalstärke (Fluoreszenzintensität)	FITC	519	CD25; PCNA; TNF- α
FL-2H	Signalstärke (Fluoreszenzintensität)	PE	578	CD71; IL-2
FL-3H	Signalstärke (Fluoreszenzintensität)	PerCP PI	678 617	CD25; DNA
FL-3-A	Über die Zeit integrierte Fläche des Fluoreszenzsignals beim Durchqueren des Laserstrahls (Partikelformfaktor)	PI	617	DNA
FL-3W	Dauer des Fluoreszenzsignals beim Durchqueren des Laserstrahls	PI	617	DNA

Tab. 2: Charakterisierung der Fluoreszenzkanäle des FACS Calibur.

Die entstehende Emissionsstrahlung wird von Farbteilerspigel und Prismen durch spezifische Reflexion oder Durchlässigkeit im optischen System getrennt und von Detektoren aufgefangen, die dann ein elektronisches Signal erzeugen. Die gemessenen Daten werden auf den angeschlossenen Computer übertragen, in Echtzeit dargestellt und gespeichert. Bei der Datenanalyse werden Gruppen von Zellen mit ähnlichen Eigenschaften, den sogenannten Populationen, identifiziert. Die Populationen werden dabei in Hinblick auf ihren Anteil an den markierten Zellen, ihre absolute Konzentration, das Expressionsmuster der verschiedenen analysierten Parameter und ihre Heterogenität beschrieben. Zur Darstellung dienen Histogramme und Dot-Plots. Histogramme dienen zur eindimensionalen Darstellung. Dabei wird auf der x-Achse die Intensität der gemessenen Signale aufgetragen. Die y-Achse stellt die Anzahl der Zellen dar, die mit einer bestimmten Intensität analysiert wurde. Die Abbildung ist durch Peaks im Histogramm gekennzeichnet, die für bestimmte Zellpopulationen charakteristisch sind. Dot-Plots (Punktwolkendarstellung) dienen zur zweidimensionalen Darstellung. Auf der x-Achse und auf der y-Achse werden die jeweiligen Intensitätsverteilungen von zwei Meßparametern aufgetragen. Jede Zelle die gemessen wird, erscheint entsprechend ihrer Intensität als Punkt. Die Abbildung ist durch Punktwolken gekennzeichnet, die für bestimmte Zellpopulationen charakteristisch sind. Durch Anlegen von Polygonen/Quadranten im Dot-Plot oder einer Linie mit definierten Grenzen im Histogramm, sogenannte Gates, können Zellpopulationen separat betrachtet werden. Der Vorgang wird als Gaten bezeichnet. Somit erlaubt eine Verknüpfung der Gates eine Eingrenzung von Populationen, die über alle gemessenen Parameter definiert werden. Die Ergebnisse der

grafischen Analysen werden tabellarisch ausgewertet und stehen zur weiteren Bearbeitung mit entsprechenden Computerprogrammen zur Verfügung.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung ein FACS Calibur Gerät der Firma Becton & Dickinson verwendet. Ein daran angeschlossener Apple Macintosh Computer mit CellQest Software wurde zur Darstellung und Analyse der gelieferten Daten benutzt. Die Abkürzung FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting.

4.2 Assay zum Nachweis der intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF- α in CD3⁺ Lymphozyten

Das Assay zum Nachweis der intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF- α gliedert sich in zwei Hauptarbeitsschritte:

1. Die in vitro Stimulation und
2. Die Färbung des Oberflächenantigens CD3⁺ und der intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF- α

In vitro Stimulation

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten unter der Reinraumarbeitsbank (LaminAir). Zu Beginn des Assays wurden folgende Arbeitslösungen vorbereitet: PMA-Arbeitslösung, Ionomycin-Arbeitslösung sowie die GolgiPlug-Arbeitslösung.

96 μ l Vollblut wurden im weiteren Schritt mit jeweils 2 μ l der PMA- und der Ionomycin-Arbeitslösung gemischt, um Endkonzentrationen von 15 ng/ml für PMA und 750 ng/ml für Ionomycin zu erhalten. Nach kurzem Durchmischen erfolgte die 30 minütige Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Durch die anschließende Zugabe von 1 μ l GolgiPlug-Arbeitslösung in jedes Röhrchen, wurde die Zytokinsekretion gehemmt. Nach wiederholtem kurzem Durchmischen wurden die Reagenzien für weitere 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Färbung des Oberflächenantigens CD3⁺ und der intrazellulären Zytokine IL-2, TNF- α

50 μ l des stimulierten Blutes wurden in ein 2 μ l CD3- PerCP beinhaltendes Polystyrenröhrchen pipettiert, durchmischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach anschließender Fixierung mit 100 μ l IntraPep Reagenz 1 (enthält Formaldehyd) und weiterer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden ca. 4 ml PBS zugegeben.

Die Proben wurden bei 210 g für 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zur Permeabilisierung und die lysierten Erythrozyten in 100 µl IntraPep Reagenz 2 (enthält Saponin) aufgenommen und weiterhin für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch die Zugabe von 2 µl FITC- bzw. PE- markierten Antikörpern gegen TNF- α bzw. IL-2 wurden die intrazellulären Zytokine während 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen und Pelletieren mit ca. 4 ml PBS, bei 210 g für 6 Minuten bei Raumtemperatur, wurde der Überstand abermals abgesaugt und durch die Zellen in 500 µl 0,5 %-igem Formalin resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Messung im Durchflußzytometer lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils an IL-2⁺ T-Zellen und TNF- α ⁺ T-Zellen

Es wurden die Proben aus dem zuvor durchgeführten Assay: Assay zum Nachweis der intrazellulärer Zytokine IL-2 und TNF- α in CD3⁺ Lymphozyten, verwendet.

Zuerst wurden die Lymphozyten anhand ihrer spezifischen Morphologie im SSC/FSC Dot-Plot im Gate 1 typisiert. Im weiteren Schritt wurden im Histogramm die CD3⁺ Lymphozyten im Gate 2 definiert. Es wurden pro Messung 3000 CD3⁺ Lymphozyten erfasst. In den Dot-Plots FL1-H/FL3-H bzw. FL2-H/FL-3H wurde ausgehend von Gate 1 und 2 der prozentuale Anteil der TNF- α ⁺ bzw. der IL-2⁺ T-Zellen bestimmt.

4.3 Assay zur Markierung der Oberflächenmoleküle CD3, CD25 und CD71

Mitogene Stimulation mit Concanavalin A

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Reinraumwerkbank durchgeführt.

200 µl des Vollblutes wurden in einem Well einer 24-Well-Platte mit 1800 µl RPMI 1640 verdünnt. Vorher wurde dem Kulturmedium ConA-Stammlösung zugegeben, so dass sich nach der Vermischung mit dem Blut eine ConA-Konzentration von 7,5 µg/ml ergab (15 µl ConA-Stammlösung pro 1800 µl RPMI 1640). Die 24-Well-Platte wurde im Anschluss für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert.

Färbung der Oberflächenmoleküle CD3, CD25 und CD71

400 µl einer 1:10 verdünnten, mit ConA stimulierten Blutproben wurden von der 24-Well-Platte, nach gutem Mischen des Blutes im Well, in ein 15 ml Polystyren-Röhrchen überführt und mit 100 µl der Antikörpermischung vermischt. Nach kurzem Durchmischen wurde die Lösung für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 ml Lysierungspuffer die Lyse der Erythrozyten bewirkt und die Proben wurden bei 477 g für 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und kurzem Durchmischen wurden die Zellen mit ca. 4 ml PBS Lösung resuspendiert und erneut bei 477 g für 6 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgesaugt und die Zellen wurden schließlich mit 500 µl 1 %-iger Formalinlösung fixiert und bis zu ihrer Messung im Durchflusszytometer lichtgeschützt gelagert.

Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils CD25⁺ bzw. CD71⁺ T-Lymphozyten (CD3⁺)

Hierfür wurden die Reagenzien aus dem zuvor durchgeführten Assay: Assay zur Markierung der Oberflächenmoleküle CD3, CD25, CD71, verwendet.

Zuerst wurden im SSC/FSC Dot-Plot die Lymphozyten anhand ihrer typischen Morphologie dargestellt und im Gate 1 definiert. Es wurden pro Messung 5000 Zellen erfasst. Im weiteren Schritt wurden die CD3⁺ Lymphozyten durch Anlegen eines Gates 2 im Histogramm typisiert. Von den Zellen, die sowohl in Gate 1 als auch in Gate 2 erfasst wurden, wurde in zwei weiteren Dot Plots der prozentuale Anteil der T-Zellen, die Oberflächenantigene CD25 bzw. CD71 exprimierten, bestimmt.

4.4 Assay zum Nachweis der Proliferation der Lymphozyten

800 µl einer 1:10 verdünnten mit ConA stimulierten Blutprobe wurden von der 24-Well-Platte, nach vorherigem gutem Mischen des Blutes im Well, in 15 ml Polystyren Röhrchen überführt. Mit 10 ml Lysierungspuffer wurden die Erythrozyten zur Lyse gebracht. Nach anschließender Zentrifugation bei 477 g für 8 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, die Pellets durchmischt und mit ca. 4 ml PBS Lösung gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation bei 477 g für 6 min bei 10°C und Absaugen des Überstandes, wurden die Zellen mit 1 ml eiskalter 1 %-iger Formalinlösung fixiert und für 5 min auf Eis im Dunkeln gelagert. Nach Ablauf der Zeit, wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS Lösung gewaschen. Es folgte eine weitere

Zentrifugation bei 477 g für 6 min bei 10°C. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet im Flüssigkeitsrest resuspendiert dann in 2 ml eiskaltem Methanol aufgenommen. Die Proben wurden für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Waschen mit 4 ml PBS Lösung und Zentrifugieren bei 477 g für 6 min bei 10°C wurden 125 µl der Färbelösung für PCNA und DNA hinzugegeben und für 30 min lichtgeschützt im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach letztmaligem Waschen mit 2 ml PBS Lösung wurde die Lösung zentrifugiert (477 g, 6 min, 10°C), abgesaugt und die Zellen mit 500 µl 1 %-iger PI-Lösung resuspendiert. Bis zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Proben lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten-Proliferationsrate

Es wurden die Reagenzien aus dem zuvor durchgeführten Assay: Assay zum Nachweis der Proliferation der Lymphozyten, verwendet.

Zuerst wurden die Lymphozyten im Gate 1 anhand ihrer spezifischen Morphologie im SSC/FSC Dot-Plot typisiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten im Gate 2 (Dot-Plot FL3-A/FL3-W) ausgegrenzt. Pro Messung wurden 3000 Nicht-aggregierte-Lymphozyten erfasst. In den Histogrammen FL1-H wurde die Grenze zwischen den PCNA⁺ und PCNA⁻ Zellen überprüft. Dabei wurden die Zellen als PCNA⁺ bezeichnet, die nicht eindeutig PCNA⁻ waren. Im Histogramm FL3-H wurde die Grenze zwischen den Zellen, die sich in der G1-Phase und in der SG2M-Phase befanden, überprüft. Anschließend wurde im Dot-Plot FL1-H/FL-3H der prozentuale Anteil von PCNA⁺ und PCNA⁻ Zellen in der SG2M-Phase ermittelt. Als proliferierend wurden die Zellen bezeichnet, die PCNA⁺ und SG2M⁺ waren.

4.5 Statistische Auswertung der Messdaten

Für die statistischen Berechnungen wurde eine lizenzierte Version des Programms SPSS 16.0 für Windows verwendet. Die Daten wurden mittels deskriptiver Verfahren ausgewertet und auf ihre Normalverteilung überprüft.

Berechnet wurden für metrische Merkmale der Median, die Standardabweichung, das arithmetische Mittel (Mittelwert), die 25 %- und 75 %-Perzentile, das Minimum, das Maximum und die Spannweite. Bei ordinal oder nominal skalierten Merkmalen wurden die absolute und die relative (prozentuale) Häufigkeit berechnet. Die Überprüfung der Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test vorgenommen. Aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung

der Ergebnisse und des kleinen Patientenkollektives wurde zur statistischen Datenanalyse ein nicht-parametrisches Testverfahren ausgewählt.

Der Friedman-Test diente zum Vergleich verbundener Stichproben. Im Signifikanzfall wurden im Anschluss die Gruppen, die sich signifikant voneinander unterschieden, mittels Wilcoxon-Test identifiziert. Die vereinbarte Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $\alpha=5\%$. Bei jedem Test wurde die exakte Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ berechnet, die zwischen 0 und 1 liegen kann. Nach dieser Nomenklatur entspricht dem $\alpha=5\%$ ein $p=0,05$. Die Berechnung der Korrelationen bei logisch miteinander verknüpften Merkmalen erfolgte mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r). Die graphische Darstellung erfolgte u. a. mit Hilfe des Boxplot mit Angabe des Median, 1. und 3. Quartile, Minimum und Maximum. Kreise und Sterne zeigen Ausreißer $> 1,5$ bzw. $>3,0$ Boxlänge.

5 Ergebnisse

5.1 Überblick über die Studienpopulation

Von den 13 Patienten waren drei (23,1 %) weiblichen und zehn (76,9 %) männlichen Geschlechts.

Einen detaillierten Überblick über die Studienpopulation gibt folgende Tabelle 3:

Charakteristika der Studienpopulation

N	13
Geschlecht:	
Männlich	n=10
Weiblich	n=3
Alter (Jahre)	49 ± 11,4
Gewicht (kg)	87,5 ± 14,7
BMI	26,7 (Spannweite: 23,7 – 36,1)
Zeit (Monate) von NTX bis Studieneinschluss	78,0 (Spannweite: 25 - 217 Monate)
Dialyse vor NTX	
ja	n=9
nein	n=4
Dialysedauer bis zur NTX (Monate)	50 (Spannweite: 19 – 86 Monate)
Serum Kreatinin (mg/dl)	2,23 ± 0,36

Medikation

Ciclosporin A	n=8
Tacrolimus	n=5
Ciclosporin A Dosis (mg/d)	130
Minimum (mg/d)	80
Maximum (mg/d)	320
Tacrolimus Dosis (mg/d)	3
Minimum (mg/d)	3
Maximum (mg/d)	6
EC-MPS Dosis (mg/d)	720
Minimum (mg/d)	720
Maximum (mg/d)	1440
Steroide:	
Ja	n=4
Nein	n=9
Steroiddosis (mg/d)	4
Minimum (mg/d)	4
Maximum (mg/d)	6

Tab. 3: Charakteristika und Medikation der Studienpopulation zum Studienbeginn (100 % CNI + EC-MPS).

Angabe des Median (Spannweite) und Mittelwert ± Standardabweichung.

5.2 Medikation

5.2.1 Calcineurin-Inhibitor: Ciclosporin A

Zum Studieneinschluss erhielten 8 Patienten im Mittel 130 mg/d CyA. Die zu diesem Zeitpunkt, direkt nach Einnahme (C0), gemessenen Blutkonzentrationen lagen im Median bei 88,5 ng/ml (Spannweite: 52,0 - 172,0 ng/ml); die dosisnormalisierten Blutkonzentrationen lagen im Median bei 46,3 ng/ml/mg/kg (Spannweite von 25,2 - 69,4 ng/ml/mg/kg). Konzentrationsmessungen 2 h nach Einnahme (C2) zeigten im Median signifikant höhere Blutkonzentrationen bzw. signifikant höhere dosisnormalisierte Blutkonzentrationen im Median von 373,0 ng/ml (Spannweite von 245,0 – 1126,0 ng/ml) bzw. im Median von 201,7 ng/ml/mg/kg (Spannweite von 100,2 – 357,9 ng/ml/mg/kg) ($p=0,016$). Nach Reduzierung der CyA-Dosis um 50 % wurden signifikant geringere CyA-Talspiegel gemessen ($p=0,008$; 51,0 ng/ml mit einer Spannweite von 25,0 – 65,0 ng/ml). Bei Betrachtung der dosiskorrigierten Blutkonzentrationen (siehe Abbildung 5) konnte nach Reduzierung der CyA Dosis um 50% im Vergleich zur vollen CyA-Dosis jedoch keine Veränderungen des dosiskorrigierten CyA-Talspiegels (C0) beobachtet werden (47,5 ng/ml/mg/kg mit einer Spannweite von 31,13 – 64,19 ng/ml/mg/kg), somit besteht eine Dosisproportionalität. 2 Stunden später nach Medikation vorgenommene Messungen (C2), zeigten erneut einen Anstieg der CyA-Blutkonzentrationen im Median auf 154,0 ng/ml (Spannweite: 84 – 397 ng/ml) bzw. der dosiskorrigierten Blutkonzentrationen im Median auf 176,1 ng/ml/mg/kg (Spannweite: 63,0 – 288,0 ng/ml/mg/kg), die jedoch im Vgl. zu den C2-Messungen unter der vollen CyA-Dosis etwas geringer waren. Diese gemessenen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p>0,05$).

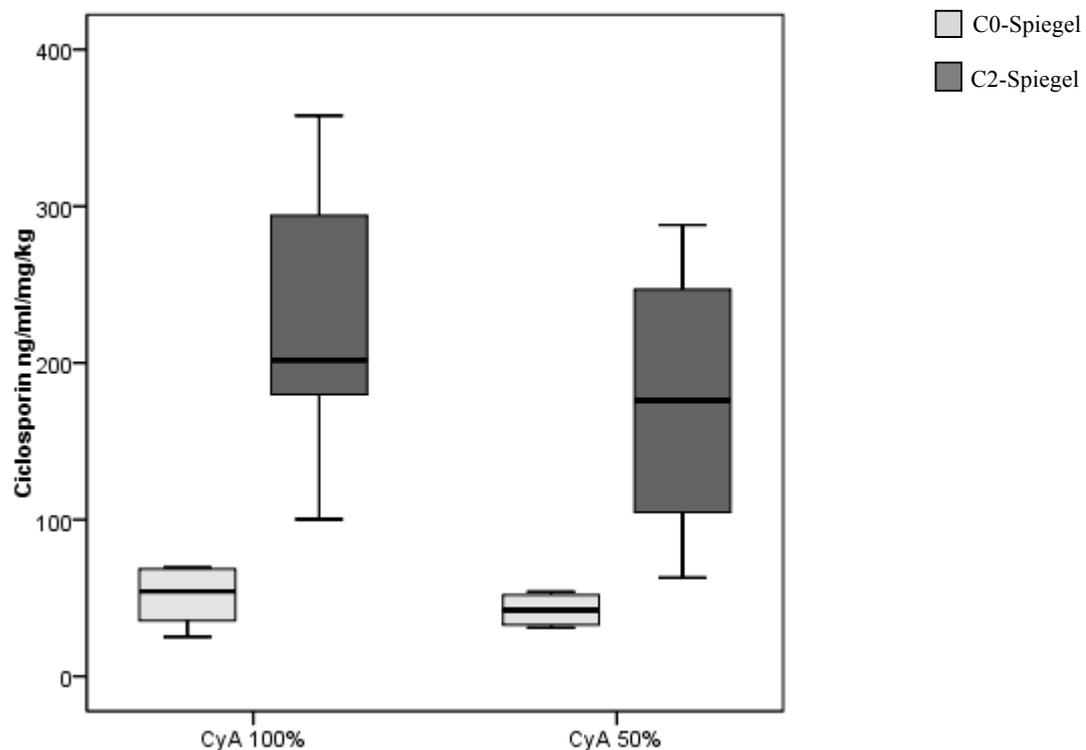


Abb. 5: Cyclosporin-Blutkonzentration in ng/ml/mg/kg (Dosis normalisiert). Messung des Talspiegel (C0) und 2 Stunden nach Einnahme (C2) unter der Medikation: 100 % CyA + EC-MPS sowie 50 % CyA + Everolimus + EC-MPS. n=8.

5.2.2 Calcineurin-Inhibitor: Tacrolimus

Zum Studieneinschluss erhielten fünf Patienten Tacrolimus mit einer mittleren Dosis von 3 mg/d. Die nach Studieneinschluss bei voller Tacrolimus-Dosis gemessenen Tacrolimus-Talspiegel (C0), lagen im Median bei 5,3 ng/ml (Spannweite: 4,2 - 6,4 ng/ml) bzw. die der dosiskorrigierten Talspiegel im Median bei 120,6 ng/ml/mg/kg (Spannweite von 77,9 – 201,69 ng/ml/mg/kg). Messungen nach Reduzierung der Tacrolimus-Dosis um 50 % der Ausgangsdosis zeigten bei diesen fünf Patienten keine signifikanten Veränderungen der Blutkonzentrationen (4,3 ng/ml mit einer Spannweite von 4,0 – 4,6 ng/ml) jedoch bei Betrachtung der dosiskorrigierten Talspiegel (siehe Abbildung 6) zeigte sich ein tendenzieller Anstieg auf Werte im Median von 256,0 ng/ml/mg/kg (Spannweite: 109,5 – 287,5 ng/ml/mg/kg). Somit bestand keine klare Dosisproportionalität in dieser kleinen Stichprobe.

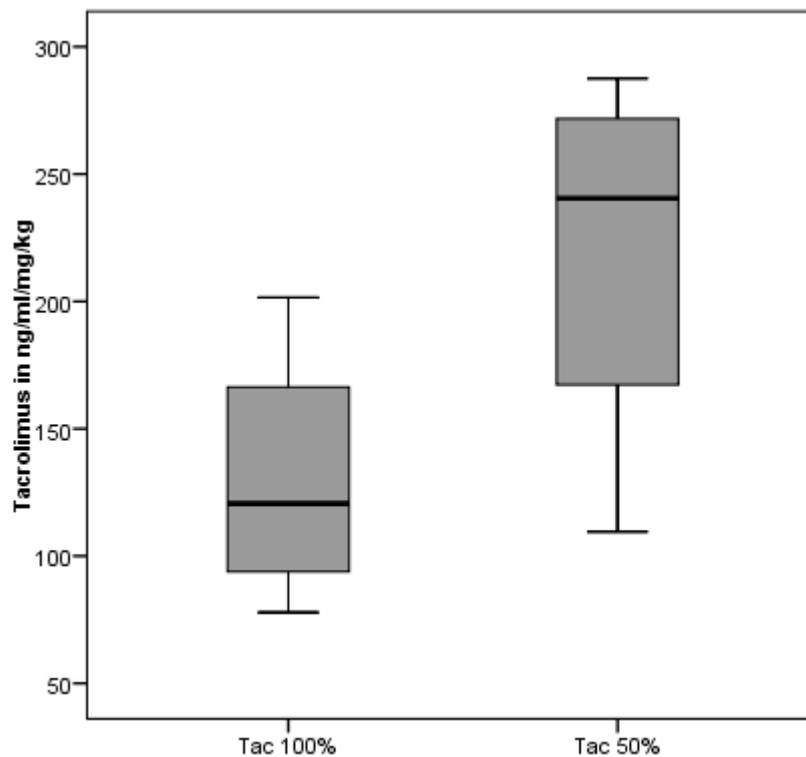


Abb. 6: Tacrolimus-Blutkonzentration in ng/ml/mg/kg (Dosis normalisiert). Messung des Talspiegels (C0) von 100 % Tacrolimus + EC-MPS sowie 50 % Tacrolimus + Everolimus + EC-MPS. n=5.

5.2.3 mTOR-Inhibitor: Everolimus

Bei einer Everolimusdosis im Median von 1,5 mg/d und reduzierter CNI-Dosis um 50 % wurden als Talspiegel (C0) im Median Everolimus Blutkonzentrationen von CyA-Patienten: 5,1 ng/ml mit einer Spannweite von 2,7 – 8,0 ng/ml bzw. Tac-Patienten: 2,8 ng/ml mit einer Spannweite von 1,3 – 3,3 ng/ml gemessen (siehe Abbildung 7A). Während bei Patienten, die CyA als Ausgangsdosis erhielten, 7 Tage nach Absetzen der CNI-Dosis und Erhöhung der Everolimusdosis im Median auf 3,0 mg/d, keine Veränderungen der Everolimus-Talspiegel beobachtet werden konnte (CyA: 5,5 ng/ml mit einer Spannweite von 2,3 – 10,8 ng/ml) nahm bei Patienten mit Tacrolimus als Ausgangsdosis, der Everolimustalspiegel tendenziell im Median auf 5,8 ng/ml (Spannweite: 5,0 – 10,0 ng/ml) zu.

Bei Betrachtung der dosisnormalisierten Everolimustalspiegel (siehe Abbildung 7B) zeigte sich bei Patienten mit CyA als Ausgangsmedikation, 7 Tage nach Absetzen der CNI

eine tendenzielle Abnahme der dosiskorrigierten Everolimustalspiegel im Median von 313,1 ng/ml (Spannweite: 149,6 – 428,8 ng/ml) auf 177,3 ng/ml (Spannweite: 62,8 – 573,3 ng/ml). Somit besteht keine Dosisproportionalität. Hingegen bei Patienten mit Tacrolimus als Ausgangsmedikation, wurden 7 Tage nach Entfernung der CNI-Medikation keine Veränderungen der dosiskorrigierten Everolimus-Talspiegel gemessen (50 % CNI: 171,5 ng/ml mit einer Spannweite von 64,7 – 232,5 ng/ml; CNI-frei: 192,0 ng/ml mit einer Spannweite von 60,5 – 217,1 ng/ml). Es bestand eine Dosisproportionalität.

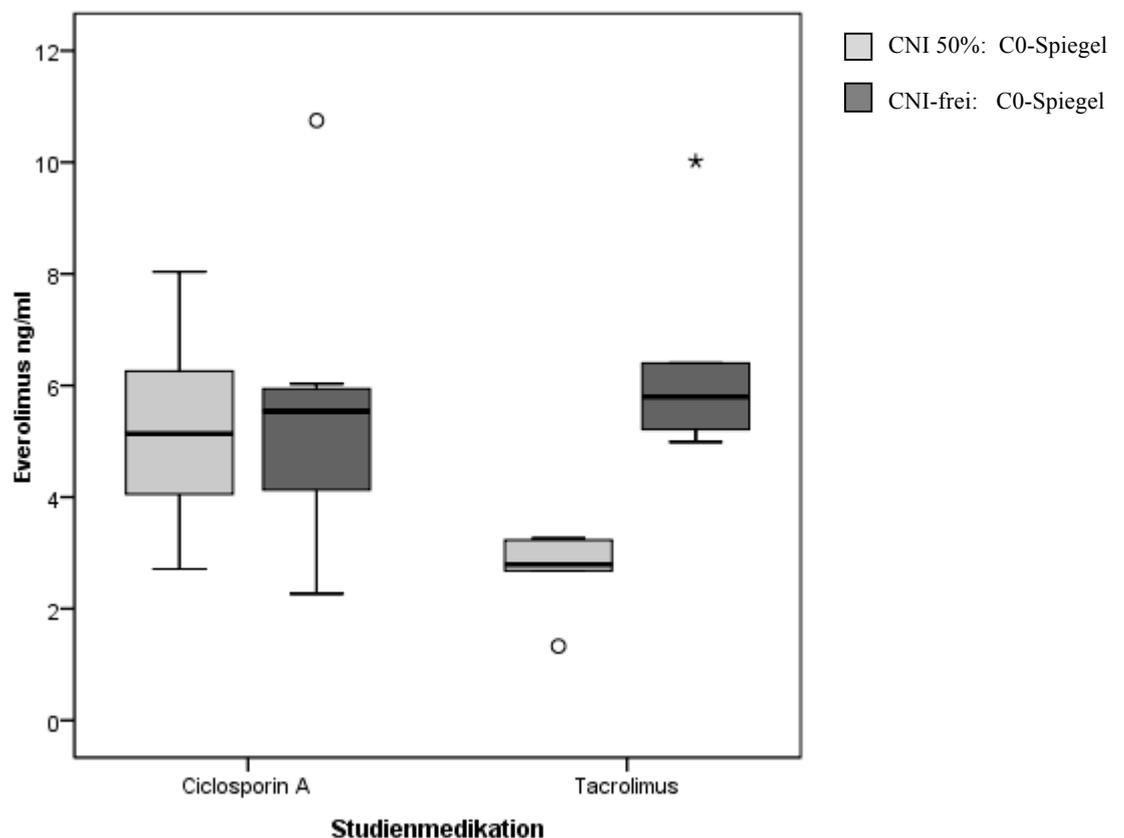


Abb. 7A: absolute Everolimus-Blutkonzentration (ng/ml) unter dem Einfluss von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus. Messung der Talspiegel (C0) unter 50 % CyA/Tac + Everolimus + EC-MPS sowie Everolimus + EC-MPS. Ciclosporin A n= 8; Tacrolimus n= 5.

