

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral und Transplantationschirurgie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
(Direktor: Univ. Prof. Dr. Peter Neuhaus)

Habilitationsschrift

**Metabonomics - Charakterisierung einer
Immunsuppressions-assoziierten Nephrotoxizität
in der Transplantationsmedizin**

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat
der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Volker Schmitz

geboren am 19.12.1967 in Wanne-Eickel/ Nordrhein-Westfalen

eingereicht am	09. November, 2009
Dekanin: Frau	Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Jürgen Klempnauer, Hannover
2. Gutachter:	Prof. Dr. Hans-J. Schlitt, Regensburg

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	4
1.1 Immunsuppression	4
1.2 Chronische Allograft Dysfunktion (CAD) nach Nierentransplantation	8
1.3 Aktuelle Strategien zur Überwachung der Transplantatfunktion	10
1.4 „Bio-Monitoring“	11
1.5 Prinzipien einer Metabonomics-basierten Diagnosedefinition	12
1.6 Anforderungen eines auf „Metabonomics“ basierenden Biomarkers	15
1.7 Biomarker-Muster als Grundlage eines zielgerichteten Screening	16
1.8 Die Messmethoden: Massenspektrometrie (HPLC-MS) und Kernresonanzspektroskopie (H-NMR)	17
1.8.1 Prinzip der H-NMR Spektroskopie	18
1.8.2 Prinzip der Massenspektrometrie	19
2. Ableitung der wissenschaftlichen Fragestellung	20
3. Klinisch experimentelle Arbeiten	23
3.1 Chronische Niereninsuffizienz nach Lebertransplantation	23
3.2 Nephrotoxizität durch Immunsuppression - Urin-Metabolite reflektieren die durch Immunsuppressiva bedingten Veränderungen der Nierenfunktion im Rattenmodell	24
3.3 Entwicklung einer Nachweismethode zur Quantifizierung von Nukleotiden mittels LC/LC Electrospray Ionisation-Massenspektrometrie	27
3.4 Metabonomische Profile unter einer Sirolimus/Cyclosporin Behandlung in einem syngenen Nierentransplantationsmodell der Ratte	29
3.5 Einfluss auf die Qualität von Spendernieren	32

4.	Diskussion	34
4.1	Niereninsuffizienz nach Lebertransplantation	34
4.2	Nephrotoxizität durch Immunsuppression - Urinmetabolite reflektieren die durch Immunsuppressiva bedingten Veränderungen der Nierenfunktion im Rattenmodell	39
4.3	Entwicklung und Validierung einer Nachweismethode zur Quantifizierung von Nukleotiden mittels Massenspektrometrie	42
4.4	Metabonomische Veränderungen im Urin unter Cyclosporine/Sirolimus in einem Nierentransplantationsmodell der Ratte	43
4.5	Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens von Spendernieren durch modifizierte Organkonservierung	46
5.	Abschließende Bewertung und Zusammenfassung	48
6.	Literatur	51
7.	Anhang	66
7.1	Verzeichnis von Abkürzungen	66
7.2	Danksagung	67
7.3	Erklärung	69

1. Einführung

1.1 Immunsuppression

Der heutige Erfolg auf dem Gebiet der Transplantation solider Organe wurde erst maßgeblich durch die Fähigkeit einer effektiven medikamentösen Unterdrückung des körpereigenen Immunsystems ermöglicht (sog. Immunsuppression).

Eines der wichtigsten Substanzen auf diesem Gebiet war und ist bis heute der Wirkstoff Cyclosporin (syn.: Neoral®, Sandimmune®), welcher bereits 1971 aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert werden konnte. Er wurde zunächst nur als Antikmykotikum eingesetzt und erst 1976 entdeckten Borel et al. seine immunsuppressiven Eigenschaften (1).

Anfang der achtziger Jahre wurde die zweite wichtige Substanz aus der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren, das Makrolid Tacrolimus (syn.: FK 506, Prograf®) aus einer Bodenprobe am Fuß des Mount Tsukuba in Japan entdeckt (2), welches ähnlich dem Cyclosporin als Wirkmechanismus eine Suppression der T-Zell-vermittelten Interleukin-2 Produktion hervorruft. Als neuere Substanz kam schließlich Anfang der neunziger Jahre das bereits vor 35 Jahren in einer Bodenprobe der Osterinsel Rapa Nui entdeckte und zunächst ebenfalls nur als Antimykotikum eingesetzte Sirolimus (syn. Rapamycin®) dazu (3).

In den letzten Jahren konnte so das Kurz- und Langzeitüberleben von Transplantatempfängern verbessert werden (4). Der Interessenschwerpunkt der meisten wissenschaftlichen Untersuchungen richtet sich nun weniger auf die Potenz dieser Immunsuppressiva, sondern vielmehr auf deren Tolerabilität im Langzeitverlauf. Aufgrund fehlender Alternativen basieren die meisten Behandlungsprotokolle nach Transplantation solider Organe jedoch nach wie vor auf einem der beiden Calcineurin-Inhibitoren Tacrolimus oder Cyclosporin. Obwohl sich diese biochemisch komplett unterscheiden, ist deren Wirkmechanismus sehr ähnlich. Die immunsuppressive Wirkung wird über eine Bindung an Calcineurin, einer intrazellulären Serin/Threonin/Kalzium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase, welches ein Schlüsselenzym in der IL-2-Produktion ist, vermittelt. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Aktivierung von CD4-

/CD8 T-Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten (5), was letztendlich zu einem wirksamen Schutz des Transplantats vor Abstoßungsreaktion führt (Abbildung 1).

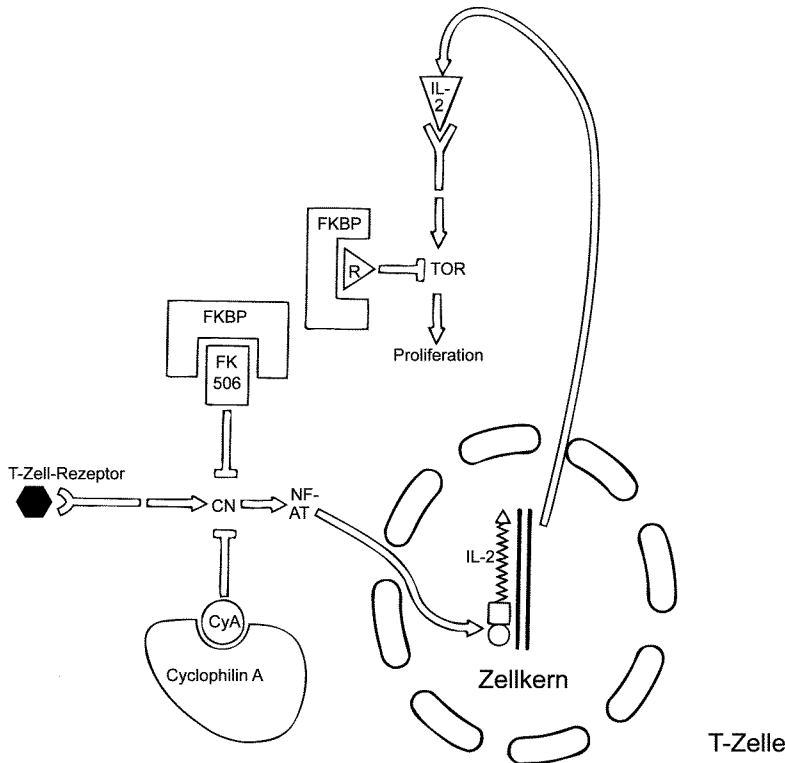


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der Wirkmechanismen verschiedener Immunsuppressiva (nach Cardenas (6)), (FKBP=FK-Bindungsprotein, TOR = "target of rapamycin", R=Rezeptor, NF-AT = „nuclear factor of activated T-cells“, CyA=Cyclosporin A, FK506=Tacrolimus, IL = Interleukin, CN = Calcineurin)

Beide Substanzen verhindern aber nicht nur wirkungsvoll eine Abstoßung, sondern haben auch organschädigende Eigenschaften, was z.B. in der Niere aufgrund von persistierender Vasokonstriktion und Endothelschädigung langfristig zu einer interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie führen kann (7). Allerdings sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die einer Calcineurin-Inhibitor vermittelten Toxizität zugrunde liegen, insbesondere auf zellulärer Ebene nach wie vor nicht ganz geklärt (8). Im Falle der Nephrotoxizität von Cyclosporin scheinen die Entwicklung und Freisetzung sogenannter „freier Radikale“ und eine Enzym-Aktivierung des Cytochrom P450 Faktoren für die

Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes zu sein (9-11). Tierexperimentelle und *in vitro* Studien haben außerdem zeigen können, dass durch Cyclosporin die mitochondriale Synthese energiereicher Phosphate in Gehirn (12), Herz (13) Niere (14, 15) und Leber (16) gehemmt werden kann, wofür folgende Mechanismen angeführt werden: 1. Direkte Interaktion des Cyclosporin mit der oxidativen Phosphorylierung (15), 2. Erhöhung des mitochondrialen Calcium Influx mit sekundärer Hemmung der ATP Synthese (17), 3. Erhöhung freier Radikale im Zytosol als Trigger einer verminderten ATP Synthese (18, 19), 4. Hemmung des Zitrat (Krebs) Zyklus (20) oder 5. Bindung an Cyclophilin mit indirekter Beeinträchtigung des transmembranösen mitochondrialen Calciumtransports (17). Die Mechanismen der Toxizität von Tacrolimus sind zwar noch weniger untersucht, es werden allerdings aufgrund der ähnlichen Wirkweise ähnliche Mechanismen vermutet. So konnte ebenfalls eine Hemmung der mitochondrialen ATP Produktion gezeigt werden (14, 15, 21).

Die Inzidenz der Nephrotoxizität unter der Behandlung mit CI ist folglich ein zunehmendes Problem, was sich nicht nur bei Nierentransplantationen zeigt, bei denen das Organ bereits durch seine Immunogenität und den vorausgegangenen Ischämie/Reperfusionsschaden sensibilisiert wurde, (22, 23), sondern auch bei einem signifikanten Anteil von Patienten nach Transplantation eines nicht-renalen soliden Organs. Bei diesen Patienten kann eine chronische Nephrotoxizität zwischen 6,9% (Herz und Lunge, kombiniert) und 21,3% (Dünndarm) auftreten, was mit einer signifikanten Minderung des Überlebens einhergeht (24).

Die Eigenschaft der Calcineurin-Inhibitoren, diejenigen Organe langfristig zu schädigen, die sie eigentlich schützen sollen, ist lange bekannt, wurde aber bisher aufgrund mangelnder Alternativen und der konkurrenzlosen Fähigkeit dieser Medikamente, eine akute Abstoßung zu verhindern, hingenommen. Ein großes Problem ist dabei die niedrige therapeutische Breite der Calcineurin-Inhibitoren, was im Falle zu hoher Spiegel neben besagter Nephrotoxizität zu zusätzlichen unerwünschten Wirkungen wie Neurotoxizität und Bluthochdruck führt (25-27). Allerdings können selbst wenn die Serumspiegel der Calcineurin

Inhibitoren im therapeutischen Bereich gehalten werden, Symptome einer Toxizität auftreten (28).

Eine gängige Strategie, den therapeutischen Index der Immunsuppressiva zu erweitern, besteht darin, unterschiedliche Substanzen zu kombinieren, welche über verschiedene Mechanismen synergistisch zusammenwirken. Dies erlaubt eine Dosisreduktion der einzelnen Kombinationspartner (29). Mit Sirolimus, einem sog. mTOR-Inhibitor, ist ein solcher vielversprechender Kombinationspartner bereits klinisch etabliert. Sowohl *in vitro* als auch in Tierstudien konnte eine synergistische immunsuppressive Wirkung beider Medikamente demonstriert werden (30, 31). Es zeigte sich aber überraschenderweise auch, dass Sirolimus, obwohl selbst nicht nephrotoxisch, zu einer Verstärkung der negativen Effekte des Cyclosporins auf die Nierenfunktion führen kann (20, 32, 33). Obwohl anzunehmen war, dass Sirolimus auch die negativen Effekte von Tacrolimus auf den Metabolismus der Nierenzelle verstärken würde, hat sich dies in den bisherigen Studien nicht bestätigt, sondern es hat sich eine bessere Verträglichkeit als bei der Kombination mit Cyclosporin gezeigt. (34-36).

In den letzten Jahren hat sich außerdem Mycophenolat Mofetil (MMF), ein weiteres ebenfalls nicht nephrotoxisches Immunsuppressivum als Standard vieler Behandlungsprotokolle durchgesetzt. Es zeigt sich allerdings unter alleiniger Therapie mit MMF eine signifikante Erhöhung akuter Abstoßungen. In Studien mit Calcineurin Inhibitor-freien Protokollen, die eine Kombination aus Sirolimus/ Azathioprin/ Prednisolon (37) oder Sirolimus/ MMF/ Prednisolon (38) untersucht haben, zeigten sich in bis zu 40% der Fälle akute behandlungsbedürftige Rejektionen in der Frühphase nach Nierentransplantation. Es scheint daher, dass CI in der Frühphase nach Transplantation nach wie vor unvermeidbar sind, und selbst für den späten Zeitraum von 6 bis 12 Monaten nach Transplantation fehlen bisher einheitliche Empfehlungen über die optimale Dosierung der Calcineurin-Inhibitoren (39).

Je nach Schweregrad einer Funktionsstörung des Nierentransplantats, kann eine Dosisreduktion der CI jedoch erfolgreich zu einer Funktionsverbesserung führen

(40, 41). Verschiedene Studien der letzten Jahren haben neben einer Reduktion der CI auch Versuche unternommen, bei selektierten Patientenkollektiven CI-freie Therapieschema zu etablieren, dies allerdings mit eingeschränktem Erfolg, denn es verblieben immer einige Patienten, bei denen der Strukturschaden der Niere offensichtlich bereits derartig fortgeschritten war, dass eine „Rescue-Therapie“ erfolglos blieb (40, 42, 43). Einige Studien bei Fällen mit Niereninsuffizienz nach Lebertransplantation konnten aber auch einen klaren Vorteil von MMF zeigen (41, 44).

1.2 Chronische Allograft Dysfunktion (CAD) nach Nierentransplantation

Bei der Mehrzahl der Patienten im Endstadium einer chronischen Nierenfunktionsstörung stellt heute die allogene Nierentransplantation ein etabliertes Verfahren dar (45). Dabei ist der größte limitierende Faktor die eingeschränkte Verfügbarkeit geeigneter Organe, weshalb ein Hauptaugenmerk auf eine Optimierung des Organüberlebens bereits transplantierte Patienten gerichtet werden muss.