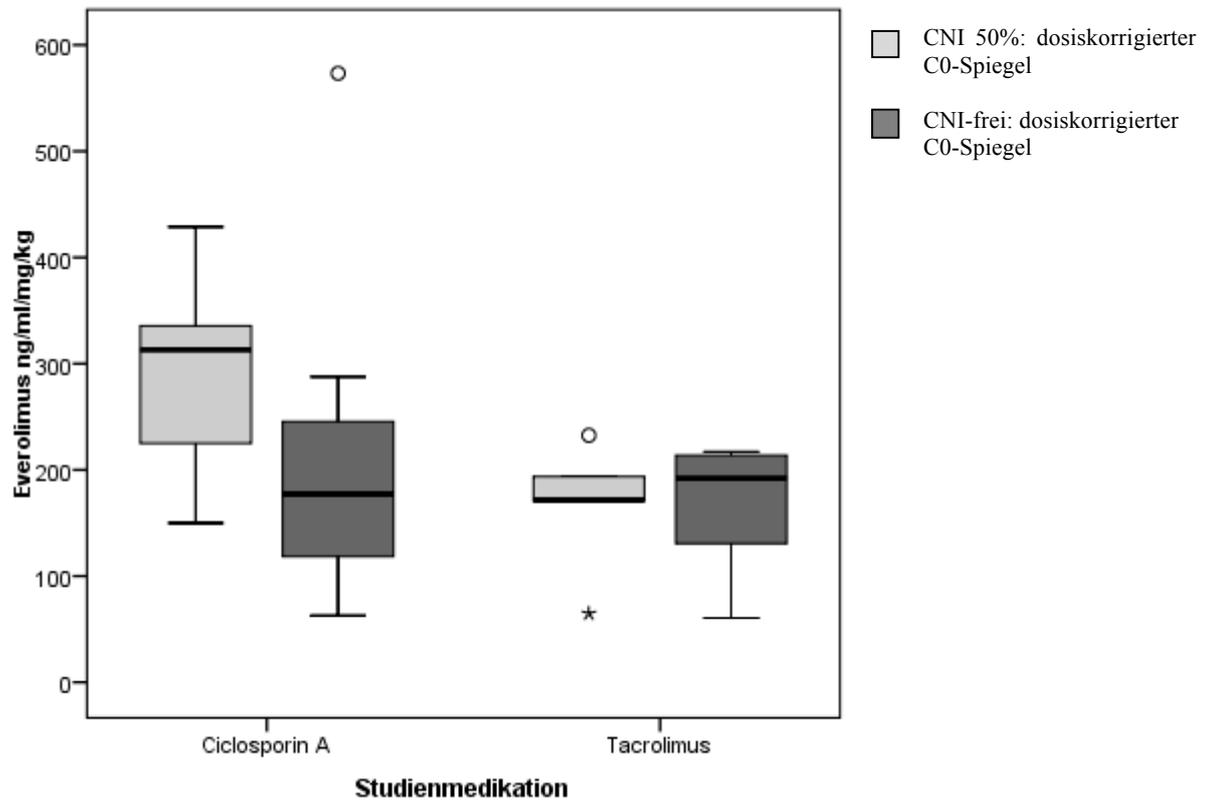


Abb. 7 B: dosisnormalisierte Everolimus-Blutkonzentration (ng/ml/mg/kg) unter dem Einfluss von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus. Messung der Talspiegel (C0) unter 50 % CyA/Tac + Everolimus + EC-MPS sowie Everolimus + EC-MPS. Ciclosporin A n= 8; Tacrolimus n= 5.

5.3 Pharmakokinetische/Pharmakodynamische Messungen von EC-MPS

Im nachfolgenden werden die Auswirkungen der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von Ciclosporin A/Tacrolimus zu einer CNI-freien Therapie mit Everolimus plus EC-MPS, insbesondere in Hinblick auf die pharmakokinetischen Parameter MPA und MPAG sowie auf den pharmakodynamischen Parameter IMPDH betrachtet.

5.3.1 Pharmakokinetik von MPA und MPAG

Pharmakokinetische Messungen von MPA und MPAG wurden im Rahmen der Studie nur bei einem Patienten mit Tacrolimus-Medikation hingegen bei allen acht Patienten mit CyA-Medikation vorgenommen. Somit ist ein Vergleich zwischen den mit CyA und Tac behandelten Patienten in Bezug auf die MPA-Blutkonzentration nicht möglich. Im Folgenden werden zur Berechnung nur Patienten mit Ciclosporin A-Medikation herangezogen (n=8).

Pharmakokinetik von MPA und MPAG nach Gabe von EC-MPS bei Ciclosporin A behandelten Patienten

Wie der Abbildung 8 zu entnehmen ist, sank nach Einnahme von EC-MPS die MPA Blutkonzentration leicht ab und erreichte nach 1,5 Stunden ihr Minimum mit 1,6 mg/l. 2 Stunden nach Einnahme stieg die MPA-Konzentration im Blut wieder an und erreichte nach 3,0 Stunden ihre maximale Blutkonzentration (4,4 mg/l mit einer Spannweite von 0,7 – 15,1 mg/l) und fiel 3 bis 4 Stunden nach Medikation wieder signifikant ab (MPA-Konzentration nach 4h: 3,5 mg/l; Spannweite: 0,4 – 6,6 mg/l; $p=0,023$). Im weiteren Verlauf, bis 6 Stunden nach verabreichter Medikation, nahm die MPA Konzentration im Blut weiterhin ab (MPA-Konzentration nach 6 h: 2,1 mg/l; Spannweite: 1,4 – 4,4 mg/l) und stieg nach 9 bis 12 Stunden wieder leicht an. Die nach 12 Stunden gemessenen MPA-Blutkonzentrationen lagen mit 3,1 mg/l (Spannweite: 0,8 - 23,0 mg/l) über dem Ausgangsniveau. Die zuletzt beschriebenen Konzentrationsveränderungen waren statistisch nicht signifikant ($p>0,05$).

Bei Beobachtung der MPAG-Blutkonzentrationen (siehe Abbildung 8) 1 Stunde nach Einnahme von EC-MPS, zeigte sich ein signifikanter Abfall um 14,4 mg/l ($p= 0,008$). 1 Stunde bis 4 Stunden nach Medikation stieg die MPAG-Blutkonzentration wieder signifikant an (1 h bis 1,5 nach Medikation: von 179,8 mg/l mit einer Spannweite von 86,8 – 131,1 mg/l auf 194,8 mg/l mit

einer Spannweite von 81,6 – 310,0 mg/l, $p=0,008$ sowie 1,5 bis 2 h nach Medikation von 194,8 mg/l auf 201,9 mg/l mit einer Spannweite von 98,8 – 323,8 mg/l; $p=0,008$) und erreichte nach 4 Stunden ihre maximale Konzentration mit 246,8 mg/l und einer Spannweite von 100,0 – 320,0 mg/l. Im weiteren Verlauf, d.h. 6 bis 12 Stunden nach Einnahme fiel die Konzentration signifikant (signifikante Abnahmen: 5 bis 6 Stunden nach Einnahme; $p= 0,039$) auf Werte (12 h nach Medikation) von 193,3 mg/l mit einer Spannweite von 101,4 – 296,9 mg/l ab.

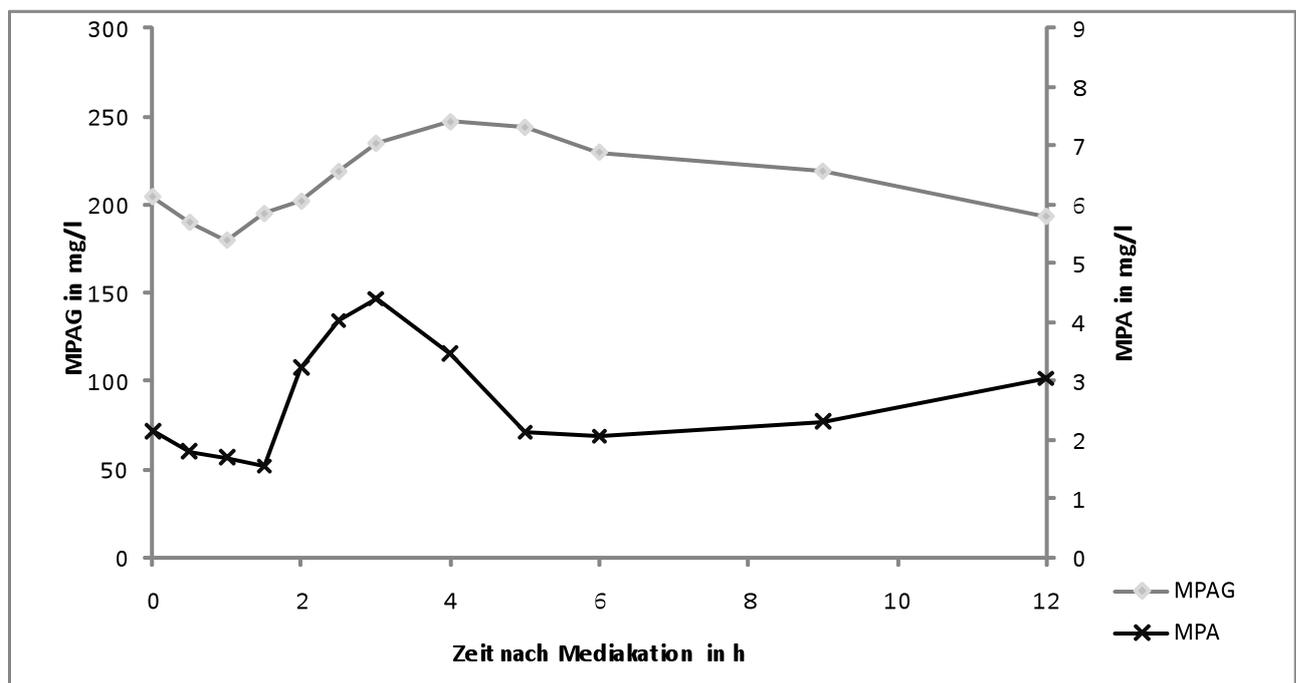


Abb. 7: Verlauf der MPA und MPAG-Blutkonzentrationen in mg/l im Tagesverlauf (0-12 Stunden nach Medikation) unter dem Einfluss von 100 % CyA + EC-MPS. Darstellung des Median; n=8.

Pharmakokinetik von MPA und MPAG nach Gabe von EC-MPS bei Everolimus behandelten Patienten

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, konnten bis eine Stunde nach Einnahme von EC-MPS keine Veränderungen der MPA-Konzentration im Blut gemessen werden. Im weiteren Verlauf, d.h. nach 1,5 Stunden, stieg die MPA-Konzentration im Blut an und erreichte nach 2,5 Stunden ihren maximalen Anstieg (8,3 mg/l mit einer Spannweite von 4,2 – 26,9 mg/l). Nach 3 bis 5 Stunden nahm die MPA-Konzentration im Blut wieder signifikant ab (signifikanter Abfall 4 h – 5 h nach

Medikation: von 4,9 mg/l mit einer Spannweite von 0,6 – 17,2 mg/l auf 3,3 mg/l; Spannweite: 0,6 – 16,8 mg/l; $p=0,039$) Mit leichten Schwankungen blieb die MPA-Konzentration 5 bis 12 Stunden nach Medikation auf hohem Niveau. Die nach 12 Stunden gemessenen MPA-Blutkonzentrationen lagen über dem Ausgangsniveau (3,7 mg/l; Spannweite: 0,7 – 7,2 mg/l). Die beschriebenen Anstiege und Abfälle waren statistisch nicht signifikant ($p>0,05$). Messungen der MPAG-Blutkonzentration zeigten 1,5 Stunden nach Medikation zunächst keine Veränderungen der Konzentration (siehe Abbildung 9). Nach 2 bis 9 Stunden nach Einnahme von EC-MPS stieg die Konzentration im Blut mit Schwankungen an und erreichte nach 9 Stunden ihre maximale Konzentration (142,5 mg/l mit einer Spannweite von 64,5 – 282,7 mg/l). Im weiteren Verlauf, bis 12 Stunden nach Medikation, nahm die Konzentration wieder signifikant ab (MPAG-Konzentrationen nach 12 h: 133,3 mg/l mit einer Spannweite von 51,9 – 276,6 mg/l; $p=0,039$).

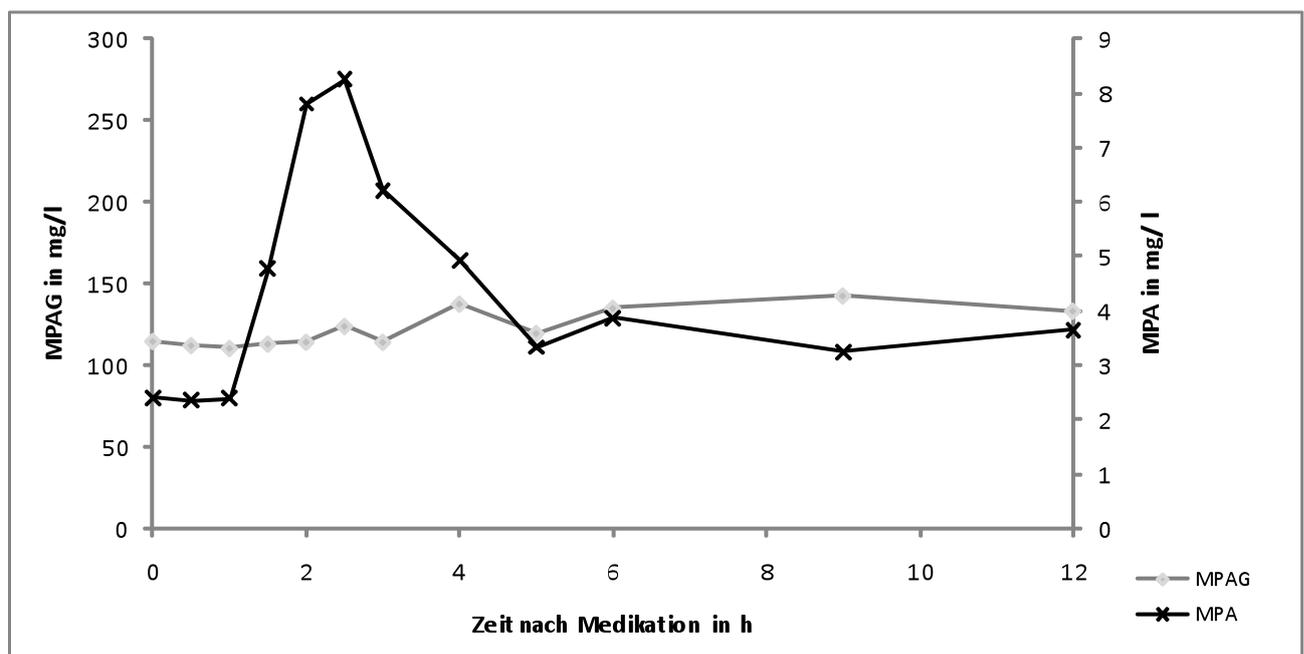


Abb. 8: Verlauf der MPA und MPAG-Blutkonzentrationen in mg/l im Tagesverlauf (0-12 Stunden nach Medikation) 7 Tage nach Absetzen der CNI unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. Darstellung des Median; n=8.

Die nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick aller wichtigen pharmakokinetischen Parameter von MPA und MPAG:

	100 % CyA n=8	50 % CyA n=8	CyA-frei n=8
MPA C_0 (mg/l)	2,15	2,12	2,41
MPA C_{min} (mg/l)	1,70	1,60	2,36
MPA C_{max} (mg/l)	4,40	7,49	8,25
MPA t_{max} (h nach Medikation)	3	2,5	2,5
MPA AUC_{0-12h} (mg x h/l)	46,11	51,92	49,08
MPAG C_0 (mg/l)	204,44	167,10	114,85
MPAG C_{min} (mg/l)	179,77	155,4	110,60
MPAG C_{max} (mg/l)	246,8	182,62	142,51
MPAG t_{max} (h nach Medikation)	4	1,5	9
MPAG AUC_{0-12h} (mg x h/l)	2629,13	2028,45	1585,39

Tab. 4: Überblick Pharmakokinetik von MPA und MPAG. C Konzentrationen; t Zeit; AUC Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve. Messzeitpunkte: 100 % CyA + EC-MPS, 50 % CyA + Everolimus + EC-MPS sowie Everolimus + EC-MPS. Darstellung des Median; n=8.

MPA-AUC_{0-12h}

Der Median der dosisnormalisierten MPA-AUC_{0-12h} betrug unter der vollen CNI-Therapie 46,11 mg x h/l mit einer Spannweite von 14,7 – 75,9 mg/h/l und zeigte einen leichten Anstieg nach Reduzierung der CyA-Dosis um 50 % (51,9 mg x h/l; Spannweite von 11,4 – 67,6 mg x h/l). 7 Tage nach Absetzen der CyA-Medikation kam es im Median der MPA- AUC_{0-12h} zu keiner weiteren Veränderung (49,1 mg x h/l; Spannweite: 36,8 – 111,1 mg x h/l), jedoch zeigten vor allem Patienten mit zuvor niedriger Exposition einen deutlichen Anstieg, so dass die Streuung um den Median deutlich abnahm.

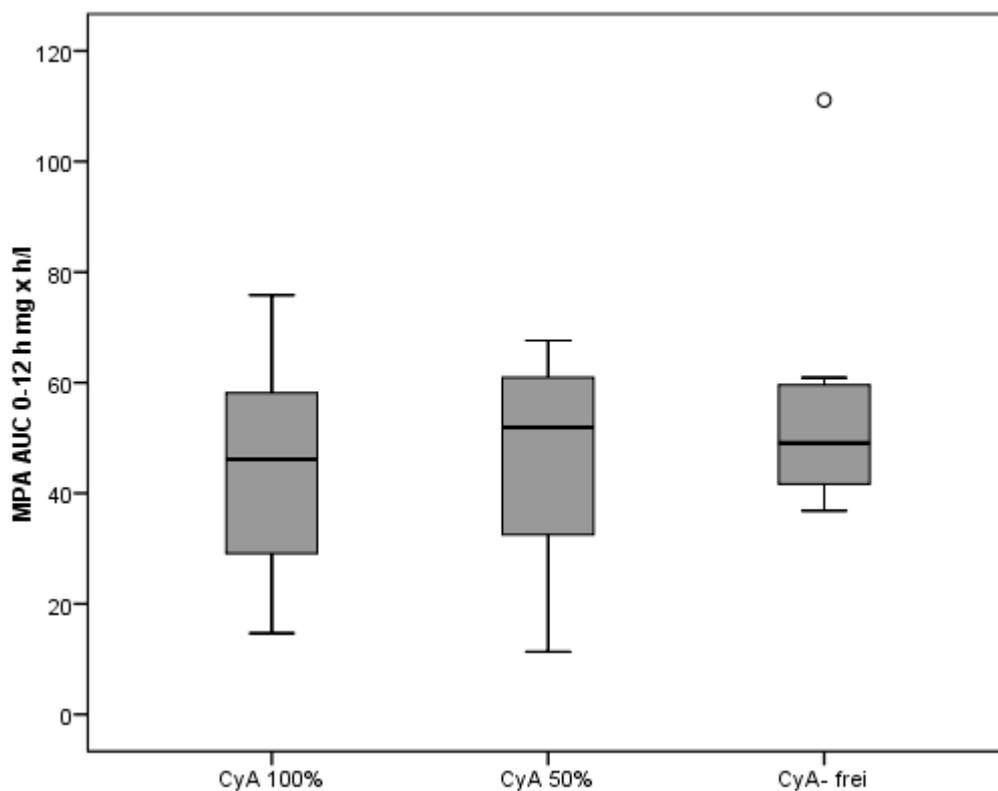


Abb. 9: MPA-AUC_{0-12h} in mg x h/l. Messzeitpunkte: 100 % CyA + EC-MPS, 50 % CyA + Everolimus + EC-MPS sowie Everolimus + EC-MPS. n=8.

MPAG-AUC_{0-12 h}

Die MPAG-AUC_{0-12h} war unter der 100 % CyA-Medikation im Median signifikant ($p=0,008$) höher (2629,1 mg x h/l; Spannweite von 1068,2 – 3674,4 mg x h/l) als unter der CNI-freien Therapie (1585,4 mg x h/l; Spannweite von 868,2 – 3552,2 mg x h/l).

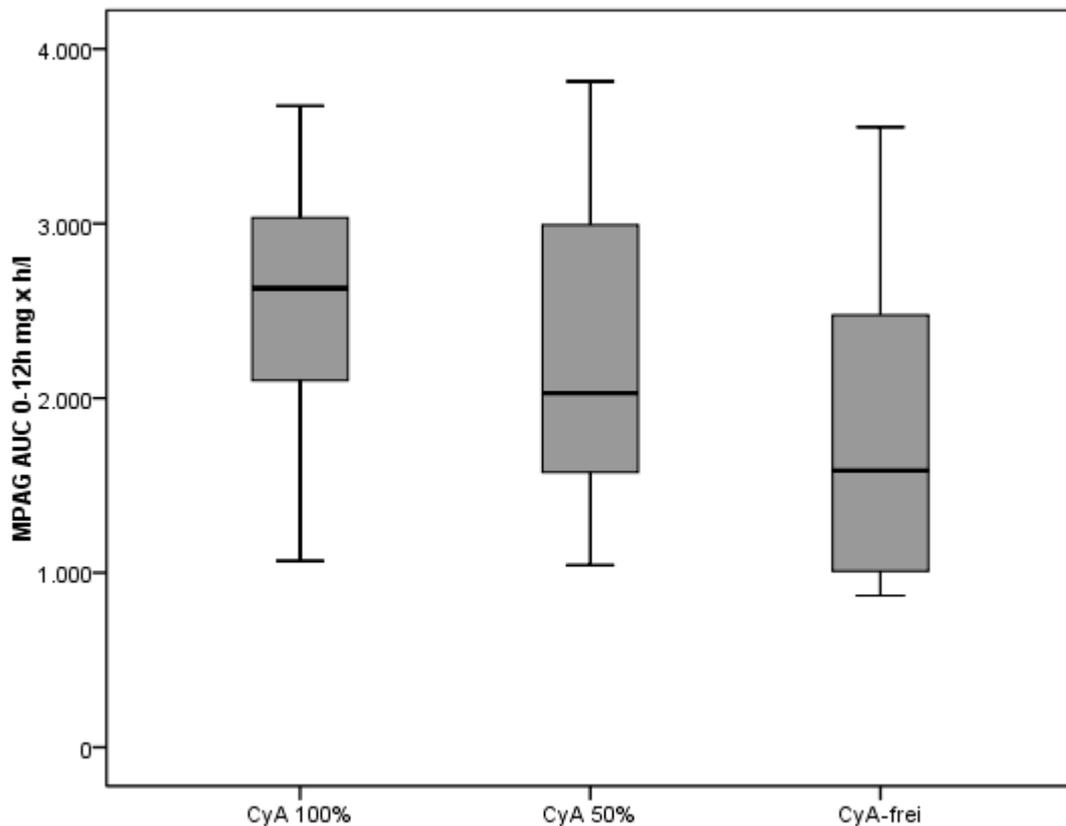


Abb. 10: MPAG-AUC_{0-12h} in mg x h/l. Messzeitpunkte: 100 % CyA + EC-MPS, 50 % CyA + Everolimus + EC-MPS sowie Everolimus + EC-MPS. n=8.

5.3.2 Pharmakodynamische Messungen der IMPDH-Aktivität

Pharmakodynamische Messungen der IMPDH-Aktivität nach Gabe von EC-MPS bei CNI – behandelten Patienten

Wie die zusammenfassende Abbildung 12 zeigt, stieg nach EC-MPS-Einnahme die IMPDH-Aktivität im Blut etwas an. Eine Stunde nach Medikation nahm die IMPDH-Aktivität im Blut wieder ab und erreichte 1,5 Stunden nach Einnahme ihr Minimum ($37,2 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$; Spannweite: $14,8 - 100,2 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$). Im Zeitraum von 2-5 Stunden nach EC-MPS Medikation stieg die IMPDH-Aktivität im Blut erneut an und erreichte nach 9-12 Stunden das Ausgangsniveau (IMPDH-Aktivität nach 12 h: $82,3 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$; Spannweite: $30,3 - 175,0 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$).

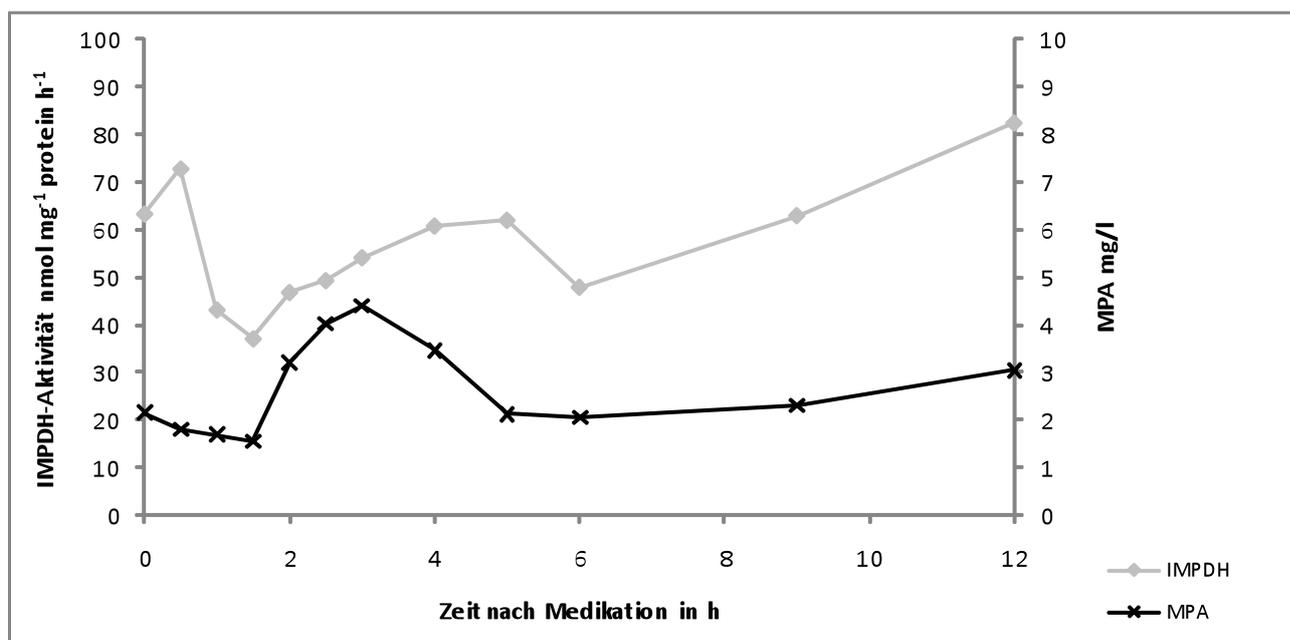


Abb. 11: Verlauf der IMPDH-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) im Tagesverlauf (0-12 Stunden nach Medikation) versus der dosisnormalisierten MPA Blutkonzentration (mg/l) zum Messzeitpunkt: 100 % CNI + EC-MPS. Darstellung des Median. IMPDH n=13.

Pharmakodynamische Messungen der IMPDH-Aktivität nach Gabe von EC-MPS bei Everolimus- behandelten Patienten

Die Summationsgraphik zum Verlauf der IMPDH-Aktivität unter Kombinationstherapie von EC-MPS und mTOR ist in Abbildung 13 dargestellt. Eine Stunde nach Einnahme von Everolimus und EC-MPS ist zunächst ein leichter Anstieg der IMPDH-Aktivität zu beobachten. Nach 1,5 Stunden fiel die IMPDH-Aktivität signifikant ab ($p=0,027$) und erreichte nach 2 Stunden ihre geringste Aktivität ($22,2 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$; Spannweite: $4,2 - 70,5 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$). Bereits 3 Stunden nach Medikation begann der Wiederanstieg der IMPDH-Aktivität von $26,49 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$ und nach 5 Stunden wurde erstmalig das Ausgangsniveau von $50,3 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$ (Spannweite: $13,1 - 130,5 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) erreicht. Nach nochmaligem Abfall der IMPDH-Aktivität, 6 Stunden nach Medikation, nahm die Aktivität, 9-12 Stunden nach Einnahme, wieder zu. Die nach 12 Stunden gemessene IMPDH-Aktivität entsprach wieder dem Ausgangsniveau.

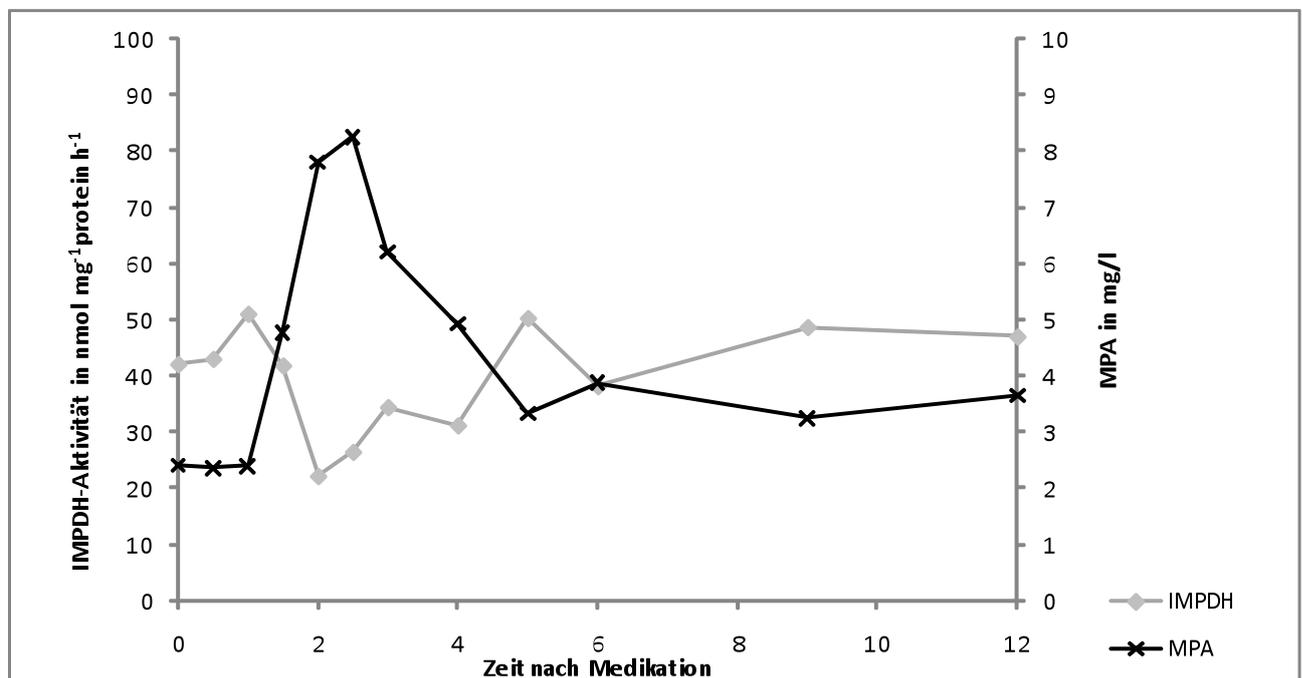


Abb. 12: Verlauf der IMPDH-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) versus der dosisnormalisierten MPA Blutkonzentrationen (mg/l) im Tagesverlauf (0-12 Stunden nach Medikation) zum Messzeitpunkt: CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. Darstellung des Median; IMPDH $n=13$.

Die nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick aller wichtigen pharmakodynamischen Parameter der IMPDH-Aktivität:

	100 % CNI n=13 (min - max)	CNI-frei n=13 (min - max)
IMPDH A_0 ($\rho\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$)	63,3 (14,0 - 124,9)	42,1 (14,5 - 96,4)
IMPDH A_{min} ($\rho\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$)	37,2 (14,8 - 100,2)	22,2 (4,1 - 70,5)
IMPDH A_{max} ($\rho\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$)	82,3 (30,3 - 175,0)	51,0 (27,0 - 95,2)
IMPDH t_{min} (h nach Medikation)	1,5	2
IMPDH AEC_{0-12h} ($\rho\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$)	765,4 (328,3 - 1251,7)	553,9 (286,9 - 808,7)

Tab. 5: Überblick pharmakodynamischer Messungen der IMPDH-Aktivität. A Aktivität; t Zeit; AEC Fläche unter der Enzym-Aktivitäts- Kurve. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS und CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. Angabe des Median; n=13.

IMPDH-AEC_{0-12h}

Die Fläche unter der Aktivitätskurve als Maß für die IMPDH-Aktivität war unter der vollen CNI-Medikation im Median mit 765,4 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$ (Spannweite: 328,3 – 1251,7 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) signifikant höher ($p=0,017$) als unter der CNI-freien Therapie (553,87 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$; Spannweite: 286,9 – 808,7 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$).

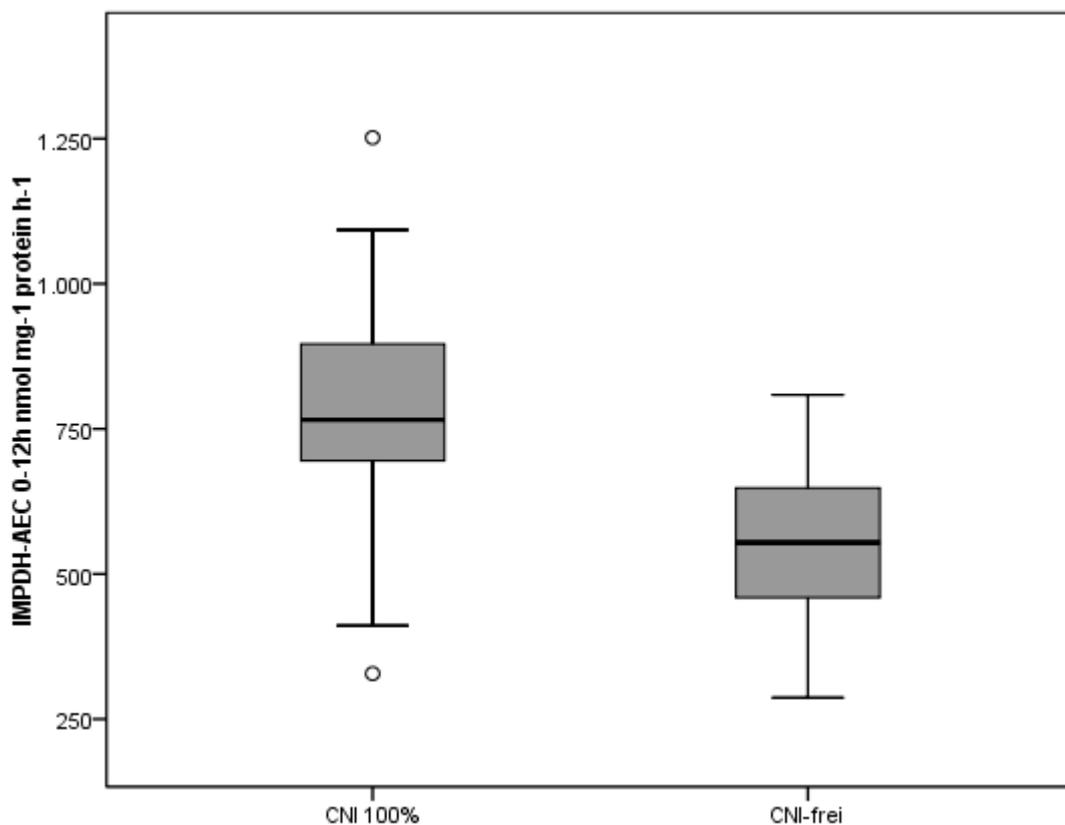


Abb. 13: IMPDH-AEC_{0-12h} in $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS und CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. $n=13$.

5.3.3 Korrelationsanalysen

Nach Spearman durchgeführte Korrelationsberechnungen zwischen dem MPA-Blutkonzentration (mg/l) und der IMPDH-Aktivität ($\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) zeigten weder unter einer CNI-Medikation (100%) noch unter einer CNI-freien Medikation zum Zeitpunkt des Talspiegels signifikante Korrelationen ($p > 0,05$). Bei Betrachtung der Tagesverläufe (0-12 h) zu den Messzeitpunkten: CyA 100% und unter der CNI-freien Medikation zeigte sich jedoch eine gute inverse Beziehung (siehe Abbildung 12 und 13). Signifikante Korrelationen wurden 7 Tage nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie zwischen der dosisnormalisierten MPA-Spiegel im Blut ($\text{kg} \times \text{d}/\text{dl}$) und der Proliferationsrate der Lymphozyten (%) beobachtet (Spearman-Rho Koeffizient: $-0,7$; $p = -0,04$). Eine weitere signifikant positive Korrelation zeigte sich 7 Tage nach Absetzen der CNI zwischen der IMPDH-Aktivität zum Zeitpunkt A_0 ($\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$) und der Proliferationsrate der Lymphozyten (%) (Spearman-Rho Koeffizient: $0,60$; $p = 0,03$).

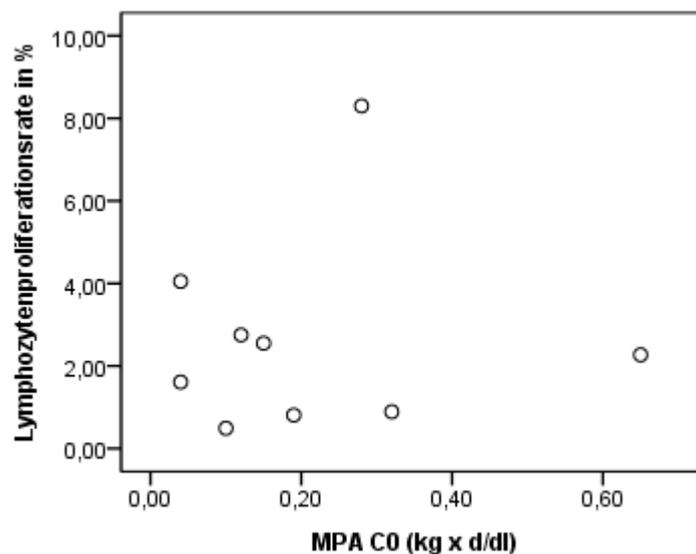


Abb. 15 (A): Signifikante Korrelation zwischen dem dosisnormalisiertem MPA-Talspiegel (0h) in mg/dl und Proliferationsrate der Lymphozyten in %, 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS.

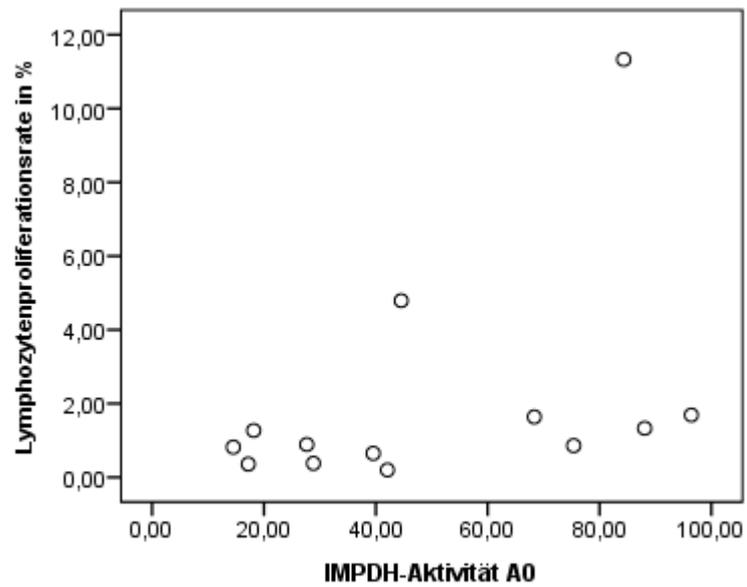


Abb. 15 (B): Signifikante Korrelation zwischen der IMPDH-Aktivität (0h) in $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{AMP}$ und der Lymphozytenproliferationsrate in %, 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS.

5.4 IL-2 und TNF- α Expression in CD3⁺ Lymphozyten

Im nachfolgenden werden die Einflüsse der Umstellung der Immunsuppressiven Therapie von Ciclosporin A/Tacrolimus und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS auf den prozentualen Anteil IL-2 und TNF- α positiver T-Lymphozyten dargestellt.

5.4.1 Anteil IL-2⁺ und TNF- α ⁺ T-Lymphozyten unter dem Einfluss der CNI- Medikation

Wie die Abbildung 16 zeigt, war der prozentuale Anteil IL-2 und TNF- α exprimierender T-Lymphozyten unter Tac im Median tendenziell etwas geringer (IL-2: 15,00 % mit einer Spannweite von 5,54 % - 37,2 % und TNF- α : 7,48 % mit einer Spannweite von 4,05 % - 35,07 %) als unter CyA (IL-2: 25,69 %; Spannweite von 0,8 % - 71,8 % und TNF- α : 23,60 %; Spannweite von 4,61 % - 50,12 %). Da die beschriebenen Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant waren ($p > 0,05$), erfolgt im weiteren Verlauf eine gemeinsame Analyse der Calcineurin-Inhibitoren (siehe Abbildung 17).

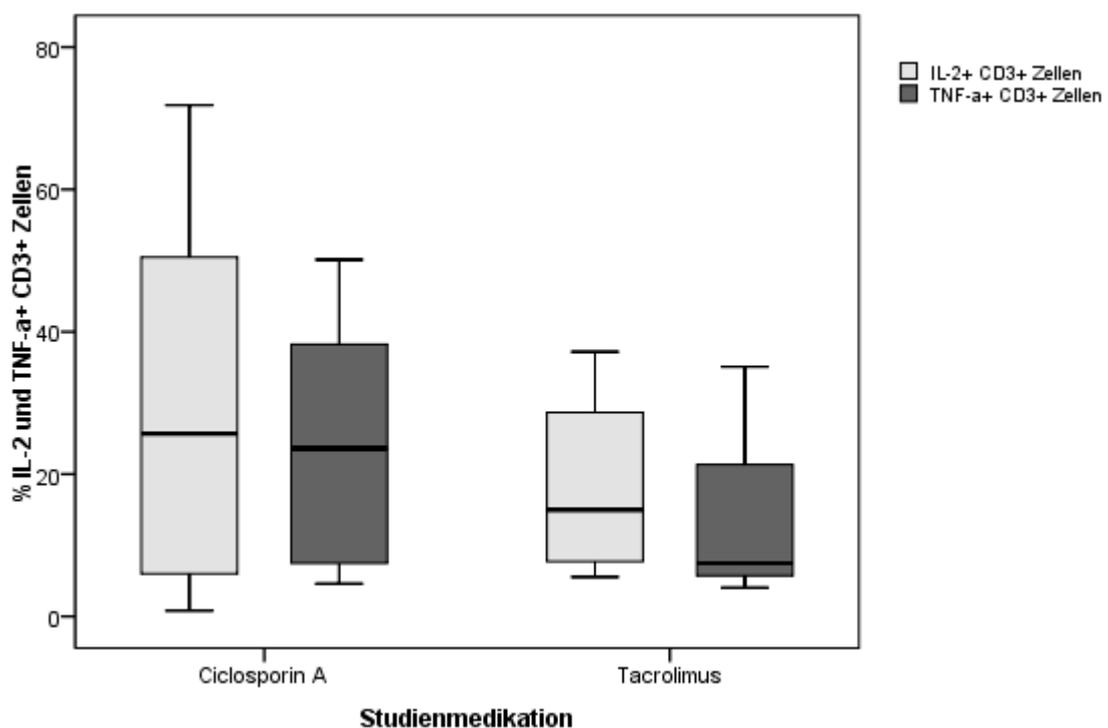


Abb. 14: Vergleich des Anteils IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen % unter dem Einfluss von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus. Messzeitpunkt: 100 % CyA /Tac + EC-MPS. CyA (n=8); Tac (n=5).

Die Abbildung 17 zeigt im Allgemeinen sowohl unter Therapie als auch ohne Immunsuppression, dass der Anteil IL-2 exprimierender T-Lymphozyten im Median höher (20,12 %, Spannweite von 0,8 % - 61,3 %) als der Anteil der TNF- α exprimierender Zellen (Median bei 9,36 %, Spannweite von 4,05 % - 44,94 %) und somit niedriger als die unbehandelte Kontrollgruppe zum Studienbeginn war. Nach Reduzierung der CNI-Dosis um 50 %, zeigte sich im Median sowohl ein Anstieg des Anteils IL-2 als auch TNF- α exprimierender T-Lymphozyten, die 7 Tage nach Absetzen der CNI ihre maximale Expression erreichte und über dem Niveau der Kontrollgruppe lag (IL2: 43,67 %; Spannweite von 6,06 % - 52,62 % und TNF- α : 29,58 % mit einer Spannweite von 5,93% - 47,77%). In der Langzeitbeobachtung (FU) nahm sowohl im Median der prozentuale Anteil IL-2 (24,31 % mit einer Spannweite von 7,58 % - 42,60 %) als auch der prozentuale Anteil TNF- α produzierender T-Lymphozyten (24,58 %, Spannweite von 6,1 % - 41,76 %) wieder ab, lagen aber über dem Ausgangsniveau.

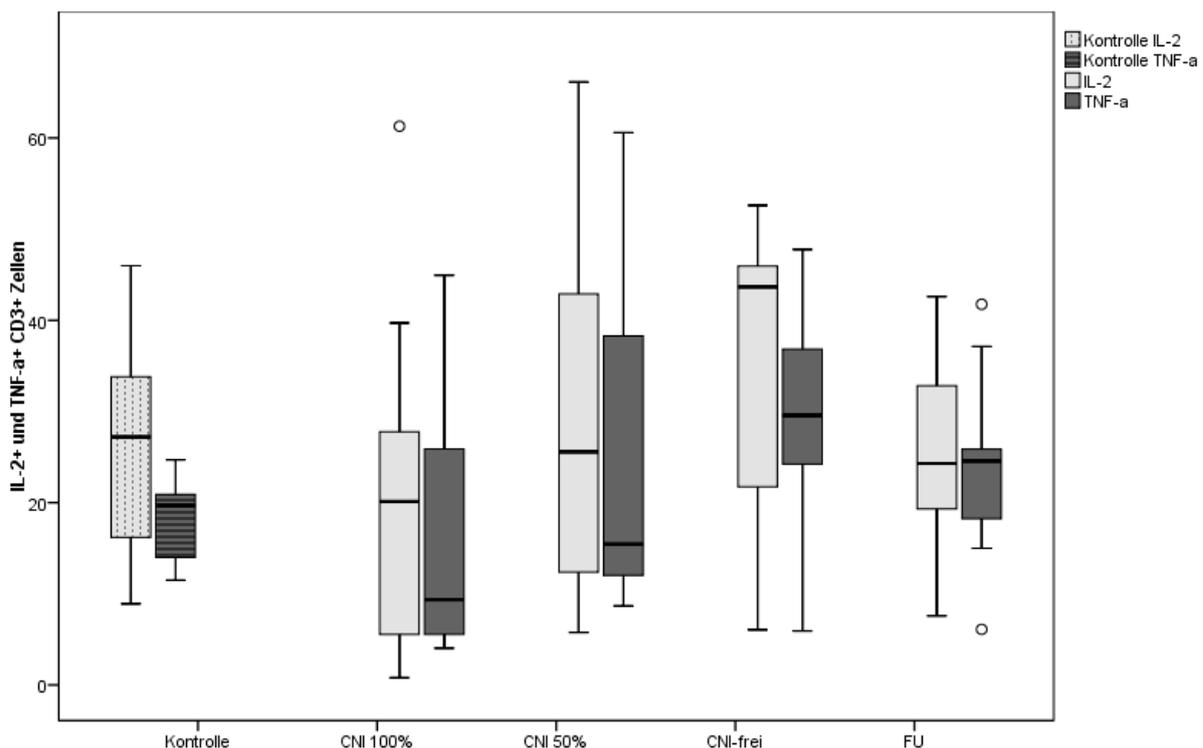


Abb. 15: Anteil IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Lymphozyten in %. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS, 50 % CNI + Everolimus + EC-MPS, sowie CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS, Folgeuntersuchungen (FU): Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. n=9.

5.4.2 Korrelationsanalysen

Signifikante Korrelationen zwischen der IL-2 Expression und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen zeigten sich, wie in Abb. 18 (A) zu sehen ist, unter der Kombinationstherapie mit 100 % CNI und EC-MPS (Spearman-Rho Koeffizient= 0,91; p=0,02). Weitere signifikante Korrelationen ließen sich nach Reduzierung der CyA Dosis um 50 % und Aufnahme von Everolimus in das Therapie-schema (Spearman-Rho Koeffizient=0,97; p=0,00) sowie im Langzeitverlauf 9-11 Monate nach Umstellung zu einer CNI-freien Therapie beobachten (Spearman-Rho Koeffizient=0,83; p=0,01), siehe Abb. 18 (B, D). Keine signifikante Korrelationen zeigten sich 7 Tage nach Absetzen der CyA/Tac Medikation (Spearman-Rho Koeffizient= 0,310; p>0,05). Zwischen den prozentualen Anteil IL-2 bzw. TNF- α positiver CD3⁺ Zellen und dem prozentualen Anteil CD25 oder CD71 positiver CD3⁺ Zellen konnten während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine signifikanten Korrelationen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

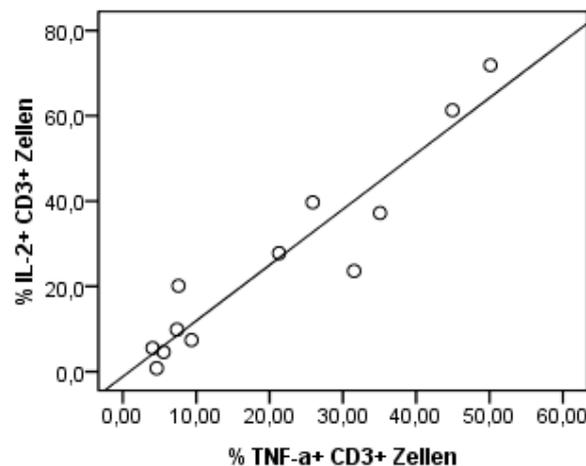


Abb. 18: (A): Korrelationen zwischen den prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS. Berechnung nach Spearman (p=0,02). n=9.

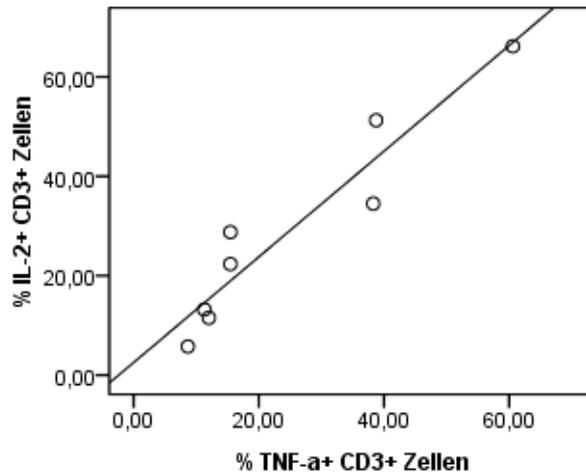


Abb. 18 (B): Korrelationen zwischen den prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: 50 % CNI + Everolimus + EC-MPS. Berechnung nach Spearman ($p=0,00$). $n=9$.

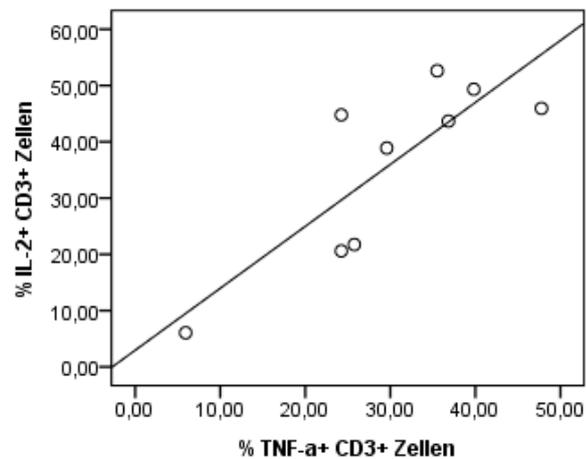


Abb. 18 (C): Korrelationen zwischen den prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: 7 Tage nach Absetzen der CNI unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. Berechnung nach Spearman ($p>0,05$). $n=9$.

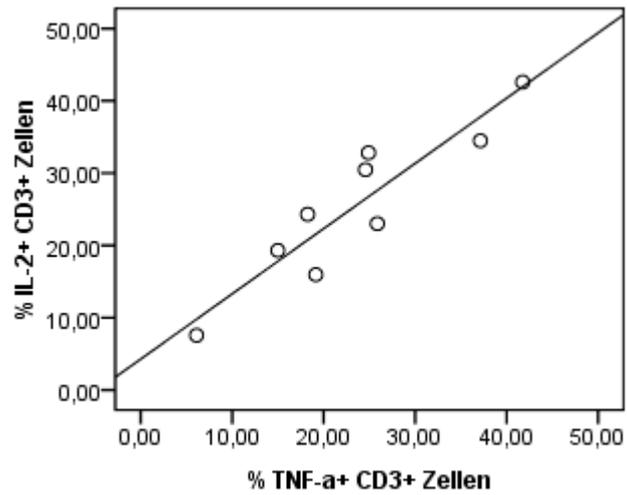


Abb. 18 (D): Korrelationen zwischen den prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: Folgeuntersuchungen: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. Berechnung nach Spearman ($p=0,01$), $n=9$.

5.5 Lymphozyten-Proliferationsrate

Im nachfolgenden werden die Einflüsse der Umstellung der Immunsuppressiven Therapie von Ciclosporin A/Tacrolimus und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS auf die Proliferationsrate der Lymphozyten dargestellt.

5.5.1 Lymphozytenproliferationsrate unter dem Einfluss der CNI-Medikation

Bei Patienten (n=8) mit CyA als Ausgangsmedikation, wurden im Median eine tendenziell gering höhere Proliferationsrate (2,08 % mit einer Spannweite von 0,49 % - 8,30 %) der Lymphozyten gemessen, als bei Patienten (n=5) mit Tacrolimus-Medikation (Median 0,86 %; Spannweite 0,24 % - 15,96 %) (siehe Abbildung 19). Da die beschriebenen Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant waren ($p > 0,05$), erfolgt im weiteren Verlauf eine gemeinsame Analyse der Calcineurin-Inhibitoren.

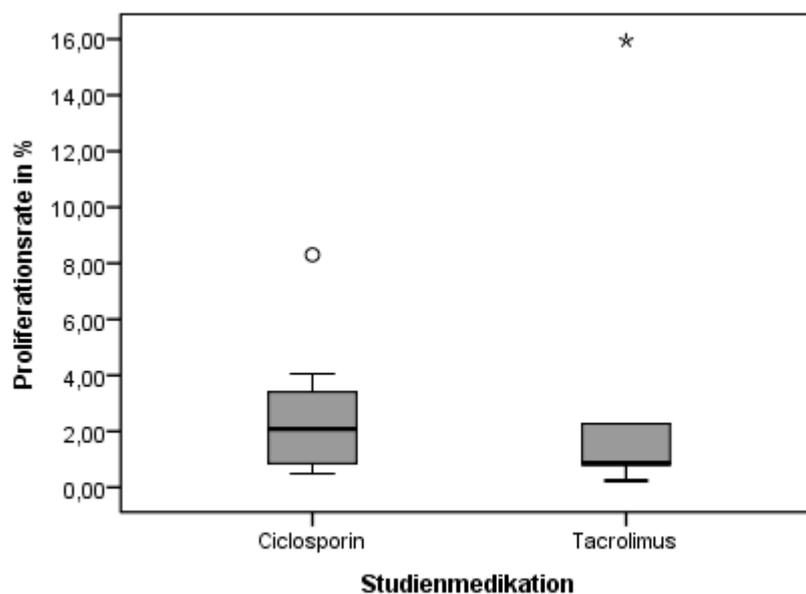


Abb. 16: Vergleich der Proliferationsrate von T-Lymphozyten in % unter dem Einfluss von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus. Messzeitpunkt: 100 % CNI + EC-MPS. CyA (n=8), Tac (n=5).