Obwohl heute wie bereits ausgeführt akute Abstoßungen durch moderne Immunsuppressiva-Protokolle weitestgehend kontrollierbar geworden sind, stellt die Inzidenz chronischer Abstoßungen mit dem späten Verlust des Transplantats nach wie vor ein ungelöstes Problem dar. Ein Jahr nach Transplantation ist eine „Chronische Allograft Dysfunktion“ (CAD) der Niere die Hauptursache eines Organverlustes (29), die wahrscheinlich in bis zu 55% aller Leichenspenden und 41% aller Lebendspenden für einen Verlust der Transplantatfunktion verantwortlich ist. Obwohl neuere Studien einen Anstieg des Halbzeitüberlebens von Nierenallografts von 7 - 14 Jahren vor 1988 auf 13 - 22 Jahre im Zeitraum danach gezeigt haben, sind die Langzeitergebnisse der Nierentransplantation nach wie vor insbesondere bei Kindern nicht befriedigend (4, 46).

Bei der CAD, die als ein progressiver Funktionsverlust definiert wird, der sich frühestens 3 Monate nach Transplantation zeigt, mit einer Proteinurie von $>0,5\text{g}/24\text{h}$ einhergeht und sich keiner anderen Ursache wie akuter Rejektion, *de novo*

Nephropathie oder alleiniger Medikamententoxizität zuordnen lässt (47), handelt es sich um ein multifaktoriell ausgelöstes Krankheitsbild mit komplexer Pathophysiologie. Es sind dabei sowohl alloantigen-abhängige Faktoren (akute Rejektion, HLA (Human Leukocyte Antigen) - Mismatches, spenderspezifische Antikörper) als auch alloantigen-unabhängige Faktoren (Spenderalter, Hirntod, Ischämie/ Reperfusionsschaden, Hypertonus, Hyperlipidämie, Virusinfekte sowie insbesondere eine Calcineurin Inhibitor vermittelte Toxizität) ursächlich involviert (48). Histologisch zeigen sich unspezifische Veränderungen, die typischerweise mit einer vaskulären Intimahyperplasie, tubulären Atrophie mit interstitieller Fibrose sowie Glomerulopathie einhergehen.

Da sich eine CAD als dynamischer Prozess im Zeitverlauf entwickelt, ist es insbesondere wichtig, das Auftreten von Ereignissen, die die Inzidenz einer CAD begünstigen, wie akute Rejektionsereignisse, lange Ischämiezeiten oder toxische Immunsuppressivaspiegel, so gut es geht zu minimieren. Der Schlüssel für eine Erfolg versprechende Intervention liegt dabei in einer frühen Erkennung des negativen Ereignisses, damit eine Intervention erfolgen kann, bevor es zu einer irreversiblen morphologisch nachweisbaren Schädigung kommt.

1.3 Aktuelle Strategien zur Überwachung der Transplantatfunktion

Zur Abschätzung der Nierentransplantatfunktion und zur Diagnose einer CAD werden in der Regel im klinischen Routinealltag lediglich traditionelle Marker wie Harnstoff und Kreatininwerte im Serum (47), und im Falle pathologischer Veränderungen zur Abklärung möglicher Ursachen Biopsien verwendet (49). Unglücklicherweise ist der Serumkreatininwert kein sehr sensitiver Marker, dessen Antwort insbesondere nach einer Immunaktivierung im Transplantat verzögert sein kann, was den Zeitpunkt einer möglichen Intervention ebenfalls nach hinten verlagert, und so zu einer zusätzlichen Gefährdung des Transplantats führen kann. Auch die Aussagekraft von Biopsien hinsichtlich der Diagnose von frühen Abstoßungen oder einer immunsuppressiva-induzierten Toxizität wird kontrovers diskutiert, da die Beurteilung der Histologie stark vom Erfahrungsgrad des Untersuchers abhängt und die Biopsien selbst zu einer zusätzlichen Gefährdung des Transplantats führen (49). Insbesondere der Stellenwert von Protokoll-Biopsien wird daher aufgrund der möglichen Komplikationen (50) und der eingeschränkten Aussagekraft zur Früherkennung einer chronischen Abstoßung (51) kontrovers diskutiert.

Daher ist es bisher kaum möglich, subklinische Veränderungen, die dem multifaktoriellen Geschehen einer chronischen Abstoßung vorangehen, zu erfassen.

Die pharmakokinetische Kontrolle einer immunsuppressiven Behandlung, welche routinemäßig nach Transplantationen eingesetzt wird, sieht die Bestimmung der Serumkonzentration eines Medikaments als Aktivitätsmarker vor. Die therapeutischen Zielspiegel der einzelnen Immunsuppressiva variieren allerdings zwischen verschiedenen Transplantationszentren und sind allenfalls hinsichtlich der Vermeidung von akuten Abstoßungen und akuter Toxizität validiert. Durch eine solche pharmakokinetische Therapieüberwachung ist man jedoch in der Regel nicht in der Lage potentielle antagonistische, additive oder synergistische pharmako-/toxikodynamische Medikamenteninteraktionen oder eine genetische Variabilität der Verträglichkeit zu erfassen, und es gelingt daher meist nicht durch

Kontrolle der Medikamentenspiegel die Inzidenz einer chronischen Toxizität zu vermeiden.

Das Auftreten einer „Chronischen Allograft Dysfunktion“ (CAD) verdeutlicht, wohin die Entwicklung einer sensitiveren Möglichkeit der Therapieüberwachung zu einer Verbesserung der Transplantatfunktion und damit dem Überleben führen könnte. Mit den bisherigen diagnostischen Möglichkeiten hat die zu späte Erkennung der CAD dazu geführt, dass Strategien zur Verringerung des Transplantatschadens und –verlustes in der Regel ebenfalls zu spät oder zu selten angewendet werden (52). Der Schlüssel für eine erfolgreiche Intervention liegt nach wie vor in einer frühen Erkennung. Die meisten Strategien zur Vermeidung des Auftretens oder Verringerung des Schweregrades einer CAD sehen eine Verringerung oder Beendigung von Calcineurin-Inhibitoren in der Langzeitbehandlung vor (52), ohne dabei genau zu wissen, welche Faktoren der CAD beim jeweiligen Patienten zugrunde liegen, da die dazu erforderlichen diagnostischen Möglichkeiten bisher fehlen. Dadurch kommt es häufig auch zu einer fälschlichen Reduktion der immunsuppressiven Behandlung, was wiederum ein Dilemma darstellt, da ein der CAD beistauernder Faktor das Auftreten immunologischer Prozesse wie subklinischer und chronischer Rejektionen darstellt (22).

Aufgrund dieser Problematik ist die Entwicklung und Validierung neuer diagnostischer Ansätze wünschenswert. Mit den modernen “Screening” Technologien auf dem Gebiet der Genetik, Protein Analyse (Proteomics) und biochemischen Metabolitenanalyse (Metabonomics) ist die Basis zur Entwicklung solcher sensitiver und spezifischer Diagnosewerkzeuge geschaffen worden (53-55).

1.4 „Bio-Monitoring“

Das Konzept einer toxikodynamischen Überwachung der immunsuppressiven Behandlung transplantierte Patienten ist nicht neu. Sowohl Medikamenteneffekte als auch Auswirkungen von Krankheitsprozessen werden

heute dahingehend untersucht, ob sich mögliche Biomarker zur Überwachung oder Diagnosefindung definieren lassen (53, 56-58).

Ein Biomarker wird definiert als eine objektiv messbare, charakteristische Substanz, die sowohl als Indikator für normale biologische als auch pathogene Prozesse oder pharmakologische Antworten nach einer therapeutischen Intervention auftritt (59). Ein klinischer Biomarker, den man aktuell zur Beurteilung der Effekte von Immunsuppressiva auf die Nierenfunktion benutzt, ist z.B. das Serumkreatinin. Ein Biomarker zur Beurteilung der durch Immunsuppressiva induzierten endothelialen Dysfunktion ist die Messung des systemischen Blutdrucks. Allerdings sind solche Marker zur Beurteilung eines Krankheitsprozesses sehr ungenau und zeigen Ereignisse, die bereits das Vorliegen eines symptomatischen Krankheitsprozesses belegen.

Die Qualität eines Parameters zur Bestätigung einer Diagnose wird durch dessen Sensitivität und Spezifität bestimmt. Lassen sich Veränderungen mehrerer Parameter als Muster einem Prozess zuordnen, erhöht sich der Informationsgehalt und erwartungsgemäß die Sensitivität und Spezifität (56, 60). Moderne Screening-Technologien auf dem Gebiet der Genetik (Genomics) Protein Analyse (Proteomics) und biochemischen Analyse (Metabonomics) ermöglichen eine ganzheitliche und systematische Betrachtung der Einflüsse von Krankheit, Medikamenten oder Umwelt auf den menschlichen Organismus. (Abbildung 1). Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten der Erfassung neuer Biomarker mittels moderner Technologien, die der Einschätzung pathophysiologischer Veränderungen unter immunsuppressiver Therapie dienen, zu erfassen und deren mögliches Potential als Marker zur Verlaufsbeurteilung von Patienten nach Nierentransplantation abzuschätzen.

1.5 Prinzipien einer Metabonomics-basierten Diagnosedefinition

“Metabonomics” wird definiert als ein quantitatives Erfassen multi-parametrischer metabolischer Antworten multizellulärer Systeme auf einen pathophysiologischen Reiz oder ein genetisches Signal (57), und bezeichnet eine Ansammlung von allen

kleinen Molekülen, die man in einer Zelle bzw. einem Organismus finden kann. Obwohl der Begriff als solcher relativ neu ist, werden bereits seit Jahrzehnten kleine Metabolite, wie z.B. das Serumkreatinin, zur Überwachung und Beurteilung einer Organfunktion herangezogen. Das Thema "Metabonomics" hat eine lange Geschichte im Bereich der Toxikologie (61), und ein Schwerpunkt war dabei immer eine mögliche Charakterisierung einer Nephrotoxizität (58). Das Innovative des „Metabonomic“-Konzepts ergibt sich aus der rasanten technischen Entwicklung moderner Messgeräte wie z.B. die Entwicklung der Kapillar-Elektrophorese oder Nano-HPLC Systemen zur schnellen Separation biochemischer Verbindungen. Außerdem hat die Weiterentwicklung der „high-throughput“ Magnet-Resonanz-Spektrographie (MRS) und die Entwicklung neuer Software Analyse Systeme eine schnelle Auswertung großer Spektral- oder Chromatographie-Datenmengen ermöglicht. Der Vorteil der Massenspektrometrie ist deren höhere Sensitivität, wohingegen der Vorteil der MRS in deren geringerer Invasivität liegt (62-64).

Aufgrund dieser Fortschritte ist es nun für einzelne Wissenschaftler möglich, statt wie früher 1-2 kleine Moleküle pro Versuchsreihe, hunderte bis tausende solcher Molekülveränderungen innerhalb weniger Minuten zu identifizieren.

Dadurch eröffnen sich zwar viele neue Anwendungsmöglichkeiten, allerdings steht die Entwicklung der Technologien zur Identifizierung solcher Metabolite noch am Anfang. Mit der großen Menge an neu gewonnenen Informationen eröffnen sich nun Probleme der Diskriminierung wichtiger von unwichtigen Informationen. Es wird deutlich, dass Metabolite nur einen Teil der Komplexität der Organfunktionen abbilden. Unabhängig von der Art und Schnelligkeit verschiedener Nachweismethoden, ist bisher nicht ganz klar, welche der gefundenen Metabolite sich als gute prognostische oder diagnostische (Bio-) marker zur Überwachung transplantierte Organe eignen. Das Ziel bisheriger Studien war im Allgemeinen zwei Aspekte der Organphysiologie zu erfassen: den Reperfusionsschaden und die Organfunktion (bzw. Dysfunktion). Die meisten Studien beschränken sich auf *ex vivo* Untersuchungen anhand von „Biofluids“ wie Urin, Galle oder Serum (65-67).

Die Entstehung einer Krankheit lässt sich prinzipiell in eine genetische, biochemische und symptomatische Stufe aufschlüsseln. Die genetische Prädisposition kann das Risiko, eine Erkrankung zu erleiden, erhöhen, und kann die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Substanz beeinflussen. Trotzdem bedarf es in der Regel noch weiterer äußerer Faktoren, um eine Erkrankung auszulösen. Während der biochemischen Phase kommt es zu Veränderungen der Gen- und Proteinexpression sowie zu Veränderungen kleinerer biochemischer Metabolite, wobei dies in der Initialphase noch von den Zellsystemen der Organe kompensiert und somit nicht symptomatisch werden muss. Da hier meist noch keine histologisch nachweisbaren Schäden vorliegen, ist dies das Stadium, in dem man idealerweise das Auftreten einer Erkrankung erkennen sollte, um präventiv therapieren zu können. Schließlich kommt es zu einem symptomatischen Krankheitsgeschehen, in dem die biochemischen Änderungen nicht mehr von den zellulären Mechanismen kompensiert werden können, was zum Auftreten der klinisch apparenten Erkrankung führt.

Da alle Organe direkt oder indirekt (über extrazelluläres Wasser) mit den leicht gewinnbaren Körperflüssigkeiten Blut und Urin in Verbindung stehen, und Zellmetabolite sezernieren, ist zu erwarten, dass sich metabolische biochemische Änderungen hier teilweise widerspiegeln lassen (68).

Klinische Diagnostik basiert meist auf einer eingeschränkten Anzahl von Krankheitsmarkern, so dass die Idee einer "Omics" basierten Technologie, die eine Vielzahl von Markern einschließen würde, einen höheren Informationsgehalt liefern könnte, ähnlich einem Barcode, der auch mehr Informationen liefert als die einzelne Zahl.

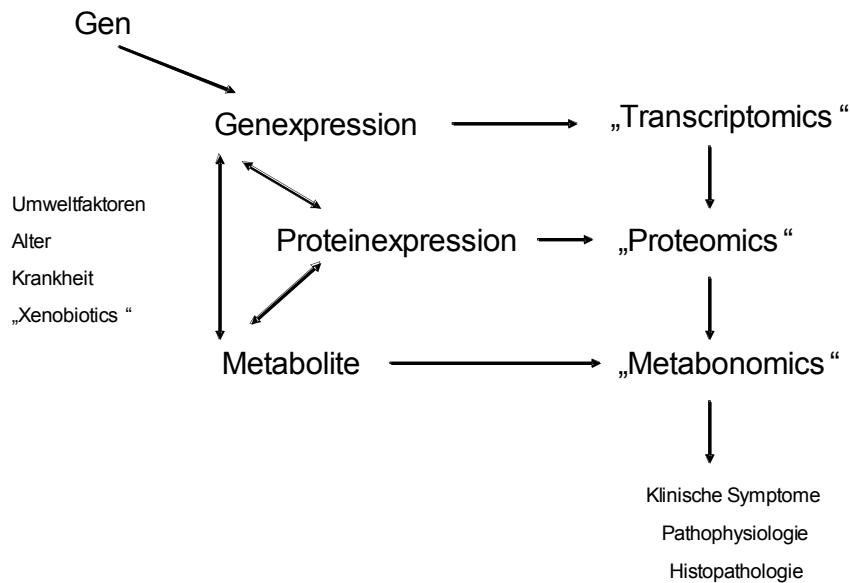


Abbildung 2. Schematische Darstellung verschiedener Ebenen, in denen Effekte von Krankheiten oder Medikamenteneinflüsse mit sog. “-omics” Technologien erfasst werden können.