Betrachtet man den in Abb. 20 dargestellten Verlauf der Proliferationsrate von Lymphozyten, so lässt sich zu Studienbeginn eine Proliferationsrate im Median von 0,89 % mit einer Spannweite von 0,24 % - 8,30 % feststellen. Nach Reduzierung der CyA Dosis um 50 % und Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema, blieb die Proliferationsrate mit 1,50 % im Median (Spannweite von 0,53 % - 11,22 %) auf einen konstant niedrigen Niveau. Im weiteren Verlauf, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CyA/Tac Medikation (0,89 %; Spannweite von 0,36 % - 11,33 %) und im Langzeitverlauf (1,65 %; Spannweite: 0,87 % - 9,32 %) konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Im gesamten Verlauf lag die Proliferationsrate deutlich unter derjenigen der Kontrollgruppe (11,80 %; Spannweite: 5,80 % - 30,10 %).

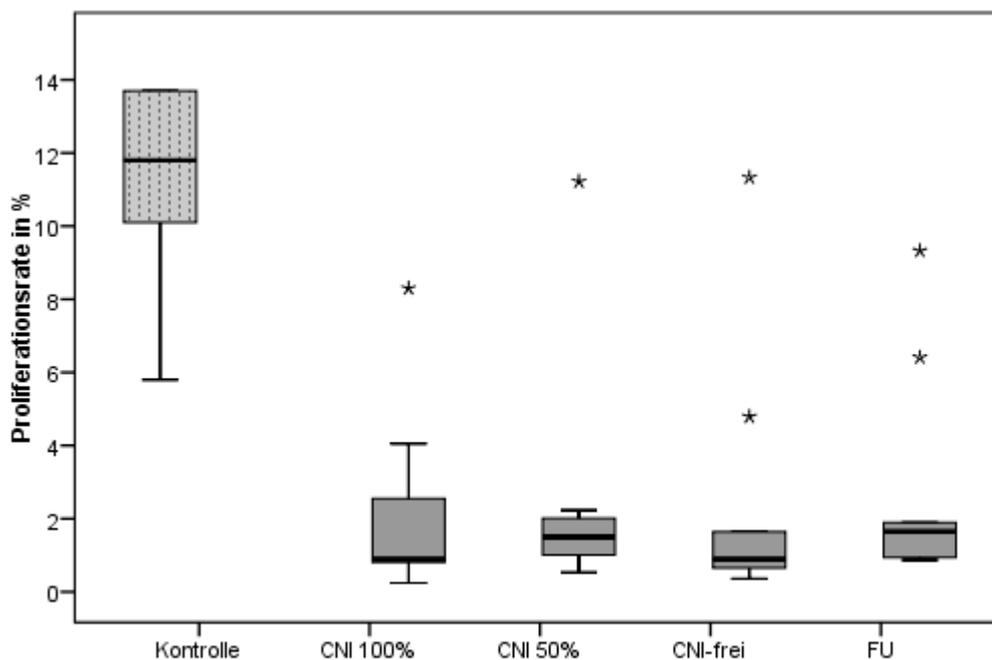


Abb. 17: Proliferationsrate der Lymphozyten in %. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS, 50 % CNI + Everolimus + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS, Folgeuntersuchungen (FU): Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. n=9.

5.6 CD25 bzw. CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten

Im nachfolgenden werden die Einflüsse der Umstellung der Immunsuppressiven Therapie von Ciclosporin A/Tacrolimus zu Everolimus auf den prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 exprimierender T-Lymphozyten dargestellt.

5.6.1 CD25 bzw. CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten unter dem Einfluss der CNI-Medikation

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, zeigten die Patienten unter Einnahme von CyA (n=8) im Median einen etwas geringeren prozentualen Anteil an CD25 positiven (Median: 23,50 %, Spannweite: 12,20 % - 41,32 %) und CD71 positiven (Median: 11,45 %, Spannweite: 8,34 % - 30,4 %) T-Zellen, als Patienten die Tacrolimus (n=5) einnahmen (CD25⁺ CD3⁺ Zellen: Median: 27,92 % mit einer Spannweite von 20,58 % - 35,51 % sowie CD71⁺ CD3⁺ Zellen: Median: 16,40 % mit einer Spannweite von 10,26 % - 27,10 %). Die beschriebenen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im weiteren Verlauf erfolgt daher eine gemeinsame Analyse der Calcineurin-Inhibitoren.

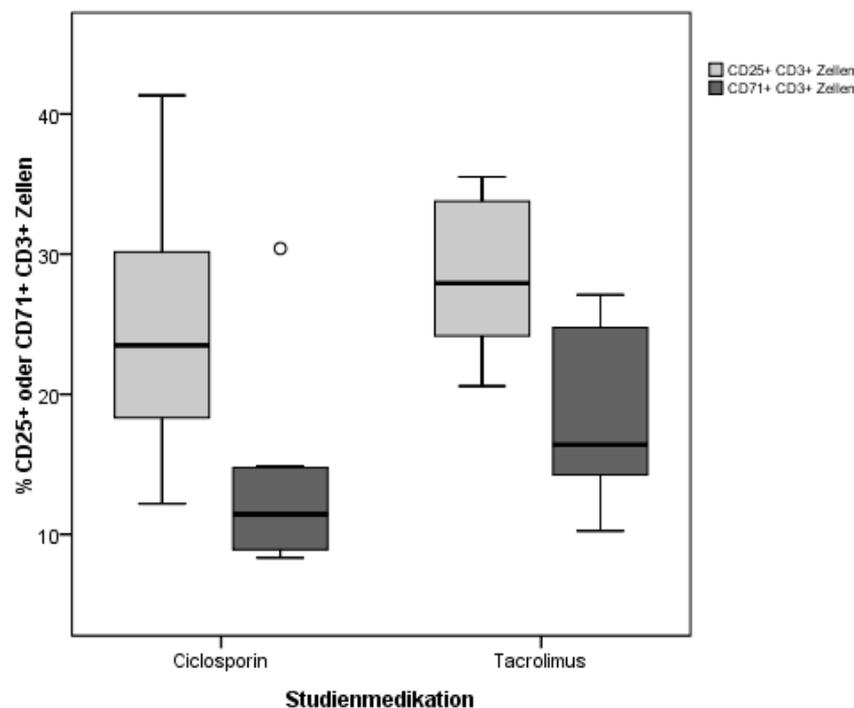


Abb. 18: Vergleich des Anteils CD25 oder CD71 positiver CD3⁺ Zellen unter dem Einfluss von Ciclosporin A bzw. Tacrolimus. Messzeitpunkt: 100 % CyA/Tac + EC-MPS. CyA (n=8); Tac (n=5).

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, lag zum Studienbeginn bei den beobachteten Patienten (n=9) der Anteil an CD25 positiven CD3⁺ Zellen höher (Median von 23,06 % mit einer Spannweite von 12,20 % - 33,33%), als der CD71 positiven CD3⁺ Zellen (Median 11,49 %, Spannweite von 8,67 % - 30,40 %). Nach Senkung der CNI-Dosis um 50 % und Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema, beobachteten wir sowohl einen Anstieg des Anteils CD25 positiver CD3⁺ Zellen auf 29,14 % (Spannweite: 17,41 % - 35,44 %) als auch des Anteils CD71 positiver CD3⁺ Zellen auf 14,21 % (Spannweite: 11,62 % - 23,47 %). Im weiteren Verlauf, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CyA/Tac Medikation (CD25: 27,69 % mit einer Spannweite von 7,63 % - 42,83 %; CD71: 17,25 % mit einer Spannweite von 4,32 % - 31,62 %) und im Langzeitverlauf (CD25: 24,41 % mit einer Spannweite von 7,79 % - 46,05 %; CD71: 10,78 % mit einer Spannweite von 3,76 % - 23,81 %) konnten keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden. Im gesamten Verlauf lag der Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen unter denen der Kontrollgruppe. Die im gesamten Studienzeitraum beobachteten Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (p>0.05).

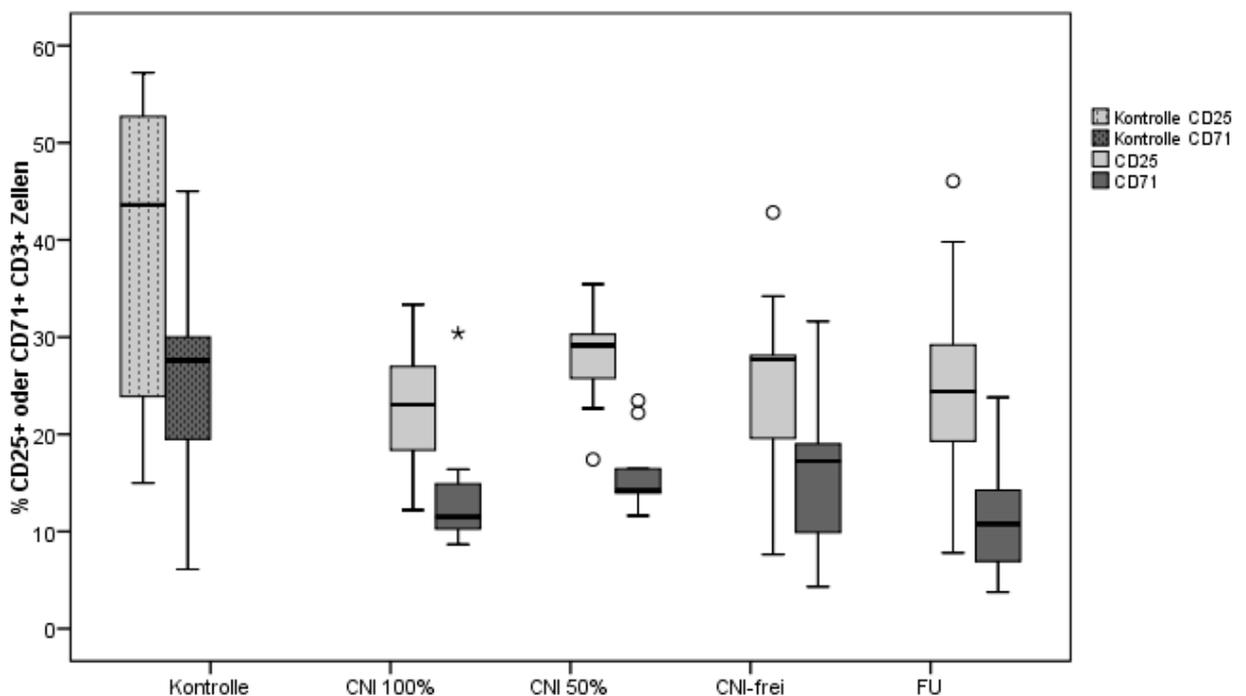


Abb. 19: Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen in %. Messzeitpunkte: 100 % CNI + EC-MPS, 50 % + Everolimus + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS, Folgeuntersuchungen (FU): Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. n=9.

5.6.2 Korrelationsanalysen

Zwischen der Expansion der Oberflächenmolekülen CD25 bzw. CD71 CD3⁺ Lymphozyten, konnten während des Untersuchungszeitraumes zu zwei Messzeitpunkten signifikant positive Korrelationen beobachtet werden. Signifikante Korrelationen bestanden 7 Tage nach Absetzen der CNI (Spearman Rho-Koeffizient= 0,87; p=0,02) sowie 9-11 Monate nach Therapieumstellung (Spearman Rho-Koeffizient= 0,85; p=0,04)

Zu den übrigen Messzeitpunkten wurden keine signifikante (p>0,05) Korrelationen festgestellt (100 % CNI + ECMPS: Spearman Rho-Koeffizient= 0,4; CNI Dosis um 50 % reduziert + Everolimus + ECMPS: Spearman Rho-Koeffizient=0,63).

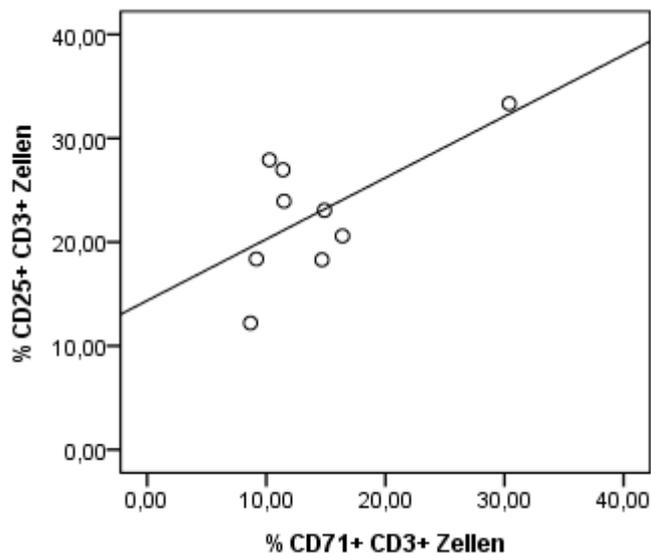


Abb. 23 (A): Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: 100 % CNI + EC-MPS. Berechnung nach Spearman (p>0,05). n=9

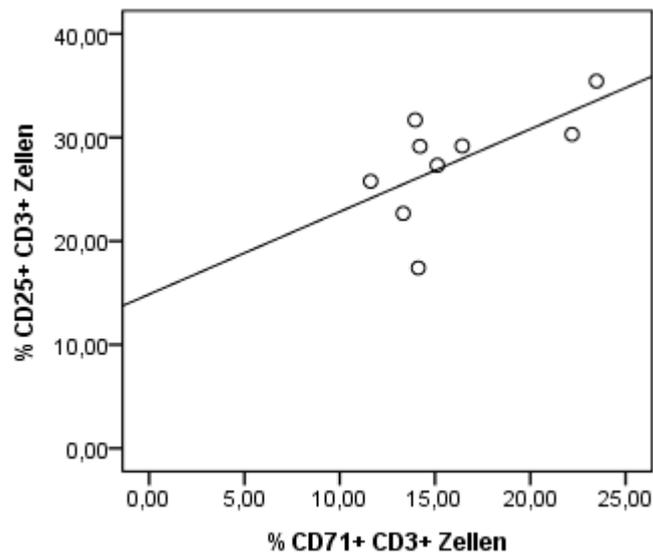


Abb. 23 (B): Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: 50 % CNI Dosis + Everolimus + EC-MPS. Berechnung nach Spearman ($p < 0,05$). $n=9$

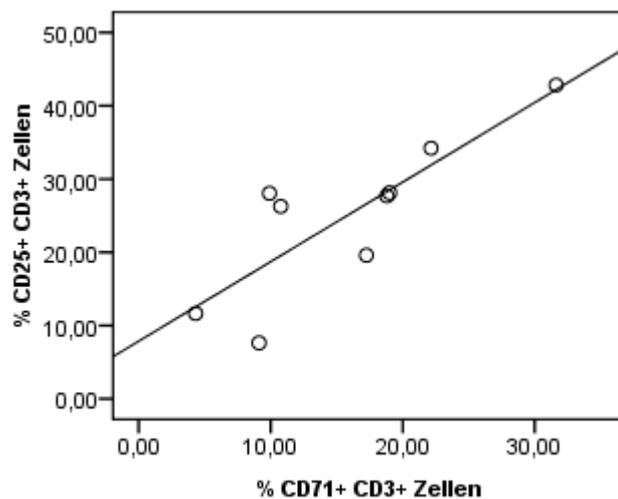


Abb. 23 (C): Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: 7 Tage nach Absetzen der CNI unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS. Berechnung nach Spearman ($p=0,02$). $n=9$

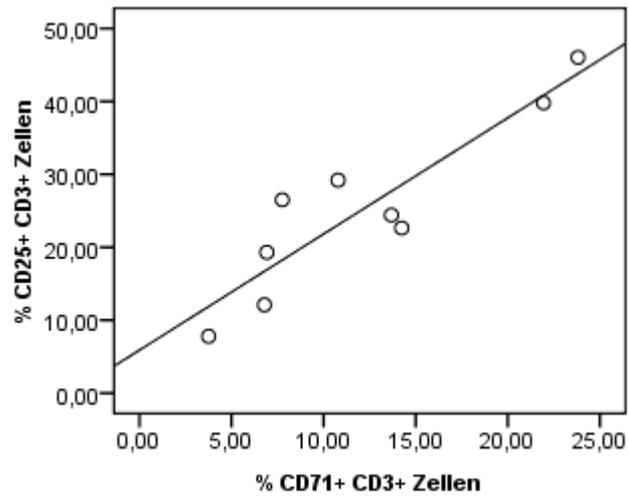


Abb. 23 (D): Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen. Messzeitpunkt: Folgeuntersuchungen: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. Berechnung nach Spearman ($p=0,04$). $n=9$.

5.7 Klinische Parameter

5.7.1 Nierenfunktion

Kreatinin

Zu Beginn der Studie lag das Serum-Kreatinin bei $2,23 \pm 0,36$ mg/dl und nahm mit Wechsel zu einer CNI-freien Therapie ab ($1,99 \pm 0,48$ mg/dl; $p > 0,05$). Im weiteren Verlauf (FU) blieben die Kreatininwerte im Serum mit $1,95 \pm 0,5$ mg/dl konstant ($p > 0,05$). Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, fiel bei Patienten, die CyA als Ausgangsmedikation erhielten, mit der Umstellung auf eine CyA-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS, das Kreatinin im Serum signifikant um 0,5 mg/dl ab (CyA 100 %: $2,36 \pm 0,38$ mg/dl; CyA-frei: $1,88 \pm 0,50$ mg/dl; $p = 0,008$). Im weiteren Verlauf (FU) blieben das Kreatinin im Serum konstant ($1,88 \pm 0,38$ mg/dl; $p > 0,05$). Im gesamten Beobachtungszeitraum, d.h. von Studienbeginn (CyA 100 %) bis 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) nahm das Kreatinin im Serum jedoch bei allen CyA-Patienten signifikant ab ($p = 0,02$). Bei Patienten, die Tac als Ausgangsmedikation erhielten, blieb das Kreatinin im Serum nach Umstellung auf eine Tac-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS im wesentlichen unverändert (Tac 100 %: $2,02 \pm 0,21$ mg/dl; Tac-frei: $2,19 \pm 0,43$ mg/dl).

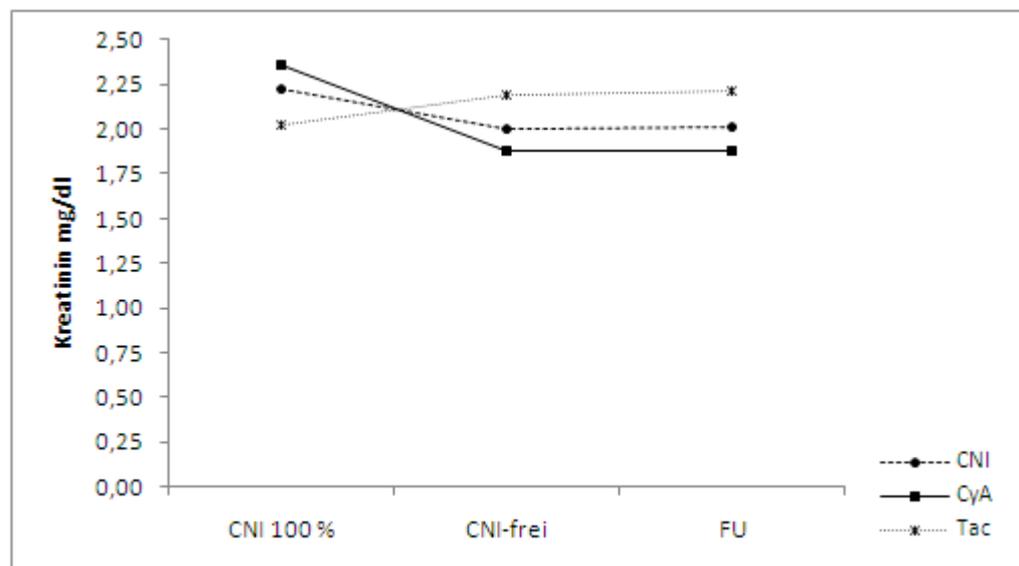


Abb. 20: Verlauf des Serum-Kreatinin in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes ± Standardabweichung.

Kreatinin-Clearance

Wie die Abbildung 25 zeigt, nahm insgesamt die Kreatinin-Clearance von Beginn der Studie unter der vollen CNI-Dosis bis zur Umstellung auf eine CNI-freie Therapie um rund 7,3 ml/min zu (CNI 100 %: $45,50 \pm 18,83$ ml/min; CNI-frei: $53,23 \pm 23,74$ ml/min; $p > 0,05$). Zum Messzeitpunkt 9-11 Monate nach Therapieumstellung blieb die Clearance im Wesentlichen unverändert ($51,54 \pm 24,82$ ml/min). Bei Patienten mit CyA als Ausgangsmedikation, zeigte sich nach Umstellung der Therapie von CyA plus EC-MPS auf Everolimus plus EC-MPS eine signifikante Zunahme der Kreatinin-Clearance um 17,7 ml/min (CyA 100 %: $42,29 \pm 22,34$ ml/min; CyA-frei: $59,96 \pm 27,78$ ml/min; $p = 0,01$). 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) blieb die Kreatinin-Clearance mit $59,00 \pm 26,95$ ml/min unverändert. Im gesamten Beobachtungszeitraum, d.h. von Studienbeginn (CyA 100 %) bis 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) nahm die Kreatinin-Clearance bei den CyA behandelten Patienten signifikant zu ($p = 0,036$). Bei Patienten mit Tacrolimus, führte die Umstellung der Therapie zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der Kreatinin-Clearance (Tac 100 %: $50,64 \pm 11,66$ ml/min; Tac-frei: $42,46 \pm 10,23$ ml/min). Die weitere Beobachtung der Clearance zeigte 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) eine weitere nicht signifikante Abnahme auf Werte von $36,62 \pm 10,94$ ml/min und lag damit unter dem Ausgangsniveau.

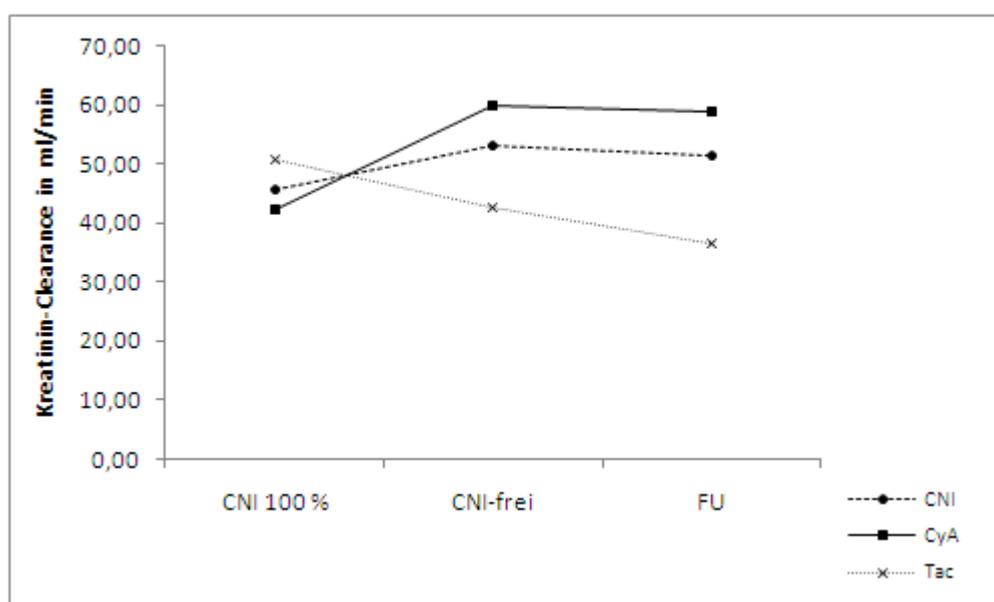


Abb. 21: Verlauf Kreatinin-Clearance in ml/min während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU:

Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes \pm Standardabweichung.

5.7.2 Fettstoffwechsel

Cholesterin

Alle Patienten zeigten nach Umstellung der Therapie von den CNI 100 % zu einer CNI-freien Therapie, einen signifikanten Anstieg des Gesamt-Cholesterins im Blut im Mittel um 24,6 mg/dl (CNI 100 %: $213,61 \pm 41,33$ mg/dl auf CNI-frei: $238,23 \pm 47,33$ mg/dl; $p=0,023$). Wie die Abbildung 26 zeigt, blieb 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) das Cholesterin im Serum unverändert ($240,36 \pm 33,75$ mg/dl). Auch im gesamten Studienzeitraums war ein signifikanter Anstieg des Cholesterin im Serum zu beobachten ($p=0,01$). Bei den mit CyA behandelten Patienten zeigte sich zu Beginn der Studie (100 % CyA) bis nach Therapieumstellung (CyA-frei) eine Zunahme des Cholesterins um 22,4 mg/dl (CyA 100 %: $224,63 \pm 38,98$ mg/dl; CyA-frei $247,00 \pm 33,94$ mg/dl). Nach zusätzlicher Therapie mit Statinen bei 3 von 8 CyA-Patienten nahm im Langzeitverlauf (FU) das Gesamt-Cholesterin im Blut im Mittel wieder ab ($239,42 \pm 41,66$ mg/dl). Bei den mit Tac behandelten Patienten wurde nach Umstellung auf eine CNI freie Therapie (Tac-frei) zunächst ein Anstieg des Cholesterins im Serum um 28,2 mg/dl beobachtet (Tac 100 %: $196,00 \pm 42,84$ mg/dl; Tac-frei: $224,20 \pm 65,61$ mg/dl). Im Gegensatz zu den mit CyA behandelten Patienten, wurde 9-11 Monate nach Therapieumstellung, ein weiterer Anstieg des Gesamt-Cholesterin im Blut im Mittel um 17,7 mg/dl gemessen (FU $241,86 \pm 19,39$ mg/dl).

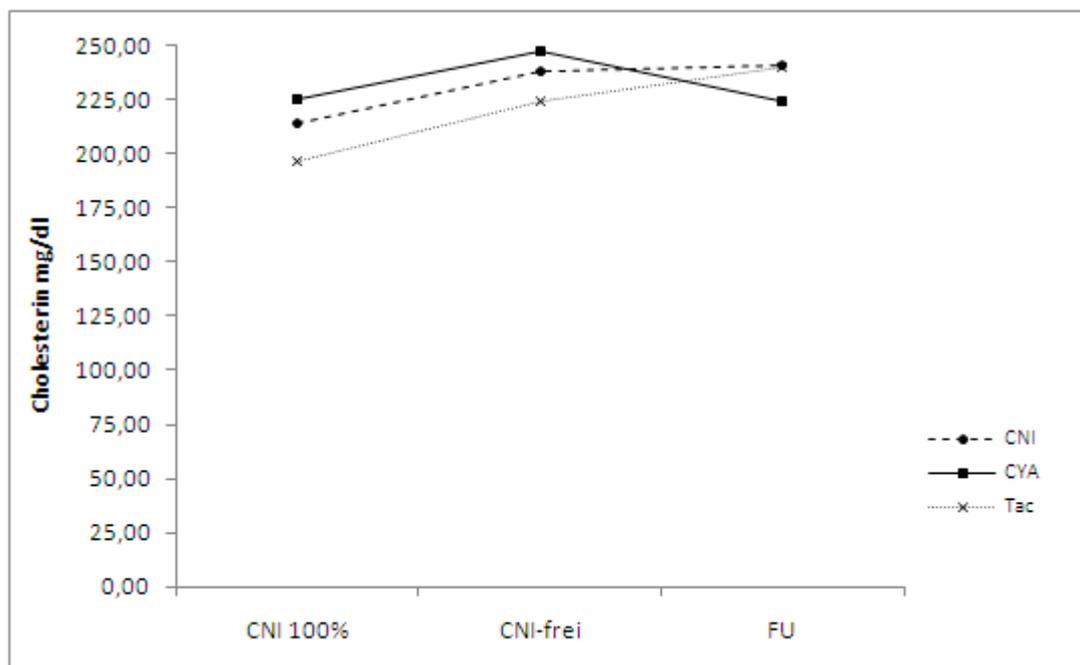


Abb. 22: Verlauf des Cholesterins in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes \pm Standardabweichung.

Triglyceride

Bei Untersuchung der Triglyceride im Serum blieben die Werte aller CNI behandelten Patienten nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie zunächst konstant (CNI 100 %: $239,30 \pm 120,36$ mg/dl; CNI-frei: $235,00 \pm 87,28$ mg/dl). Im Langzeitverlauf (FU) nahmen die Triglyceridwerte im Blut im Mittel um $24,5$ mg/dl ab ($210,53 \pm 68,95$ mg/dl). Die beschriebenen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Wie die Abbildung 26 zeigt, nahm bei Patienten, die CyA als Ausgangsmedikation erhielten, die Triglyceridkonzentrationen nach Wechsel der immunsuppressiven Therapie im Mittel um $11,75$ mg/dl ab (CyA 100 %: $224,00 \pm 122,60$ mg/dl; CyA-frei: $212,25 \pm 66,90$ mg/dl). Messungen, 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU), zeigten eine weitere signifikante Abnahme der Werte im Mittel um $46,63$ mg/dl ($165,62 \pm 30,19$ mg/dl; $p = 0,04$). Bei Patienten, die Tacrolimus erhielten, stieg die Triglyceridblutkonzentration sowohl nach Wechsel der immunsuppressiven Therapie von $263,80 \pm 126,27$ mg/dl (Tac 100 %)

auf $271,40 \pm 111,04$ mg/dl (Tac-frei) als auch im Langzeitverlauf (FU) auf $282,37 \pm 46,76$ mg/dl. Die zuletzt beschriebenen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

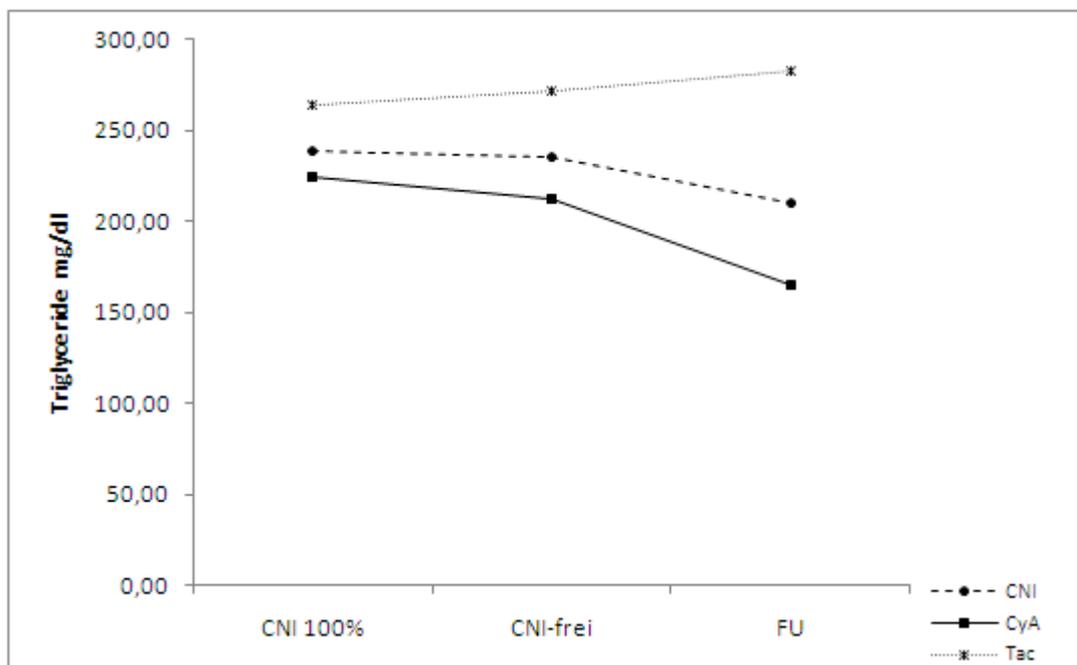


Abb. 23: Verlauf der Triglyceride in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes \pm Standardabweichung.

LDL-Cholesterin

Wie in Abbildung 28 zu sehen, nahm bei allen Patienten, die LDL-Cholesterin-Konzentrationen im Blut nach Absetzen der vollen CNI-Dosis von $122,07 \pm 33,18$ mg/dl auf $151,38 \pm 34,89$ mg/dl signifikant zu ($p=0,01$) sowie 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU: $153,54 \pm 36,42$ mg/dl) ($p > 0,05$). Über den gesamten Messzeitraum nahm die LDL-Cholesterin-Konzentration signifikant zu ($p=0,001$). Die mit CyA behandelten Patienten, zeigten nach Absetzen der CNI eine Zunahme der LDL-Konzentration im Blut um 9,6 mg/dl (CyA 100 %: $133,50 \pm 32,53$ mg/dl; CyA-frei: $143,13 \pm 33,91$ mg/dl). Im weiteren Verlauf (FU) nahm die LDL-Konzentration im Blut weiter zu ($159,31 \pm 36,44$ mg/dl). Auch im gesamten Beobachtungszeitraum nahm die LDL-Konzentration signifikant ($p=0,01$) zu. Unter den mit Tac behandelten Patienten, zeigte sich nach dem Wechsel der immunsuppressiven Therapie auf Everolimus und EC-MPS

(Tac-frei) eine deutliche Zunahme der LDL-Konzentration im Blut von 60,8 mg/dl (Tac 100 %: $103,80 \pm 27,82$ mg/dl; Tac-frei: $164,6 \pm 35,84$ mg/dl). Im weiteren Verlauf (FU) fiel die LDL-Konzentration auf $138,16 \pm 38,69$ mg/dl ab, lag aber über dem Ausgangsniveau.

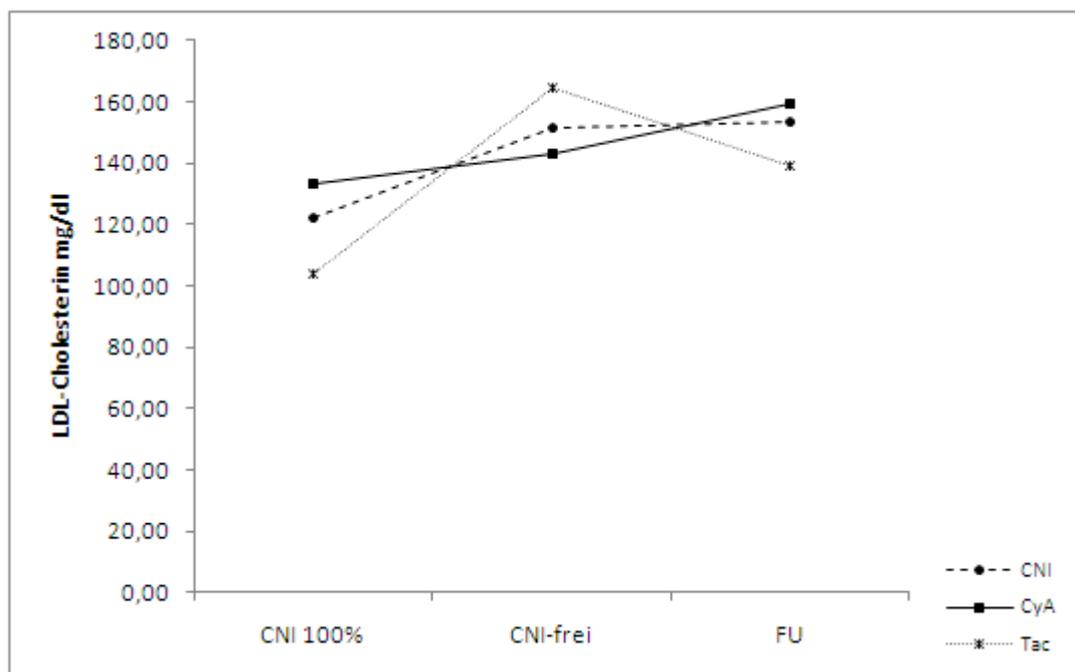


Abb. 24: Verlauf des LDL-Cholesterins in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes \pm Standardabweichung.

HDL-Cholesterin

Bei allen Patienten ließ sich nach Absetzen der CNI eine Zunahme des HDL-Cholesterins im Blut von $47,46 \pm 16,20$ mg/dl (CNI 100 %) auf $51,15 \pm 14,22$ mg/dl (CNI-frei) beobachten (siehe Abbildung 29). 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) stieg die HDL-Cholesterinkonzentration im Blut weiter auf Werte im Mittel von $54,10 \pm 16,24$ mg/dl an. In der CyA Gruppe ließen sich während des gesamten Studienzeitraumes keine wesentlichen Veränderungen der HDL-Konzentration im Blut messen. So blieb die HDL-Cholesterinkonzentration von Studienbeginn bis nach Wechsel der immunsuppressiven Therapie unverändert (CyA 100 %: $50,75 \pm 19,17$ mg/dl; CyA-frei: $51,75 \pm 17,58$ mg/dl). Im Langzeitverlauf nahm die HDL-Cholesterinkonzentration im Serum leicht zu (FU: $54,17 \pm 15,59$ mg/dl). In der Tac Gruppe

wurde eine Zunahme der HDL-Konzentration um 8 mg/dl während der Umstellung von Tac und EC-MPS (Tac 100 %: $42,20 \pm 9,39$ mg/dl) auf Everolimus und EC-MPS (Tac-frei: $50,20 \pm 7,98$ mg/dl) beobachtet. Messungen, 9-11 Monate nach Therapieumstellung (FU) zeigten eine weitere Zunahme der HDL-Cholesterin-Konzentration im Blut um 4,2 mg/dl ($54,00 \pm 19,13$ mg/dl).

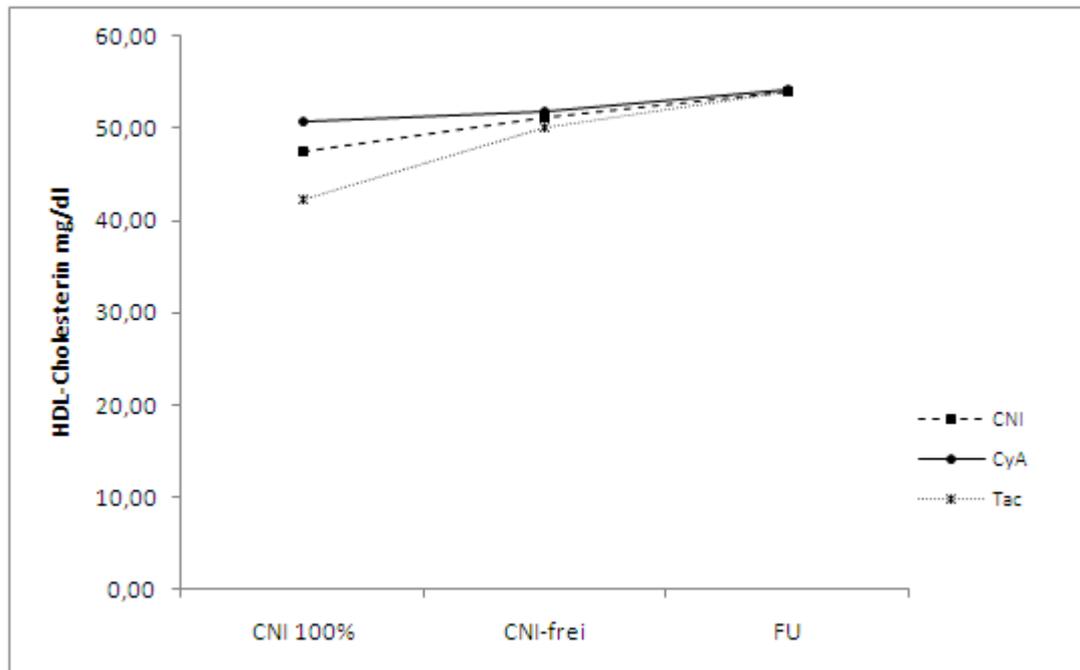


Abb. 25: Verlauf des HDL-Cholesterins in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. CNI + EC-MPS: n=13; CyA: n=8; Tac: n=5. Darstellung des Mittelwertes \pm Standardabweichung.

5.7.3 Entzündungsparameter

Bei allen Patienten ließ sich während der Umstellung von den Calcineurin-Inhibitoren und EC-MPS (CNI 100 %) auf eine CNI-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS ein signifikanter Abfall der Leukozytenzahl im Blut messen ($p=0,016$). Insbesondere bei Patienten, die CyA als Ausgangsmedikation erhielten, konnte ein signifikanter Abfall nach Absetzen der CNI beobachtet werden ($p=0,008$). Bei Patienten mit Tacrolimus als Ausgangsmedikation wurden im gleichen Beobachtungszeitraum keine Veränderungen der Leukozytenzahl im Blut registriert. Im Langzeitverlauf, d.h. 9-11 Monate nach Therapieumstellung auf eine CNI-freie Medikation mit Everolimus und EC-MPS (FU) lag bei allen Studienteilnehmern, unabhängig von der

Ausgangsmedikation, die Leukozytenzahl im Blut wieder im Ausgangsbereich.

In Hinblick auf das C-reaktive Protein befanden sich zum Studienbeginn unter allen Studienteilnehmern 11 von 13 Patienten (CyA: 6/8 Patienten; Tac: 5/5 Patienten) im erforderlichen Referenzbereich (CRP<0,5mg/dl). Sieben Tage nach Absetzen der CNI wurde bei allen Studienteilnehmern ein nicht signifikanter Anstieg des CRP's im Mittel um 0,23mg/dl beobachtet. Dabei stieg vor allem bei den Tac behandelten Patienten das C-reaktiven Proteins im Mittel um 0,54 mg/dl ($p>0,05$) an. Bei den CyA behandelten Patienten hingegen, blieb das CRP im Mittel unverändert. Während 9-11 Monate nach Umstellung (FU) unter allen Studienteilnehmern sowie bei den Tac Patienten ein Rückgang des CRP's gemessen wurde ($p>0,05$) und somit die Zahl der Studienteilnehmer mit normalen CRP nahm wieder zunahm (10/13 Patienten; CyA: 5/8 Patienten; Tac: 5/5 Patienten), blieb bei den mit CyA behandelten Patienten das CRP während des gesamten Untersuchungszeitraumes im Mittel unverändert auf hohem Niveau.

	Messzeitpunkt		
	CNI 100%	CNI-frei	FU
Leukozyten			
insgesamt	6,48 (4,20 - 10,49)	5,67 (4,30 - 10,34)	6,23 (4,06 - 8,46)
CyA	7,03 (4,87 - 10,49)	5,88 (4,48 - 10,34)	6,26 (4,30 - 8,46)
Tac	5,62 (4,20 - 7,88)	5,34 (4,30 - 7,10)	6,19 (4,06 - 8,13)
CRP			
insgesamt	0,48 (0,05 - 2,98)	0,71 (0,10 - 2,67)	0,55 (0,07 - 3,16)
CyA	0,70 (0,05 - 2,98)	0,74 (0,16 - 1,77)	0,74 (0,10 - 3,16)
Tac	0,13 (0,10 - 0,24)	0,67 (0,10 - 2,67)	0,25 (0,70 - 0,41)

Tab. 6: Entzündungsparameter: Leukozytenzahl in /ng und C-reaktive Protein (CRP) in mg/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. Darstellung des Mittelwertes, Minimum und Maximum. Insgesamt: n=13, CyA: n=8, Tac: n=5.

5.7.4 Anämie

Wie die Tabelle 7 zeigt, nahm während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI (CNI 100%) zu einer CNI-freien Therapie und Aufnahme von Everolimus in das Therapie-schema bei allen Patienten, trotz einer begleitenden Anti-anämischen Therapie bei insgesamt 7 von 13 Patienten mit Erythropoietin bzw. Eisenpräparaten, der Hämoglobin-Wert im Blut

signifikant ab ($p=0,001$). Im Zeitraum 9 bis 11 Monate nach Therapieumstellung (FU) wurde bei weiteren 5 Patienten (CyA: 7/8 Patienten; Tac: 5/5 Patienten) mit Anämie eine Therapie mit Erythropoietin (7/12 Anämiepatienten) und/oder Eisenpräparaten (11/12 Anämiepatienten) eingeleitet, die im Langzeitverlauf wieder zu einem tendenziellen Anstieg der Hämoglobin-Werte im Mittel um 0,8 g/dl führte.

	Messzeitpunkt		
	CNI 100 %	CNI-frei	FU
Hämoglobin			
insgesamt	11,66 (9,00 - 13,20)	10,77 (8,30 - 12,10)	11,52 (10,40 - 13,15)
CyA	11,40 (10,50 - 13,20)	10,57 (9,10 - 12,10)	11,91 (10,45 - 13,15)
Tac	12,02 (9,00 - 13,20)	11,04 (8,30 - 12,00)	10,96 (10,40 - 11,73)

Tab. 7: Hämoglobin in g/dl während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS. Messzeitpunkte: 100 % CyA/Tac + EC-MPS, CNI-frei, d.h. 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus + EC-MPS sowie FU: Everolimus + EC-MPS 9-11 Monate nach Therapieumstellung. Darstellung des Mittelwertes, Minimum und Maximum. Insgesamt: n=13, CyA: n=8, Tac: n=5.

5.8 Komplikationen/Nebenwirkungen

In der Tabelle 8 sind alle Ereignisse zusammengefasst, die im gesamten Beobachtungszeitraum mit Beginn der ersten Gabe von Everolimus dokumentiert wurden. Während des Beobachtungszeitraumes traten vor allem respiratorische Nebenwirkungen, wie Bronchitiden mit 16 registrierten Ereignissen bei insgesamt 10 Patienten oder Bronchopneumonien mit 4 registrierten Ereignissen bei insgesamt 3 Patienten, auf. Mit 12 Ereignissen bei 12 Patienten stellen die Anämien ein weiteres häufig dokumentiertes Ereignis dar. Weitere häufige unerwartete Ereignisse waren gastrointestinale Nebenwirkungen, insbesondere Diarrhoen, Harnwegsinfekte, Ödeme und Hypercholesterinämien. Insgesamt wurden während des gesamten Studienzeitraumes 8 notwendige Hospitalisationen dokumentiert. Gründe hierfür waren mit jeweils zwei notwendigen Hospitalisationen, Diarrhoen und Bronchopneumonien sowie mit jeweils einer notwendigen Hospitalisation Harnwegsinfekt und tiefe Beinvenenthrombose. Weiterhin wurde während des gesamten Beobachtungszeitraums wegen einer progredienten Proteinurie eine Biopsie durchgeführt, die eine Rejektion zu Tage brachte. Bei einem anderen Patienten führte eine progrediente Proteinurie zum vorzeitigen Absetzen der Everolimus Medikation. Ein weiterer Grund, der zum

vorzeitigen Absetzen der mTOR-Inhibitoren führte, war eine Everolimus induzierte Pneumonitis. Im Untersuchungszeitraum ist kein Patient verstorben und kein Transplantverlust aufgetreten.

	Anzahl der Ereignisse			Anzahl der Patienten
	absolut	Prozent %		absolut
Renale Funktion				
Erhöhtes Kreatinin	4	30,77		4
Proteinurie	4	30,77		4
interstitielle Nephritis	1	7,69		1
Gastrointestinale Nebenwirkungen				
Diarrhö	9	69,23	**	7
Übelkeit	4	30,77		4
Erbrechen	1	7,69		1
Sodbrennen	1	7,69		1
Respiratorische Nebenwirkungen				
Bronchopneumonie	4	30,77	**	3
Bronchitis/ respiratorischer Infekt	16	123,08	*	10
Hämatologischen Nebenwirkungen				
Leukopenie	2	15,38		2
Anämie	12	92,31		12
Opportunistische Infektionen				
Herpes simplex	3	23,08		3
Soor	1	7,69		1
Harnwegsinfekt	6	46,15	*	2
Endokrine / Metabolische Störungen				
Hyperlipidämie	1	7,69		1
Hypercholesterinämie	5	38,46		5
Hypertriglycerinämie	1	7,69		1
Hyperurikämie	3	23,08		2
Störungen im Elektrolythaushalt				
Hypocalcämie	2	15,38		2
Hypokaliämie	2	15,38		2
Hyperkaliämie	3	23,08		3
Hypernatriämie	1	7,69		1
Hypophosphatämie	1	7,69		1
Hypermagnesämie	1	7,69		1
Azidose	2	15,38		2

	Anzahl der Ereignisse			Anzahl der Patienten
	absolut	Prozent %		absolut
kardiovaskuläre Nebenwirkungen				
arterielle Hypertonie	3	23,08		3
arterielle Hypotonie	1	7,69		1
tiefe Venenthrombose	1	7,69	*	1
Mitral-/Trikusspidalinsuffizienz	2	15,38		1
pulmonale Hypertonie	1	7,69		1
Ödeme	6	46,15		5
Thrombophlebitis	2	15,38		2
Haut- /Schleimhauterkrankungen				
Akne	4	30,77		4
Analfissur	1	7,69	*	1
Aphten	3	23,08		2
Dermatitis	5	38,46		4
Gingivitis	1	7,69		1
Parodontitis	1	7,69		1
Juckreiz	1	7,69		1
Hämorrhoiden	1	7,69		1
Wundheilungsstörungen	1	7,69		1
Epistaxis	2	15,38		2
Muskuloskelettale System				
Ischialgie	1	7,69		1
Lumbargo	3	23,08		3
Achillessehnenruptur	1	7,69		1
Meniskusruptur	1	7,69		1
Andere				
Ovarialzysten	1	7,69		1
Kopfschmerz	1	7,69		1
Otitis externa	2	15,38		2
Rejektion	1	7,69	*	1
Therapieabbruch wegen Nebenwirkungen	2	15,38		2
Hospitalisationen	8	61,54		7

Tab. 8: Anzahl der registrierten Ereignisse während des gesamten Studienzeitraumes unter der immunsuppressiven Therapie mit 100 % CNI + EC-MPS, 7 Tage nach Absetzen der CNI-Medikation unter dem Einfluss von Everolimus und EC-MPS sowie 9-11 Monate nach Absetzen nach Umstellung. Darstellung der Anzahl der absoluten registrierten Ereignisse, Prozentualer Anteil (%) in Bezug auf die Gesamtpatientenzahl, *Sternchen: Anzahl der notwendigen Hospitalisationen: **: 2 notwendige Hospitalisationen, *: 1 notwendige Hospitalisation. n=13.

6 Diskussion

Die Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus spielen eine bedeutende Rolle in der Verbesserung der Überlebensrate von Transplantaten, insbesondere tragen sie zur Reduzierung von akuten Rejektionen bei (54). Eine häufige Nebenwirkung beider Medikamente ist die Nephrotoxizität, die klinisch relevant und oft dosislimitierend ist (27). Um die CNI-induzierte Nephrotoxizität zu minimieren oder zu umgehen, werden in der Praxis CNI entweder reduziert und mit neuen Immunsuppressiva kombiniert, über einen definierten Zeitraum ausgeschlichen oder gänzlich vermieden (54). Eine Reduktion oder eine Elimination der CNI jedoch, kann das Risiko einer akuten Abstoßung erhöhen. Gerade wegen ihrer geringen therapeutische Breite, ihrer großen intra- und interindividualen Variabilität (Pharmakokinetik) und ihrer ausgedehnten Interaktionen mit anderen Substanzen, werden für CNI die Überwachung der Blutspiegel zur Optimierung der Therapie, empfohlen (55). Somit soll auf der einen Seite der Verlust des neuen Organs verhindert werden und auf der anderen Seite, die CNI-induzierte Nephrotoxizität überwacht werden. Aufgrund der Limitationen der pharmakokinetischen Parameter bezüglich der Beurteilung der Effektivität, die sich darin äußern, dass sich z.B. bei gleichen Blutspiegeln in verschiedenen Patienten Rejektionen einerseits und Überimmunsuppression andererseits zeigen, hat zum Konzept des pharmakodynamischen Monitorings geführt (46, 56).

Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden über einem Zeitraum von 12 Monaten die Auswirkungen der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von den Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A/Tacrolimus und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS sowohl auf die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Parameter untersucht.

6.1 Pharmakokinetik CN-Inhibitor: Ciclosporin A/Tacrolimus versus mTOR-Inhibitor: Everolimus

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich sowohl zu Studienbeginn unter der vollen CNI Medikation als auch nach Reduzierung der CyA bzw. Tac - Dosis um 50 % und Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema, keine Veränderungen der dosisnormalisierten CyA-Blutkonzentrationen (C₀) messen ließen. Messungen der Tac-Blutkonzentrationen zeigten jedoch einen tendenziellen Anstieg nach Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema.

Unsere Beobachtungen stehen hierbei im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien. So wurde bereits gezeigt, dass eine Kombinationstherapie mit Ciclosporin A und Everolimus die

Pharmakokinetik von CyA nicht beeinflusst (57-59). Auch Kovarik et al. (60) beobachteten in ihrer Studie, dass eine Komedikation mit CyA zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Everolimus führt, nicht jedoch zu einer veränderten CyA Pharmakokinetik. In Bezug auf Everolimus ließen sich unter der Kombinationstherapie mit CyA tendenziell, jedoch nicht signifikant höhere dosisnormalisierte Everolimus-Blutkonzentrationen messen als unter der CyA-freien Therapie. Die Ursache für die unter der CyA-Therapie messbare höhere dosisnormalisierte Everolimus-Blutkonzentration ist die gemeinsame Biotransformation von CyA und Everolimus über das Zytochrom P450-Isoenzym CYP3A4 bzw. 3A5. Weiterhin sind sie beide Substrate für das P-Glykoprotein und bieten somit theoretisch die Voraussetzung zur Interaktion (57, 61). CyA und Everolimus konkurrieren um das P450-Isoenzym und beeinflussen somit gegenseitig ihre Clearance. Die CyA fungiert dabei als moderater CYP 3A4 bzw. 3A5 Inhibitor für Everolimus. Unsere Beobachtungen bestätigen eine unter der CyA-Co-Medikation reduzierte Clearance für Everolimus und mit der Folge einer scheinbar erhöhten Bioverfügbarkeit an Everolimus. Unsere Ergebnisse zeigen, dass beim Absetzen von CyA mit einer Abnahme der Gesamtexposition von Everolimus zu rechnen ist. Aufgrund der Unterschiede der Dosierung von CyA und Tacrolimus und damit der am metabolisierenden Enzym konkurrierenden Stoffmenge, ist bei beiden Substanzen mit unterschiedlichen Effekten zu rechnen. Das ist in Everolimus-Dosierungsplänen zu berücksichtigen und beeinflusst auch den Spiegelverlauf von Tac bei Einführung von Everolimus. So konnte beobachtet werden, dass während der Konversionsphase bei Reduzierung der CNI Dosis um 50 % etwa gleichbleibende dosisnormalisierte CyA-Blutkonzentrationen aber tendenziell eine Zunahme der Tacrolimus-Blutkonzentration auftraten. Folglich ist daher zu beachten, dass gerade in der Umstellungsphase sowohl die CNI-Spiegel als auch die Everolimuspiegel durch ein intensiviertes therapeutisches Drug Monitoring zu beobachten sind und durch gleichzeitige Dosisveränderungen der Interaktionspartner mit nicht dosisproportionalen bei der Dosisanpassung gerechnet werden muss.

6.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von EC-MPS

Ziel dieser Arbeit war weiterhin, den Einfluss des Wechsels der immunsuppressiven Therapie von CNI und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS auf die pharmakokinetischen Parameter MPA und MPAG sowie auf den pharmakodynamischen Parameter IMPDH, zu untersuchen.