1.6 Anforderungen eines auf „Metabonomics“ basierenden Biomarkers

Neben einer hohen Spezifität und Sensitivität muss ein klinisch verwertbarer diagnostischer Marker eine Qualifizierungs- und Validierungsprüfung bestehen, wobei die Validierung die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit des analytischen Tests wiedergibt, wohingegen eine Qualifizierung überprüft, inwieweit ein Marker wirklich als Parameter zur Erfassung einer spezifischen Erkrankung oder dem Effekt einer Substanz dienen kann. Da sogenannte nicht-zielgerichtete Screening-Methoden wie Proteomics oder Metabonomics zunächst nur eine große Masse ungefilterter Informationen liefern, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse. Die Wertigkeit solcher Methoden

wird durch folgende Strategien verbessert: Zum einen kann die Identifikation der molekularen Mechanismen, die zu den gefundenen metabolischen Veränderungen geführt haben, den Stellenwert der Marker verifizieren, zum anderen können statistische Auswertungen eine signifikante Korrelation zwischen bestimmten Metaboliten und einem Krankheitsprozess zeigen (69). Letzteres ist das häufigere Vorgehen, da statistische Betrachtungen wesentlich leichter als eine Entschlüsselung möglicher bisher unbekannter Mechanismen sind. Die meisten aktuellen Studien zur Identifikation neuer Biomarker einer akuten oder chronischen Immunsuppressiva-Toxizität bzw. Transplantatrejektion haben nur einen statistischen Ansatz und sind lediglich deskriptiv (53-55). Da in solchen Studien allerdings meist nur zwischen 10 und 100 Patienten eingeschlossen sind, und es neben den Studienendpunkten Toxizität/Rejektion noch eine Vielzahl von Einflussvariablen gibt, muss man die statistische Wertigkeit solcher Untersuchungen häufig in Frage stellen (56, 58, 70).

Vor einer klinischen Untersuchung möglicher Marker dienen vor allem Tiermodelle der Entschlüsselung möglicher Pathomechanismen, da hier der Einfluss von Begleitfaktoren größtenteils minimiert und die statistische Wertigkeit der Ergebnisse durch höhere Fallzahlen erhöht werden kann (27, 71).

1.7 Biomarker-Muster als Grundlage eines zielgerichteten „Screening“

Ein generelles Problem der meisten Studien ist, dass bei dem Versuch, spezifische Marker als Screening-Werkzeug für ein Krankheitsbild zu entwickeln, lediglich deskriptiv metabolische Veränderungen erfasst werden, sofern sich diese mit der Erkrankung korrelieren lassen. Es gibt bisher nur wenige Ansätze, die Erkenntnisse eines metabonomischen Screening als diagnostisches Werkzeug in den klinischen Alltag einfließen zu lassen. Ein Grund hierfür liegt darin, dass die generierten Informationen moderner nicht-zielgerichteter Screening-Methoden häufig als klinisch nicht relevant eingestuft werden oder die Menge an generierten Daten zu komplex für eine sinnvolle Auswertung bzw. praktikable Anwendung sind; letzteres vor allem, da klinische Entscheidungen

häufig kein langes Überlegen erlauben und sich meist auf eine einfache „ja/nein“-/„mehr/weniger“-Entscheidung reduzieren lassen müssen (z.B. im Falle des nierentransplantierten Patienten mit steigendem Serum-Kreatinin, bei dem sich die Entscheidung stellt, ob er eine akute/chronische Abstoßung - erfordert mehr Immunsuppression - oder eine Immunsuppression-bedingte Toxizität - erfordert eine Reduktion der CI - hat). Die Informationen moderner Screening Technologien können daher nur an Bedeutung gewinnen, wenn sie helfen, die Präzision der Richtigkeit klinischer Entscheidungen zu verbessern. Bisher sind nicht-zielgerichtete Screening-Methoden als klinisches Werkzeug ungeeignet, da die generierten Datenmengen in ihrer Komplexität einer praktischen Anwendung entgegenstehen. Trotzdem dienen solche nicht-zielgerichteten Untersuchungen in dem Feld der „Omics“ dazu, Hypothesen über mögliche pathophysiologische Vorgänge zu untersuchen, und diese Erkenntnisse für spätere mehr zielgerichtete Analysen von Medikamenten- oder krankheitsinduzierten metabolischen Veränderungen einzusetzen. Eine realistische Umsetzung eines zielgerechten Ansatzes wäre die Entwicklung von kombinierten „Markern“, die als Muster eine wesentlich höhere Spezifität und Sensitivität als ein einzelner Parameter erreichen würden (56, 60).

1.8 Die Messmethoden: Massenspektrometrie (HPLC-MS) und Kernresonanzspektroskopie (H-NMR)

Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (H-NMR [nuclear magnetic resonance]) sind heute etablierte Methoden zur Detektion und Charakterisierung kleiner Moleküle. Bei der Massenspektrometrie ist vor der eigentlichen Analyse ein Separationsschritt, meist mittels Liquid-Chromatographie (LC), chemischer Derivatisierung oder Gas-Chromatographie erforderlich (72). Die Massenspektrometrie hat eine niedrigere Nachweisgrenze als das H-NMR und ist somit die deutlich sensitivere Methode. Aufgrund von unterschiedlichen Ionisierungseffekten verschiedener untersuchter Strukturen kann es allerdings manchmal methodische Probleme geben. Die Methode der H-NMR ist besonders für eine metabonomische Analyse von Proben geeignet, da

quasi nur eine geringe bis keine Aufbereitung der Substanzen erforderlich ist, was dadurch eine nahezu zerstörungsfreie Analyse ermöglicht und nur kleine Probenmengen erfordert.

1.8.1 Prinzip der H-NMR Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (H-NMR) ist eine der wichtigsten spektroskopischen Methoden zur Aufklärung der Struktur und Dynamik von Molekülen. Bei Substanzen, die Atome mit einer ungeraden Nukleonenzahl (Summe der Protonen und Neutronen) enthalten ist eine NMR-Messung möglich. Solche Atomkerne (z. B. das in der Natur weit verbreitete Wasserstoff-Isotop ^1H oder des Kohlenstoff-Isotops ^{13}C) besitzen ein kernmagnetisches Moment und weisen in einem Magnetfeld Zustände unterschiedlicher Energie auf, die durch das Gesetz der Quantenmechanik für jeden einzelnen Atomkern charakteristisch ist. Übergänge zwischen diesen Energiezuständen können mittels Ein- bzw. Abstrahlung elektromagnetischer Wellen mit resonanter Frequenz ausgelöst bzw. registriert werden. Die jeweiligen Resonanzfrequenzen werden dabei durch das anliegende Magnetfeld und durch Details der Molekülstruktur bestimmt. Dabei weisen die Kernspins der Kohlen- oder Wasseratome verschiedener Verbindungen nicht immer die gleichen Kernspinresonanzen auf, da sich diese durch die Lage der Atome zu anderen Molekülgruppen oder durch Doppel- oder Dreifachbindungen voneinander unterscheiden können.

Die NMR-Spektroskopie erlaubt die zeitliche Dynamik von Veränderungen des Stoffwechsels zu erfassen. Somit können aus Zellextrakten oder isolierten Organellen die Stoffwechselwege in Tiermodellen oder aus humanen Studien analysiert werden. Eine NMR-spektroskopische Analyse von Körperflüssigkeiten bzw. Bioflüssigkeiten (d. h. auch Extrakte von Gewebeproben wie Biopsien oder Zellkulturen) findet zunehmend Eingang in die klinische Diagnostik und biochemische Grundlagenforschung. Der unmittelbare Vorteil der Methode besteht darin, dass komplexe Metabolitengemische in der Regel nicht vorab

aufgetrennt werden müssen (z. B. mittels chromatographischer oder anderer Trennverfahren), sondern als native Probe analysiert werden können.

1.8.2 Prinzip der Massenspektrometrie

In der Regel wird das Verfahren als Verbindung einer Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS) angewendet. Dabei dienen die Chromatographie zur Auftrennung und die Massenspektrometrie zur Identifikation und/oder Quantifizierung verschiedener Substanzen. Diese Technologie kann zur selektiven, sensitiven und quantitativen Messung von endogenen Metaboliten oder auch Medikamentenkonzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten genutzt werden. Bei der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), werden die Massen der zu messenden Substanzen selektiert, fragmentiert und die „molekularen“ Ionen der Fragmente detektiert. Aus diesem Prinzip einer Fragmentierung einer Substanz resultiert nicht nur eine höhere Spezifität und Sensitivität, hierdurch kann auch die Laufzeit einer HPLC-MS verkürzt werden, da das gesamte Gemisch nicht mehr komplett aufgetrennt werden muss. Eine wichtige klinische Anwendung der (HP)LC-MS/MS stellt die exakte Messung der Blutspiegel von Immunsuppressiva dar (72).

2. Ableitung der wissenschaftlichen Fragestellung

Bei fast allen transplantierten Patienten stellt die Toxizität von Calcineurin-Inhibitoren nach wie vor ein großes klinisches Problem dar. Könnte man diese früher Erkennen wäre es wahrscheinlich möglich, durch Modifikation der immunsuppressiven Behandlungsprotokolle Langzeitschäden zu reduzieren oder sogar zu verhindern (48). Die Erfahrungen der letzten zwei Dekaden haben aber gezeigt, dass ein pharmakokinetisches Medikamentenmonitoring allein als Strategie zur Vermeidung chronischer Toxizität nicht ausreicht, wohingegen toxikodynamische, auf sog. Biomarkern basierende Untersuchungen, sehr viel Erfolg versprechendere Konzepte darstellen könnten (53).

Zunächst erfolgte daher eine Analyse unseres Patientenkollektivs nach Lebertransplantation, um abzuschätzen, inwieweit sich das Problem einer Medikamenten-vermittelten Nierenfunktionsstörung nachvollziehen lässt. Dabei wurden insbesondere lebertransplantierte Patienten betrachtet, um den Faktor immunologischer Einflüsse auf das Organ auszuschließen.

Da unsere Hypothese darin besteht, dass sich die negativen Effekte von Calcineurin-Inhibitoren auf den Metabolismus von Nierenzellen und schließlich in Veränderungen von Metabolitenmustern in Plasma, Urin und Gewebe widerspiegeln, erfolgte als zweites eine systematische Betrachtung der Effekte einer chronischen Immunsuppression im Rattenmodell.

Anschließend wurden die Erkenntnisse der ersten Versuchsreihe benutzt, um in einem syngenem Nierentransplantationsmodell der Ratte zu untersuchen, inwieweit die durch die Immunsuppressiva induzierten Veränderungen spezifisch sind und bzw. inwieweit eine Beeinflussung durch den zusätzlichen Ischämie-/Reperfusionsschaden eintritt. Der Faktor einer immunologischen Reaktion wurde in dieser Versuchsreihe bewusst durch die Benutzung syngener Spender- und Empfängertiere ausgeschaltet und soll Ziel zukünftiger Studien werden.

In einem weiteren Projekt wurde ebenfalls in einem Rattenmodell untersucht, inwieweit sich durch Optimierung der Konservierungsbedingungen von Spendernieren der Ischämie-/Reperfusionsschaden verringern lässt, da dieser

wie bereits erwähnt ebenfalls ein signifikanter Einflussfaktor für das Entstehen einer Nierenfunktionsstörung nach Transplantation darstellt.

Durch unsere Arbeiten sollten vor allem neue Aspekte der pathophysiologischen Vorgänge einer Immunsuppressiva-bedingten Nephrotoxizität gezeigt, und insbesondere die Frage geklärt werden, ob sich die Ergebnisse anderer Studien, die als Pathomechanismus eine vermehrte Bildung „Freier Radikale“ und eine Inhibierung der mitochondrialen Synthese energiereicher Phosphate beschrieben haben, so bestätigen lassen.

Da es sich bei den intrazellulären energiereichen Phosphaten um vor allem unter Hypoxie extrem labile Verbindungen handelt, bestand ein Teil des Projektes in einer Optimierung sowohl der Gewebe-Asservierung als auch der Entwicklung und Validierung einer neuen HPLC-MS-basierten Nachweismethode zur Bestimmung von Nukleotiden im Gewebe.

Diese Methode konnte sowohl in den Studien zur Pharmakodynamik einer immunsuppressiven Therapie als auch zur Evaluierung einer modifizierten Konservierungsmethode zur Verringerung des Ischämie-/Reperfusionsschadens angewendet werden.

Im Rahmen der im Anschluss dargestellten Untersuchungen sollten folgende wissenschaftliche Fragen erarbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat die langjährige Exposition mit Calcineurin-Inhibitoren auf die Nierenfunktion von Patienten nach Lebertransplantation?
2. Lässt sich ein standardisiertes Tiermodell (Ratte) zur Darstellung der chronischen Toxizität von Immunsuppressiva erarbeiten?
3. Welche (histo-)morphologischen Veränderungen im Nierentransplantat gehen mit einem Funktionsverlust einher?
4. Welche Rolle haben pharmakokinetische und –dynamische Faktoren bei der Behandlung mit verschiedenen Immunsuppressiva-Protokollen?

5. Gibt es Veränderungen von Metaboliten in sog. „Biofluids“ (= direkt oder indirekt mit dem Zielorgan korrespondierender Körpersekrete wie Urin), die sich unter der Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten anhand neuer sensitiver Methoden wie H-NMR oder Massenspektrometrie (HPLC-MS) nachweisen lassen.
6. Sollten sich derartige Metabolite finden lassen, korrelieren diese auch mit den histomorphologischen oder klinischen Funktionsveränderungen des Nierentransplantats?
7. Führt die Exposition durch Calcineurin Inhibitoren wie *in vitro* gezeigt zu einer negativen Beeinflussung der mitochondrialen Funktion und einem Abfall energiereicher Phosphate? Und wenn ja, welche Rolle spielt dabei die Entstehung „Freier Radikale“?
8. Lässt sich durch eine Optimierung der im klinischen Alltag als Standard verwendeten Organkonservierungsmethodik die Qualität von Spendernieren verbessern, was zu einer Verbesserung der Transplantatfunktion beitragen könnte?

3. Klinisch-experimentelle Arbeiten

3.1 Chronische Niereninsuffizienz nach Lebertransplantation

Schmitz V, Laudi S, Moeckel F, Puhl G, Stockmann M, Tran ZV, Kahl A, Neumann UP, Neuhaus P: Chronic Renal Dysfunction following Liver Transplantation. Clinical Transplantation; 2008, May-Jun;22(3): 333-340

Um den Stellenwert einer Immunsuppressiva-induzierten Niereninsuffizienz nach Transplantation zu objektivieren, führten wir zunächst eine retrospektive Analyse (Zeitraum 1988 bis 2001) unserer Patienten nach Lebertransplantation durch. Die Auswahl dieser Patientengruppe war deshalb interessant, da es sich in der Regel um nierengesunde Patienten handelte, und so eine isolierte Wirkung der Immunsuppressiva auf die Nierenfunktion ohne mögliche Einflüsse der initialen Ischämie oder immunologische Vorgänge untersucht werden konnte.

Kurz zusammengefasst zeigte sich, dass es bei Patienten unter zusätzlicher Therapie mit Mycophenolat Mofetil (MMF), einer Substanz die keine bekannten nephrotoxischen Eigenschaften besitzt, im Vergleich zu der Gruppe ohne MMF über einen Beobachtungszeitraum von drei Jahren zu keiner Besserung der Nierenfunktion kam. Dies erklärt sich möglicherweise daraus, dass die Umstellung der Immunsuppression zu einem Zeitpunkt erfolgt war, an dem es bereits zu strukturellen irreversiblen Schädigungen des Nierenparenchyms gekommen war. Da es sich hier um eine retrospektive Analyse ohne Randomisierung der Patienten handelte, muss anhand neuerer prospektiver Untersuchungen geprüft werden, wie letztendlich der Einfluss von MMF auf die Funktion chronisch geschädigter Nieren nach Lebertransplantation ist, da neuere Studien für Patienten mit renaler Dysfunktion nach Lebertransplantation bereits einen klaren Vorteil unter MMF Behandlung zeigen konnten (41, 44).

3.2 Nephrotoxizität durch Immunsuppression - Urin-Metabolite reflektieren die durch Immunsuppressiva bedingten Veränderungen der Nierenfunktion im Rattenmodell

Klawitter J, Bendrick-Peart J, Rudolph B, Beckey V, Klawitter J, Haschke M, Rivard C, Chan L, Leibfritz D, Christians U, Schmitz V: Urine Metabolites Reflect Time Dependent Effects of Cyclosporine and Sirolimus on Rat Kidney Function. Chemical Research in Toxicology; 2009, 22: 118-128

In der ersten tierexperimentellen Studie wurde der Zusammenhang zwischen einer kurz- (6 Tage) und langfristigen (28 Tage) Exposition von Ratten mit Sirolimus, Cyclosporin oder einer Kombination aus beidem untersucht. Es erfolgte hierzu eine nicht-zielgerichtete Analyse biochemischer Profile aus Urin und Plasma mittels „High-Performance Liquid Chromatography“ Massenspektrometrie (HPLC-MS) und Nuklearer Magnetresonanz Spektroskopie (H-NMR).

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit konventionellen Nierenfunktionsparametern (Kreatinin) und den Blutspiegeln der jeweiligen Immunsuppressiva (Pharmakokinetik) hat zur Identifikation verschiedener biochemischer Metabolite geführt, die sich unter einer Behandlung signifikant verändert zeigten. Diese Metabolitenmuster ließen sich mit den morphologischen Veränderungen (Histologie) einer Nierenschädigung (tubulärer Schaden) korrelieren. Obwohl sich bereits nach einer Kurzzeitbehandlung funktionelle Funktionseinschränkungen (Anstieg des Serumkreatinins; Gruppe Cyclosporin 25mg/ 6 Tage: 1.0 ± 0.1 mg/dl; Gruppe Cyclosporin 10mg + Sirolimus 1mg/ 6 Tage: 0.8 ± 0.5 mg/dl (Kontrolle 0.4 ± 0.1 mg/dl)) zeigten, fanden sich in keiner Kurzzeitbehandlungsgruppe histologisch nachvollziehbare morphologische Veränderung des Nierenparenchyms. Diese zeigten sich allerdings deutlich nach 28 Behandlungstagen, wo sich unter Cyclosporin eine ausgeprägte Vakuolisierung der Tubulusepithelien sowie eine Atrophie der Tubuluszellen vor allem unter

Sirolimus zeigte. Diese Veränderungen verstärkten sich deutlich unter einer Kombinationsbehandlung.

Die alleinige Behandlung mit Cyclosporin führte außerdem nach 28 Tagen zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) um 59%, und auch unter Sirolimus kam es zu einer leichten, allerdings nicht signifikanten Einschränkung um 25%. Die Kombination beider Medikamente wiederum verstärkte diesen Effekt deutlich mit einer GFR-Abnahme um 86%.

Gleichzeitig fand sich eine signifikante pharmakokinetische Interaktion der beiden Substanzen Sirolimus und Cyclosporin. Insbesondere die Sirolimusspiegel im Gewebe der Nieren wurde durch die simultane Applikation von Cyclosporin signifikant angehoben:

Behandlung Sirolimus allein (1mg/kg/Tag):

Gewebespiegel_{Sirolimus} - Tag 6: **0.3±0.1** ng/mg Gewebe, Tag 28: **0.1±0.03** ng/mg/Gewebe;

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (10mg/kg/Tag):

Gewebespiegel_{Sirolimus} - Tag 6: **1.3±0.61** ng/mg/Gewebe, Tag 28: **0.72±0.07** ng/mg/Gewebe;

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (25mg/kg/Tag):

Gewebespiegel_{Sirolimus} - Tag 6: **1.89±0.44** ng/mg/Gewebe, Tag 28: keine Daten/Gruppe, da kein Tier eine solche Behandlung überlebt hat.

Eine HPLC-MS Urin-Analyse hinsichtlich des Vorliegens sogenannter 15-F_{2t}-Isoprostane, welche als eine stabile Form der Isoprostane nicht-enzymatisch durch freie Radikale als Abbauprodukt der Arachnoidonsäure (Peroxidation) aus Zellmembranen entstehen, und welche sich somit als stabiler Marker zum Nachweis freier Radikale nutzen lassen (73), zeigte vor allem in der Frühphase nach 6 Tagen unter Sirolimus und der Kombination Sirolimus + Cyclosporine einen deutlichen Anstieg bis auf das 6 - 10fache der Kontrollwerte. Nach 28 Behandlungstagen normalisierten sich diese Werte wieder. Hieraus ergibt sich, dass vor allem in der Frühphase der Pathogenese einer Nephrotoxizität die Bildung freier Radikale eine Rolle zu spielen scheint.

Die auffälligsten Veränderungen der sich anschließenden NMR-Analyse der korrespondierenden Urinproben war ein Neuauftreten von Trimethylamin (TMA), einer volatilen Substanz, die im Darm aus Cholin synthetisiert und von dort in den Blutkreislauf absorbiert wird, sowie ein Anstieg von Acetat und das fast komplette Verschwinden von 2-Oxoglutarat in allen Langzeitbehandlungsgruppen. Es fand sich außerdem vor allem in der Langzeit-Kombinationsgruppe (Cyclosporin + Sirolimus) ein signifikanter Anstieg von Glukose und ein Abfall von Citrat, Hippurat, Kreatinin und Trimethylamine-N-Oxid (TMAO).

In der Frühphase nach sechs Behandlungstagen zeigten sich lediglich kleinere Veränderungen, wobei ebenfalls ein signifikanter Abfall von Citrat, Succinat, Taurin und 2-Oxoglutarat sowie ein Anstieg von Kreatin, einer organischen Säure, aus der sich das Lactam Kreatinin bilden kann, nachzuweisen war.

3.3 Entwicklung einer Nachweismethode zur Quantifizierung von Nukleotiden mittels LC/LC Electrospray Ionisation - Massenspektrometrie

Klawitter J, Schmitz V, Klawitter J, Leibfritz D, Christians U.: Development and validation of an assay for the quantification of 11 nucleotides using LC/LC-electrospray ionization-MS. Analytical Biochemistry; 2007 Jun 15;365(2): 230-239

Da sich eine unserer Hypothesen zur Pathophysiologie der Nierenfunktionsstörung unter Calcineurin Inhibitoren auf eine Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung bezog, war Teil unseres Projekts die Entwicklung einer massenspektrometrischen Nachweismethode für energiereiche Phosphate (Nukleotide).

Nukleotide (Mono-, Di- und Triphosphate) spielen als Energieträger in vielen biochemischen Abläufen eine Rolle und stellen nicht nur eine universelle Energiewährung dar, sondern fungieren häufig auch als Coenzyme (74-76). Um eine genaue Übersicht über den Energiestatus einer Zelle zu bekommen, sollte man sich insgesamt mindestens vier Nukleotide ansehen, da all diese in enger Verknüpfung zueinander stehen (76). Vereinfacht dargestellt wird der Pool an Guanosin, Cytidin und Uracil triphosphate durch ein Equilibrium an Phosphorylierungsreaktionen aus dem ATP-Bestand aufgefüllt. ATP wird wiederum zu ADP dephosphoryliert, wobei das Phosphatanion wiederum auf ein anderes Nucleotid übertragen wird.

In der Vergangenheit wurden bereits sogenannte "online" HPLC/MS Methoden entwickelt, mit denen eine Quantifizierung und/oder Separation von Nukleotiden möglich war (77-81). Die meisten Nukleotide haben, wie bereits für das zyklische Nucleosid-Monophosphat gezeigt (82), selber Ionen-unterdrückende Eigenschaften gegen andere Substanzen in der Matrix der Extrakte, was eine Messungenauigkeit zur Folge hat, die allerdings in den meisten bisher veröffentlichten Methoden nicht berücksichtigt wurde (79). Außerdem ist offensichtlich für die Konservierung der Nukleotide die Art der Gewebeextraktion entscheidend. Herz, Leber und Nierengewebe haben zwar einen sehr hohen

ATP Gehalt, aber in diesen Geweben sollte das Lösungsmittel nicht nur in der Lage sein, diese großen Mengen an Nukleotiden zu extrahieren, sondern auch die Aktivität der abbauenden Enzyme minimieren. Bei der Probengewinnung ist vor allem auf eine maximale Minimierung des ischämischen Schadens zu achten, da bereits kurze hypoxische Phasen zu einem dramatischen Verlust energiereicher Phosphate führen kann (Abbildung 3).

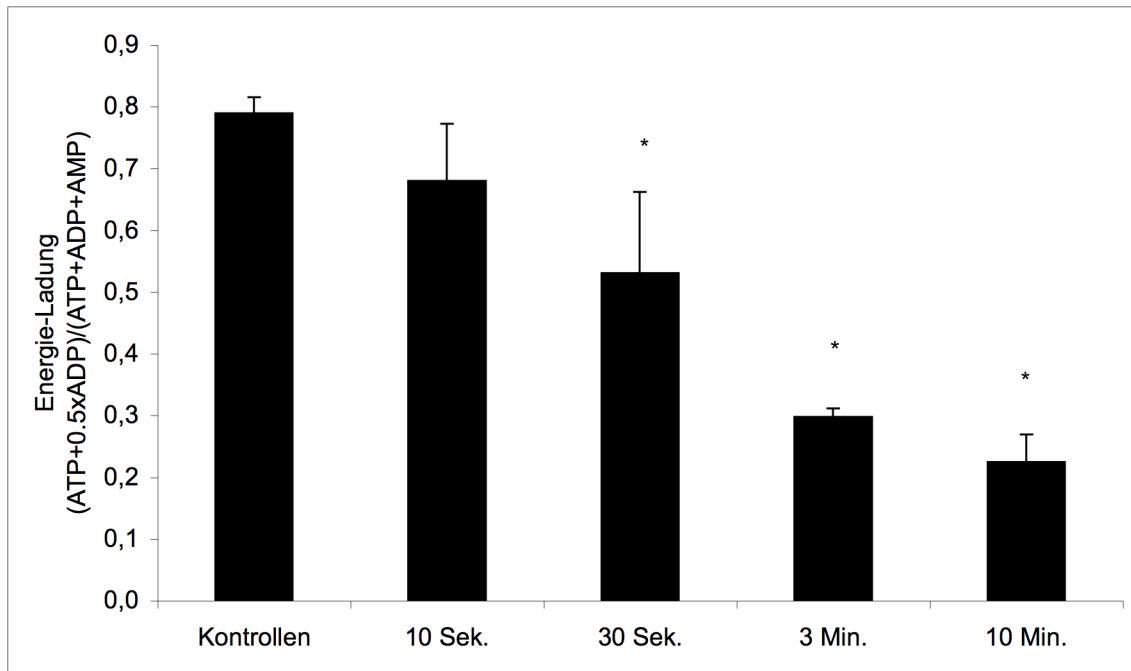


Abbildung 3. Systematische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Ischämiezeiten auf den Status energiereicher Phosphate am Beispiel von Nierengewebe. Das Gewebe wurde mittels einer sog. Freeze-Clamping Methode asserviert (Nieren werden hierbei *in vivo* mit einer auf $- 80^{\circ}$ gekühlten großen Metallklemme auf 1mm zusammengepresst und so in Bruchteilen einer Sekunde eingefroren und konserviert).

Neben einer Optimierung der Probenasservierung wurden in der folgenden Methodenarbeit die Ion-suppressiven Eigenschaften und verschiedenen Extraktionsmethoden evaluiert und verglichen, und eine schnelle verlässliche LC-MS Methode zum Nachweis von Nukleotiden in biologischen Geweben entwickelt und validiert. Diese auf Perchloroessigsäure-Extraktion basierende Methode besitzt das Potential zum Nachweis vieler phosphathaltiger, negativ geladener organischer Verbindungen.

3.4 Metabonomische Profile unter einer Sirolimus/Cyclosporin Behandlung in einem syngenem Nierentransplantationsmodell der Ratte

Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Pearl J, Puhl G, Haschke M, Klawitter J, Consoer J, Rivard CJ, Chan L, Tran ZV, Leibfritz D, Christians U: Metabolic Profiles in Urine reflect Nephrotoxicity of Sirolimus and Cyclosporine Following Rat Kidney Transplantation. *Nephron Experimental Nephrology*; 2008, 111 (4): 80-91

Durch die Etablierung eines syngenem Rattentransplantationsmodells sollte untersucht werden, inwieweit es durch den zusätzlichen Effekt eines Ischämie-/Reperfusionsschadens, der sich zwangsläufig im Rahmen der Organkonservierung vor einer Transplantation ergibt, zu einer Verstärkung der vorab beschriebenen Effekte kommt.