Im Gegensatz zum therapeutischen Drug Monitoring der CNIs und mTOR-Inhibitoren, das auf einer Messung der Talspiegel und damit einmaligen Blutentnahme im Tagesverlauf beruht, kann die Exposition für die MPA-Therapie nicht über einmalige Spiegelmessungen mit hinreichender Sicherheit beschrieben werden. Daher wurden zur Beurteilung der MPA-Pharmakokinetik und Pharmakodynamik sowohl unter der Kombinationstherapie CNI und EC-MPS als auch nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS, mehrere Blutproben, in definierten Zeitabständen innerhalb von 0-12 Stunden nach Medikation entnommen, so dass Tagesprofile hinsichtlich der MPA und MPAG-Blutkonzentration sowie der IMPDH-Aktivität, dargestellt werden konnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Zeitverläufe von MPA und MPAG ähnlich waren, wobei sich der Verlauf von MPAG weitgehend als zeitverzögerte Kurve von MPA präsentierte. So zeigte sich im Tagesverlauf sowohl unter dem Einfluss der vollen CyA-Dosis und EC-MPS als auch unter der CyA-freien Therapie mit Everolimus und EC-MPS ein Anstieg der MPA-Blutkonzentration nach 2,5 bzw. 3 Stunden sowie nach 9 bis 12 Stunden. Die maximale MPAG-Blutkonzentration stellte sich unter der vollen CyA-Dosis und EC-MPS Therapie hingegen zeitverzögert nach 4 Stunden bzw. 9 Stunden im Vgl. zu der CyA-freien Therapie, dar. Diese Beobachtungen können durch den enterohepatischen Kreislauf von MPA erklärt werden. Der erste Anstieg von MPA spiegelt die Reabsorption von EC-MPS im Dünndarm wider. Nach der Aufnahme im Dünndarm wird MPA durch die Uridine-Diphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT), die hauptsächlich in der Leber als auch im gastrointestinalen Trakt zu finden ist, metabolisiert. Dabei entsteht MPAG (62, 63). MPAG wird nun zu 85 % über die Nieren ausgeschieden, der Rest wird in die Galle abgegeben. Mit Hilfe des Multidrug-resistance-associated protein 2 (MRP2) gelangt es wieder in den Dünndarm. Dort wird es durch Bakterien deglucuronidiert, so dass erneut MPA entsteht, sofort reabsorbiert und dem Kreislauf wieder zugeführt wird (64). Dieser enterohepatische Kreislauf findet sich im zweiten Anstieg der MPA-Konzentration nach 9-12 Stunden wieder und trägt zu 10-60 % zur Gesamtexposition an MPA bei (62). Der durch den enterohepatischen Kreislauf auftretende zweite Peak und seine Variabilität sowohl hinsichtlich des Ausmaßes als auch des zeitlichen Auftretens ist ein

wichtiger Grund für die Unsicherheit bei der Beurteilung von Talspiegeln als surrogat-Marker für die Gesamtexposition im Dosisintervall.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, einen Vergleich zwischen den mit CyA und Tac behandelten Patienten in Bezug auf die MPA-Blutkonzentration vorzunehmen, da in der Gruppe der mit Tac behandelten Patienten der Datensatz nur eines Patienten vorlag, dagegen in der CyA Gruppe, Datensätze von 8 Patienten.

Vor und nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA auf Everolimus wurde kein qualitativer Unterschied im Verlauf der MPA sowie MPAG Blutkonzentration im Tagesprofil (0-12 h) beobachtet. Es zeigte sich jedoch unter der Kombinationstherapie mit CyA im Vgl. zur Kombinationstherapie mit Everolimus eine tendenziell quantitativ geringere MPA-Blutkonzentration im Tagesverlauf (AUC_{0-12h}). Umgekehrt ließen sich signifikant niedrigere MPAG-Blutkonzentrationen im Tagesverlauf (AUC_{0-12h}) unter einer CyA-freien Therapie mit Everolimus ermitteln im Vgl. zu den Ausgangsmessungen vor dem Absetzen des CyA. Die unter der CyA-Therapie gemessenen tendenziell geringeren MPA-Blutspiegel zeigen, dass zwischen den CNI und EC-MPS Wechselwirkungen bestehen und mit dem enterohepatischen Kreislauf von MPA/MPAG interferieren. CyA beeinflusst das MRP2 Protein und verhindert die MRP2 vermittelte MPAG Sekretion in die Galle und damit die im Dünndarm stattfindende Deglucuronidierung von MPAG. Die Folge ist ein Abfall des MPA-Blutspiegels (65, 66, 67). Gleichzeitig steigt die Konzentration von MPAG an. Die unter der CyA-Therapie geringer gemessene MPA-Blutkonzentrationen, stehen im Einklang mit anderen Studienergebnissen (65, 68). Hier wurde gezeigt, dass die MPA-Exposition signifikant geringer bei Patienten war, die eine Kombination aus MMF und CyA erhielten, im Vergleich zu den Patienten, die MMF in Kombination mit einem mTOR-Inhibitor (SRL/TAC) oder allein erhielten (69-76). Die Beeinflussung der MPA-Blutspiegel wiederum, hat auch Auswirkungen auf die IMPDH-Aktivität. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass mit einem geringeren MPA-Blutspiegel unter der vollen CNI-Dosis und EC-MPS Kombinationstherapie im Vgl. zu der CNI-freien Medikation, eine höhere IMPDH-Aktivität einhergeht. So ließ sich unter der Kombinationstherapie mit CNI und EC-MPS eine signifikant höhere IMPDH-Aktivität im Tagesverlauf messen als im Vgl. zu der Kombinationstherapie mit Everolimus und EC-MPS.

Bei Vergleich der Kurvenverläufe von MPA und IMPDH zeigte sich sowohl unter CyA als auch unter Everolimus ein ähnlich zeitverzögerter Verlauf. Diese Beobachtungen verdeutlichen die

Reversibilität und damit die Abhängigkeit vom Verteilungsverhalten der Wirkung von MPA. MPA hemmt die IMPDH, die die Umwandlung von Inosin-5-Monophosphat in Xanthosin-5-Monophosphat katalysiert. Es ist das Geschwindigkeit-bestimmende Enzym der de-novo-Synthese von Guanosinnukleotiden. Wird die IMPDH durch MPA gehemmt, kommt es wiederum zur Hemmung der Purinbiosynthese und die Proliferation von Lymphozyten unterbleibt.

Untersuchungen zu möglichen Korrelationen im Rahmen dieser Arbeit sollten zeigen, ob über die Messung der IMPDH-Aktivität Rückschlüsse auf die Proliferationsrate der Lymphozyten und damit auch auf das Risiko einer möglichen akuten Rejektion möglich sind. Es wurde beobachtet, dass zwischen dem MPA-Talspiegel und der Lymphozytenproliferation nach Absetzen der CyA ein signifikant negativer Zusammenhang besteht. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass unter der Kombinationstherapie mit Everolimus und EC-MPS signifikant positive Korrelationen zwischen dem dosisnormalisiertem MPA-Talspiegel (0h) und der Proliferationsrate der Lymphozyten sowie zwischen der IMPDH-Aktivität und der Lymphozytenproliferationsrate bestehen. Das lässt den Schluss zu, je höher die IMPDH-Aktivität ist, desto mehr Purinnukleotide stehen für die Lymphozytenproliferation zur Verfügung, die Folge ist eine höhere Proliferationsrate. Damit ist noch nicht erklärt, warum dieser Zusammenhang sich unter einer CNI-basierten Therapie nicht so deutlich darstellt. Möglicherweise spielt hier der MPA-unabhängige antiproliferative Effekt der CNI vermittelt durch die Zytokinhemmung eine größere Rolle. Einschränkung ist zu vermerken, dass wir nur zum Zeitpunkt der Talspiegel die Proliferation gemessen haben und die MPA-Talspiegel nicht mit der MPA-AUC korrelieren (77).

Im Rahmen einer Kombinationstherapie mit CyA kommt es durch die bekannte Wechselwirkung mit EC-MPS und die durch sie bewirkte Reduzierung der MPA-AUC bei vielen Patienten nur zu einer unzureichenden MPA-Exposition (78). Hierbei hat sich in einigen Studien gezeigt (72, 79) dass eine Erhöhung der MPA-AUC über $30 \mu\text{g}\cdot\text{h ml}^{-1}$ mit einer effektiven Rejektionprophylaxe einhergeht. Auch Van Gelder et al. (81) zeigten an 154 nierentransplantierten Patienten, dass das Auftreten akuter Rejektionen signifikant mit der Höhe der MPA-AUC im Zusammenhang steht. In einer Gruppe mit niedrigen MPA-AUC-Zielspiegeln traten 27,5 % Biopsie gesicherte Rejektionen, hingegen in der Gruppe mit mittleren MPA-AUC-Zielspiegeln bzw. hohen Zielspiegeln nur in 14,9 % bzw. 11,5 % Rejektionen auf. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit innerhalb der Studienpopulation eine hohe interindividuelle Spannweite der MPA-AUCs_{0-12h} trotz fester bzw. einheitlicher EC-MPS Dosierung beobachtet. Diese hohe interindividuelle Variabilität der MPA-AUC_{0-12h} sowie die durch CyA-induzierte Reduzierung der MPA-AUC_{0-12h} stellen

einen guten Grund für die Durchführung eines therapeutischen Monitorings dar, um die individuelle Immuntherapie zu optimieren und somit eine Verbesserung der Transplantatfunktion zu bewirken (81). Für die Durchführung des Monitoring wäre die Bestimmung der freien MPA-Konzentration optimal. In den üblich eingesetzten Dosierungen wird MPA zu 97 % an Albumin gebunden (82). Jedoch ist nur der nicht gebundene Anteil pharmakologisch aktiv. Die Messung des nicht gebundenen Anteils ist aber routinemäßig nicht möglich. Auch erweist sich ein TDM von EC-MPS als schwierig, da bei dem mikroverkapselten EC-MPS es zu einer verzögerten Freisetzung von MPA im Dünndarm anstatt wie bei MMF zu einer raschen Freisetzung im Magen kommt. Die Folge ist eine im Vgl. zu MMF zeitverzögerte messbare maximale Plasmakonzentration an MPA. Diese hohe interindividuelle Variabilität der Absorption durch die wechselnde Freigabe von EC-MPS vom Magen bis zum Dünndarm hat eine hohe interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Profile zur Folge, die ein TDM erschweren (77). Eine andere Möglichkeit wäre die Messung der MPA-AUC_{0-12h} Profile, die sich in der Praxis jedoch als sehr zeitaufwendig und kostspielig erweisen. Eine Lösung wäre wie bereits in der FDCC-Studie durchgeführt, eine punktuelle, reduzierte Bestimmung der MPA Gesamtexposition (78). Eine andere Lösung wäre eine intensives PD-Monitoring, die Messung der IMPDH-Aktivität (AEC_{0-12h}). Sommerer et al. (80) beobachteten bei ihren Patienten, die eine niedrige IMPDH-Aktivität aufwiesen, eine erhöhte Rate an Infektionen, trotz ähnlicher MPA-Exposition. Obwohl mit Etablierung einer geeigneten Methode der IMPDH-Aktivitätsmessungen methodische Grenzen in den letzten Jahren überwunden werden konnten, hat die Bestimmung der IMPDH-Aktivität aber bisher noch keinen Eingang in die klinische Routine gefunden (53).

6.3 Pharmakodynamik Ciclosporin A versus Tacrolimus

6.3.1 IL-2 und TNF- α Expression in CD3⁺ Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich zwischen dem Ausmaß der Hemmung von Ciclosporin A und Tacrolimus auf die IL-2 und TNF- α Expression CD3⁺ Zellen vorgenommen. In der Literatur beschriebene Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Kombinationstherapie mit CNI und MMF zeigten, dass unter zusätzlicher Einnahme von MMF der Anteil IL-2 positiver T-Lymphozyten sowohl in Kombination mit CyA als auch mit Tac stärker gesenkt werden konnte, im Vergleich zu einer CNI-Monotherapie (83). Ein Projekt unserer Arbeitsgruppe um Kamar et al. (45, 84) zeigte, dass MMF jedoch keinen Effekt auf die Bildung der Zytokine wie IL-2 und

TNF- α hat. Deshalb lässt sich dieser Effekt eher über die hemmende Wirkung auf die klonale Expansion aktivierter Lymphozyten erklären. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Anteils an IL-2 und TNF- α exprimierenden T-Lymphozyten zwischen den mit CyA und Tac behandelten Patienten. Dennoch scheint tendenziell die IL-2 und TNF- α Synthese unter der Tac-Medikation geringer zu sein als unter CyA. Im Unterschied zu CyA, welches an das Immunophilin „Cyclophilin“ bindet, bildet Tac einen Komplex mit dem Immunophilin „FK-506-binding-protein 12“, der eine höhere Affinität zu Calcineurin besitzt, als der Ciclosporin A/Cyclophilin-Komplex (28). In einer Studie von Barten et al. (85) wurde ein Wechsel der immunsuppressiven Therapie von CyA zu Tac vorgenommen. Pharmakodynamische Messungen und T-Zell-Funktionsmessungen mittels Durchflusszytometrie, zeigten bereits nach einmaliger Tac-Gabe einen Abfall der Zytokinexpression (IL-2 und TNF- α), die nach dreitägiger Tac-Medikation das Signifikanzniveau erreichte.

6.3.2 Lymphozyten-Proliferationsrate

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin Vergleiche zwischen dem Ausmaß der Hemmung von CyA und Tac auf die Proliferationsrate von Lymphozyten unternommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen in ihrer Stärke der Hemmung der Lymphozytenproliferationsrate. Dennoch scheint unter der Tac Medikation die Lymphozytenproliferationsrate geringer im Vgl. zu CyA sein. Die Ergebnisse erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau und sind möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl nur als eine Tendenz zu werten. Dass Tac eine vermutlich stärkere Wirkung auf die Hemmung der Lymphozytenproliferationsrate hat, wurde in anderen Studien bereits beschrieben. Bei Barten et al. (85) wurde nach dreitägiger Tac-Medikation von 3 mg/d, im Vergleich zu der CyA-Medikation, eine signifikant geringe Proliferationsrate der Lymphozyten gemessen. Unsere Arbeitsgruppe um Böhler et al. (45) erzielte in Con A stimuliertem Blut unter Tac-Medikation eine stärkere Hemmung der Proliferationsrate im Vergleich zu der CyA-Medikation. Die Stärke der Hemmung war dabei dosisabhängig. Während unter Tac mit einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ eine 82 %-ige Hemmung erzielt wurde, benötigte man unter CyA für eine 75 %-ige Hemmung, Konzentrationen von 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Somit zeigte Böhler et al. eine auf molekularer Basis stärkere Wirkung von Tac versus CyA. Eine mögliche Erklärung ist beispielsweise, die hohe Affinität des Tac-FKBP-12 Komplexes an Calcineurin. Die Folge ist eine Hemmung der IL-2 abhängigen Proliferation der Lymphozyten.

6.3.3 CD25 und CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten

Ferner wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Anteil CD25 als auch CD71 positiver T-Lymphozyten sowohl unter der CyA als auch unter Tac-Medikation sich nicht unterschieden. Entsprechend unserer Ergebnisse zeigte auch Barten et al. (85, 86), dass die Umstellung der CyA-Medikation auf eine Tac-Medikation keinen Einfluss auf die Höhe des Anteils CD25 positiver Zellen hat. Gewiss ist unsere Beobachtung in Anbetracht der geringen Fallzahl kritisch zu betrachten. Hier sind weitere pharmakodynamische Untersuchungen mit einer größeren Patientenkohorte notwendig, um eine eindeutigere Aussage treffen zu können.

6.4 Pharmakodynamik CNI + EC-MPS versus mTOR + EC-MPS

6.4.1 IL-2 und TNF- α Expression in CD 3⁺ Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der prozentuale Anteil, der mit PMA und Ionomycin stimulierten IL-2 und TNF- α exprimierenden T-Lymphozyten, nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS anstieg. Die beobachteten Unterschiede waren möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl und recht großen Streuung nicht signifikant. Zudem wurden die pharmakodynamischen Untersuchungen zum Zeitpunkt des Talspiegels bestimmt und damit zum Zeitpunkt des geringsten pharmakologischen Effekts. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Kombinationstherapie mit einem CNI die IL-2 und TNF- α exprimierenden Zellen wirksamer zu hemmen scheinen, als eine Kombinationstherapie mit einem mTOR-Inhibitor. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die durch CNI bewirkte vermutlich stärkere Hemmung des prozentualen Anteils IL-2 und TNF- α positiver CD3 Lymphozyten, lassen sich mit der in der Literatur beschriebenen Wirkungsweise der CNI erklären. Bei CyA und Tac steht die Hemmung der Synthese von Zytokinen, durch Regulation der Aktivität NFAT-regulierter Gene, insbesondere von IL-2 und des TNF- α in T-Lymphozyten, im Vordergrund (87, 88). Everolimus als mTOR-Inhibitor hemmt die Zellproliferation ohne dabei einen Einfluss auf die IL-2 Synthese zu nehmen (45). Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Ergebnis, wird auch durch andere Studienergebnisse gestützt (45, 47, 85, 89). So beobachtete unsere Arbeitsgruppe um Böhler et al. (45) in einem *ex vivo* vs. *in vitro* Vergleich unter Einsatz von CyA oder Tac, eine Reduzierung des prozentualen Anteils IL-2 und TNF- α exprimierender Zellen, während der mTOR-Inhibitor Sirolimus keinen Einfluss auf die Zytokinsynthese hatte. Van den Berg

et al. (89) zeigten an 13 nierentransplantierten Patienten sowie an 21 lebertransplantierten Patienten, die mit CNI behandelt wurden im Vgl. zur Kontrollgruppe, ebenfalls eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an IL-2 produzierenden T-Zellen (23 % versus 59,0 %). Weitere Beobachtungen unserer Arbeit waren, dass 9-11 Monate nach Therapieumstellung der prozentuale Anteil IL-2 und TNF- α exprimierender Zellen entgegen unserer Erwartungen wieder leicht abnahm. Eine Rückumstellung auf CNI z.B. aufgrund einer mTOR-Unverträglichkeit als Ursache, kann ausgeschlossen werden. Mögliche Gründe hierfür können die kleine Fallzahl, die sehr große Spannweite und hohe intra- und interindividuelle Variabilität des Assays sowie die besonders zum Tragen kommende Fluktuation in der Assay-Durchführung, sein.

Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Korrelationsberechnungen für die Zytokinabhängigkeiten, zeigten signifikante positive Zusammenhänge zwischen den prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen unter der vollen CNI (CyA/Tac)-Dosis, nach Aufnahme von Everolimus in das Therapieschema und gleichzeitiger Reduzierung der CyA Medikation um 50 % sowie 9-11 Monate nach Therapieumstellung auf eine CNI-freie Therapie. Die sowohl unter CNI als auch unter mTOR-Inhibitoren bestehende Korrelation zwischen IL-2 und TNF- α positiver CD3⁺ Zellen lässt sich durch ihre Regulation des nukleären Transkriptionsfaktors sowie ihrer gleichen Stimulation erklären. Wie bereits beschrieben, kommt es nach Aktivierung von T-Lymphozyten zu einem Anstieg an intrazellulärem Calcium. Das dadurch aktivierte Calcineurin dephosphoryliert NFAT, das nun in den Zellkern gelangen kann, um dort die Transkription u.a. von IL-2 und TNF- α zu initiieren. Durch die CNI CyA und Tac kommt es zu einer Hemmung von Calcineurin, die Dephosphorylierung des hoch phosphorylierten Transkriptionsfaktors NFAT wird unterbunden. Die Folge ist eine Inaktivierung des NFAT und somit die gemeinsame Synthese von IL-2 und TNF- α in aktivierten Lymphozyten. Dass die Proteinkinase mTOR ebenfalls einen Einfluss auf die Phosphorylierung von NFAT hat, beschrieb die Arbeitsgruppe um Yang et al. (90). Sie zeigten, dass die Proteinkinase mTOR sowohl an der Gleichgewichtsregulierung an phosphorylierten NFAT im Zytosol als auch im Nucleolus beteiligt ist. mTOR phosphoryliert im Zytosol NFAT. Nach Aktivierung der T-Lymphozyten gelangt das durch Calcineurin wieder dephosphorylierte NFAT in den Nucleolus. Nach Transkription bewirkt mTOR eine erneute Rephosphorylierung des NFAT, so dass nun NFAT-P zurück ins Zytosol gelangen kann. Yang et al. zeigten weiterhin, das Rapamycin, als mTOR-Inhibitor die

Rephosphorylierung von NFAT u.a. im Nucleolus hemmt. Die Folge ist ein Anstieg an dephosphorylierten NFAT im Nucleolus, die Transkription von IL-2 und TNF- α kann gleichermaßen weiterhin stattfinden. IL-2 stellt den wichtigsten Wachstumsfaktor für T-Zellen dar. Durch IL-2 werden B-Lymphozyten zur Antikörperbildung stimuliert und es werden zytolytische Reaktionen z.B. durch NK-Zellen ausgelöst. Somit spielt IL-2 eine entscheidende Rolle bei Abstoßungsreaktionen. TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin des Immunsystems, das sowohl von aktivierten Monozyten als auch Makrophagen und Lymphozyten gebildet wird. Es kann die Zelldifferenzierung, Ausschüttung anderer Zytokine anregen sowie Apoptose und Zellproliferation von Zellen bewirken. Ferner scheint TNF- α die Expression der IL-2 Rezeptoren in aktivierten T-Lymphozyten zu steigern (91). Starke IL-2 als auch starke TNF- α Expressionen in stimulierten T-Zellen erhöhen das Risiko, eine Abstoßungsreaktion auszulösen. Rink und Kirchner (92) fanden zudem eine positive Beziehung zwischen einem hohen TNF- α Spiegel und einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko. Andere Studien lieferten Beweise dafür, dass TNF- α eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt (93, 94). So ist TNF- α zum Beispiel an der Entstehung von Nierenzellkarzinomen oder Melanomen beteiligt (95). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen über die Rolle der Zytokine IL-2 bei Abstoßungsreaktionen und TNF- α bei der Entstehung von Tumoren, resultiert die Frage, ab welchem prozentualen Anteil IL-2 und TNF- α exprimierender T-Lymphozyten, sowohl unter einer CNI- als auch unter einer mTOR-Inhibitoren Medikation, mit einer erhöhten Rate an Abstoßungsreaktionen zu rechnen ist oder sie die Entstehung von Tumoren begünstigen. In dieser Studie wurde nur eine Abstoßungsreaktion registriert. Untersuchungen der Höhe der IL-2 und TNF- α exprimierender T-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Rejektion, 9-11 Monate nach Therapieumstellung, zeigten bei dem betroffenen Patienten im Median die stärkste IL-2 Expression im Vgl. zu den anderen Patienten. Auch die Höhe der TNF- α exprimierender T-Lymphozyten lag bei diesem Patienten über dem Median. Durch pharmakodynamische Messungen von IL-2 und TNF- α , könnten während der Umstellung von CNI auf einen mTOR-Inhibitor zusätzliche Informationen zum möglichen Risiko einer Abstoßungsreaktion bzw. Tumorentstehung der einzelnen Patienten gewonnen werden. Dazu sind jedoch weitere pharmakodynamische Untersuchungen und Studien mit einer höheren Fallzahl und eine längere Beobachtungszeit erforderlich.

6.4.2 Lymphozyten-Proliferationsrate

Unsere Arbeitsgruppe um Böhler zeigte bereits, dass mit ConA stimuliertem Blut gesunder Kontrollgruppen Proliferationsraten von 18 % aufwiesen (45). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten keine Veränderungen der Lymphozytenproliferationsrate während des gesamten Beobachtungszeitraums. Die Ergebnisse der Arbeit zeigten jedoch, dass sowohl unter der Kombinationstherapie mit CNI als auch unter der Kombinationstherapie mit einem mTOR-Inhibitors die Lymphozytenproliferationsrate auf einem quantitativ sehr niedrigen Niveau lag, so dass insgesamt von einer deutlichen Hemmung der Proliferation ausgegangen werden kann. Die beobachteten Ergebnisse der Hemmung der Lymphozytenproliferationsrate, lassen sich durch den Wirkmechanismus der verabreichten Substanzgruppen erklären. Die CNI hemmen in der frühen Phase der Aktivierung die Produktion von IL-2 durch T-Zellen und nachfolgend die IL-2 vermittelte Lymphozytenproliferation. Everolimus hingegen hemmt direkt die Zellproliferation über die Blockade von mTOR, was zu einer verminderten Progression aus der G-1 in die S-Phase des Zellzyklus führt. In dieser Phase erfolgt die Replikation der Lymphozyten-DNA, die so vermindert stattfindet. Die Folge ist eine reduzierte Lymphozytenproliferation. MPA als aktiver Metabolit des EC-MPS ist hingegen ein Inhibitor der IMPDH, die die Purinnukleotid-Synthese katalysiert. Durch Hemmung der IMPDH-Aktivität stehen die für die T- und B-Lymphozytenproliferation benötigten Purine limitiert zur Verfügung, die Proliferationsrate ist folglich vermindert.

Dass CNI (47, 85), mTOR-Inhibitoren (96) und EC-MPS (97, 98) einen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsrate der Lymphozyten haben, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Stalder et al (47) zeigten an 8 stabilen nierentransplantierten mit CyA und EC-MPS behandelten Patienten, eine signifikant geringere Lymphozytenproliferationsrate im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (12 % versus 40 %). Auch die schon erwähnte Studie von Barten et al. (85) beobachtete bereits 2 Stunden nach einmaliger Gabe von CyA eine signifikant geringere Proliferationsrate der mit Con A stimulierten Lymphozyten im Vgl. zur Kontrollgruppe. Dass MMF einen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsrate besitzt, zeigte die Arbeitsgruppe um Kamar et al. (97). Sie demonstrierten an fünf Lebertransplantierten Patienten nach Gabe von 1 mg MMF einen signifikanten Abfall der T-Lymphozytenproliferationsrate.

Die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse zeigten weiterhin, dass nach Umstellung von CNI auf Everolimus bei unseren Patienten in Bezug auf die Hemmstärke der Proliferationsrate von Lymphozyten keine Unterschiede festgestellt wurden. Andere Studien zeigten ebenfalls, dass ein

Wechsel von CyA, als einen Vertreter der CNI, zu Sirolimus (45, 85, 99) bzw. zu Everolimus (96) zu keinen wesentlichen Veränderungen der Proliferationsrate führte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass sowohl die CNI als auch Everolimus in der eingesetzten Dosis in etwa die gleiche Wirkstärke in Bezug auf die Hemmung der Proliferationsrate von Lymphozyten besitzen und somit bezogen auf die antiproliferative Wirkung von einer ähnlichen Potenz für die Rejektionsprophylaxe ausgegangen werden kann. Der Anstieg der MPA-AUC nach Therapiewechsel ist hier auch nicht mit einer Zunahme der antiproliferativen Potenz verbunden, weil die effektive Hemmkonzentration bereits mit geringer MPA-AUC überschritten wurde. Weitere Untersuchungen mit mehr Studienteilnehmern sind notwendig, um den prädiktiven Wert in Bezug auf das Auftreten von Rejektionen zu bestimmen.

6.4.3 CD25 und CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der prozentuale Anteil CD25 bzw. CD71 positiver T-Zellen sowohl unter der Kombinationstherapie mit CNI und EC-MPS als unter der Kombinationstherapie mit Everolimus und EC-MPS keinen signifikanten Unterschied zeigte. Es wurde aber beobachtet, dass unter der CNI und EC-MPS Therapie der prozentuale Anteil CD25 bzw. CD71 positiver T-Zellen tendenziell geringer war als unter der Everolimus und EC-MPS Medikation. Das Ergebnis der vermutlich stärkeren Hemmung der CD25 bzw. CD71 exprimierenden T-Zellen unter CNI und EC-MPS, kann durch die unterschiedlichen Wirkungsweisen der CNI und mTOR-Inhibitoren erklären werden. CNI hemmen zum einen direkt die IL-2 Synthese und zum anderen kommt es durch Hemmung des Calcineurin zu einer verminderten Synthese der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptor (CD25) (28). CNI verhindern somit, dass über die Interaktion zwischen dem Zytokin IL-2 und dem IL-2 Rezeptor, die IL-2 getriggerten molekularen Vorgänge eingeleitet werden. Everolimus und MPA haben keinen direkten Einfluss auf die IL-2 Synthese. IL-2 kann in Wechselwirkung mit dem IL-2 Rezeptor treten, CD71 wird exprimiert und über das RAS/MAP-Kinasen-System (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen) können ungehindert bestimmte Gene, die einen Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung haben, aktiviert werden (100-102).

Der in dieser Arbeit beobachtete etwas stärkere Einfluss der Kombinationstherapie von CNI und EC-MPS auf den Anteil CD25 bzw. CD71 exprimierender T-Lymphozyten lässt vermuten, dass eine Kombinationstherapie mit CNI und EC-MPS, eine geringfügig potentere Immunsuppression darstellt. In diesem Zusammenhang spielen alloreaktive Interleukin-2 abhängige, aktivierte T-

Lymphozyten eine wichtige Rolle (103). Die durch CNI bewirkte Hemmung der IL-2 Synthese und der verminderten Expression des IL-2 Rezeptors auf der Zelloberfläche, kann die Bildung zytotoxischer Lymphozyten und humoraler Antikörper unterbunden oder zumindest abgeschwächt werden, die sich sonst gegen die allogenen Organe der Spender richten würden und zur möglichen Transplantabstoßung beitragen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch gezeigt, dass der prozentuale Anteil CD25 exprimierender Lymphozyten während des gesamten Beobachtungszeitraums quantitativ höher als der Anteil CD71 exprimierender T-Lymphozyten lag. Die beobachteten Unterschiede waren aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant und sind nur als Tendenz zu betrachten. Die Proliferation von T-Lymphozyten ist unter anderem von dem Vorhandensein der Wachstumsfaktoren IL-2 und Transferrin abhängig. Ruhende Zellen besitzen nur schwach bindende IL-2 Rezeptoren in Form der β - und γ Untereinheit. Erst nach Aktivierung der Zellen, wie in dieser Arbeit mit Con A, werden auf ihre Zelloberfläche die Oberflächenantigene CD25 und CD71 exprimiert, die den Rezeptor zu hochaffinen IL-2 Rezeptoren komplettiert. CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors, wird ein bis fünf Tage nach Aktivierung auf T-Zellen exprimiert und bleibt für einige Tage CD25 positiv (104, 105). Die Interaktion zwischen den IL-2 Rezeptoren und IL-2 ist Bedingung für die Induktion des Transferrinrezeptors (CD71) und somit für den Beginn der Proliferation (106). Dies könnte erklären, warum der Anteil CD25 exprimierender Lymphozyten höher lag, als der Anteil an CD71 exprimierender T-Zellen. Die Ergebnisse des beobachteten möglichen stärkeren Einfluss der CNI im Vgl. zu dem mTOR-Inhibitor auf die Expression CD25 bzw. CD71 positiver Lymphozyten stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe um Böhler et al. (45). Ein Vergleich zwischen den CNI und mTOR-Inhibitoren in Bezug auf ihre Hemmstärke CD25 bzw. CD71 positiver Lymphozyten zeigte, eine unter mTOR-Inhibitoren geringer ausgeprägte Wirkung.

Neben den CNI hat auch EC-MPS einen Einfluss auf den Anteil CD25 bzw. CD71 positiver Zellen (45, 47, 85). Dies wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (98, 107-108). Kamar et al. (97) beispielsweise, zeigten an fünf nierentransplantierten Patienten, das MMF, bereits eine Stunde nach Einnahme zu einer signifikanten Abnahme des prozentualen Anteils der CD25 und CD71 positiven T-Lymphozyten um 40 % bzw. 53 % führte. Als Ursache vermutete man eine Hemmung der Purinsynthese durch MPA. Es entsteht ein Mangel an Purinen, der in vitro eine Abnahme der Glykosid-Konzentration an der Oberfläche von Zellen bewirkt (109). Da CD25

ebenfalls ein Glykosid ist, wird auch seine Expression, durch die verminderte Synthese der CD25-mRNA, reduziert (110).

Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD25 bzw. CD71 positiver CD3⁺ Zellen

Interessant sind auch die in dieser Arbeit unter einer CNI-freien Therapie mit Everolimus und EC-MPS beobachteten signifikanten Korrelationen zwischen den Oberflächenantigen CD25 und CD71 sieben Tage nach Absetzen der CyA Medikation sowie 9-11 Monate nach Therapieumstellung. Wie bereits beschrieben, wurde während des Studienzeitraumes nur eine Abstoßungsreaktion unter den Studienteilnehmern registriert. Genaue Untersuchungen des Anteils CD25 sowie CD71 positiver T-Lymphozyten zeigten bei diesem Patienten zum Abstoßungszeitpunkt mit 34,11 % versus 26,04 % (Median aller Patienten) einen überdurchschnittlich hohen Anteil an CD25 positiven T-Lymphozyten sowie mit 23,14 % versus 10,8 % (Median aller Patienten) einen überdurchschnittlichen Anteil CD71 positiver T-Lymphozyten.

Wie bereits beschrieben führt Everolimus, trotz fehlendem Einfluss der IL-2 und IL-2-Rezeptor-Interaktion, dennoch zu einem Teil zur Bildung und Differenzierung von T-Lymphozyten. Dieser Fall zeigt, dass pharmakodynamische Messungen des prozentualen Anteils CD25 oder CD 71 positiver T-Lymphozyten auch nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS hilfreich und sinnvoll sein können, um das mit einem erhöhten Anteil an CD25 und somit CD71 positiven Lymphozyten mögliche assoziierte Risiko einer Transplantatabstoßung, zu überwachen.

6.5 Nierenfunktion

Kreatinin/Kreatinin-Clearance

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich auch mit der Frage, welchen Einfluss die Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS auf die Nierenfunktion hat.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zu Studienbeginn bei Patienten der CyA-Gruppe ein höheres Kreatinin im Serum gemessen wurde, als bei Patienten der Tac Gruppe ($p > 0,05$).

Eine Elimination der CNI führte bei den mit CNI- behandelten Patienten zu einem signifikanten Abfall des Serum-Kreatinins ($p = 0,02$). Jedoch bei genauerer Differenzierung der Patientengruppen nach ihrer Ausgangsmedikation, zeigten sich während des Beobachtungszeitraumes

hinsichtlich des Serum-Kreatinins Unterschiede. Bei Patienten der CyA-Gruppe ließen sich nach 7 Tage nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie auf eine CyA-freie Therapie mit Everolimus und EC-MPS ein signifikanter Abfall des Kreatinins um 0,5 mg/dl messen. Auch über den gesamten Studienzeitraum betrachtet nahm das Serum-Kreatinin bei den mit CyA behandelten Patienten signifikant ab. Hingegen bei Patienten der Tac-Gruppe wurden keine signifikanten Änderungen in Bezug auf das Kreatinin im Serum festgestellt. Zur weiteren Beurteilung der Nierenfunktion wurde die Kreatinin-Clearance untersucht. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS zu einer Zunahme der Clearance führte. Bei genauerem Vergleich der einzelnen verabreichten CNI, zeigten sich jedoch Unterschiede. Bei den mit CyA behandelten Patienten, wurde nach Umstellung der Therapie auf Everolimus und EC-MPS, eine signifikante Zunahme der Kreatinin-Clearance um 17,7 ml/min gemessen. Bei Patienten der Tac-Gruppe, zeigte sich ein anderes Bild. Hier kam es nach Umstellung der Therapie zu einer nicht signifikanten Abnahme der Kreatinin-Clearance.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Umstellung von einem CNI, insbesondere CyA zu einem mTOR-Inhibitor zu einer signifikant besseren Nierenfunktion führen kann. Somit könnten CyA behandelte Patienten von einer Konversion auf Everolimus profitieren. Das Hauptproblem von CNI ist, dass sie nephrotoxisch sind und zu fibrotischen Veränderungen beispielsweise durch die Expression von TGF- β an der Transplantatniere führen. Die Folge ist eine im Langzeitverlauf zunehmende Verschlechterung der Nierenfunktion (111, 112). Einige Studien zeigten, dass sich bei Patienten unter einer Tac-Therapie signifikant geringere TGF- β Spiegel finden lassen, als bei Patienten unter einer CyA-Medikation (113, 114). Dies könnte auch, die in dieser Arbeit zu Studienbeginn quantitativ gemessenen niedrigeren Kreatininwerte sowie die höhere Kreatinin-Clearance der Tac behandelten Patienten, erklären. Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit, wurden auch von anderen Autoren beschrieben. Artz et al. (32) nahmen eine Randomisierung von 124 nierentransplantierter Patienten vor. Eine Gruppe erhielt als immunsuppressive Therapie Tac und die andere Gruppe CyA. Beide Gruppen wurden zu Beginn der Studie, 3 und 6 Monate auf verschiedene Parameter hin untersucht. Dabei zeigten sich in der mit Tac behandelten Gruppe nach 6 Monaten signifikant geringere Serumkreatininwerte im Vgl. zu der mit CyA behandelten Gruppe. Das Ergebnis der nach Therapieumstellung von CNI und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS, resultierenden verbesserten Nierenfunktion, steht im Einklang mit der derzeitigen Literatur. Bemelmann et al. (115) untersuchte an 264 nierentransplantierten die Auswirkungen

des Wechsels der Kombinationstherapie von CyA/MPS/Prednisolon zu CyA/Prednisolon sowie Everolimus/Prednisolon auf verschiedene klinische Parameter. So beobachtete er in der Everolimus-Gruppe ein signifikant geringeres Serum-Kreatinin im Vgl. zu der CyA-Gruppe. In der derzeitigen Literatur finden sich noch nicht hinreichend Daten zur Beurteilung eines Regimewechsels von einem CNI zu Everolimus. Diese Studie sollte hierzu einen entsprechenden Beitrag leisten. Es ist hilfreich, Studien in denen ein Wechsel von CNI zu SRL vorgenommen wurde, zur Auswertung heranzuziehen. Bei der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI zu einem mTOR-Inhibitor, zeigte Dominguez et al. (116) anhand von 20 nierentransplantierten Patienten, bereits nach 6 Monaten unter den mit SRL behandelten Patienten signifikant geringere Kreatininwerte im Serum im Vgl. zu den mit CNI behandelten Patienten ($210 \pm 56 \mu\text{mol/l}$ versus $233 \pm 34 \mu\text{mol/l}$). Von Giron et al. (117) wurde ein Jahr nach Therapieumstellung von CNI zu Everolimus eine Abnahme der Kreatininwerte im Serum beobachtet, die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der signifikant niedrigeren Serum-Kreatininwerte und signifikant höheren Kreatinin-Clearance von Everolimus im Vgl. zu Ciclosporin A behandelten Patienten, können von anderen Studien bestätigt werden. Flechner et al. (118) zeigten in einer prospektiven randomisierten Studie mit 61 nierentransplantierten Patienten, dass die mit SRL behandelten Patienten 3, 6 und 12 Monate nach Transplantation, signifikant geringere Kreatininwerte im Serum aufwiesen im vgl. zu der CyA-Gruppe. Auch die Kreatinin-Clearance war 6 und 12 Monate nach TX in der SRL-Gruppe signifikant besser. Anhand von 78 nierentransplantierten Patienten zeigten Kreis et al. (119) in einer randomisierten Multi-center Studie, dass unter den Patienten, die mit SRL behandelt wurden, durchweg geringere Kreatininwerte im Serum im Vgl. zu den mit CyA behandelten Patienten, gemessen wurden.

Die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der unveränderten Nierenfunktion bei der Umstellung von Tac auf Everolimus stehen trotz der geringen Fallzahl im Einklang zu der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Die Beobachtungen anderer Studien weisen darauf hin, dass die Umstellung von Tac auf einen mTOR-Inhibitor keine Veränderung der Nierenfunktion herbeiführt. Witzke et al. (120) verglichen die Auswirkungen der Konversion von CNI zu SRL. In der CNI-Gruppe wurde eine weitere Differenzierung zwischen Tac und CyA vorgenommen. Nach Eliminierung der CNI ließen sich in der Tac-Gruppe keine Veränderungen der Nierenfunktion feststellen. Auch Larson et al. (121) konnte im direkten Vergleich der Immunsuppressiva

Tacrolimus und Sirolimus nach einem Jahr keine Unterschiede in der Nierenfunktion beobachten.

6.6 Fettstoffwechsel

Ziel dieser Arbeit war es weiterhin, den Einfluss der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI zu einem mTOR-Inhibitor auf den Fettstoffwechsel zu untersuchen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI auf Everolimus bewirkte bei allen Patienten während des gesamten Studienzeitraumes einen signifikanten Anstieg der Cholesterin- und LDL- (low density lipoprotein) Konzentration im Blut sowie einen quantitativen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der HDL- (high density lipoprotein) Konzentration im Blut. Bei genauerer Betrachtung und Differenzierung des Einflusses der verschiedenen CNI CyA und Tac auf die Blutfettwerte, zeigte sich zu Studienbeginn unter der Tac-Medikation im Vgl. zur CyA-Medikation quantitativ geringere Cholesterin-, HDL- und LDL-Blutkonzentrationen. Weiterhin führte der in dieser Arbeit vorgenommene Wechsel der immunsuppressiven Therapie von CyA zu Everolimus bzw. Tac zu Everolimus, bei der mit CyA behandelten Gruppe, während des gesamten Untersuchungszeitraumes zu einem signifikanten Anstieg der LDL-Konzentration im Blut. Die beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CNI, insbesondere CyA im Vergleich zu Everolimus ein für den Patienten signifikant günstigeres Lipidprofil bewirken. Bei Betrachtung der Triglyceride im Blut, zeigte sich in dieser Arbeit ein anderes Bild. Hier führte die Umstellung der immunsuppressiven Therapie im gesamten Studienzeitraum bei den mit CyA behandelten Patienten überraschenderweise zu einem signifikanten Abfall der Triglyceridwerte im Blut.

Diese beobachteten Effekte können durch die von mTOR-Inhibitoren bewirkte verminderte Synthese der Apo B₁₀₀ enthaltenden Lipoproteine VDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein) und LDL erklärt werden. Sie stellen weiterhin einen wichtigen Liganden für den LDL Rezeptor dar. Eine Abnahme der Lipoproteine führt so zu einer Downregulierung des LDL-Rezeptors, der bei der Regulation der LDL-Plasma-Konzentration eine entscheidende Rolle spielt (122-124). Die Folge ist nicht nur eine verminderte Aufnahme von LDL in die Leber und einem daraus resultierenden Anstieg der LDL-Blutkonzentration, sondern auch eine verzögerte Clearance des LDL-Cholesterins aus dem Blut, die wiederum zu einem Anstieg der Cholesterin-Plasma-Konzentration führt. Weiterhin führen mTOR-Inhibitoren zu einer vermehrten Expression von Liver-X-Rezeptoren. Liver-X-Rezeptoren regulieren u.a. die

Stoffwechselfgene, wie die des Cholesterinmetabolismus. Sie verhindern die Überladung der Zelle mit Cholesterin, in dem sie den Cholesterin-Efflux aus der Zelle erhöhen. Weiterhin steigern sie den HDL-Plasma-Spiegel (124-126).

In der Literatur werden der Einfluss der CNI und mTOR-Inhibitoren auf die verschiedenen Parameter des Fettstoffwechsels kontrovers diskutiert. Das Ergebnis des Anstiegs der Cholesterinkonzentration im Blut nach Wechsel der immunsuppressiven Therapie von CNI auf Everolimus steht im Einklang mit der Literatur. Studien zeigen, dass mTOR-Inhibitoren zu einem Anstieg der Cholesterinkonzentration im Blut führen. In der Mehrzahl der Studien wurde jedoch ein Wechsel der Immunsuppressiven Therapie von CNI auf SRL vorgenommen (119-120, 127). Entsprechend des Regimewechsels in der vorliegenden Arbeit von CNI auf Everolimus, lassen sich derzeit nicht hinreichend Daten finden. Daher ist es hilfreich, Studien in denen ein Wechsel von CNI zu SRL vorgenommen wurde, zur Auswertung heranzuziehen.

In einer von Büchler et al (129) durchgeführten prospektiven randomisierten Studie mit 145 nierentransplantierten Patienten wurde nach 3 Monaten und 12 Monaten Fettparameter kontrolliert und hinsichtlich des immunsuppressiven Regimes ausgewertet. Dabei ließen sich bei den Patienten der CyA-Gruppe zu allen Zeitpunkten signifikant geringere Cholesterinkonzentrationen im Vgl. zur SRL-Gruppe messen. Im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit, führte in der retrospektiven Studie von Ayala et al. (130) der Wechsel der immunsuppressiven Therapie von CNI zu Everolimus einen Monat, sechs Monate und 12 Monate nach Umstellung bei sechs nierentransplantierten Patienten zu keinen Veränderungen der Cholesterinkonzentration im Blut. Hier ist sicherlich die geringe Fallzahl (6 Patienten) kritisch zu bemerken. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Auswirkungen der Therapieumstellung auf die Triglyceride, werden in der Literatur findbaren Studien kontrovers diskutiert. Weitere Messungen von Ayala et al. (130) zeigten innerhalb der ersten sechs Monate nach Umstellung einen nicht signifikanten Abfall der Tg-Konzentration um 12,5 %. Nach 12 Monaten jedoch nahm die Konzentration im Blut wieder zu und lag über dem Ausgangsniveau. Andere Studien jedoch, die einen Wechsel des Therapieschemas von CNI zu SRL oder ein Gruppenvergleich zwischen den CNI und SRL durchführten, beschrieben unter SRL Medikation quantitativ höhere Triglycerid-Konzentrationen im Blut im Vgl. zu den CNI (1119, 127-128). Um die kontrovers zur Literatur stehenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit richtig beurteilen zu können, ist es hilfreich die Beobachtungen von Tendrich et al. (131) heranzuziehen. In dieser retrospektiven Studie mit 55 herztransplantierten Patienten führte die Gabe von SRL zu einer signifikanten Erhöhung der

Triglyceridkonzentration im Blut, während die Gabe von Everolimus keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen bewirkte. Die Ergebnisse von Tendrich's et al. sowie die Beobachtungen aus dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Umstellung von CNI zu Everolimus zu keiner relevanten Erhöhung der Triglyceridkonzentration im Blut führt bzw. keinen Einfluss hat. Bei getrennter Betrachtung der Auswirkung der CNI Tacrolimus und Ciclosporin A wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass gerade Patienten mit einer CyA-Medikation, in Bezug auf die Triglyceridkonzentration im Blut, signifikant von einem Wechsel der Immuntherapie auf niedrig dosiertes Everolimus profitieren würden. Hingegen bei Patienten mit vorheriger Tac-Medikation, die Umstellung auf Everolimus zu keiner Verschlechterung der Triglyceride im Blut führt.

Der während der Langzeitbeobachtung gemessene leichte Anstieg der Triglyceridkonzentration in dieser Patientengruppe, kann möglicherweise durch eine zusätzliche Steroidgabe, die bei zwei Patienten 9 bis 11 Monaten nach Therapieumstellung erfolgte, bedingt sein. In einigen Studien wurden weiterhin die Auswirkungen aller Immunsuppressiva auf die Lipidparameter LDL und HDL untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, der signifikanten Zunahme der LDL-Blutkonzentration nach Umstellung der Therapie, stehen im Einklang mit der bereits erwähnten Studie von Ayala et al. (130). Hier führte der Wechsel der CNI-Therapie zu einer Everolimus-Therapie zu einer Zunahme der LDL-Blutkonzentration. Ein quantitativer Anstieg der HDL-Konzentration im Blut, wie in der vorliegenden Arbeit, konnte bei Ayala et al. nicht festgestellt werden, es zeigte sich keine Veränderung der HDL-Konzentration. Auch Büchler et al. (129) konnte keinen Unterschied zwischen den mit CyA behandelten Patienten und den mit SRL behandelten Patienten in Bezug auf die LDL- und HDL-Konzentration feststellen. In unserer Arbeit wurde sowohl unter CyA als auch unter Tac eine Zunahme der LDL- sowie der HDL-Konzentration während des gesamten Zeitraumes beobachtet. Jedoch bei Anwendung des LDL/HDL-Quotienten, zur Risikobeurteilung bei Herz-Kreislaufkrankungen, sind während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine Veränderungen des Quotienten festzustellen. So wiesen Patienten nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie auf Everolimus zwar erhöhte LDL-Konzentrationen auf, die jedoch durch die gleichzeitige Zunahme der HDL-Konzentration zu keinen Veränderungen des Lipidprofils führten.

Zusammenfassend deuten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass die Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI auf Everolimus zu einer signifikanten Erhöhung der Blutfettwerte, insbesondere Cholesterin und LDL, führt. Bei Patienten mit

schon bestehender Hyperlipidämie kann die Umstellung zu einer Verschlechterung des Lipidprofils führen. Eine nach erfolgreicher Transplantation auftretende Hyperlipidämie, gehört zu den häufigen Komplikationen und trägt zur kardiovaskular bedingten Morbidität und Mortalität bei. Zu den Risikofaktoren, die eine Hyperlipidämie begünstigen, zählen: das Alter des Empfängers, Diabetes mellitus, Proteinurie sowie die im unterschiedlichem Maße die verschiedenen Immunsuppressiva. Tritt eine Hyperlipidämie auf, kann sie möglicherweise die Entwicklung einer Allograft-Vaskulopathie und damit den Verlust des neuen Organs, ungünstig beeinflussen (132-134). Dass Immunsuppressiva, wie mTOR-Inhibitoren und CyA einen hyperlipidämiefördernden Einfluss haben, konnte in großen Studien immer wieder nachgewiesen werden. Der Pathomechanismus konnte noch nicht vollständig geklärt werden, so dass die Herausforderungen für die Zukunft der Transplantationsmedizin in der Entwicklung wirksamer und auf den Lipidstoffwechsel neutral wirkende immunsuppressiver Wirkstoffe, liegt. Weiterhin sind prospektive Studien mit langem follow-up an nierentransplantierten Patienten notwendig, um den Zusammenhang zwischen verschiedenen Immunsuppressiva und Hyperlipidämie auf das Transplantatüberleben zu klären.

6.7 Entzündungsparameter

In unserer Arbeit wurde gezeigt, dass ein Wechsel der immunsuppressiven Therapie von den CNI (CyA/Tac) und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl im Blut führte. Dieses Ergebnis kann durch Holdaas et al. (135) gestützt werden. Er beobachtete bei 20 de novo nierentransplantierten Patienten 7 Wochen nach Wechsel der immunsuppressiven Therapie von CyA zu Everolimus einen signifikanten Abfall der Leukozytenzahlen im Blut. Diese Beobachtungen könnten durch die Veränderungen der Pharmakokinetik von MPA während der Umstellungsphase erklärt werden. CyA hemmt, wie bereits beschrieben, die MRP2 vermittelte Sekretion von MPAG in die Galle und damit die im Dünndarm stattfindende Deglucuronidierung von MPAG, ein Abfall des MPA-Blutspiegels ist die Folge. Die Konversion von CyA auf Everolimus führt, wie Ergebnisse unserer Arbeit zeigten, zu einer Zunahme der MPA-Konzentration bzw. signifikanten Abnahme der MPAG-Konzentrationen im Blut sowie zu einer signifikant verminderten IMPDH-Aktivität. MPA ist ein Inhibitor der IMP-Dehydrogenase II leukozytärer Zellen, das Schlüsselenzym der Purinnukleotid-Synthese. Da Leukozyten auf diesen Syntheseweg angewiesen sind, führt eine Verringerung des Guanin-

Nukleotid- Pools zu einer verminderten DNA-Synthese und somit zu einer antiproliferativen Reaktion der Leukozyten (136).

Weiterhin konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass die Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CNI auf Everolimus zunächst zu einem minimalen Anstieg des C-reaktiven Proteins führte und im Langzeitverlauf, 9-11 Monate nach Umstellung, tendenziell wieder leicht abnahm. Sanchez et al. (137) beobachteten ebenfalls einen Monat nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie auf Everolimus einen signifikanten Anstieg des C-reaktiven Proteins, das 3 und 6 Monate nach Umstellung wieder leicht abnahm. Seine Arbeitsgruppe sieht eine möglichen Ursache in einer durch Everolimus erhöhten Rate an neu aufgetretenen Eisenmangelanämien, die ein chronisch entzündliches Milieu schaffen, das wiederum mit dem erhöhten CRP-Level assoziiert ist. Auch in unserer Arbeit wurden während des gesamten Beobachtungszeitraumes bei 12 von 13 Patienten eine Anämie registriert. Sie stellt mit 92,31 % die zweit häufigste dokumentierte Komplikation unserer Arbeit dar. CRP, als Marker eines gering gradigen systemisch chronischen Entzündungsgeschehens, ist ein wichtiger Prädiktor für das Auftreten von Myokardinfarkten und Schlaganfällen bei gesunden Patienten (138). Selbst ein geringfügiger erhöhter CRP-Level ist prädiktiv für kardiovaskuläre Ereignisse. So beobachtete Ducloux et al. (139) einen positiven Zusammenhang zwischen einem erhöhten CRP-Level und einem erhöhten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei nierentransplantierten Patienten. Daher ist bei der Umstellung von einem CNI zu einem mTOR-Inhibitor wie Everolimus eine engmaschige Kontrolle der Patienten notwendig, um durch individuelle Dosisreduzierung oder Komedikation, die durch einen erhöhten CRP-Spiegel im Blut einhergehenden kardiovaskulären Risiken, zu minimieren. Somit können langfristig die Funktion und das Überleben des Transplantates gesichert werden.

6.8 Anämie

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit Umstellung der immunsuppressiven Therapie von einem Calcineurininhibitor zu einer CNI-freien Therapie mit einem mTOR und EC-MPS zu einem weiteren signifikanten Abfall (ausgehend von einem Hb-Wert unterhalb des Referenzbereiches) der Hämoglobin-Konzentration im Blut führte. Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien. So zeigten beispielsweise Bumbea et al. (140) an 43 nierentransplantierten Patienten, dass ein Wechsel der Immuntherapie von einem CNI zu einem mTOR-Inhibitor: Sirolimus zu einem signifikanten Abfall der Hämoglobin-Konzentration führte.

Im Langzeitverlauf, d.h. 1 Jahr nach Konversion, wurde bei Bumbea et al kein weiterer Abfall der Hb-Konzentration registriert. In der vorliegenden Arbeit jedoch, zeigte sich 9-11 Monate nach Konversion eine tendenzielle Zunahme der Hb-Konzentration. Wie bei Bumbea et al. kann hier die notwendig gewordene Begleittherapie mit Eisenpräparate und Erythropoietin zur Stabilisierung bzw. zum Anstieg der Hb-Konzentration ursächlich sein. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der Wechsel von einem CNI zu einem mTOR-Inhibitor (Sirolimus) zu einer Zunahme an registrierten Anämien führte (141-143). Die Ursache ist hierfür ist in einer durch den mTOR induzierte Hemmung der S6 Kinase-Aktivität, die eine Schlüsselrolle bei der Translokation der mRNA in die Zelle, spielt. Durch die Hemmung unterbleibt die notwendige Aktivierung der Zellproliferation. Die Folge ist z.B. eine veränderte Erythrozytenzell-Entwicklung (144), die letztendlich wie unsere Ergebnisse zeigten, zu einer Anämie und zu einem erhöhten Bedarf an Erythropoietin trotz Verbesserung der Nierenfunktion, führte.

6.9 Komplikationen/Nebenwirkungen

In dieser Arbeit wurden im gesamten Beobachtungszeitraum alle unter den Studienpatienten aufgetretenen Nebenwirkungen und Komplikationen registriert. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei festgestellt, dass sowohl vor als auch nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie unter den insgesamt 143 registrierten Ereignissen respiratorische Nebenwirkungen wie Bronchitis und Bronchopneumonien (20 registrierte Ereignisse) am häufigsten auftraten. Weiterhin traten Anämien mit 12 registrierten Ereignissen am zweithäufigsten auf. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen von Diekmann et al. (141). In ihrer Studie wurden ebenfalls während des Regimewechsels von CNI zu mTOR-Inhibitoren (Sirolimus) am häufigsten Anämien registriert. Ursächlich hierfür wird der bereits beschriebene mTOR induzierte antiproliferative und apoptotische Effekt auf Blutzellen gesehen. Weiterhin wurde in unserer Studie zudem ein erhöhtes Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Diarrhoen oder Harnwegsinfekten festgestellt. Als weitere Nebenwirkungen traten eine Vielzahl unterschiedlichster Haut- und Schleimhautrekrankungen (Dermatitis, Akne, Aphten, Gingivitis, Parodontitis) auf. Bereits van Gelder et al. (145) registrierten unter einer Kombinationstherapie mit Sirolimus und MMF eine erhöhtes Auftreten von Ulzerationen. Eine Überimmunsuppression oder eine fehlende antivirale Prophylaxe während des Studienzeitraumes können mögliche Erklärungen hierfür sein. Weiterhin traten kardiovaskuläre Nebenwirkungen, wie Ödeme oder arterielle Hypertonie, häufig auf. Während des

gesamten Studienzeitraumes kam es bei 7 Patienten zu 8 registrierten notwendigen Hospitalisationen und bei einem Patienten zu einer Rejektion. Bei einem anderen Patienten führte eine progrediente Proteinurie zu einem vorzeitigen Absetzen der Everolimus-Medikation. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein Wechsel der Therapie von CNI zu Sirolimus trotz verbesserter Nierenfunktion mit einem gehäuften Auftreten einer Proteinurie assoziiert ist (146). Diekmann et al. (141) fanden im Umkehrschluss, dass eine geringe Proteinurie (unter 800 mg/d) sowohl während der Umstellungsphase von CNI zu Sirolimus als auch 12 Monate nach Umstellung ein signifikanter Prädiktor für ein positives Outcome in Bezug auf den Regimewechsel darstellt. Das lässt den Schluss zu, dass gerade Patienten mit einer geringen Proteinurie vor Umstellung von einem Regimewechsel von einem CNI zu einem mTOR-Inhibitor wie Everolimus positiv (geringe Rejektionsraten) profitieren würden. Ein weiterer Grund für das Absetzen der Everolimus-Medikation eines Patienten war das Auftreten einer Everolimus induzierten Pneumonie. Alexandru et al. (147) berichteten 2008 erstmalig von dem Auftreten einer Everolimus induzierten Pneumonitis bei nierentransplantierten Patienten. Bis dahin wurden nur über dosisabhängige Sirolimus induzierte Pneumonitiden berichtet. Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass im gesamten Beobachtungszeitraum vor Umstellung der immunsuppressiven Therapie bis 11 Monate nach Umstellung auf Everolimus, eine gehäufte Zahl an Infektionen auftrat. Deshalb sollte neben der Nachsorge nach Nierentransplantation, dem Erhalt der Organfunktion, auch ein Hauptaugenmerk auf eine effektive Therapie der Begleiterkrankungen gerichtet sein. Denn durch eine gezielte Überwachung der Patienten, durch eine spezifische bzw. individuelle Therapie und einer wohl überlegten Dosisanpassung, können diese beschriebenen Nebenwirkungen, unabhängig von dem gewählten Immunsuppressivum, gut kontrolliert und behandelt werden, ohne dass ein Wechsel der bestehenden immunsuppressiven Therapie vorgenommen werden muss.

7 Zusammenfassung

Die Nierentransplantation stellt für Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz das beste Verfahren einer Nierenersatztherapie dar. Werden allogene Organe transplantiert, erfordert dies eine lebenslange immunsuppressive Therapie. Hierfür steht der Transplantationsmedizin eine Vielzahl von Wirkstoffen zur Verfügung. Die Kombination aus einem Calcineurin-Inhibitor, MPA und Methylprednisolon hat sich als eine sichere Therapie bewährt. Immunsuppressiva zeigen jedoch ein breites Spektrum an Nebenwirkungen. Hervorzuheben ist die Nephrotoxizität der CNI. Sie hat eine Verschlechterung der Nierenfunktion im Langzeitverlauf zur Folge und stellt daher einen wichtigen Grund für den Wechsel der Basisimmunsuppression dar.

In dieser nicht randomisierten, Open-Label Pilotstudie wurden bei 13 stabilen nierentransplantierten Patienten über einem Zeitraum von 12 Monaten die Auswirkungen der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von den Calcineurin-Inhibitoren CyA/Tac und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS auf pharmakokinetische sowie pharmakodynamische Parameter untersucht.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass eine Umstellung von einem CN-Inhibitor: CyA auf den mTOR-Inhibitor: Everolimus die Pharmakokinetik von CyA nicht beeinflusst. Jedoch ließen sich unter der CyA-Therapie höhere Everolimus-Blutkonzentrationen messen, eine Folge der gemeinsamen Biotransformation von CyA und mTOR-Inhibitoren.

Gegenstand dieser Untersuchung war weiterhin die Messung der IMPDH-Aktivität, um neue Erkenntnisse über die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Wechselwirkungen nach Umstellung des Immunsuppressivum EC-MPS zu erhalten. Die Studie zeigte eine unter CyA signifikant höhere IMPDH-Aktivität im Vgl. zur Everolimus-Therapie. Die Umstellung der Immunsuppressiven Therapie führte zu keiner signifikanten Änderung der MPA-Blutkonzentration jedoch wurden nach Absetzen von CyA signifikant geringere MPAG-Blutkonzentrationen gemessen.

Korrelationsanalysen zeigten signifikante negative Korrelationen zwischen dem dosisnormalisiertem MPA-Talspiegel und der Lymphozytenproliferationsrate sowie signifikant positive Korrelationen zwischen der IMPDH-Aktivität zum Zeitpunkt C0 und der Lymphozytenproliferationsrate, 7 Tage nach Absetzen der CNI. Zwischen der MPA-Blutkonzentration und der IMPDH-Aktivität konnte bei Betrachtung der Tagesverläufe (0-12 h) eine gute inverse Beziehung beobachtet werden.

Pharmakodynamische Messungen zeigten in dieser Studie während der Umstellung von einem CNI und EC-MPS zu Everolimus und EC-MPS keinen signifikanten Unterschied in dem Anteil IL-2 sowie TNF- positiver T-Lymphozyten im Blut. Korrelationsanalysen zwischen dem prozentualen Anteilen IL-2 und TNF- α positiver Lymphozyten zeigten jedoch vor, während und 9-11 Monate nach Therapieumstellung auf einen mTOR-Inhibitor einen signifikant positiven Zusammenhang dieser Parameter.

Weitere pharmakodynamische Messungen in Bezug auf die Lymphozytenproliferationsrate oder des prozentualen Anteils CD25 bzw. 71 positiver Lymphozyten, zeigten keine signifikanten Unterschiede während der Umstellungsphase von den CNI zu einem mTOR-Inhibitor. Korrelationsanalysen zeigten jedoch signifikant positive Korrelationen zwischen den beiden Oberflächenantigenen CD25 und CD71 auf.

Die Umstellung der Therapie von CNI und EC-MPS auf Everolimus und EC-MPS führte zu einer signifikanten Verbesserung der Nierenfunktion. Während das Serum-Kreatinin in den zuvor mit CyA behandelten Patienten signifikant abfiel, nahm die Kreatinin-Clearance in der CyA-Gruppe signifikant zu. Bezogen auf den Fettstoffwechsel zeigte diese Studie, dass die Umstellung der Therapie zu einer signifikanten Zunahme der Cholesterin- und LDL- Konzentration im Blut führte, während die Triglycerid-Konzentration der CyA behandelten Patienten im Langzeitverlauf signifikant abnahm.

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurden während der Umstellungsphase sowie im Langzeitverlauf nach Umstellung auf eine CNI-freie Therapie mit Everolimus vor allem respiratorische Nebenwirkungen, wie Bronchitiden und Bronchopneumonien registriert, gefolgt von Anämien und gastrointestinalen Nebenwirkungen (Diarrhoen, Übelkeit). Weiterhin ist eine Vielzahl von aufgetretenen Haut- und Schleimhauterkrankungen, wie Aphten oder Akne zu erwähnen. Bei den aufgetretenen Nebenwirkungen/Komplikationen führte bei zwei Patienten jeweils eine progrediente Proteinurie und eine Everolimus induzierte Pneumonitis zu einem vorzeitigen Absetzen der mTOR-Medikation. Insgesamt wurden neun notwendige Hospitalisationen registriert sowie eine Rejektion. Während der gesamten Studiendauer wurden keine Todesfälle beobachtet.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass unter der Kombinationstherapie mit CyA und dem mTOR-Inhibitor: Everolimus Interaktionen bestehen, die zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Everolimus führen - ein Ereignis, das in Everolimus-Dosierungsplänen

berücksichtigt werden muss. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich sowohl unter der Kombinationstherapie CNI und EC-MPS, als unter der Kombinationstherapie Everolimus und EC-MPS ein ähnliches immunologisches pharmakodynamisches Profil findet. Die Kombinationstherapie mit Everolimus und EC-MPS führt zu einer signifikant verbesserten Nierenfunktion. Everolimus und EC-MPS könnten im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation ohne CNI angewandt werden, da sie von nierentransplantierten Patienten ausreichend gut toleriert wurden.

8 Literaturverzeichnis

1. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:201-4.
2. Rudolf P. Wüthrich: Nierentransplantation: Grundlagen, Vor- und Nachsorge, Langzeitüberwachung; 2. Auflage, Springer-Verlag.
3. Doyle MA, Lechler RI, Turka LA. Organ Transplantation: Halfway through the First Century. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2965-2971.
4. Tilney NL: Transplant: From Myth to Reality, New Haven, Yale University Press 2003.
5. Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959;183:1682-1683.
6. Nierentransplantation. Deutsche Stiftung Organtransplantation. (Accessed March 21 2011, at www.dso.de)
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric Transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725-1730.
8. Ojo OA, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney International* 2000;57:307-313.
9. Neumayer H-H., Böhrer T, Budde K, et al. Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin. Bremen. Uni-Med Science 2001.
10. Vanrenterghem Y. Role of acute rejection in chronic rejection. *Transplant Proc* 1998;30:1210-1211.
11. Sommerer C, Schmidt J, Zeier M. Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens nach Nierentransplantation. *Intensivmed* 2005;42:241-249.
12. Banasik M, Klinger M. Chronic allograft nephropathy- Immunologic and nonimmunologic factors. *Ann Transplan* 2006;11:7-10.
13. Kasiske BL. Clinical correlates to chronic renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl* 1997;63:S71-4.
14. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int* 1998;53:217-222.
15. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506-12.

16. Brown HJ, Jardetzky T, Saper MA, et al. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332:845-850.
17. Bretscher P, Cohn M. A theory of Self-Nonself Discrimination. *Science* 1970;169:1042-49.
18. Yang Y, Wilson JM. CD40 Ligand-dependent T cell activation: Requirement of B7-CD28 Signaling through CD40. *Science* 1996;273:1862-64.
19. Gudmundsdottir H, Turka LA. T cell costimulatory blockade: New therapies for transplant rejection. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1356-65.
20. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;338:1813-1821.
21. Sayegh MH. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999;56:1967-1979.
22. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, et al. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:1-18.
23. Whitehurst CE, Geppert TD. MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J Immunol* 1996;156:1020-1029.
24. Moon JJ, Nelson BH. Phosphatidylinositol 3-kinase Potentiates, but does not trigger, T-cell proliferation mediated by the IL-2 receptor. *J Immunol* 2001;167:2714-23.
25. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, et al. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990;11:83-8.
26. Spernscheider H, et al. Immunsuppression nach Nierentransplantation. *Med. Klin* 2003;98:140-5.
27. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, et al. Moderne Immunsuppressiva nach Nierentransplantation. *Urologe* 2006;45:9-17.
28. Halloran P. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
29. Pasual M, Theruvath T, Kawai T, et al. Medical progress: Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346:580-90.
30. Lindholm A. Factors Influencing the pharmacokinetics of cyclosporine in man. *Ther Drug Monit* 1991;13:465-77.
31. Fellström B. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2004;36:220S-223S.

32. Artz MA, Boots J, Ligtenberg G, et al. Improved cardiovascular risk profile and renal function in renal transplant patients after randomized conversion from cyclosporine to tacrolimus. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1880-8.
33. Kohnle M, Zimmermann U, Lütke P, et al. Conversion from cyclosporine A to tacrolimus after kidney transplantation due to hyperlipidemia. *Transpl Int* 2000;13:S345-8.
34. Budde K, Curtis J, Knoll G, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium can be safely administered in maintenance renal transplant patients: results of a 1-year study. *Am J Transplant* 2004;4:237-43.
35. Staatz CE, Tett SE. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:13-58.
36. Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, et al. Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol Chem* 1991;266:506-9.
37. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335-48.
38. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S-14S.
39. Dean PG, Lund WJ, Larson TS, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004;77:1555-61.
40. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. *Lancet* 2000;356:194-202.
41. McDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001;71:271-80.
42. Chapman TM, Perry CM. Everolimus. *Drugs* 2004; 64:861–872.
43. Baboolal K. A phase III prospective, randomized study to evaluate concentration-controlled sirolimus (rapamune) with cyclosporine dose minimization or elimination at six months in de novo renal allograft recipients. *Transplantation* 2003;75:1404-8.
44. Watson CJ, Firth J, Williams PF, et al. A randomized controlled trial of late conversion from CNI-based to sirolimus-based immunosuppression following renal transplantation. *Am J Transplant* 2005;5:2496-503.

45. Böhler T, Nolting J, Kamar N, et al. Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Ther Drug Monit* 2007;29:77-86.
46. Dambrin C, Klupp J, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol* 2000;12:557-62.
47. Stalder M, Birsan T, Holm B, et al. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2003;25:22-7.
48. Komada H, Nakabayashi H, Hara M, et al. Early calcium signaling and calcium requirements for the IL-2 receptor expression and IL-2 production in stimulated lymphocytes. *Cell immunol* 1996;173:215-20.
49. Imboden JB, Stobo JD. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J Exp Med* 1985;161:446-56.
50. Truneh A, Albert F, Golstein P, et al. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 1985;313:318-20.
51. Budde K, Glander P, Bauer S, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1213-1216.
52. Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, et al. Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes in vivo is rapidly reversible. *J Clin Invest* 1995;96:1254-1260.
53. Glander P, Braun KP, Hambach P, et al. Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit*. 2009;31:351-9.
54. O. Bestard, Cruzado J.M., Grinyó J.M. Calcineurin-Inhibitor-Sparing Immunosuppressive Protocols. *Transplant Proc*. 2005;37:3729-32.
55. Barten MJ, Streit F, Boeger M, et al. Synergistic effects of sirolimus with cyclosporine and tacrolimus: analysis of immunosuppression on lymphocyte proliferation and activation in rat whole blood. *Transplantation*. 2004;77:1154-62.
56. Yatscoff RW, Aspeslet LJ. The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug Monit*. 1998;20:459-63.

57. Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, et al. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:48-56.
58. Neumayer HH, Paradis K, Korn A, et al. Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48:694-703.
59. Kahan BD, Wong RL, Carter C, et al. A phase I study of a 4-week course of SDZ RAD (RAD) in quiescent cyclosporin-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 1999;68:1100-6.
60. Kovarik JM, Kalbag J, Figueiredo J, et al. Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:95-9.
61. Kovarik JM, Hsu CH, McMahon L, et al. Population pharmacokinetics of everolimus in de novo renal transplant patients: impact of ethnicity and comedications. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:247-54.
62. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *Clin Pharmacol.* 1996;36:315-24.
63. Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, et al. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2005;33:139-46.
64. de Jonge H, Naesens M, Kuypers DR. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit.* 2009;31:416-35.
65. van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, et al. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit.* 2001;23:119-28.
66. Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, et al. Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:1029-35.

67. Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, et al. Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant.* 2005;5:987-94.
68. Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ, et al. Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:706-8.
69. Cattaneo D, Merlini S, Zenoni S, et al. Influence of co-medication with sirolimus or cyclosporine on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2005;5:2937-44.
70. Picard N, Prémaud A, Rousseau A, et al. A comparison of the effect of ciclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62:477-84.
71. Gregoor PJ, de Sévaux RG, Hené RJ, et al. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid trough levels in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1999;68:1603-6.
72. Engelbertink R, Smak Gregoor P, Hesse C, et al. High mycophenolic acid area under-the-curve values in renal transplant recipients on long-term mycophenolate mofetil treatment. *Transplant Proc.* 2002;34:2983-4.
73. Buchler M, Lebranchu Y, Beneton M, et al. Higher exposure to mycophenolic acid with sirolimus than with cyclosporine cotreatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78:34-42.
74. Pou L, Brunet M, Cantarell C, et al. Mycophenolic acid plasma concentrations: influence of comedication. *Ther Drug Monit.* 2001;23:35-38.
75. Hohage H, Zeh M, Heck M, et al. Differential effects of cyclosporine and tacrolimus on mycophenolate pharmacokinetics in patients with impaired kidney function. *Transplant Proc.* 2005;37:1748-50.
76. Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, et al. Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther Drug Monit.* 2001;23:717-21.
77. Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, et al. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem.* 2001;47:88-94.

78. van Gelder T, Silva HT, de Fijter JW, et al. Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation*. 2008;86:1043-51.
79. van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, et al. Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:871-80.
80. Sommerer C, Müller-Krebs S, Schaier M, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of enteric-coated mycophenolate sodium: limited sampling strategies and clinical outcome in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;69:346-57.
81. van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, et al. A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation*. 1999;68:261-6.
82. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*. 1995;41:1011-7.
83. Millán O, Brunet M, Campistol JM, et al. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem*. 2003;49:1891-9.
84. Kamar N, Glander P, Nolting J, et al. Pharmacodynamic evaluation of the first dose of mycophenolate mofetil before kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:936-42.
85. Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, et al. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression. *Cell Prolif*. 2007;40:50-63.
86. Barten MJ, Rahmel A, Garbade J, et al. Pharmacodynamic monitoring of the conversion of cyclosporine to tacrolimus in heart and lung transplant recipients. *Transplant Proc*. 2005;37:4532-4.
87. Giese T, Zeier M, Schemmer P, et al. Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation*. 2004;77:339-44.

88. Sommerer C, Zeier M, Meuer S, et al. Individualized Monitoring of nuclear factor of activated T-Cells-Regulated Gene Expression in FK-506-Treated Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*. 2010;89:1417-1423.
89. van den Berg, Arie P, Twilhaar, et al. Quantitation of immunosuppression by flowcytometric measurement of the capacity of t cells for interleukin-2 production 1. *Transplantation* 1998;65:1066-1071.
90. Yang TT, Yu RY, Agadir A, et al. Integration of protein kinases mTOR and extracellular signal-regulated kinase 5 in regulating nucleocytoplasmic localization of NFATc4. *Mol Cell Biol*. 2008;28:3489-501.
91. Wang YL, Si LS, Kanbour A, et al. Lymphocytes infiltrating human ovarian tumors: synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in the generation of CD8+ effectors from tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res*. 1989;49:5979-85.
92. Rink L, Kirchner H. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;111:199-209.
93. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*. 2008;13:5094-107.
94. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 2006;42:745-50.
95. Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*. 2003;4:565-73.
96. Böhler T, Waiser J, Lichter S, et al. Pharmacodynamic effects of everolimus on anti-CD3 antibody-stimulated T-lymphocyte proliferation and interleukin-10 synthesis in stable kidney-transplant patients. *Cytokine*. 2008;42:306-11.
97. Kamar N, Glander P, Nolting J, et al. Effect of mycophenolate mofetil monotherapy on T-cell functions and inosine monophosphate dehydrogenase activity in patients undergoing a kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2006;38:2292-4.
98. Gummert JF, Barten MJ, van Gelder T, et al. Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology. *Transplantation*. 2000;70:1038-49.
99. Barten MJ, Streit F, Boeger M, et al. Synergistic effects of sirolimus with cyclosporine and tacrolimus: analysis of immunosuppression on lymphocyte proliferation and activation in rat whole blood. *Transplantation*. 2004;77:1154-62.

100. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:180-6.
101. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;15;351:289-305.
102. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl.* 2001;7:473-84.
103. Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2005;105:1828-36.
104. Biselli R, Matricardi PM, D'Amelio R, et al. Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1992;35:439-47.
105. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 1997;27:71-6.
106. Neckers LM, Cossman J. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:3494-8.
107. Gummert JF, Barten MJ, Sherwood SW, et al. Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291:1100-12.
108. Barten MJ, van Gelder T, Gummert JF, et al. Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *Am J Transplant.* 2002;2:719-32.
109. Hayes GR, Williams A, Costello CE, et al. The critical glycosylation site of human transferrin receptor contains a high-mannose oligosaccharide. *Glycobiology.* 1995;5:227-32.
110. Catapano CV, Dayton JS, Mitchell BS, et al. GTP depletion induced by IMP dehydrogenase inhibitors blocks RNA-primed DNA synthesis. *Mol Pharmacol.* 1995;47:948-55.
111. Johnson DW, Heather J. Saunders, et al. Fibrogenic Effects of Cyclosporin A on the Tubulointerstitium: Role of Cytokines and Growth Factors. *Exp Nephrol.* 1999;7:470-8.

112. Khanna A, Cairns V, Hosenpud JD. Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor-beta1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells. *Transplantation*. 1999;67:614-9.
113. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs*. 1997;54:925-75.
114. Baan CC, van Riemsdijk-van Overbeeke IC, Balk AH, et al. Conversion from cyclosporin A to tacrolimus is safe and decreases blood pressure, cholesterol levels and TGF-beta 1 type I receptor expression. *Clin Transplant*. 2001;15:276-83.
115. Bemelman FJ, de Maar EF, Press RR, et al. Minimization of maintenance immunosuppression early after renal transplantation: an interim analysis. *Transplantation*. 2009;88:421-8.
116. Dominguez J, Mahalati K, Kiberd B, et al. Conversion to rapamycin immunosuppression in renal transplant recipients: report of an initial experience. *Transplantation*. 2000;70:1244-7.
117. Giron F, Baez Y, Niño-Murcia A, et al. Conversion therapy to everolimus in renal transplant recipients: results after one year. *Transplant Proc*. 2008;40:711-3.
118. Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, et al. Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation*. 2002;74:1070-6.
119. Kreis H, Cisterne JM, Land W, et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2000;69:1252-60.
120. Witzke O, Viklicky O, Türk TR, et al. Conversion to sirolimus of patients with chronic allograft nephropathy-a retrospective analysis of outcome and influencing factors. *Langenbecks Arch Surg*. 2009;394:1073-8.
121. Larson TS, Dean PG, Stegall MD, et al. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant*. 2006;6:514-22.
122. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Pownall HJ, et al. Effect of sirolimus on the metabolism of apoB100- containing lipoproteins in renal transplant patients. *Transplantation*. 2001;72:1244-50.

123. Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Hoogeveen R, et al. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. *J Lipid Res.* 2002;43:1170-80.
124. Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, et al. Sirolimus modifies cholesterol homeostasis in hepatic cells: a potential molecular mechanism for sirolimus-associated dyslipidemia. *Transplantation.* 2007;84:1029-36.
125. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000;289:1524-9.
126. Kugimiya A, Takagi J, Uesugi M, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *2007;52:1814-5.*
127. Citterlo F, Scatà MC, Violi P, et al. Rapid conversion to sirolimus for chronic progressive deterioration of the renal function in kidney allograft recipients. *Transplant Proc.* 2003;35:1292-4.
128. Martinez-Mier G, Mendez-Lopez MT, Budar-Fernandez LF, et al. Living related kidney transplantation without calcineurin inhibitors: initial experience in a Mexican center. *Transplantation.* 2006;82:1533-6.
129. Büchler M, Caillard S, Barbier S, et al. Sirolimus versus cyclosporine in kidney recipients receiving thymoglobulin, mycophenolate mofetil and a 6-month course of steroids. *Am J Transplant.* 2007;7: 2522-31.
130. Ayala M, Morales J, Fierro A, et al. Metabolic changes following conversion from an anticalcineurin-based therapy to an everolimus-based one: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2008;40:3265-9.
131. Tenderich G, Fuchs U, Zittermann A, et al. Comparison of sirolimus and everolimus in their effects on blood lipid profiles and haematological parameters in heart transplant recipients. *Clin Transplant.* 2007;21:536-43.
132. Massy ZA. Hyperlipidemia and cardiovascular disease after organ transplantation. *Transplantation.* 2001;72:S13-5.
133. Pirsch JD, D'Alessandro AM, Sollinger HW, et al. Hyperlipidemia and transplantation: etiologic factors and therapy. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2:S238-42.
134. Vathsala A, Weinberg RB, Schoenberg L, et al. Lipid abnormalities in cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 1989;48:37-43.

135. Holdaas H, Bentdal O, Pfeffer P, et al. Early, abrupt conversion of de novo renal transplant patients from cyclosporine to everolimus: results of a pilot study. *Clin Transplant*. 2008;22:366-71.
136. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*. 1996;10:77-84.
137. Sánchez Fructuoso A, Calvo N, et al. Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. *Transplant Proc*. 2007;39:2242-4.
138. Ridker P. High sensitivity C-reactive protein. *Circulation*. 2001;103:1813.
139. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Posttransplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation*. 2005;9:438-43.
140. Bumbea V, Kamar N, Ribes D, et al. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:2517-23.
141. Diekmann F, Budde K, Oppenheimer F, et al. Predictors of success in conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus in chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant*. 2004;4:1869-75.
142. Peddi VR, Jensik S, Pescovitz M, et al. An open-label, pilot study evaluating the safety and efficacy of converting from calcineurin inhibitors to sirolimus in established renal allograft recipients with moderate renal insufficiency. *Clin Transplant*. 2005;19:130-6.
143. Morelon E, Kreis H. Sirolimus therapy without calcineurin inhibitors: Necker Hospital 8-year experience. *Transplant Proc*. 2003;35:52S-57S.
144. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*. 2004;15;100:657-66.
145. van Gelder T, ter Meulen CG, Hené R, et al. Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 2003;75:788-91.
146. Bumbea V, Kamar N, Ribes D, et al. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:2517-23.

147. Alexandru S, Ortiz A, Baldovi S, et al. Severe everolimus-associated pneumonitis in a renal transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:3353-5.
148. Abbas AK, Lichtmann HL, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Saunders W.B.; Auflage: 6th ed. (1. Juni 2007)

9 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Aktivating protein 1
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Fläche unter der Konzentrations- Zeit- Kurve
AEC	Fläche unter der Enzym-Aktivitätskurve
BMI	Body-Mass-Index
C _{max} .	Maximale Konzentration
C _{min} .	Minimale Konzentration
CMV	Cytomegalievirus
CNI	Calcineurin-Inhibitor
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktive Protein
CyA	Cicloporin A
DAG	Diacyglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimehtylsulfoxid
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EC-MPS	Mycophenolat-Natrium
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELK	Ets – like- protein
ERK-Kinase	Extracellular Signal Regulated-Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Flourescin isothicyanate
FKB 12	FK-506-binding-protein 12
FSC	forward scatter
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GFR	glomeruläre Filtrationsrate

GST	Glutathione S-Transferase
H ₂ O	Aquadest
HDL	high density lipoprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IDL	intermediate density lipoprotein
IL-2	Interleukin 2
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
IONO	Ionomycin
IP ₃	Inositol 1,4,5 Triphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LDL	low density lipoprotein
LH	luteinisierende Hormon
Lp(a)	Lipoprotein a
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MeOH	Methanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
MPAG	Mycophenolat-Glucuronid
(m)TOR	(mammalian) Target of Rapamycin
Na ₂ EDTA	Natriumethyldiamintetraessigsäure
NFAT	nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen
NH ₄ CL	Ammoniumchlorid
NTX	Nierentransplantation
NZ	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD	Pharmakodynamik
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PI	Propidium Iodid
PK	Pharmakokinetik

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
SRL	Sirolimus
SSC	side scatter
β -NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
Tac	Tacrolimus
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
Tg	Triglyceride
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TX	Transplantation
VLDL	very low density lipoprotein

10 Danksagung

Mein herzlichen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klemens Budde für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung der Arbeit während des gesamten Zeitraums. Vielen Dank für die Unterstützung!

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Hans-H. Neumayer dafür bedanken, dass ich die Arbeit an der Medizinische Klinik, Schwerpunkt Nephrologie, anfertigen durfte.

Bei Dr. Petra Glander und Jochen Nolting bedanke ich mich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die stete fachliche Unterstützung bei jeglichen Fragestellungen und für das so sorgfältige und kritische gegenlesen meiner Doktorarbeit.

Auch meinen anderen Kollegen aus dem Nephrologischen Forschungslabor mit Dr. Mareen Matz, Pia Hambach, Christine Lorkowsky und Marco Mai danke ich für die freundliche Unterstützung und die lustige Atmosphäre, in der es immer Spaß gemacht hat zu arbeiten.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Mann Paavo Beth und meinem Sohn Pauljonas, die mich während der Promotion begleitet, unterstützt und stets motiviert haben.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Erklärung

„Ich, Katrin Beth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Pharmakodynamisches Monitoring stabiler nierentransplantierter Patienten bei der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von Calcineurin-Inhibitoren auf Everolimus

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 05.04.2011