Wie in der ersten Versuchsreihe zeigte sich eine noch deutlichere signifikante pharmakokinetische Interaktion der beiden Immunsuppressiva Sirolimus und Cyclosporin. Die gleichen Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zu der Behandlungsstudie ohne Transplantation im Falle des Sirolimus am Tag 6 eine weitere Anhebung der Blutspiegel

Behandlung Sirolimus allein (1mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Sirolimus}: **12±9** (ohne Tx: **3.2±1.7** ng/ml);

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (10mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Sirolimus}: **32±8** (ohne Tx: **7.4±5** ng/ml);

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (25mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Sirolimus}: **55±28** (ohne Tx: **18.67±7** ng/ml).

Im Gewebe der Transplantatnieren fanden sich jedoch ähnliche Sirolimusspiegel wie bei den nur behandelten Tieren.

Für das Cyclosporin stellte sich ein ähnlicher Effekt ein. Sowohl die Blutspiegel (s.u.) als auch die Gewebespiegel (siehe Publikation 4) zeigten sich bei den transplantierten und mit beiden Immunsuppressiva behandelten Tieren im Vergleich zu den nur behandelten Tieren signifikant erhöht.

Behandlung Cyclosporin allein (10mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Cyclosporin}: **0.9±0.4** (ohne Tx: **1.1±0.2** g/l);

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (10mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Cyclosporin}: **3.5±0.8** ng/ml (ohne Tx: **1.0±0.1** g/l);

Behandlung Sirolimus (1mg/kg/Tag) + Cyclosporin (25mg/kg/Tag):

Blutspiegel_{Cyclosporin}: **2.6±1.1** (ohne Tx: **1.4±0.3** g/l),

In dieser Versuchsreihe stellte sich außerdem ein signifikanter Anstieg der 15-F_{2t}-Isoprostane im Urin in den kombiniert behandelten und damit der stärksten Toxizität ausgesetzten Behandlungsgruppen dar; ein Effekt, der bei den nur behandelten Tieren der ersten Versuchsreihe lediglich als Trend zu sehen war. Dabei fand sich in der Gruppe nur nierentransplantierter Ratten ohne zusätzliche Behandlung kein Unterschied zu Kontrolltieren.

Um im weiteren den Einfluß einer Immunsuppressiva-induzierten Toxizität auf den mitochondrialen Stoffwechsel zu analysieren, erfolgte nun durch Anwendung der unter 3.3 angeführten Methode eine Gewebeanalyse der Transplantatnieren hinsichtlich des Vorliegens energiereicher Phosphate (ATP, ADP, NADH etc.). Hierbei fand sich entgegen unserer Hypothese lediglich in der nach Transplantation mit einer Kombination aus der Höchstdosis Cyclosporin (25 mg) und Sirolimus (1 mg) behandelten Gruppe im Vergleich zur nicht transplantierten und nicht behandelten Kontrollgruppe (1.37 ± 0.2 und 0.44 ± 0.04 $\mu\text{mol/g}_{\text{Gewebe}}$) ein signifikanter Abfall der absoluten Werte für ATP und NAD⁺ (0.62 ± 0.2 and 0.17 ± 0.02 $\mu\text{mol/g}_{\text{Gewebe}}$); diese waren allerdings ohne Unterschied zu der nicht behandelten, aber transplantierten Gruppe (0.87 ± 0.4 und 0.27 ± 0.12 $\mu\text{mol/g}_{\text{Gewebe}}$). Alle anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Gewebekonzentrationen energiereicher Phosphatverbindungen.

Die NMR-Analyse der 24-Stunden Sammelurine in den Empfängertieren ergab wiederum ähnliche Veränderungen wie in der ersten Versuchsreihe, deren Ausmaß sich in den Behandlungsgruppen wie folgt darstellte: keine Transplantation [Tx] + keine Behandlung < Tx + keine Behandlung < Tx + Sirolimus 1mg < Tx + Cyclosporin 10mg < Tx + Cyclosporin 10mg + Sirolimus 1mg < Tx + Cyclosporin 25mg + Sirolimus 1mg. In der letztgenannten Gruppe zeigte sich im Vergleich zu nicht transplantierten und nicht behandelten Tieren

ein Abfall des Kreatinin (-36%), Succinat (-57%), Citrat (-89%), 2-Oxoglutarate (-75%) sowie ein Anstieg von Kreatin (+498%), TMA (Trimethylamine) (+210%) und Taurin (+370%).

3.5 Einfluss einer modifizierten Organkonservierungstechnik auf die Qualität von Spendernieren

Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Peart J, Haschke M, Beckey VE, Laudi S, Neumann UP, Schoening W, Neuhaus P., Christians U, Puhl G: Impact of Organ Preservation Using HTK for Graft Flush and Subsequent Storage in UW in Rat Kidney Transplantation. European Surgical Research; 2006, 38 (4): 388-298

Neben einer langfristigen Schädigung der Niere durch chronische Immunsuppression kann wie unter 1.2 erwähnt, die Schädigung des Spenderorgans durch einen Ischämie/Reperfusionsschaden einen signifikanten Faktor zur Entwicklung einer chronischen Nierenfunktionsstörung (= „Chronische Allograft Dysfunktion“) darstellen. Ziel der folgenden Studie war es daher, durch Optimierung der Konservierungsbedingungen eine Verbesserung der Organqualität zu erreichen, was möglicherweise zu einer Verbesserung der späteren Organfunktion beitragen könnte.

Im deutschsprachigen Raum haben sich zwei Lösungen, UW (University of Wiskonsin) und HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) zur Transplantatkonservierung von Nieren etabliert. Beide Lösungen ermöglichen zwar eine akzeptable Organkonservierung, dennoch stellt der Konservierungsschaden nach wie vor ein großes Problem dar.

Wir haben daher in einem Rattentransplantationsmodell untersucht, ob durch eine Kombination beider Lösungen eine Verbesserung der Organqualität möglich ist. Dazu wurden in der Zielgruppe die Spenderorgane unmittelbar bei der Entnahme mit HTK gespült, 30 Minuten später jedoch nochmals mit UW nachperfundiert und schließlich in UW gelagert. Verglichen wurde diese Vorgehensweise gegen alleinige Konservierungen mit entweder nur UW oder nur HTK zu unterschiedlichen Ischämiezeiten (16 und 24 Stunden (h)). Unser neues Konzept führte insbesondere bei langer Ischämiezeit (24h) bei den transplantierten Tieren zu einem signifikant verbesserten Überleben und einer signifikant geringeren Rate einer initialen Nicht-Funktion der transplantierten

Nieren. Begleitend fand sich in der Gruppe kombinierter Konservierungslösungen, eine signifikant niedrigere Konzentration von F_{2t}-Isoprostanen im Urin, welche wie vorab erwähnt etablierte Marker für ein Vorliegen freier Radikale sind. Eine Analyse der konservierten Spendernieren hinsichtlich ihres Gehaltes an energiereichen Phosphatverbindungen vor Transplantation, die wiederum als indirekter Marker eines hypoxischen Schadens dienen, zeigte einen höheren Gehalt dieser Substanzen in der HTK/UW Gruppe im Vergleich zu einer Konservierung mit HTK allein, aber auch im Vergleich zu UW allein, wobei dieser Unterschied sich als nicht signifikant erwies. Histologisch zeigte sich das stärkste Schadensausmaß in den nur mit HTK konservierten Nieren.

4. Diskussion

4.1 Niereninsuffizienz nach Lebertransplantation

Durch kontinuierliche Optimierung der chirurgischen Techniken und der perioperativen Versorgung konnte das Überleben von Patienten nach Lebertransplantation in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich verbessert werden. Leider ist es damit auch zu einer steigenden Inzidenz eines chronischen Nierenversagens gekommen. Die Einführung des MELD (**M**odel of **E**nd-stage **L**iver **D**isease) Systems vor etwa zwei Jahren, welches als eines von drei Hauptkriterien den Serumkreatininwert mit einschließt, hat zusätzlich dazu geführt, dass eine zunehmende Anzahl von Patienten bereits vor dem Zeitpunkt der Transplantation eine Nierenfunktionsstörung aufzeigt, was wiederum das Risiko eines postoperativen Nierenversagens erhöht (83).

Je nachdem welche Definitionskriterien Anwendung finden, wird die Inzidenz einer akuten oder chronischen Niereninsuffizienz zwischen 4% und 95% beschrieben (83-85). Stellt das akute Nierenversagen meist eine reversible und damit kontrollierbare Situation dar, stellt das rechtzeitige Erkennen und Vermeiden des chronischen Nierenversagens eine weit größere Herausforderung dar, da diese Form der Nierenfunktionsstörung zu einer signifikanten Verschlechterung des Patientenüberlebens führt (26, 83, 86).

Eine Analyse der aktuellen Literatur zeigt, dass neben Faktoren wie einer präoperativen Nierendysfunktion z.B. als hepatorenales Syndrom, einer Dysfunktion des Transplantats, einem präoperativem Diabetes oder einer Hepatitis C Infektion, die Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren (CI) offensichtlich der wichtigste Faktor für die Entwicklung einer akuten und chronischen Nephrotoxizität ist. In der bis jetzt größten retrospektiven Multizenterstudie zur Untersuchung des Auftretens einer chronischen Nierenfunktionsstörung nach Transplantation eines nicht-renalen Organs (definiert als Kreatinin Clearance von kleiner gleich 29ml/min pro 1.73 m² Körperoberfläche) entwickelten 18% aller Patienten nach Lebertransplantation (n = 36,849) eine chronische Nierenfunktionsstörung. Diese Zahl wurde nur von Patienten nach Dünndarmtransplantation (21%, n=228), bei denen in der Regel

noch höhere Immunsuppressivspiegel zur Vermeidung einer Abstoßung erforderlich sind, übertroffen (24).

Ein Problem bei der Erfassung einer Nierenfunktionsstörung nach Lebertransplantation ist dabei die Anwendung unterschiedlicher Definitionskriterien in den einzelnen Studien. Einige Autoren schließen bereits leichte Funktionsstörungen ein, wohingegen andere nur sehr fortgeschrittene Ausfälle bis hin zur terminalen dialysepflichtigen Nierenfunktionstörungen als Eckpunkte Ihrer Analysen sehen.

Für das Auftreten einer chronisch renalen Dysfunktion werden ein hohes Patientenalter, das Vorliegen eines präoperativen Diabetes, Dialyse vor Transplantation und das Vorliegen einer Hepatitis C in den verschiedenen Studien uneinheitlich als Risikofaktoren angeführt (24, 87, 88). Konsens besteht jedoch in allen Studien dahingehend, dass die Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren ein Hauptgrund und der dominierende Faktor zur Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz darstellt.

Interessanterweise ergab die Analyse von Ojo et al. (24), dass dieses Risiko nur unter Fällen mit Cyclosporin als initiale Immunsuppression besteht (relatives Risiko 1.25 im Vergleich zu Tacrolimus: relatives Risiko 1.0), ein Ergebnis, das sich auch in unserer retrospektiven Patientenanalyse findet, wo ebenfalls nur Cyclosporin als unabhängiger Risiko Faktor für die Entwicklung einer chronisch renalen Dysfunktion (definiert als Kreatinin \geq 1.8mg/dl über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 2 Wochen) gefunden wurde.

In einer retrospektiven Analyse von Gonwa et al. (84), fand sich ebenfalls bei 834 Patienten in einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren in 14.4% eine chronische Nierenfunktionsstörung, wovon sich bei über 50% (7.9% aller Patienten) eine terminale dialysepflichtige Niereninsuffizienz (Serumkreatinin >2.5 mg/dL oder Dialyse) ausbildete. Auch hier fand sich in 73.3% eine Calcineurin Inhibitor induzierte Toxizität als Ursache, gefolgt von selteneren Ursachen wie z.B. einer fokal sklerosierenden Glomerulonephritis (6.7%).

Entsprechend den unterschiedlichen Inzidenzen einer Niereninsuffizienz in den verschiedenen Studien, ergibt sich auch eine große Bandbreite an publizierten Daten zum Einfluss einer Nierenfunktionsstörung auf das Patienten- und Transplantatüberleben. Laut Ojo et al. ist das relative Risiko mit einer chronischen Nierenfunktionsstörung nach Transplantation eines nicht-renalen Organs (Leber, Herz, Lunge etc.) zu versterben signifikant erhöht (relatives Risiko: 4.55, $p < 0.001$). Dabei waren nicht nur Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz betroffen, auch eine noch kompensierte Störung der Nierenfunktion hatte zu einer Erhöhung des Sterberisikos auf das fast Zweifache geführt (24).

In unserer Arbeit zeigte sich ebenfalls bei Patienten mit Kreatininwerten über 1.8mg/dL eine signifikante Verschlechterung des Überlebens (5-/10-Jahresüberleben 76/68%). Allerdings zeigte eine genauere Analyse, dass insbesondere die Patienten, bei denen eine solche Nierenfunktionsverschlechterung in der Frühphase (3 bis 12 Monate) nach Transplantation auftrat, eine deutliche Verschlechterung des Überlebens zeigten (5-/10 Jahresüberleben 66/46%), wohingegen bei den Patienten, bei denen eine Verschlechterung der Nieren nach mehr als 12 Monaten nach Transplantation auftrat, das Überleben nicht beeinträchtigt schien.

In einer Serie von 102 Patienten fanden Rimola et al. (89) für das akute Nierenversagen eine Inzidenz von 48%, wobei sich das Vorliegen einer präoperativen Nierenfunktionsstörung als signifikanter Einflussfaktor für ein schlechteres Überleben darstellte. In einer großen retrospektiven Studie von Gonwa et al. (90) konnte in 1535 Fällen nach Lebertransplantation bei den Patienten, die unmittelbar postoperativ eine *de novo* Dialyse benötigt hatten, ein signifikant schlechteres Einjahresüberleben, im Vergleich zu denen, die bereits vor Transplantation dialysepflichtig waren (41% vs. 73.6%, $p=0.03$) gezeigt werden.

In einigen Studien einschließlich früherer Arbeiten aus unserer Abteilung zeigten sich in Bezug auf eine Calcineurin-Inhibitor vermittelte Nephrotoxizität ähnliche Raten an Nierenfunktionsstörungen unter Tacrolimus und Cyclosporin (26, 91),

was zunächst plausibel scheint, da beide Medikamente einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben. Allerdings zeigten neuere Arbeiten einen möglichen Vorteil unter der Behandlung mit Tacrolimus, was sich auch in der von uns dargestellten Analyse bestätigt (24, 92, 93). Ein Problem vieler Studien zur Risikoanalyse eines Nierenversagens unter Calcineurin Inhibitoren liegt in den sehr unterschiedlichen Studiendesigns und unterschiedlichen Kriterien zur Definition der Nierenfunktionseinschränkung. Viele Arbeiten fokussieren sich lediglich auf nierentransplantierte Patienten, denen die sympathische Innervation der Niere fehlt, was als ein möglicher prädisponierender Faktor zur Ausbildung einer Calcineurin-Inhibitor vermittelten Nephrotoxizität diskutiert wird (94). Bei vielen Patienten erfolgt ein Wechsel zwischen den Calcineurin-Inhibitoren, nachdem bereits ein chronisches Nierenversagen mit irreversiblen strukturellem Veränderungen der Niere stattgefunden hat (92, 93, 95-97).

Obwohl die nephrotoxischen Eigenschaften einer Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren allgemein bekannt sind (91, 98-100), erklärt die Komplexität der pathophysiologischen Veränderungen die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien und das bisherige Unvermögen, Risikopatienten eindeutig zu einem frühen Zeitpunkt zu identifizieren (24, 26, 84).

Obwohl bei vielen leber- und herztransplantierten Patienten eine Wiederherstellung der Nierenfunktion unter MMF Gabe und Dosisreduktion der CI gezeigt werden konnte (98, 101), war eine solche Dosisreduktion der CI in anderen Untersuchungen mit höheren Stadien einer Nierenfunktionsstörung weniger erfolgreich (41, 102), was sicherlich darin begründet liegt, dass zum Zeitpunkt der Intervention bei einem Großteil der Patienten bereits ein irreversibler struktureller Nierenschaden vorlag. Dieses erklärt möglicherweise auch das Ergebnis unserer Analyse, die keine Verbesserung der Nierenfunktion unter MMF-Therapie trotz CI-Reduktion zeigt. In einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren kam es bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung, denen zu einem späteren Zeitpunkt zusätzlich MMF gegeben und eine Reduktion der CI durchgeführt wurde, (n = 44) bei 48% zu einem Kreatininabfall, bei 21% zu keiner Änderung und bei 32% zu einem Kreatininanstieg. Im Vergleich hierzu zeigt sich

bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung, denen kein MMF gegeben wurde, (n = 93) kein Unterschied (59% Kreatininabfall, 16% keine Änderung, 25% Kreatininanstieg; p = 0.821).

Das Problem der Nierenfunktionsstörungen nach Lebertransplantation wird sicherlich in Zukunft noch an Bedeutung zunehmen, da es zum einen, insbesondere in der Frühphase nach Lebertransplantation, nach wie vor keine equipotente Alternative zu den bislang eingesetzten Calcineurin-Inhibitoren zur suffizienten Vermeidung einer Abstoßung gibt, zum anderen hat, wie bereits erwähnt, die Einführung des neuen Organ-Verteilungssystems (MELD), welches schwerpunktmäßig lediglich drei Kriterien (Bilirubin, INR und Kreatinin) berücksichtigt, dazu geführt, dass immer mehr Patienten bereits zum Zeitpunkt einer Lebertransplantation eine schwere Nierenfunktionsstörung aufzeigen.

Präventive Maßnahmen sind daher unabdingbar, und da Calcineurin-Inhibitoren als einer der Hauptverursacher akuter und chronischer Nierenversagen identifiziert worden sind, sollten sich aktive Strategien auf eine Optimierung bestehender Immunsuppressiva Behandlungsprotokolle sowie eine frühe Identifizierung möglicher Risikopatienten konzentrieren.

Eine genauere Entschlüsselung der pathophysiologischen Vorgänge, die einer Calcineurin Inhibitoren induzierten Nephrotoxizität zugrunde liegen, würde die Diagnostik erleichtern und möglicherweise eine frühere Intervention vor Auftreten eines irreversiblen Schadens erlauben.

4.2 Nephrotoxizität durch Immunsuppression - Urinmetabolite reflektieren die durch Immunsuppressiva bedingten Veränderungen der Nierenfunktion im Rattenmodell

Mehrere experimentelle Untersuchungen haben bereits versucht, eine Korrelation zwischen metabolischen Veränderungen und einer Exposition mit Cyclosporin herzustellen, aber interessanterweise fokussieren sich bisher die meisten Arbeiten nicht direkt auf die Niere, sondern auf andere Organe (12, 20, 71, 103). Erst in einer Studie von Lenz et al. (71) ist es gelungen, einen Effekt von Cyclosporin auf Urinmetabolite zu zeigen, allerdings wurden hierbei sehr hohe Dosen (45mg/kg/d) verabreicht, ohne dabei Blut- oder Gewebespiegel zu bestimmen, so dass viele der gefundenen Effekte Folge einer akuten unspezifischen Toxizität sein dürften, was somit wenig Rückschlüsse auf die physiologische Situation zulässt.

Grundsätzlich ergibt sich aus der experimentellen toxikologischen Untersuchung im Rattenmodell das Problem, dass diese Spezies im Gegensatz zum Menschen die meisten Medikamente und somit auch das Cyclosporin besser toleriert (104). Dieses machte bisher die Etablierung eines Toxizitätsmodell in der Ratte schwierig, und neben der Applikation sehr hoher toxischer Dosen, die zu weit höheren Blutspiegeln führen, als dies im klinischen Alltag bei Patienten der Fall ist (71), ist das am besten beschriebene Konzept, ein als erstes von Elzinga et al (105) dargestelltes sogenanntes Salz-depletierendes Rattenmodell. Bei diesem Modell, welches bislang in den meisten Arbeiten zur Toxizität von Calcineurin Inhibitoren angewendet wurde (106-108), wird den Ratten vor einer Behandlung durch eine entsprechende salzarme Diät, NaCl entzogen, was aus bisher unerklärten Ursachen zu einer Verstärkung der Toxizität von Cyclosporin führt. Aus unserer Sicht eignen sich solche Strategien wenig, Rückschlüsse auf den klinischen Alltag zu gewinnen, da sich Patienten in der Regel normal ernähren und deren Medikamentenspiegel selten derart hohe Werte erreichen. Das Ziel unserer Studie war daher auch, die Etablierung eines Toxizitätsmodell von Calcineurin Inhibitoren unter hochnormalen, aber physiologischen Blutspiegeln und einer physiologischen (normalen) Diät, um so die Wertigkeit und

Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse zu verbessern. Mit unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass insbesondere die Langzeitbehandlung mit Cyclosporin und Sirolimus zu einer renalen Funktionseinschränkung führt, und wir konnten parallel hierzu strukturelle morphologische Veränderungen in den korrespondierenden histologischen Präparaten finden (hauptsächlich Tubulusschäden wie Vakuoleneinschlüsse in den Tubuluszellen, sowie eine Tubulusatrophie), welche auch typischerweise in anderen Arbeiten als pathognomisch für eine Cyclosporin induzierte Toxizität beschrieben wurden (49).

Nachdem wir so ein für uns funktionierendes Toxizitätsmodell etabliert hatten, richteten sich unsere weiteren Überlegungen auf eine Analyse möglicher Pathomechanismen. Obwohl sowohl Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (109) als auch andere Studien eine Akkumulation freier Radikale gezeigt hatten, konnte dies in dieser Untersuchung zunächst nur bedingt nachgewiesen werden. In den Kurzzeitbehandlungsgruppen gab es zwar einige Versuchstiere mit hohen 15-F_{2t}-Isoprostan-Spiegeln. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Diese Werte fielen in den Langzeitbehandlungsgruppen weiter ab, waren aber weiterhin oberhalb derer der Kontrollgruppe. Damit ließ sich unsere Hypothese einer freien Radikalbildung als ein Mechanismus einer Calcineurin Inhibitor - induzierten Schädigung zwar nicht eindeutig be-, aber letztendlich auch nicht widerlegen. Dieses wird vor allem klar, wenn man im Weiteren die Veränderungen der NMR Urin-Analyse betrachtet. Die Abnahmen von 2-Oxoglutarat, Citrat und Succinat (alle Metabolite spielen eine Schlüsselrolle im Citratzyklus) werden als typische Metabolitenveränderungen in einem etablierten Rattenmodell für oxidativen Stress (durch Exposition mit Tetrachlormethan (CCl₄)) beobachtet (70).

In anderen Arbeiten, in denen durch bekannte Nephrotoxine wie Hexachlorbutadien (HCBd) (110) oder S-(1,2-dichlorovinyl)-L-Homocystein (DCVHC) (111) ein proximaler Tubulusschaden induziert wurde, fanden sich ebenfalls Anstiege von Glukose, Lactat, Amino- und organischen Säuren sowie

ein Abfall von Hippurat, Kreatinin, Succinat und Citrat. Ein möglicher Mechanismus hierfür wäre, dass die Tubuluszelle aufgrund der ihrer Schädigung nicht mehr Glukose/Laktat als Energiesubstrat verarbeiten kann, und dies durch eine vermehrte Aufnahme der Krebszyklusmetabolite kompensiert. Dieser Vorgang würde in erster Linie durch sogenannte (Natrium-Dicarboxylat Symporter - NaDC-3) Transporter in den proximalen Tubuluszellen vermittelt werden. Träfe unsere Hypothese zu, dann wären die Veränderungen von Urinmetaboliten unter Cyclosporin und Sirolimus in erster Linie Folge von aktiven Kompensationsmechanismen der geschädigten Tubuluszellen. Diese Hypothese würde auch erklären, warum die heute angewendeten klinischen Parameter, die hauptsächlich die Funktion der Glomeruli widerspiegeln, sich erst zu einem späten Zeitpunkt verändern.

Letztendlich reichen die aus dieser Studie gewonnen Erkenntnisse zwar nicht aus, eindeutige Marker zur sensitiven Detektion einer medikamentös induzierten Nierenschädigung zu identifizieren, dennoch ergeben sich eine Vielzahl neuer Erkenntnisse, die zur Entschlüsselung der Pathomechanismen beitragen können. Weiter bestätigt sich in unserer Arbeit die bereits bekannte Intensivierung der Toxizität von Cyclosporin durch die zusätzliche Applikation von Sirolimus, wobei nicht nur die Blut-, sondern sicherlich auch die signifikant erhöhten Gewebespiegel hierfür maßgeblich eine Rolle spielen.

In Zusammenfassung ergibt sich damit aus unserer ersten tierexperimentellen Studie die erfolgreiche Etablierung eines Modells zur Induktion einer Immunsuppressiva induzierten Toxizität in normal ernährten Wistar-Ratten. Hierbei ließen sich dosis- und zeitabhängige Veränderungen finden, wobei sich in der Frühphase (Tag 6) noch keine morphologischen Schäden, jedoch Hinweise einer Freisetzung freier Radikale und oxidativem Stress zeigen. Mit den so gefunden Daten bestätigt sich unsere Hypothese, dass es unter einer Immunsuppressiva-Toxizität zu signifikanten Veränderungen bisher unbekannter Urinmetabolite kommt, welche mit den bisher etablierten Nierenfunktionsmarkern (Serumkreatinin, Histologie) einhergehen.

4.3 Entwicklung und Validierung einer Nachweismethode zur Quantifizierung von Nukleotiden mittels Massenspektrometrie

Anhand der in unserem Labor entwickelten Methode erfolgte die Bestimmung energiereicher Phosphate in den Gewebeproben von Nieren aus Publikation 4 und 5, in denen in einem syngenem Rattentransplantationsmodell eine immunsuppressive Behandlung bzw. eine Optimierung der Konservierung von Spendernieren erfolgt war. Mehrere *in vitro* Studien hatten bereits, wie in der Einleitung erwähnt, eine Hemmung der mitochondrialen Synthese energiereicher Phosphate durch Calcineurin Inhibitoren zeigen können (12, 14-16). Neben der Etablierung der Nachweismethode konzentrierten sich unsere Überlegungen vor allem auf eine Optimierung der Organentnahmetechnik. Der sehr schnelle Zerfall von ATP unter Sauerstoffmangel durch die hohe ATPase Aktivität in Nieren ist dahingehend von Bedeutung, dass unter normalen Bedingungen eine chirurgische Nierenentnahme bis zur vollständigen Kryokonservierung mind. 30 Sekunden dauert, ein Zeitraum in dem sich in unseren Versuchsreihen bereits ein Abfall des ATP Gehalts um 30% gezeigt hatte. Deshalb muss man Studien, die einen Einfluss von Calcineurin Inhibitoren auf die mitochondriale ATP Synthese diskutieren und die nicht eine spezielle Methodik zur Organentnahme anwenden, möglicherweise kritisch bewerten (13, 103).

Als Ergebnis unserer Untersuchung findet sich lediglich in der mit einer nach Transplantation in maximaler Dosierung behandelten Gruppe (Cyclosporin 25 mg + Sirolimus 1 mg) ein Abfall der sogenannten Energieladung (0.67 ± 0.14 / Kontrollgruppe 0.79 ± 0.03), ein dimensionsloser Wert, der sich aus der Formel $ATP + 0.5 \times ADP / (ATP + ADP + AMP)$ berechnet und somit besser als die absoluten Werte den Energiestatus widerspiegelt. Ausschlaggebend für dieses Ergebnis ist in erster Linie ein signifikanter Abfall des ATP in dieser Gruppe.

In allen anderen Gruppen zeigte sich trotz Transplantation und Behandlung keine signifikante Änderung der Gewebekonzentrationen energiereicher Phosphate, so dass sich die Hypothese einer mitochondrialen Dysfunktion infolge Calcineurin

Inhibitor vermittelter Nierenfunktionsstörung anhand unserer Ergebnisse so nicht bestätigen ließ.

In einer früheren Studie, die sich methodisch allerdings komplett von unserem Versuch unterscheidet, und in der man mittels eines sogenannten NMR-Tier-Scanners eine Analyse des ATP/ADP Gehalts am lebenden Versuchstier durchgeführt hatte, ließ sich in der Frühphase der Behandlung ebenfalls kein Effekt nachweisen, allerdings kam es nach 60 Tagen unter einer Behandlung mit Cyclosporin in einer Dosis von 25 mg/kg/Tag zu einem signifikanten ATP Abfall (-40%) (112). Eine weitere Studie konnte den Einfluss einer frühen Abstoßung (Tag 7) auf den renalen ATP Gehalt belegen (113).

4.4 Metabonomische Veränderungen im Urin unter Cyclosporin/Sirolimus in einem Nierentransplantationsmodell der Ratte

Grundsätzlich zeigten sich in unserer zweiten Studie zur Darstellung metabonomischer Veränderungen unter Calcineurin Inhibitoren die gleichen Veränderungen, wie in der ersten Toxizitätsstudie ohne Transplantation. In allen Behandlungsgruppen kam es zu einem Abfall von Succinat, Citrat und 2-Oxoglutarat. Diese und auch die Anstiege der Isoprostane im Urin, stellen sich nunmehr jedoch sehr viel deutlicher dar, und das, obwohl nur ein kurzer Behandlungszeitraum (6 Tage) gewählt wurde. Auch hatte sich durch den Ischämisch-/Reperfusionsschaden eine noch stärkere Akkumulation der Nierengewebespiegel beider Substanzen (Sirolimus/Cyclosporin) gezeigt, was dahingehend interessant war, dass solche Spiegel im klinischen Alltag quasi nie bestimmt und damit in der Regel zur individuellen Einstellung einer Patientendosis nicht berücksichtigt werden. Da diese Studie sich vor allem auch auf eine Quantifizierung von Nukleotiden konzentriert hatte, war aufgrund der vorab beschriebenen speziellen Nierenentnahmetechnik (Freeze-Clamping) keine histologische Auswertung der Transplantatnieren möglich. Dennoch zeigten die etablierten Nierenfunktionsparameter (Serumkreatinin) auch hier eine deutliche dosisabhängige Schädigung, die sich anhand des Ausmaßes der

Verschiebungen der Urinmetabolite nachvollziehen ließ. Dabei zeigten sich wiederum in erster Linie Abfälle der Konzentrationen verschiedener Metabolite aus dem Citratzyklus (Abbildung 4), welcher der Zelle durch Bereitstellung von Substraten für die Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) als wichtigster ATP Lieferant dient. Die Tatsache, dass sich trotzdem keine signifikanten Beeinträchtigungen der ATP Spiegel im Nierengewebe zeigten, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass es in der Frühphase noch andere Kompensationsmechanismen (anaerobe Glykolyse) zur Bereitstellung ausreichender ATP Mengen gibt, und Veränderungen hier erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten. Dies stünde im Einklang mit der bereits erwähnten Studie von Buss et al (112), der erst nach einem Behandlungszeitraum von 60 Tagen signifikante Veränderungen (-40%) der ATP Spiegel finden konnte.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass es im Nierentransplantationsmodell der Ratte durch einen Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einer Verstärkung pharmakokinetischer Wechselwirkungen zwischen dem mTOR Inhibitor Sirolimus und dem Calcineurin Inhibitor Cyclosporin kommt. Obwohl sich dies teilweise durch eine gegenseitige Hemmung enzymatischer Abbauwege (Cytochrom P450 (CYP 3A), P-Glykoprotein) erklären lässt, sind auch hier die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt (114). Weiter zeigte sich erneut, dass offensichtlich freie Radikale in der Frühphase der Pathogenese einer Immunsuppressiva-induzierten Nierenfunktionsstörung eine wichtige Rolle spielen, wofür sich abermals entsprechende Metabolite im Urin nachweisen ließen, die wiederum mit dem Ausmaß einer Schädigung korrelieren.

4.5 Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens von Spendernieren durch modifizierte Organkonservierung

Obwohl mit den beiden etablierten Konservierungslösungen UW und HTK akzeptable Ergebnisse zur Reduktion des Gewebeschadens von Spendernieren erreicht werden, lässt sich auch heute ein Ischämie/Reperfusionsschaden nicht gänzlich vermeiden. Da dieser wiederum einen signifikanten Einfluss auf die spätere Organfunktion hat und sich zu anderen immunologischen und toxischen Schädigungsmechanismen addiert, sind Ansätze zur Minimierung des Konservierungsschadens sinnvoll und erstrebenswert.

In unserer Studie zeigte sich unter einer Kombination beider Lösungen, wobei niedrig visköses HTK zur initialen Organspülung und hyperkaliämisches UW zur Langzeitkonservierung verwendet wurden, nicht nur funktionell ein besseres Ergebnis, eine detaillierte Gewebeanalyse zeigte außerdem eine bessere Erhaltung der zelleigenen Energiesubstrate (angegeben als Energieladung [siehe 4.3]) und ein geringeres Auftreten freier Radikale im Urin transplantierte Tiere.

In einer ähnlichen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir als einen weiteren Mechanismus für die funktionell besseren Ergebnisse anhand kombiniert

konservierter Lebern nach Transplantation eine signifikante Verbesserung der sinusoidalen Mikrozirkulation darstellen (115).

In klinischen Studien konnte bisher lediglich ein Vorteil einer Konservierung mit UW bei Ischämiezeiten über 24 Stunden gezeigt werden (116) wohingegen andere Arbeiten keinen funktionellen Unterschied beider Lösungen darstellen konnten (117). Klinische Arbeiten, die eine kombinierte Anwendung verschiedener Lösungen vorsehen, existieren lediglich für die Nierenkonservierung herztoter Spender mittels Maschinenperfusion (118). Obwohl die in unserer Untersuchung dargestellten Unterschiede lediglich klein und nur im Tiermodell nachweisbar waren, belegen diese Daten dennoch, dass selbst die heute verwendeten Organkonservierungsmethoden Verbesserungspotential besitzen.

Auch hier kann erst anhand klinischer Studien geprüft werden, inwieweit diese Ergebnisse übertragbar sind. Sollte das Konzept einer initialen Perfusion mit HTK und anschließender Konservierung in UW Lösung jedoch auch klinisch zu einer Verminderung des Ischämie/Reperfusionsschadens beitragen, könnte dieses einen weiteren wichtigen Aspekt zur Reduktion eines durch Immunsuppression induzierten chronischen Nierenschadens nach Nierentransplantation darstellen.

5. Abschließende Bewertung und Zusammenfassung

Erst die Entwicklung und Einführung der heute benutzten immunsuppressiven Medikamente aus der Familie der Calcineurin Inhibitoren (Cyclosporin, Tacrolimus) hat zu der rasanten Entwicklung auf dem Gebiet der Transplantation solider Organe geführt. Dennoch ist deren Wirkungsweise nach wie vor nicht ganz geklärt und Inhalt vieler experimenteller Studien (allein das Stichwort „Cyclosporin“ ergibt über 30.000 Einträge in der Publikationsdatenbank „Pubmed“).

Ein großes Problem dieser Substanzen ergibt sich aus deren geringer therapeutischer Breite, die vor allem im Langzeitverlauf zu einer Reihe unerwünschter Wirkungen wie Neurotoxizität, Bluthochdruck, Diabetes mellitus (25, 52, 99, 119) und chronischer Nephrotoxizität (120, 121) führen kann. Letzteres gewinnt zunehmend Bedeutung, insbesondere da dies zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Patientenüberlebens beiträgt (24).

Die Erfahrungen der letzten zwei Dekaden haben gezeigt, dass ein pharmakokinetisches Medikamentenmonitoring allein als Strategie zur Vermeidung chronischer Toxizität nicht ausreicht, wohingegen toxikodynamische, auf sog. Biomarkern basierende Untersuchungen sehr viel Erfolg versprechendere Konzepte darstellen könnten (53).

Unser Ziel war es daher zunächst, herauszufinden, inwieweit unser eigenes Patientenkollektiv unter einer langjährigen Exposition mit Calcineurin Inhibitoren eine chronische Nierenfunktionsstörung zeigt. Diese Analyse führten wir an Patienten nach Lebertransplantation durch, da hier andere Einflüsse auf die Nierenfunktion, wie immunologische Vorgänge oder im Rahmen der Transplantation auftretende Konservierungsschäden, weitestgehend ausgeschlossen werden können. Entsprechend anderer Arbeiten (24, 26, 104, 122), bestätigte sich auch bei unseren Patienten eine in erster Linie durch Cyclosporin induzierte Nephrotoxizität, die sich in unserer retrospektiven Analyse in der Regel nicht nach Gabe alternativer, weniger toxischer Substanzen (MMF) verbessern ließ. Ursächlich hierfür diskutierten wir, dass die Diagnose einer

Nierenfunktionsstörung anhand konventioneller Marker (Kreatinin) wahrscheinlich häufig zu spät gestellt wird, wenn bereits ein irreversibler Nierenschaden vorliegt. In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit fokussierten wir uns in tierexperimentellen Studien auf neue moderne Diagnosetechniken (HPLC-MS, NMR) zur früheren Identifizierung möglicher Risikogruppen. Hierdurch ist es uns in einer systematischen Analyse gelungen, signifikante dosisabhängige Veränderungen verschiedener Urinmetabolite nachzuweisen, die mit den histomorphologischen Nierenveränderungen (Tubulusschaden) und konventionellen Funktionsparametern (glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Serumkreatininwerten) einhergehen. Weiter konnten wir zeigen, dass ein zusätzlicher Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einer Verstärkung dieser Effekte führt. In der frühen Behandlungsphase fand sich außerdem ein Anstieg sogenannter F_{2t}-Isoprostane, die einen indirekten Hinweis für das Vorliegen freier Radikale geben. Diese ließen sich sowohl mit den Gewebespiegeln der Immunsuppressiva als auch mit den am meisten veränderten Metaboliten im Urin korrelieren.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit eine Beeinflussung der mitochondrialen Zellfunktion in der Pathogenese der Calcineruin Inhibitor assoziierten Nephrotoxizität eine Rolle spielt, aber auch zur qualitativen Beurteilung eines Ischämie-bedingten Gewebeschadens zur Evaluierung einer möglichen Verbesserung von Konservierungsmethoden, etablierten wir eine Nachweismethode für Nukleotide und optimierten die Gewebe-Asservierungs- und Extraktionsmethoden, um so eine objektive Analyse dieser labilen Verbindungen zu erreichen. Das Ergebnis zeigte, dass es offensichtlich zumindest in der Frühphase der Exposition von Immunsuppressiva zu keiner signifikanten Beeinflussung energiereicher Nukleotide im Nierengewebe kommt und sich lediglich unter einer maximalen Dosis von Cyclosporin und Sirolimus ein Abfall von ATP zeigt. Da sich in unserer Versuchsreihe zur Immunsuppressivtoxizität eine Verstärkung der Schädigungsmechanismen nach Transplantation bzw. kalter Ischämie gezeigt hatte, untersuchten wir in einer weiteren Studie, ob und inwieweit sich durch eine Modifikation der heute

etablierten Konservierungsmethoden eine Verbesserung der Organqualität möglich ist. Hierbei zeigte sich, dass eine initiale Perfusion mit der niedrig viskösen Lösung HTK mit anschließender Konservierung in UW zu einer besseren Erhaltung der Zellenergiespeicher (Energieladung) und zu einem besseren funktionellen Ergebnis nach Transplantation führen können.

Zusammenfassend ergeben unsere Arbeiten neue Einblicke in die Pathophysiologie von unter Immunsuppression und nach Ischämie-/Reperfusion auftretenden Nierenfunktionsstörungen. Da es sich jedoch um ein multifaktorielles Geschehen mit vielen Variablen handelt, bleiben nach wie vor viele Fragen ungeklärt. Weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe richten sich nun auf eine Untersuchung der Pathomechanismen in einem tierexperimentellen Modell für chronische Rejektion sowie auf eine Metabonomics-basierende Untersuchung von Patienten im Rahmen einer prospektiven (sogenannten „proof-of-concept“) Studie bei Patienten nach Nierentransplantation.

6. Literatur

1. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. 1976. *Agents Actions* 1994; 43 (3-4): 179.
2. Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation* 2004; 77 (9 Suppl): S41.
3. Neff GW, Montalbano M, Tzakis AG. Ten years of sirolimus therapy in orthotopic liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35 (3 Suppl): 209S.
4. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342 (9): 605.
5. Geba GP, Ptak W, Askenase PW. Topical tacrolimus and cyclosporin A differentially inhibit early and late effector phases of cutaneous delayed-type and immunoglobulin E hypersensitivity. *Immunology* 2001; 104 (2): 235.
6. Cardenas ME, Zhu D, Heitman J. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4 (6): 472.
7. Shulman H, Striker G, Deeg HJ, Kennedy M, Storb R, Thomas ED. Nephrotoxicity of cyclosporin A after allogeneic marrow transplantation: glomerular thromboses and tubular injury. *N Engl J Med* 1981; 305 (23): 1392.
8. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (6): 1366.

9. Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 621.
10. Perez de Hornedo J, de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T. [Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells]. *Nefrologia* 2007; 27 (5): 565.
11. Serino F, Grevel J, Napoli KL, Kahan BD, Strobel HW. Oxygen radical formation by the cytochrome P450 system as a cellular mechanism for cyclosporine toxicity. *Transplant Proc* 1994; 26 (5): 2916.
12. Serkova N, Brand A, Christians U, Leibfritz D. Evaluation of the effects of immunosuppressants on neuronal and glial cells in vitro by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1314 (1-2): 93.
13. Niemann CU, Saeed M, Akbari H, et al. Close association between the reduction in myocardial energy metabolism and infarct size: dose-response assessment of cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302 (3): 1123.
14. Henke W, Nickel E, Jung K. Cyclosporine A inhibits ATP net uptake of rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1021.
15. Massicot F, Martin C, Dutertre-Catella H, et al. Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporin A in a renal epithelial cell line. *Arch Toxicol* 1997; 71 (8): 529.
16. Salducci MD, Chauvet-Monges AM, Tillement JP, et al. Trimetazidine reverses calcium accumulation and impairment of phosphorylation induced by cyclosporine A in isolated rat liver mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277 (1): 417.

17. Salducci MD, Chauvet-Monges AM, Berland Y, Dussol B, Elsen R, Crevat A. The restoration of ATP synthesis may explain the protective effect of calcium antagonists against cyclosporine A nephrotoxicity. *Life Sci* 1992; 50 (26): 2053.
18. Buetler TM, Cottet-Maire F, Krauskopf A, Ruegg UT. Does cyclosporin A generate free radicals? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21 (8): 288.
19. Wang C, Salahudeen AK. Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Transplantation* 1994; 58 (8): 940.
20. Serkova N, Jacobsen W, Niemann CU, et al. Sirolimus, but not the structurally related RAD (everolimus), enhances the negative effects of cyclosporine on mitochondrial metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol* 2001; 133 (6): 875.
21. Gabe SM, Bjarnason I, Tolou-Ghamari Z, et al. The effect of tacrolimus (FK506) on intestinal barrier function and cellular energy production in humans. *Gastroenterology* 1998; 115 (1): 67.
22. Campistol JM, Grinyo JM. Exploring treatment options in renal transplantation: the problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity. *Transplantation* 2001; 71 (11 Suppl): SS42.
23. Seron D, Moreso F, Grinyo JM. Prevention and management of late renal allograft dysfunction. *J Nephrol* 2001; 14 (2): 71.
24. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349 (10): 931.
25. Morozumi K, Takeda A, Uchida K, Mihatsch MJ. Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc* 2004; 36 (2 Suppl): 251S.

26. Platz KP, Mueller AR, Blumhardt G, et al. Nephrotoxicity following orthotopic liver transplantation. A comparison between cyclosporine and FK506. *Transplantation* 1994; 58 (2): 170.
27. Serkova NJ, Christians U, Benet LZ. Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity. *Mol Interv* 2004; 4 (2): 97.
28. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2001; 41 (5): 542.
29. Kahan BD. Potential therapeutic interventions to avoid or treat chronic allograft dysfunction. *Transplantation* 2001; 71 (11 Suppl): SS52.
30. Brook NR, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. Cyclosporine and rapamycin act in a synergistic and dose-dependent manner in a model of immunosuppressant-induced kidney damage. *Transplant Proc* 2005; 37 (2): 837.
31. Stepkowski SM, Tian L, Napoli KL, et al. Synergistic mechanisms by which sirolimus and cyclosporin inhibit rat heart and kidney allograft rejection. *Clin Exp Immunol* 1997; 108 (1): 63.
32. Andoh TF, Burdmann EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int* 1996; 50 (4): 1110.
33. Morales JM, Campistol JM, Kreis H, et al. Sirolimus-based therapy with or without cyclosporine: long-term follow-up in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2005; 37 (2): 693.
34. MacDonald A. Improving tolerability of immunosuppressive regimens. *Transplantation* 2001; 72 (12 Suppl): S105.

35. McAlister VC, Peltekian KM, Malatjalian DA. Orthotopic liver transplantation using low-dose tacrolimus and sirolimus. *Liver Transpl* 2001; 7 (8): 701.
36. Trotter JF, Wachs ME, Trouillot TE, et al. Dyslipidemia during sirolimus therapy in liver transplant recipients occurs with concomitant cyclosporine but not tacrolimus. *Liver Transpl* 2001; 7 (5): 401.
37. Groth CG, Backman L, Morales JM, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67 (7): 1036.
38. 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 (7): 1252.
39. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346 (8): 580.
40. Creput C, Blandin F, Deroure B, et al. Long-term effects of calcineurin inhibitor conversion to mycophenolate mofetil on renal function after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13 (7): 1004.
41. Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, et al. Conversion of liver transplant recipients on cyclosporine with renal impairment to mycophenolate mofetil. *Liver Transpl Surg* 1999; 5 (5): 414.
42. Pfitzmann R, Klupp J, Langrehr JM, et al. Mycophenolatemofetil for immunosuppression after liver transplantation: a follow-up study of 191 patients. *Transplantation* 2003; 76 (1): 130.

43. Schlitt HJ, Barkmann A, Boker KH, et al. Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet* 2001; 357 (9256): 587.
44. Tannuri U, Gibelli NE, Maksoud-Filho JG, et al. Mycophenolate mofetil promotes prolonged improvement of renal dysfunction after pediatric liver transplantation: experience of a single center. *Pediatr Transplant* 2007; 11 (1): 82.
45. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 4: 1.
46. Gonin JM. Maintenance immunosuppression: new agents and persistent dilemmas. *Adv Ren Replace Ther* 2000; 7 (2): 95.
47. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002; 24 (3): 330.
48. Merville P. Combating chronic renal allograft dysfunction : optimal immunosuppressive regimens. *Drugs* 2005; 65 (5): 615.
49. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1988; 20 (3 Suppl 3): 759.
50. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant* 2005; 5 (8): 1992.
51. Jindal RM, Hariharan S. Chronic rejection in kidney transplants. An in-depth review. *Nephron* 1999; 83 (1): 13.
52. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (10): 3015.

53. Christians U, Reisdorph N, Klawitter J, Schmitz V. Biomarkers of immunosuppressive drug toxicity. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10 (4): 284.
54. Clarke W. Proteomic research in renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2006; 28 (1): 19.
55. Raulf F. Novel biomarkers of allograft rejection: 'omics' approaches start to deliver. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10 (4): 295.
56. Koop R. Combinatorial biomarkers: From early toxicology assays to patient population profiling. *Drug Discov Today* 2005; 10 (11): 781.
57. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29 (11): 1181.
58. Shockcor JP, Holmes E. Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis. *Curr Top Med Chem* 2002; 2 (1): 35.
59. N.N. Biomarkers Definition Work Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89.
60. Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol* 2004; 22 (8): 411.
61. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1 (2): 153.
62. Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 2005; 130 (5): 606.

63. Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7 (5): 648.
64. Pelczar I. High-resolution NMR for metabonomics. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005; 8 (1): 127.
65. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096 (2): 101.
66. Foxall PJ, Mellotte GJ, Bending MR, Lindon JC, Nicholson JK. NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kidney Int* 1993; 43 (1): 234.
67. Hauet T, Baumert H, Gibelin H, et al. Noninvasive monitoring of citrate, acetate, lactate, and renal medullary osmolyte excretion in urine as biomarkers of exposure to ischemic reperfusion injury. *Cryobiology* 2000; 41 (4): 280.
68. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3 (4): 311.
69. Christians U, Schmitz V, Schoning W, et al. Toxicodynamic Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants: Promises, Reality, and Challenges. *Ther Drug Monit* 2008; 30 (2): 151.
70. Robertson DG, Reilly MD, Sigler RE, Wells DF, Paterson DA, Braden TK. Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants. *Toxicol Sci* 2000; 57 (2): 326.

71. Lenz EM, Bright J, Knight R, Wilson ID, Major H. Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field ^1H NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35 (3): 599.
72. Niessen WMA. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* 1999; 79: 634 pp.
73. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (4): 505.
74. von Ballmoos C, Brunner J, Dimroth P. The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (31): 11239.
75. Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, Osterman A, Dorrestein P. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitam Horm* 2001; 61: 103.
76. Ataullakhanov FI, Vitvitsky VM. What determines the intracellular ATP concentration. *Biosci Rep* 2002; 22 (5-6): 501.
77. Tuytten R, Lemiere F, Dongen WV, Esmans EL, Slegers H. Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16 (12): 1205.
78. Claire RL, 3rd. Positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled to ion-pairing high-performance liquid chromatography with a phosphate buffer for the quantitative analysis of intracellular nucleotides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14 (17): 1625.

79. Qian T, Cai Z, Yang MS. Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 2004; 325 (1): 77.
80. Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, et al. Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem* 2004; 76 (10): 2869.
81. Buchholz A, Takors R, Wandrey C. Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Anal Biochem* 2001; 295 (2): 129.
82. Witters E, Roef L, Newton RP, Van Dongen W, Van Onckelen HA. Quantification of Cyclic Nucleosides in Biological Samples by Negative Electrospray Tandem Mass Spectrometry coupled to Ion Suppression Liquid Chromatography. *Rapid Commun Mass Spec* 1996; 10 (2): 225.
83. Pawarode A, Fine DM, Thuluvath PJ. Independent risk factors and natural history of renal dysfunction in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2003; 9 (7): 741.
84. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation* 2001; 72 (12): 1934.
85. McCauley J, Van Thiel DH, Starzl TE, Puschett JB. Acute and chronic renal failure in liver transplantation. *Nephron* 1990; 55 (2): 121.
86. Fisher NC, Nightingale PG, Gunson BK, Lipkin GW, Neuberger JM. Chronic renal failure following liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 1998; 66 (1): 59.

87. Gayowski T, Singh N, Keyes L, et al. Late-onset renal failure after liver transplantation: role of posttransplant alcohol use. *Transplantation* 2000; 69 (3): 383.
88. Velidedeoglu E, Crawford MD, Desai NM, et al. Predictors of late kidney dysfunction post-liver transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34 (8): 3315.
89. Rimola A, Gavaler JS, Schade RR, el-Lankany S, Starzl TE, Van Thiel DH. Effects of renal impairment on liver transplantation. *Gastroenterology* 1987; 93 (1): 148.
90. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. Renal replacement therapy and orthotopic liver transplantation: the role of continuous veno-venous hemodialysis. *Transplantation* 2001; 71 (10): 1424.
91. Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: experimental and clinical observations. *Semin Nephrol* 1997; 17 (1): 34.
92. Hernandez-Herrera G, Castillo DD, Perez R, Lopez-Rubio F, Aljama P. Tacrolimus rescue therapy for cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: S104.
93. Morris-Stiff GJ, Baboolal K, Dunstan F, Jurewicz WA. Conversion from cyclosporin (Neoral) to tacrolimus (Prograf) in renal allograft recipients with chronic graft nephropathy: results of an observational study. *Transpl Int* 1999; 12 (4): 288.
94. Zhang W, Li JL, Hosaka M, et al. Cyclosporine A-induced hypertension involves synapsin in renal sensory nerve endings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (17): 9765.
95. Nielsen FT, Ottosen P, Starklint H, Dieperink H. Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A,

- tacrolimus and sirolimus in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (3): 491.
96. Trompeter R, Filler G, Webb NJ, et al. Randomized trial of tacrolimus versus cyclosporin microemulsion in renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2002; 17 (3): 141.
 97. Waller JR, Murphy GJ, Metcalfe MS, Sandford RM, Pattenden CJ, Nicholson ML. Primary immunosuppression with tacrolimus is associated with a reduction in renal allograft fibrosis compared with neoral therapy. *Transplant Proc* 2002; 34 (5): 1587.
 98. Jain AB, Hamad I, Rakela J, et al. A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplant recipients: an interim report. *Transplantation* 1998; 66 (10): 1395.
 99. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984; 311 (11): 699.
 100. Neau-Cransac M, Morel D, Bernard PH, et al. Renal failure after liver transplantation: outcome after calcineurin inhibitor withdrawal. *Clin Transplant* 2002; 16 (5): 368.
 101. Aleksic I, Baryalei M, Busch T, et al. Improvement of impaired renal function in heart transplant recipients treated with mycophenolate mofetil and low-dose cyclosporine. *Transplantation* 2000; 69 (8): 1586.
 102. Chan CY, DasGupta K, Baker AL. Cyclosporin A: drug discontinuation for the management of long-term toxicity after liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24 (5): 1085.

103. Serkova N, Klawitter J, Niemann CU. Organ-specific response to inhibition of mitochondrial metabolism by cyclosporine in the rat. *Transpl Int* 2003; 16 (10): 748.
104. Racusen LC, Solez K. Cyclosporine nephrotoxicity. *Int Rev Exp Pathol* 1988; 30: 107.
105. Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4 (2): 214.
106. Andoh TF, Lindsley J, Franceschini N, Bennett WM. Synergistic effects of cyclosporine and rapamycin in a chronic nephrotoxicity model. *Transplantation* 1996; 62 (3): 311.
107. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (5): 1059.
108. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF. Sirolimus increases transforming growth factor-beta1 expression and potentiates chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004; 65 (4): 1262.
109. Christians U, Gottschalk S, Miljus J, et al. Alterations in glucose metabolism by cyclosporine in rat brain slices link to oxidative stress: interactions with mTOR inhibitors. *Br J Pharmacol* 2004; 143 (3): 388.
110. Gartland KP, Bonner FW, Nicholson JK. Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. *Mol Pharmacol* 1989; 35 (2): 242.
111. Anthony ML, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK. Studies on the comparative toxicity of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine, S-(1,2-

- dichlorovinyl)-L-homocysteine and 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene in the Fischer 344 rat. *Arch Toxicol* 1994; 69 (2): 99.
112. Buss WC, Griffey R. Dissociation of decreases in renal cellular energetics and recovery of renal microsomal translation during chronic cyclosporine A administration. *Biochem Pharmacol* 1991; 42 (1): 71.
 113. Chan L, Shapiro JI. Magnetic resonance study of renal transplantation. *Ren Physiol Biochem* 1989; 12 (3): 181.
 114. Christians U, Schmitz V, Haschke M. Functional interaction between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2005.
 115. Olschewski P, Hunold G, Eipel C, et al. Improved microcirculation by low-viscosity histidine- tryptophan-ketoglutarate graft flush and subsequent cold storage in University of Wisconsin solution: results of an orthotopic rat liver transplantation model. *Transpl Int* 2008; 21 (12): 1175.
 116. Roels L, Coosemans W, Donck J, et al. Inferior outcome of cadaveric kidneys preserved for more than 24 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Leuven Collaborative Group for Transplantation. *Transplantation* 1998; 66 (12): 1660.
 117. de Boer J, De Meester J, Smits JM, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int* 1999; 12 (6): 447.
 118. Daemen JH, de Wit RJ, Bronkhorst MW, et al. Short-term outcome of kidney transplants from non-heart-beating donors after preservation by machine perfusion. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1: S76.
 119. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K, Eris J. Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation

- resulting in improved renal function and lower blood pressure.
Transplantation 2001; 72 (5): 777.
120. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation. *Drugs* 2001; 61 (13): 1957.
 121. Winkler M, Christians U. A risk-benefit assessment of tacrolimus in transplantation. *Drug Saf* 1995; 12 (5): 348.
 122. Bennett WM, Burdmann E, Andoh T, Elzinga L, Franceschini N. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20 (4): 214.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Rapa	Sirolimus
CsA	Cyclosporin
D ₂ O	Deuterooxid
DCI	Deuterchlorid
FID	Free induction decay
H.E.	Hematoxylin und Eosin Färbung
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaOD	Deuterisiertes Natriumhydroxid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NMR	Nuklear-Magnet-Resonanz Spektroskopie
TMA	Trimethyl amine
TMAO	Trimethyl amine-N-oxide
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat - (Lösung)
UW	University of Wisconsin - (Lösung)

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich bei meinen klinisch-experimentellen Arbeiten unterstützt und mir bei meinen Bemühungen geholfen haben, die Mechanismen einer ischämischen und durch Medikamente induzierten Nierenschädigung zu untersuchen und das Gemessene zu verstehen.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Chef, Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus, für die großzügige sowohl klinische als auch wissenschaftliche Förderung. Vor allem bedanke ich mich für dessen Engagement, mir einen zweijährigen Forschungsaufenthalt in Denver zu ermöglichen.

Ich danke weiter in Besonderen Herrn Prof. Uwe Christians, meinem „temporären“ Chef in Denver, für sein Vertrauen und dafür, dass er mich durch seine tatkräftige Unterstützung und große Erfahrung bei unseren gemeinsamen Projekten unterstützt hat, und mich dabei auch in schwierigen Phasen immer wieder durch seine optimistische Einstellung ermutigt hat, nicht aufzugeben.

Weiter danke ich Herrn Dr. rer. nat. Jost Klawitter, der mir die Methoden unseres Projektes erst nahe gebracht hat und ohne dessen unermüdlichen Einsatz, das Projekt nie hätte verwirklicht werden können. In ihm habe ich nicht nur einen guten Freund, sondern auch einen unersetzbaren Kooperationspartner gefunden.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Herrn Dr. Gero Puhl und Herrn Dr. Ulf Neumann bedanken. Beide haben nicht nur durch verschiedene kleine gemeinsame Projekte maßgeblich zur Fertigstellung meiner Habilitationsarbeit beigetragen, sondern auch durch konstruktive Diskussionen meinen wissenschaftlichen Erfahrungsschatz erweitert.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Dr. Marcus Bahra für das konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Allen weiteren Kollegen in der Klinik danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Weiter danke ich besonders meiner Freundin Katharina, die immer zur mir gestanden hat und ohne deren Unterstützung und uneingeschränktes

Verständnis, meine wissenschaftliche Tätigkeit und damit die Fertigstellung dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen wären.

7.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse von mir selbst gewonnen, die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Gegen mich sind keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig.