

**Aus dem Katharinenhospital Stuttgart
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
mit Laborpraxis
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. E. Wieland**

**CD26 als prädiktiver Marker für die Abstoßung unter
der immunsuppressiven Therapie mit Myfortic® bei
Patienten in der frühen Phase nach
Nierentransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Simone Adriana Leicht

aus

Schweinfurt

2013

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Wieland

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. S. Nadalin

**Meinen Eltern und
Großeltern**

1. Einleitung	6
1.1 Allgemeines	6
1.2 Immunsuppressiva	8
1.2.1 Mycophenolsäure/Myfortic®	8
1.2.2 Tacrolimus/Prograf®	9
1.3. Abstoßung	10
1.3.1 Hyperakute Abstoßung	10
1.3.2 Akute Abstoßung	11
1.3.3 Chronische Abstoßung	11
1.4. Pharmakogenetik und Pharmakogenomik.....	12
1.5 Biomarker	13
1.6 Vorgängerstudie	14
1.7 CD26/Dipeptidylpeptidase IV	16
1.8 Ziele der Studie	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Kontrollgruppe	19
2.2 Patienten	19
2.2.1 Ein- und Ausschlußkriterien der Studie	19
2.2.2 Aufklärung der Probanden.....	20
2.2.3 Entnahme des EDTA-Vollbluts	20
2.2.4 Patientenkollektiv.....	21
2.2.4.1 Gesamtkollektiv	21
2.2.4.2 High-risk-Gruppe	21
2.3 Transplantationsarten	22
2.3.1 Leichennierenspende	22
2.3.2 Acceptable Mismatch Programm.....	23
2.3.3 European Senior Programm.....	23
2.3.4 Lebendnierenspende.....	24
2.3.5 AB0-inkompatible Lebendnierenspende.....	24

2.4 Medikation im Rahmen der Nierentransplantation	24
2.4.1 Standard-Therapie nach Leichennieren- und Lebendnierentransplantation	24
2.4.2 Therapie bei ABO-inkompatible Lebendnierentransplantation	25
2.4.3 Therapie bei Rejektion.....	26
2.4.3.1 Humorale Rejektion	26
2.4.3.2 Borderline-Rejektion	26
2.4.3.3 Akute Rejektion.....	27
2.4.3.4 Steroidresistente Rejektion.....	27
2.5 Analysen-Parameter	27
2.5.1 Reihenfolge der Analysen der Studie	27
2.5.2 Hämatologische und klinisch-chemische Parameter	28
2.5.3 Infektionen nach Transplantation.....	29
2.6 Durchführung der Studien-Analysen	29
2.6.1 Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometrie	29
2.6.2 Analyse der Immunsuppressiva.....	30
2.6.2.1 Tacrolimus-Talspiegel	30
2.6.2.2 Konzentration von MPA, AcMPAG und fMPA mittels HPLC	30
2.6.3 DPP IV-Aktivität mittels Spektralphotometer	31
2.6.4 Analyse der sCD26-Konzentration im Plasma mittels ELISA	31
2.6.4.1 Testprinzip	31
2.6.4.2 Auswertung.....	32
2.7 Statistik.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Kontrollgruppe und Patientenkollektiv	33
3.1.1 Kontrollgruppe	33
3.1.2 Patienten an Tag 0.....	36
3.1.3 Blutspender vs. Patientenkollektiv	37
3.1.4 Patientenwerte von Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14	42
3.2 Vergleich zwischen unterschiedlichen Patientenkollektiven	46

3.2.1 Glomerulonephritis vs. Diabetische Nephropathie vs. ADPK	46
3.2.2 Ethnische Zugehörigkeit	47
3.2.3 Lebendnierenspende vs. Leichennierenspende	48
3.2.4 Präemptive Transplantation vs. nicht-präemptive Transplantation	49
3.2.5 Vortransplantierte Patienten vs. ersttransplantierte Patienten	51
3.2.6 AB0-inkompatible Lebendnierentransplantation vs. AB0-kompatible Nierentransplantation	52
3.2.7 Delayed graft function vs. unmittelbare Funktionsaufnahme	54
3.2.8 Kreatinin-Konzentration im Serum an Tag 0, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 21:	56
3.2.9 High-risk-Gruppe	56
3.3 Klinische Ereignisse	58
3.3.1 Akute Abstoßung bis zum Ende des zweiten Monats	58
3.3.1.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Abstoßung	59
3.3.1.2 Tacrolimus-Talspiegel und Abstoßung	60
3.3.1.3 Mycophenolsäure-Konzentration und Abstoßung	61
3.3.1.4 Immunsuppressiva-Konzentration und Abstoßung in der High-risk- Gruppe	63
3.3.1.5 ROC-Analyse	67
3.3.1.6 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit CD8+/CD26+ >2,2%	68
3.3.2 Transplantatfunktionsverschlechterung (TFV)	72
3.3.2.1 Kreatinin-Konzentration im Serum bei TFV	73
3.3.2.2 Expression der Oberflächenmarker und der DPP IV-Aktivität bei TFV ..	74
3.3.2.3 Immunsuppressiva-Konzentration bei TFV	76
3.3.3 Infektionen nach Transplantation	76
3.3.3.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit Infektionen nach Transplantation	77
3.3.3.2 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit Infektion nach Transplantation	81
3.3.4 Leukopenien:	81

3.3.4.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit Leukopenien	81
3.3.4.2 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit Leukopenie.....	83
3.4 Protein sCD26-Konzentration bei Blutspendern und Patienten.....	83
4. Diskussion.....	87
4.1. Beantwortung der aufgestellten Fragen	87
4.1.1 Bestätigt sich der Zusammenhang zwischen der Expression von CD26 auf T-Zellen und einer akuten Abstoßung nach Nierentransplantation, wenn CD26 direkt aus EDTA-Vollblut bestimmt wird, ohne dass vorher eine Zellisolation oder eine Stimulation wie in der Vorgängerstudie stattgefunden haben?.....	87
4.1.2 Korreliert die Aktivität der DPP IV im Plasma mit der CD26-Expression auf T-Zellen und kann somit DPP IV als Marker für eine akute Abstoßung verwendet werden?	90
4.1.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen der CD26-Expression auf T-Zellen und der Konzentration von MPA, AcMPAG, fMPA und Tacrolimus, oder ein Zusammenhang zwischen der DPP IV-Aktivität und den Konzentrationen von MPA, AcMPAG, fMPA und Tacrolimus?	93
4.2 Weitere Beobachtungen	100
4.2.1 Präemptiv transplantierte Patienten vs. dialysepflichtige Patienten	100
4.2.2 AB0-inkompatible vs. AB0-kompatible Transplantationen	103
4.2.3 Transplantatfunktionsverschlechterung	105
4.2.4 Vortransplantation vs. Ersttransplantation	109
4.2.5 Grunderkrankung.....	109
4.2.6 LSP vs. Cadaver.....	110
4.2.7 Delayed Graft Function.....	111
4.2.8 High-risk Gruppe	112
4.2.9 Überimmunsuppression.....	114
4.3 CD26-Expression, sCD26 und DPP IV-Aktivität.....	115

5. Zusammenfassung	117
6. Literaturverzeichnis.....	119
7. Danksagung	130

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Seit über einem Jahrzehnt geistert ein Bild durch das Internet: eine kleine nackte Maus mit einem riesigen Ohr auf dem Rücken, die sogenannte Vacanti-Maus, geschaffen von Dr. CA Vacanti *et al.* (1).



Abb. 1: Die Vacanti-Maus (2)

Auch wenn das Ohr nicht aus menschlichem Gewebe, sondern aus Rinderknorpel bestand, und die Maus nicht einem gentechnischen Experiment unterzogen wurde, so zeigt diese kleine Maus dennoch eindrucksvoll den Traum der Menschen, benötigte Organe einfach nachwachsen lassen zu können. Könnte man Organe (und sogar ganze Körperteile wie Hände und Arme) mit der Patienten-DNA, und damit mit den identischen HLA-Antigenen, nachwachsen lassen, so wäre für viele Menschen in Deutschland und auf der ganzen Welt ein großes Problem gelöst. Die ethischen Aspekte eines solchen Organ-Ersatzteil-Lagers sind jedoch eine ganz andere Geschichte und werfen viele Fragen auf.

Befindet sich ein Patient im terminalen Stadium einer chronischen Niereninsuffizienz, wegen einer Erkrankung oder aufgrund genetischer Faktoren, so stellt sich die Frage nach einer Nierentransplantation. Auch wenn die Dialyse den Patienten mehrere Jahre lang am Leben erhalten kann, bietet

eine Nierentransplantation eine bessere Überlebenschance (3). Nicht zu vernachlässigen ist auch die durch das Wegfallen der Dialyse verbesserte Lebensqualität nach einer Transplantation (3).

Gemäß dem Jahresbericht von Eurotransplant (4) warteten Ende Dezember 2010 alleine in Deutschland 7869 Menschen auf eine Spenderniere. Aufgrund von erworbenen oder angeborenen Erkrankungen brauchen immer mehr Patienten ein Spenderorgan. Dem entgegengesetzt erfolgten im Jahre 2010 in Deutschland nur 2272 Leichennieren- und 665 Lebendnierentransplantationen.

Aufgrund des massiven Spenderorgan-Mangels, sowie der steigenden Anzahl der Patienten, welche sich auf der Warteliste bei Eurotransplant befinden, müssen alle Möglichkeiten ausgeschöpft werden, um bereits transplantierte Organe so lange wie möglich zu erhalten. Die durchschnittliche Transplantat-Überlebenszeit liegt nach 8 Jahren bei ca. 60%, wobei diese stark variiert, in Abhängigkeit von Faktoren wie z.B. HLA-Mismatch zwischen Spender- und Empfängertypisierung, dem Vorhandensein von präformierten HLA-Antikörpern und ob es sich um eine Leichen- oder Lebendnierenspende gehandelt hat (5, 6).

Da die Leichennierenspende in Deutschland weiterhin nicht einmal ansatzweise die Transplantatnachfrage decken kann, befindet sich die Lebendnierenspende auf dem Vormarsch. Immer mehr Transplantationen erfolgen mittels Lebendnierenspenden (4). Bei einer Lebendnierenspende wird einem gesunden Menschen (meist einem Angehörigen des Patienten) eine Niere entfernt und diese dem Patienten transplantiert. Lebendnierenspenden zeichnen sich durch eine gute Organqualität und eine relativ kurze kalte Ischämiezeit aus, welche sich positiv auf das Outcome und das Transplantatüberleben auswirken (7, 8)

1.2 Immunsuppressiva

Seit über 50 Jahren werden Immunsuppressiva zur Vermeidung von Abstoßungen eingesetzt und leisten einen großen Beitrag zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen. Die stete Weiterentwicklung und Neuentdeckung weiterer Immunsuppressiva führten dazu, dass uns heute eine Vielzahl potenter immunsuppressiver Substanzen zur Verfügung steht. Die sehr schweren Nebenwirkungen der ersten Immunsuppressiva konnten zwar reduziert werden, dennoch haben Immunsuppressiva auch heute noch gravierende unerwünschte Arzneimittelwirkungen, welche die Morbidität und Mortalität der Nierentransplantatpatienten erhöhen (9). Im Klinikum Stuttgart erfolgt bei Nierentransplantationen eine standardisierte Tripel-Therapie mit Prednisolon (Decortin[®]), Tacrolimus (Prograf[®]) und Mycophenolat-Natrium (Myfortic[®]) (siehe Methoden).

1.2.1 Mycophenolsäure/Myfortic[®]

Mycophenolat-Natrium (EC-MPS oder EC-MPA, „enteric-coated mycophenolate sodium“) gehört zur Gruppe der DNA-Synthese-Hemmer. Es wird im Dünndarm freigesetzt und resorbiert. Es wirkt als nicht-kompetitiver, reversibler Inhibitor des Enzyms Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welches für die *de novo* Synthese von Guanosin-Nukleotiden verantwortlich ist. Die Mycophenolsäure (MPA) wird in der Leber, der Niere und dem Gastrointestinaltrakt durch das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) zum größten Teil in den inaktiven Metaboliten MPA-7-O-Glucuronid (MPAG) und zu einem geringeren Anteil in den aktiven Metaboliten Acyl-Glucuronid-MPA (AcMPAG) glucuronidiert. Auch weitere Enzyme der UGT1A-Gruppe sind zu einem geringeren Anteil an der Glucuronidierung beteiligt. MPAG wird über organische Anionen-Transporter (OATs) und auch über das multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in die Galle sezerniert und gelangt in das Darmlumen. Dort wird MPAG wieder zu MPA umgewandelt und gelangt über den enterohepatischen Kreislauf zurück ins Blut. Diese Wiederaufnahme ist für 10-60% der gesamten MPA-Exposition verantwortlich und zeigt sich im Plasma durch einen zweiten Peak in der MPA-Zeit-

Konzentrationskurve. Ungefähr 97-99% von MPA und 82% von MPAG liegen im Plasma proteingebunden vor. Die Ausscheidung der MPA-Metaboliten geschieht über die Niere, wobei vermutlich auch MRP2 als aktiver Transporter an der renalen Ausscheidung beteiligt ist. (10 - 13)

Im Gegensatz zu den meisten Körperzellen, welche über den sogenannten Salvage-Pathway Nukleotide erneut verwenden können, sind die T- und B-Lymphozyten auf die *de novo*-Synthese von Guanosin angewiesen. Dadurch kommt es durch EC-MPS zu einer selektiven Hemmung der T- und B-Lymphozyten. (10)

Im Unterschied zu anderen Immunsuppressiva wirkt EC-MPS nicht nephrotoxisch, jedoch zeigt auch EC-MPS unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie, opportunistische Infektionen (z.B. BKV, Candida, Herpes-Viren), sowie gastrointestinale Beschwerden (10, 11).

Eine weitere Darreichungsform von MPA ist Mycophenolatmofetil (MMF). MMF wird im Dünndarm rasch resorbiert, im Gegensatz zu EC-MPS, welches im Dünndarm verzögert freigesetzt und somit langsamer resorbiert wird. Durch die rasche Resorption von MMF kommt es nach 30 – 60 min nach oraler Verabreichung zu einem ersten Peak in der Blutkonzentration, ein weiterer Peak entsteht nach 6 – 12 h, bedingt durch die gastrointestinale Reabsorption von MPA. Dieser Peak ist bei MMF stärker ausgeprägt als bei EC-MPS, bedingt durch die bei EC-MPS initiale verzögerte Aufnahme im Dünndarm. (14)

1.2.2 Tacrolimus/Prograf®

Tacrolimus ist ein Calcineurin-Inhibitor und gehört zu den Makroliden. Durch Hemmung der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen bei T-Zellen wirkt Tacrolimus sowohl auf den zellulären als auch den humoralen Anteil des Immunsystems. Wird der T-Zell-Rezeptor aufgrund eines Antigens aktiviert, so kommt es zu einem Calcium-Anstieg in der Zelle und damit zur Aktivierung des Calcineurins. Das Calcineurin ist für die Transkription der T-Zell-Aktivierungsgene von mehreren pro-inflammatorischen Zytokinen, zum Beispiel Interleukin-2, zuständig, welche die T-Zell-Proliferation fördern. Tacrolimus

bindet nun im Zytoplasma der T-Zelle an das FK-Bindungsprotein 12 und bindet als Komplex wiederum an das Calcineurin, wodurch dessen Aktivierung gehemmt wird. Durch die Inhibition des Calcineurins kommt es zu einer Hemmung der Transkription und somit zur Hemmung der Zytokin-Produktion und T-Zell-Proliferation. (10, 15)

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite erfolgt die Dosierung von Tacrolimus nach dem individuellen Plasmatalspiegel des Patienten. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Tacrolimus beinhalten unter anderem Nephrotoxizität, Neurotoxizität, gastrointestinale Störungen, Hypertonus und Hyperlipidämie sowie Diabetes mellitus (10, 15).

1.3. Abstoßung

Trotz intensiver Immunsuppression kommt es dennoch weiterhin zu Transplantatabstoßungen. Es wird zwischen hyperakuter, akuter und chronischer Abstoßung unterschieden. Ein Sonderfall ist die Borderline-Abstoßung, welche sich durch grenzwertige Veränderungen im histologischen Präparat auszeichnet, die den Verdacht einer Abstoßung nahe legen. In dieser Arbeit wurde die Borderline-Abstoßung als Abstoßung gewertet, andere Quellen (16) zählen sie jedoch noch nicht als Abstoßung. Die Einteilung der Rejektionen erfolgt histologisch gemäß der BANFF-Klassifikation.

1.3.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach einer Transplantation auf. Sie wird hervorgerufen durch präformierte zytotoxische Antikörper, wie z.B. HLA Klasse I-Antikörper oder Isoagglutinine bei AB0-Blutgruppeninkompatibilität. Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie des Komplementsystems kommt es zur Entstehung von Mikrothromben im Transplantat und dadurch schlussendlich zur Transplantatnekrose. (16 - 18)

1.3.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung tritt innerhalb von Tagen bis mehreren Wochen nach Transplantation auf. Ursache ist hier die primäre Aktivierung von T-Lymphozyten (18). Zu den klinischen Zeichen gehören Rückgang der Diurese, Blutdruckanstieg sowie Anstieg des Serumkreatinins um mehr als 20% des Ausgangswerts, Fieber und ein angeschwollenes Transplantat, welches auf Druck schmerzhaft ist. Oftmals weist allerdings nur der Anstieg des Serumkreatinins auf eine akute Abstoßung hin. Beweisend für das Vorliegen einer akuten Abstoßung ist nach wie vor die Histologie, welche durch eine Nierenpunktion gewonnen wird. Die histologische Einteilung der akuten Abstoßung erfolgt gemäß der BANFF-Klassifikation in eine geringgradige Abstoßung (Grad I), eine mäßiggradige Abstoßung (Grad II) und eine schwere Abstoßung (Grad III) (16, 17).

Therapiert wird eine akute Abstoßung mit Erhöhung der Immunsuppressiva sowie der Gabe von Steroiden und gegebenenfalls der Gabe von Anti-Thymoglobulin (ATG) (siehe Methoden).

1.3.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung tritt Monate bis Jahre nach einer Transplantation auf. Die genauen Ursachen und Mechanismen für eine chronische Abstoßung sind bisher nicht völlig geklärt. Zusätzlich zu den immunologischen Vorgängen scheinen auch allgemein inflammatorische Mechanismen daran beteiligt zu sein. Die chronische Abstoßung zeichnet sich durch einen Rückgang der Nierenfunktion aus, zudem kommt es zu einer Ansammlung von T-Zellen im Nierenparenchym und einer Infiltration von T-Zellen und Makrophagen im Interstitium (18).

Auch hier erfolgt die histologische Einteilung gemäß der BANFF-Klassifikation in eine milde (Grad I), mäßige (Grad II) und eine schwere (Grad III) Abstoßung. (16, 17)

1.4. Pharmakogenetik und Pharmakogenomik

Trotz intensiver, teilweise Blutspiegel-angepaßter Immunsuppression kommt es bei einigen Patienten weiterhin zu Abstoßungsepisoden, obwohl die Immunsuppressiva im therapeutischen Bereich liegen. Bei anderen Patienten kommt es zu opportunistischen Infektionen, welche typisch bei Überimmunsuppression sind, obwohl auch hier die Blutspiegel im therapeutischen Bereich liegen. Medikamente können somit in unterschiedlichen Menschen unterschiedliche Effekte haben, obwohl die Dosierung und die Medikamenten-Konzentration gleich sind (9). Es wird also eine Methode benötigt, die für jeden Patienten die individuelle Medikamentenkonzentration ermittelt, die der Patient braucht, um ein Maximum an Effektivität der Immunsuppression bei gleichzeitig minimalster Toxizität zu erreichen (19 - 23).

Ein Ansatzpunkt ist die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik. Hier werden die Auswirkungen der genetischen Einflüsse auf die Wirksamkeit von Medikamenten untersucht. Aufgrund von Mutationen und Polymorphismen können die kodierten Enzyme verändert werden, was zu einer veränderten Enzymfunktion führt, welche wiederum den Abbau eines Medikaments beschleunigen, verlangsamen oder gar verhindern kann.

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit Variationen von einzelnen Genen, welche den Effekt eines Medikaments beeinflussen können, wie z.B. die Mutation eines Enzyms, welches für den Abbau eines Arzneimittels benötigt wird. Bei der Pharmakogenomik werden wiederum mehrere Gene bezüglich deren Einflüsse auf ein Medikament und dessen Metabolismus untersucht. Ziel der Pharmakogenetik und Pharmakogenomik ist die individualisierte Pharmakotherapie, durch die Patienten eine für sie persönlich perfekt angepaßte Medikamentendosis erhalten, um einen maximalen Medikamenteneffekt bei minimalsten Nebenwirkungen zu erhalten (24 - 26).

Man schätzt, dass 20-95% der unterschiedlichen Arzneimitteldispositionen und Arzneimittelwirkungen auf genetische Einflüsse zurückzuführen sind (27).

Untersuchungen an Genen, welche Enzyme kodieren, die unter anderem für die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Mycophenolsäure (MPA) verantwortlich sind, gaben Hinweis darauf, dass genetische Variationen mitverantwortlich für die Unregelmäßigkeiten im Medikamentenabbau sein könnten (24). Um genauere Aussagen bezüglich des Einflusses der genetischen Variabilität auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MPA treffen zu können, sind allerdings weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven nötig.

Ein weiterer Vorteil der Pharmakogenetik und Pharmakogenomik ist die Möglichkeit, bei Patienten bereits vor der ersten Immunsuppressiva-Gabe aufgrund ihrer Genetik eine optimale Dosierung zu ermitteln, während das Therapeutic Drug Monitoring (TDM) erst nach Verabreichung der Immunsuppressiva beginnen kann (28).

Ein großer Nachteil der pharmakogenetischen Analyse ist der finanzielle Aspekt. Molekulargenetische Untersuchungen sind teuer, und damit nicht für den Routineeinsatz bei jedem Patienten finanzierbar. Des Weiteren ist der rechtliche und ethische Aspekt nicht zu vernachlässigen, da genetische Untersuchungen Befürchtungen des „gläsernen Menschen“ schüren könnten.

1.5 Biomarker

Ein weiterer Schritt zur individualisierten Pharmakotherapie ist die Identifizierung und Analyse sogenannter Biomarker. Ein Biomarker ist ein „objektiv messbarer Parameter, der einen normalen biologischen Prozess, einen pathogenetischen Prozess oder die pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention widerspiegelt“ (29). Ein bekannter Biomarker ist zum Beispiel die Glucose im Serum, sie spiegelt die aktuellen glykämischen Verhältnisse im Körper wieder.

Oftmals weist nur ein Kreatinin-Anstieg im Serum auf eine Rejektion hin, dennoch können auch subklinisch verlaufende Abstoßungen das Transplantat schädigen und müssen daher erkannt werden. Diese subklinisch verlaufenden

Rejektionen sind jedoch meist nur im Biopsat sichtbar. Bei den Patienten gibt es weder klinische Anzeichen noch Anzeichen in den Laboruntersuchungen, welche auf eine Nierentransplantatdysfunktion hinweisen würden (30). Hier könnte die Anwendung von entsprechenden Biomarkern von großem Vorteil sein.

Da das Immunsystem ein sehr individuelles komplexes Geschehen ist, besteht auch die Notwendigkeit, die immunsuppressiven Medikamente individuell einstellen zu können. In einer Studie von Long *et al.* (31) wurde berichtet, dass durch Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus auch die für die Toleranzentstehung wichtigen regulatorischen T-Zellen (Treg) in ihrer Proliferation gehemmt werden. Die Notwendigkeit zur genauen Einstellung der Immunsuppressiva zeigt sich demnach einerseits im Verhindern einer Abstoßung, andererseits im Verhindern einer Überimmunsuppression, welche zu einer fehlenden Toleranzentwicklung bezüglich des Transplantats und zu nicht-immunologischen Nebenwirkungen führt (9).

1.6 Vorgängerstudie

In einer vorangegangenen Studie (32) wurden bei nierentransplantierten Patienten (n=35) in der frühen Phase nach Transplantation die Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern, und klinischen Ereignissen überprüft. Die Patienten erhielten als Initialtherapie Basiliximab und die Standard-Tripel-Therapie Steroide, Tacrolimus und Mycophenolsäure.

Es zeigten sich hier starke interindividuelle Variationen in der Pharmakokinetik von Mycophenolsäure (MPA) und den Metaboliten MPA-7-O-Glucuronid (MPAG), Acyl-Glucuronid-MPA (AcMPAG) und fMPAG (freies MPAG). Während sich keine Assoziation zwischen den MPA-pharmakokinetischen Parametern und Transplantatrejektionen zeigte, fand man bei Diarrhoe niedrige pharmakokinetische Parameter, sowie eine hohe AcMPAG-Konzentration bei gastrointestinalen Beschwerden ohne Diarrhoe und bei Leukopenie.

Die pharmakodynamischen Biomarker zeigten eine inverse Korrelation zwischen MPA und AcMPAG einerseits und der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) in Leukozyten. Es fand sich aber keine Assoziation zwischen der IMPDH-Aktivität und klinischen Ereignissen. Die Lymphozytenproliferation, welche mit dem kommerziellen BrDU-test bestimmt wurde, zeigte eine Assoziation mit Leukopenien.

Einige CD-Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten (CD3+) waren mit klinischen Ereignissen assoziiert. Während die Expression des Interleukin 2-Rezeptors CD25 keine Assoziation mit klinischen Ereignissen zeigte, fand sich beim Transferrin-Rezeptor CD71 eine verminderte Expression bei Infektionen. Eine vermehrte Expression von CD26 zeigte sich bei akuten Abstoßungen. Sieben der 35 Patienten erlitten innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation eine Abstoßung. Diese Patienten zeigten an Tag 7 nach Transplantation eine deutlich erhöhte CD26-Expression auf den T-Lymphozyten. Setzte man den Cut-Off bei 42,1 (% CD26 auf CD3 Zellen), so zeigte sich eine Sensitivität hinsichtlich einer Abstoßung von 100%, die Spezifität betrug ca. 70%. Lag die prozentuale Anzahl der CD26+/CD3+ Zellen über 50%, so bedeutete dies ein 10-fach höheres relatives Risiko, eine Abstoßung zu erleiden.

Aufgrund der Ergebnisse der Studie, dass CD26 mit Abstoßungen assoziiert ist, wurde eine weiterführende Studie mit einem größeren Patientenkollektiv veranlaßt, um zu überprüfen, ob CD26 als prädiktiver Marker für Rejektionen in der frühen Phase nach Transplantation eingesetzt werden kann.

Die isolierten und stimulierten Lymphozyten zeigten außerdem eine reduzierte CD26-Expression unter der immunsuppressiven Therapie mit Myfortic[®], wobei die fehlende Signifikanz dieser Ergebnisse an der geringen Fallzahl liegen könnte und somit in einer größeren Patientenpopulation überprüft werden muß. Wenn sich diese Ergebnisse bestätigen, käme die Expression von CD26 auf T-Zellen möglicherweise auch als Biomarker für das pharmakodynamische Monitoring der Immunsuppression mit MPA, Tacrolimus und Steroiden in Betracht.

Da die Untersuchungen in der Vorstudie mit Isolation von mononukleären Zellen und deren Stimulation mittels Phytohämagglutinin sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv waren, und die CD26-Expression sich hinsichtlich der Stimulation bei Patienten mit und ohne Abstoßung nicht unterschied, wurde in der Nachfolgestudie auf Zellkulturen mit Isolation und Stimulation verzichtet. Die Untersuchungen wurden direkt im EDTA-Blut mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Dieses EDTA-Blut wurde auf Station im Rahmen der Routineblutentnahmen entnommen. So konnte gleichzeitig geprüft werden, ob sich die Untersuchungen auch im Routinebetrieb bewähren könnten.

1.7 CD26/Dipeptidylpeptidase IV

CD26 ist ein Oberflächenmarker, welcher auf Zellen von verschiedenen Gewebetypen wie zum Beispiel Niere, Darm, Lunge, Leber, Herz und Plazenta exprimiert wird (33 - 36). Auch auf den T-Lymphozyten im peripheren Blut ist CD26 als Oberflächenmolekül nachweisbar (37), wobei bei gesunden Menschen eine niedrige CD26-Expression beschrieben wird (38 - 40). Im peripheren Blut wird CD26 vor allem auf aktivierten CD4+ und CD8+ Lymphozyten exprimiert, ruhende T-Zellen zeigen hingegen nur eine schwache CD26-Expression (41 - 50).

Der Oberflächenmarker CD26 ist ein Transmembran-Protein, gehört zu den membranassoziierten Proteasen und hat co-stimulatorische Fähigkeiten (9). Bindet ein Antigen an den T-Zell-Rezeptor (TCR), so kommt es erst durch die co-stimulatorische Wirkung des CD26 zu einer Aktivierung der T-Zelle (51). Durch ein Transmembransignal kommt es zur Tyrosyl-Phosphorylierung von Proteinen im Zytoplasma, was wiederum zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung und Interleukin-2-Sekretion mit anschließender T-Zell-Proliferation führt (52 - 54).

Durch Proteolyse wird ein Teil des CD26 (sCD26) ins Serum abgegeben und besitzt als Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) enzymatische Aktivität (55, 56, 42). Die DPP IV spaltet als Exopeptidase Dipeptide vom N-terminalen Ende ab,

wobei Prolin oder Alanin die vorletzte Aminosäure der Peptide oder Proteine sind (57). Als natürliche Substrate für die DPP IV kommen zum Beispiel verschiedene Zytokine, Neuropeptide, Peptidhormone und Chemokine in Betracht (58, 59).

In *in vitro* Experimenten exprimierten T-Zellen, welche vorher mit Phytohämagglutinin oder Concanavalin A stimuliert wurden, das Oberflächenmolekül CD26. Gleichzeitig konnte DPP IV-Aktivität im Zellkulturmedium nachgewiesen werden (41).

Da auf Th1-Zellen eine vermehrte Expression von CD26 nachgewiesen werden konnte, und bekannt ist, dass Th1-Effektor-Zellen bei einem starken Reiz auf das Immunsystem aktiviert werden, wie es zum Beispiel im Rahmen einer akuten Abstoßung vorkommt (60, 61), könnte CD26 sich als Biomarker für die Diagnostik von akuten Abstoßungen im Rahmen einer Nierentransplantation eignen. (9)

Die DPP IV ist bei -20°C 12 Monate lang stabil und übersteht auch wiederholtes Auftauen und Einfrieren (11). Gemessen werden kann die Aktivität der DPP IV mittels Spektralphotometer mit einem chromogenen oder fluorogenen Substrat (9).

1.8 Ziele der Studie

Die vorliegende Studie ist eine Nachfolgestudie der Dissertation von Frau Dr. Y. Martius „Zusammenhang zwischen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Parametern und der Therapie mit Myfortic® bei Patienten in der frühen Phase nach Nierentransplantation“. An einem größeren Patientenkollektiv sollten folgende drei Punkte überprüft werden:

1. Bestätigt sich der Zusammenhang zwischen der CD26-Expression auf T-Lymphozyten und einer Abstoßung des Transplantats, wenn die

Oberflächenmarker direkt aus EDTA-Vollblut bestimmt werden, ohne vorherige Zellisolation und Stimulation?

Die Möglichkeit einer Analyse aus EDTA-Vollblut wäre eine große Vereinfachung der Analyse. Zeitaufwendige Zellisolationen und nachfolgende Stimulationen, welche mehrere Tage in Anspruch nehmen, würden entfallen. Die Analyse des Biomarkers CD26 könnte somit für die Routinebestimmung zur Verfügung stehen.

2. Korreliert die DPP IV-Aktivität im Plasma mit der CD26-Expression auf T-Lymphozyten und kann somit die DPP IV-Aktivität ebenfalls als Marker für eine drohende Transplantatabstoßung verwendet werden?

Dies würde eine weitere Vereinfachung für die Analyse bedeuten, da die DPP IV im Plasma auch nach dem Einfrieren für mehrere Monate stabil bleibt, und somit auch längere Transportwege toleriert werden können. Dies würde die DPP IV zu einem praktikablen Biomarker machen, welcher auch bei Multicenter-Studien zum Einsatz kommen könnte (9). Zusätzlich wäre das Problem der Wochenenden und Feiertage, an denen keine Durchflußzytometrie durchgeführt wird, gelöst.

3. Besteht zwischen der CD26-Expression auf T-Lymphozyten und der DPP IV-Aktivität im Plasma ein Zusammenhang mit der MPA-, AcMPAG- und fMPA-Konzentration?

Anders als Tacrolimus kann die Mycophenolsäure-Dosis, besonders bei der Verwendung von Myfortic[®] nicht durch die Ermittlung des täglichen Plasmatalspiegels für jeden Patienten individuell eingestellt werden. Grund hierfür ist die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Mycophenolsäure (11). Ein Biomarker wäre eine Möglichkeit, Rückschlüsse auf die individuelle Immunsuppression durch Myfortic[®] zu ziehen.

2. Material und Methoden

2.1 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe und zur Erhebung von Referenzwerten wurden von 49 Blutspendern Blutproben entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen einer Blutspende im Institut für Transfusionsmedizin und Blutspende des Klinikums Stuttgart. Für die Studie wurde den Blutspendern (BS) zusätzlich zu den Routineentnahmen eine 2,6 ml-Monovette EDTA-Blut entnommen. Es wurden nur Blutspender ausgewählt, die seit der letzten Spende keine Medikamente, auch keine oralen Kontrazeptiva, eingenommen hatten. Der Spendeabstand zwischen zwei Spenden muss mehr als 56 Tage betragen.

Um eine annähernd gleichmäßige Altersverteilung der Kontrollgruppe zu erhalten, wurden 5 Altersgruppen gebildet: 18-30 Jahre, 31-40 Jahre, 41-50 Jahre, 51-60 Jahre und 61-70 Jahre. Jede Altersgruppe setzt sich aus 5 weiblichen und 5 männlichen Blutspendern zusammen, mit Ausnahme der Gruppe der 61-70 Jahre alten Blutspender, welche 5 männliche, aber nur 4 weibliche Blutspender enthielt.

2.2 Patienten

2.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Die Patienten wurden gemäß der Ein- und Ausschlusskriterien der Studie im Klinikum Stuttgart rekrutiert. Die ersten Patienten wurden Ende 2008 rekrutiert, die letzten im Sommer 2010. Solange die Einschlusskriterien erfüllt waren und keine Ausschlusskriterien zutrafen, wurden die Nierentransplantat-Patienten rekrutiert. Es erfolgte keine weitere Sortierung oder ein weiteres Auswählen der Patienten.

Einschlusskriterien:

- Männer und nicht schwangere Frauen über 18 Jahre
- nur Nierentransplantatempfänger (Leichen- und Lebendnierenspende)

- nur oral therapierbare Patienten
- nur mündige und geschäftsfähige Patienten
- nur nach Aufklärung sowie nach schriftlicher Zustimmung des Patienten

Ausschlußkriterien:

- Alter unter 18 Jahren
- kalte Ischämiezeit des Transplantats über 48h
- Induktionstherapie mit ATG
- Abbruch der Therapie mit Myfortic®
- Leukopenie ($< 2500/\mu\text{l}$), Thrombopenie ($< 100\ 000/\mu\text{l}$) und/oder Hb $< 6\text{g/dl}$ bei Rekrutierung
- Unmündigkeit/Debilität
- Schwangerschaft
- aktives Magengeschwür oder schwere gastrointestinale Erkrankung bei Rekrutierung
- Tod des Patienten

2.2.2 Aufklärung der Probanden

Die Patienten wurden mündlich und schriftlich über die Studie aufgeklärt und erhielten zusätzlich ein Informationsblatt. Ausländische Patienten wurden im Beisein eines Übersetzers aufgeklärt. Die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie erfolgte in schriftlicher Form durch Unterschrift des Patienten.

2.2.3 Entnahme des EDTA-Vollbluts

Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der Routineblutentnahmen auf Station, dabei wurde darauf geachtet, dass die Blutentnahmen vor der täglichen Medikamenteneinnahme durchgeführt wurden. Verwendet wurden für die Studie EDTA-Vollblut. Dieses EDTA-Vollblut wurde zuerst für die von der Klinik angeforderte maschinelle Blutbild-Analyse oder die Analyse des Tacrolimus-Talspiegels verwendet, anschließend stand es für Studienzwecke zur Verfügung. Dies war möglich, da sowohl für die Blutbild-Analyse als auch für die Ermittlung des Tacrolimus-Talspiegels nur geringe Blutmengen benötigt werden

und somit genug EDTA-Vollblut für die Studien-Analysen vorlag. Zusätzliche Blutentnahmen waren nicht nötig.

Die erste Probenentnahme bei den Patienten erfolgte einen Tag vor der Transplantation oder am Tag der Transplantation noch vor der Operation, und wurde mit Tag 0 deklariert. Die weiteren Probenentnahmen erfolgten an Tag 3 (+/- 1 Tag), Tag 7 (+/- 1 Tag), und Tag 14 (+/- 3 Tage) nach der Transplantation.

2.2.4 Patientenkollektiv

2.2.4.1 Gesamtkollektiv

Von 87 Patienten konnten die Messungen komplett durchgeführt und für die Auswertung verwendet werden. Bei den Patienten handelte es sich um 37 Frauen und 50 Männer, im Alter zwischen 20 und 72 Jahren, mit einem Median bei 52 Jahren. Bis auf 2 Patientinnen (Asiaten) waren alle Patienten kaukasischer Abstammung. Für 11 Patienten war es das zweite Transplantat, 76 erhielten ihr erstes Nierentransplantat. 54 Patienten erhielten eine Leichenniere. Von den 33 Patienten, welche eine Lebendniere spende erhielten, wurden 6 ABO-inkompatibel nach einem speziellen Protokoll transplantiert.

2.2.4.2 High-risk-Gruppe

Es wurde aus dem Patientenkollektiv eine sogenannte Hochrisikogruppe erstellt, welche ein erhöhtes Risiko für eine Abstoßung hatten. Darunter fielen Patienten, welche ABO-inkompatibel transplantiert wurden, 4 oder mehr HLA-Mismatches zur Spenderniere aufwiesen, eine delayed graft function (verzögerte Transplantatfunktion, DGF) entwickelten, bereits vortransplantiert waren oder vor der Transplantation einen PRA im LCT von mehr als 15% aufwiesen (62, 63). Insgesamt wurden 54 Patienten dieser Gruppe zugerechnet.

Obwohl diese Patientengruppe ein erhöhtes Risiko für eine akute Abstoßung aufweist, bekommen diese Patienten im Klinikum Stuttgart generell erstmal die Standardtherapie. Besteht initial jedoch ein LCT PRA > 85%, oder besitzt der Patient bereits vor der Transplantation donor-spezifische Antikörper (DSA), wird

die Induktionstherapie mit ATG durchgeführt. Diese Patienten wurden aufgrund der Ausschlusskriterien nicht in unsere Studie aufgenommen.

Insgesamt wird die immunsuppressive Therapie der Patienten mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko bei jedem Patienten einzeln betrachtet und abgewogen. Wichtige Faktoren, die ebenfalls in die Entscheidung bezüglich der immunsuppressiven Therapie des einzelnen Patienten einfließen, sind unter anderem die Historie und die physischen Voraussetzungen (Begleiterkrankungen, Alter, etc) des Patienten. So enthält jeder Patient, der bereits vor der Transplantation schon ein erhöhtes Abstoßungsrisiko aufweist, eine individuell auf seine Bedürfnisse abgestimmte Immunsuppression.

Entwickelt ein Patient mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko unter der Standard-Therapie eine akute Abstoßung, so wird abhängig von der individuellen Beurteilung des Patienten der Tacrolimus-Talspiegel gegebenenfalls angehoben, der neue Zielwert beträgt dann 8-10 µg/l statt 6-8 µg/l.

2.3 Transplantationsarten

2.3.1 Leichennierenspende

Mit Hilfe einer zentralen Datenbank koordiniert die Organisation Eurotransplant mit Sitz in Leiden, Niederlande, die Spenderorganvergabe (z.B. Spendernieren) in vielen europäischen Ländern, unter anderem Deutschland. Außer dem Namen und dem Geburtsdatum des Patienten werden noch weitere Daten gespeichert, wie z.B. das betreuende Dialysezentrum und Transplantationszentrum, die HLA-Typisierung und evtl. vorhandene HLA-Antikörper. Steht ein Spenderorgan zur Verfügung, erfolgt die sogenannte Allokation: Die Datenbank wird nach bestimmten Kriterien wie z.B. Wartezeit und Dringlichkeitsstatus auf einen passenden Empfänger hin durchsucht (64, 65). Ist ein potentieller Empfänger gefunden, informiert Eurotransplant das betreuende Transplantationszentrum und die Ärzte vor Ort, welche dann den Patienten kontaktieren.

Um eine noch bessere Organvergabe zu ermöglichen, hat Eurotransplant zwei Programme ins Leben gerufen: das AM-(Acceptable Mismatch) Programm und das ESP (European Senior Program, auch old-for-old genannt).

2.3.2 Acceptable Mismatch Programm

Das AM-Programm wurde für hochimmunisierte Patienten (LCT PRA > 85%) initiiert, die aufgrund ihrer HLA-Antikörper im normalen Allokationsverfahren kaum noch eine Chance auf ein Organangebot hätten. Die Allokation erfolgt hier nicht nur gemäß der HLA-Typisierung des Empfängers, sondern es werden auch die HLA-Antigene berücksichtigt, gegen die der Patient nachweislich keine Antikörper hat. Patienten mit multiplen Antikörpern, sowie Patienten mit Antikörpern gegen hochfrequente HLA-Antigene bekommen so dennoch eine Chance auf ein Spenderorgan (66 - 68).

Während der Studie wurde eine AM-Patientin transplantiert, die medikamentöse Therapie entsprach der Standard-Therapie.

2.3.3 European Senior Programm

In das European Senior Program (ESP, „old for old“) können Patienten mit über 65 Jahren aufgenommen werden. Da in diesem Programm die HLA-Typisierung eine untergeordnete Rolle spielt und bei der Allokation nicht berücksichtigt wird, können nur Patienten aufgenommen werden, bei denen bisher keine HLA-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Im ESP wird die Vergabe von Transplantatnieren älterer Spender aus der Region koordiniert, was sich wiederum durch kürzere kalte Ischämiezeiten auszeichnet. Dadurch wird auch die Verwendung von sogenannten marginalen Organen möglich (64, 65, 69, 70).

Von den rekrutierten Patienten erhielten 12 Patienten eine Transplantat über das ESP, auch hier entsprach die immunsuppressive Therapie der Standard-Therapie.

2.3.4 Lebendnierenspende

Da die Leichennierenspende in Deutschland weiterhin nicht einmal ansatzweise die Transplantatnachfrage decken kann, befindet sich die Lebendnierenspende auf dem Vormarsch. Immer mehr Transplantationen erfolgen aufgrund von Lebendnierenspenden. Bei einer Lebendnierenspende wird einem gesunden Menschen (meist einem Angehörigen des Patienten) eine Niere entfernt und diese dem Patienten transplantiert. Lebendnierenspenden zeichnen sich durch eine relativ kurze kalte Ischämiezeit aus, was sich positiv auf das Outcome und das Transplantatüberleben auswirkt (71).

2.3.5 AB0-inkompatible Lebendnierenspende

Eine in Deutschland noch recht neue Form der Lebendnierenspende ist die AB0-inkompatible Lebendnierenspende. Hier wird die früher geltende Kontraindikation „Blutgruppeninkompatibilität“ zwischen dem potentiellen Spender und dem Empfänger umgangen. Erreicht wird dies, indem die sonst zu einer hyperakuten Abstoßung führenden Isoagglutinine (Blutgruppenantikörper Anti-A und Anti-B) des Empfängers durch verschiedene Verfahren entfernt werden. Im Klinikum Stuttgart erfolgt dies durch Immunadsorptionen vor der Transplantation sowie der Gabe von Rituximab. Fällt der Isoagglutinin-Titer tief genug ab ($< 1:4$), kann die Transplantation durchgeführt werden. Auch wenn das Risiko für eine Abstoßung bei AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen im Vergleich zu AB0-kompatiblen Nierentransplantationen erhöht ist, so ist das Outcome dieser AB0-inkompatiblen Lebendnierenspende in der Zwischenzeit vergleichbar mit dem Outcome der AB0-kompatiblen Nierentransplantation (72 - 74).

2.4 Medikation im Rahmen der Nierentransplantation

2.4.1 Standard-Therapie nach Leichennieren- und Lebendnierentransplantation

Die Immunsuppression beginnt bereits vor der Operation. Die Patienten erhalten 4 Stunden vor der Transplantation 250 mg i.v. Prednisolon (Solu-

Decortin H[®]) und 20 mg i.v. Basiliximab (Simulect[®]) als Induktions-Therapie unmittelbar vor Transplantation. Weitere 250 mg i.v. Prednisolon (Solu-Decortin H[®]) erhält der Patient 6 Stunden nach erfolgter Transplantation, sowie 50 mg i.v. am ersten postoperativen Tag. Die Initialtherapie besteht aus 2 x 0,10 mg/kgKG/Tag Tacrolimus (Prograf[®]) und 2 x 720 mg Mycophenolsäure (Myfortic[®]). Im weiteren Verlauf wird die Tacrolimus-Dosierung gemäß dem Tacrolimus-Talspiegel individuell angepaßt. In den ersten drei Monaten nach Transplantation wird bei Tacrolimus ein therapeutischer Bereich von 6-8 µg/l angestrebt. Ab dem zweiten postoperativen Tag wird Prednisolon (Decortin H[®]) oral verabreicht, wobei die Dosis 0,5 mg/kgKG beträgt. Eine weitere Gabe von 20 mg i.v. Basiliximab (Simulect[®]) erfolgt am vierten Tag nach Transplantation. Die Prednisolon-Dosis wird ab dem 15. postoperativen Tag auf 20 mg/Tag gesenkt, mit einer weiteren Reduktion auf 15 mg nach zwei Wochen. Danach wird Prednisolon alle 2 Wochen um 2,5 mg gesenkt, bis 3 Monaten nach Transplantation eine Dosis von 5 mg/Tag erreicht ist.

Bei CMV-Risikokonstellation (Empfänger CMV negativ, Spender CMV positiv) wird zur Prophylaxe i.v. Gancyclovir (Cymeven[®]) bzw. oral Valgancyclovir (Valcyte[®]) für 6 Monate verabreicht, als Pneumocystis-carinii-Pneumonie (PcP)-Prophylaxe erhalten die Patienten Co-trimoxazol (Cortim[®] bzw. Cotrim forte[®]). Die immunsuppressive Tripel-Therapie bei der stationären Entlassung setzt sich zusammen aus Tacrolimus (individuelle Dosierung nach Serum-Talspiegel), Mycophenolsäure (2 x 720 mg) und Prednisolon (20 mg). Zusätzlich wurden Heparin und Enoxaparin zur Thromboseprophylaxe, Pamidronsäure zur Osteoporose-Prophylaxe, sowie je nach Bedarf verschiedene Antihypertensiva und Antidiabetika verabreicht. Weitere Medikamente erhielten die Patienten gemäß ihrer Vorgeschichte und dem stationären und ambulanten Verlauf.

2.4.2 Therapie bei AB0-inkompatible Lebendnierentransplantation

Bei potentiellen AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen werden im Klinikum Stuttgart vorab bereits die Ausgangstiter von Anti-A bzw. Anti-B bestimmt. Je höher der Ausgangstiter, desto mehr Immunadsorptionen werden vor der Transplantation durchgeführt. Bereits 28 Tage vor der geplanten OP

erhält der Empfänger Rituximab (MabThera®, 375 mg/m²) um die Proliferation der B-Zellen und somit eine weitere Antikörper-Produktion zu verhindern. Angiotensin-Antagonisten und ACE-Hemmer werden 10 Tage vor Transplantation abgesetzt. Abhängig von der Höhe des Isoagglutinin-Ausgangstiters erfolgt meist eine Woche vor geplanter Transplantation die erste Immunadsorption. Im Klinikum Stuttgart werden für die Immunadsorption entweder Glycosorb®-Säulen oder Globaffin®-Säulen verwendet. Ebenfalls eine Woche vor OP wird mit der Tripel-Therapie Tacrolimus (Prograf®, 0,1 mg/kgKG/Tag), Mycophenolsäure (Myfortic®, 2 x 720 mg/ Tag) und Prednisolon (Decortin H, 0,5 mg/kgKG/Tag), sowie der PcP-Prophylaxe und gegebenenfalls der CMV-Prophylaxe begonnen. Nach der 2. Immunadsorption erhalten die Patienten Immunglobuline i.v. (0,5 g/kgKG). Die Induktionstherapie wird genau wie bei AB0-kompatiblen Nierentransplantationen mit Basiliximab durchgeführt, auch die weitere medikamentöse Therapie entspricht dem der Standard-Therapie nach Nierentransplantation. In der ersten Woche nach Transplantation wird zur Kontrolle täglich ein Isoagglutinin-Titer bestimmt, ab einem IgG-Titer von 1:8 wird eine Immunadsorption durchgeführt. Mit Beginn der zweiten Woche erfolgt die Titer-Kontrolle alle zwei Tage, wobei eine Immunadsorption ab einem IgG-Titer von 1:16 erfolgt.

Keiner der in dieser Studie aufgenommenen AB0-inkompatibel transplantierten Patienten benötigte Immunadsorptionen nach Transplantation.

2.4.3 Therapie bei Rejektion

2.4.3.1 Humorale Rejektion

Bei einem Nachweis von donor-spezifischen HLA-Antikörpern und/oder histologischem Nachweis von C4d im Nierenbiopsat erfolgt im Rahmen einer humoralen Abstoßung eine Plasmapherese sowie eine anschließende Immunglobulin-Gabe.

2.4.3.2 Borderline-Rejektion

Die Therapie besteht hier aus einer Steroidstoß-Therapie mit 250 – 500 mg Solu-Decortin H® mittels Kurzinfusion für 3 – 5 Tage.

2.4.3.3 Akute Rejektion

Hier ist die BANFF-Klassifikation für die Therapie ausschlaggebend.

Zeigt das Nierenbiopsat eine Abstoßung gemäß BANFF Ia, Ib und IIa, erfolgt wie bei der Borderline-Rejektion eine Steroidstoß-Therapie (250 – 500 mg Solu-Decortin H[®] i.v. über 3 – 5 Tage) sowie gegebenenfalls eine Erhöhung des Tacrolimus-Spiegels auf 8 - 10 µg/l.

Die BANFF-Einteilung IIa und III bedarf einer Thymoglobulin[®]-Gabe (ATG, 1,0 – 1,5 mg/kgKG/Tag), zusätzlich zur Steroidstoß-Therapie (250 – 500 mg Solu-Decortin H[®] i.v. über 3 – 5 Tage) und des Anhebens des Tacrolimus-Spiegels. Im Rahmen dieser Antikörpertherapie wird Mycophenolsäure pausiert, der Tacrolimus-Spiegel sollte zwischen 8 – 10 µg/l liegen. Als Begleitmedikation werden 1 Stunde vor ATG-Gabe H₁- und H₂-Blocker i.v. verabreicht, sowie 50 mg Prednisolon (Solu-Decortin H[®]) i.v. und 1 g Paracetamol oral. Die Länge der Thymoglobulin[®]-Therapie richtet sich nach dem Kreatininverlauf und beträgt zwischen 5 und 10 Tagen bei gleichzeitiger Kontrolle der CD3+ Zellen.

2.4.3.4 Steroidresistente Rejektion

Bei einer Rejektion, die auf die Steroidstoß-Therapie nicht anspricht, erfolgt die Gabe von Thymoglobulin[®]. Die Dosierung und Therapielänge entspricht hierbei der Thymoglobulin[®]-Therapie bei einer BANFF IIb oder III.

2.5 Analysen-Parameter

2.5.1 Reihenfolge der Analysen der Studie

Sowohl bei Blutspendern als auch Patienten wurde die Expression der Oberflächenparameter CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ am FACS durchgeführt. Die Oberflächenmarker wurden in Abhängigkeit der Gesamtlymphozytenzahl in Prozent (%) bestimmt. Anschließend erfolgte die DPP IV-Aktivitätsmessung kinetisch mit Hilfe des Spektralphotometers sowie bei den Patienten die Analyse von MPA, AcMPA und fMPA mittels HPLC. Die ermittelten Ergebnisse der Analysen wurden einerseits im Verhältnis zu den

Ergebnissen der Blutspender betrachtet, andererseits wurden bestimmte Patientenkollektive bezüglich der erhobenen Daten miteinander verglichen.

Die Konzentration des Proteins sCD26 im Plasma mittels ELISA konnte nur bei einer Subpopulation (31 Blutspendern und 34 Patienten) erfolgen, da nicht von allen Probanden genügend Material für diese abschließende Analyse vorhanden war. Hierfür wurde das Plasma von Blutspendern und Patienten gesammelt und bei -20°C eingefroren, um dann mehrere Proben gleichzeitig in einem batch messen zu können.

2.5.2 Hämatologische und klinisch-chemische Parameter

In dieser Studie wurde zusätzlich zu den oben genannten Parametern, auch die Serum-Kreatinin-Konzentration sowie die Kreatinin-Clearance der Patienten betrachtet. Die Kreatinin-Konzentration im Serum wurde mit der Jaffé-Methode im Rahmen der postoperativen Überwachung der Patienten ermittelt und erfolgten mit den für den Routinebetrieb validierten klinisch chemischen Geräten (Dimension VISTA[®], Siemens Healthcare Diagnostics) im KCI des Klinikum Stuttgart. Die Kreatinin-Clearance der Patienten wurde anhand der vereinfachten MDRD-Formel berechnet (75).

Korrigierte MDRD-Formel (Levey 2005):

$$\text{GFR}(\text{ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2) = 186 \times (\text{Kreatinin i.S. } /0,95)^{-1.154} \times (\text{Alter})^{-0.203} \times (0.742 \text{ bei Frauen}) \times (1.21 \text{ bei Pat. mit schwarzer Hautfarbe})$$

Ebenfalls im Rahmen der postoperativen Überwachung und Nachsorge wurden hämatologische Parameter (Blutbild) untersucht. Diese wurden zur Beurteilung einer Leukopenie während des Beobachtungszeitraums der Studie herangezogen. Die hämatologischen Analysen erfolgten wiederum im KCI des Klinikums Stuttgart und wurden mit dem ADVIA[®] 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics) durchgeführt. Eine Gesamtleukozytenzahl von unter 4000/μl wurde als Leukopenie gewertet.

2.5.3 Infektionen nach Transplantation

Bei dem Verdacht auf das Vorliegen einer viralen Infektion sowie zur Transplantatnachsorge erfolgten Untersuchungen auf serologische Antikörper gegen CMV, BKV, EBV, HSV und VZV. Die Analysen erfolgten auf den Geräten Advia Centaur[®] (Siemens Healthcare Diagnostics) und Liaison[®] (DiaSorin). Die Viruslast von CMV und BKV wurde durch PCR mittels einer nach DIN EN ISO 15189 validierten hausinternen Methode ermittelt, das Ergebnis wurde in DNA-Kopien pro ml Plasma angegeben bei einer unteren Nachweisgrenze von 200 DNA-Kopien pro ml Plasma.

2.6 Durchführung der Studien-Analysen

2.6.1 Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometrie

Die Expression der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8 und CD26 wurden mittels Durchflußzytometrie am Gerät FC500[®] (Beckmann Coulter) gemessen. Um sicherzustellen, dass die Oberflächenmarker auf Leukozyten gemessen wurden, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen CD45 mitgeführt. Die Fluorochrom-markierten Antikörper wurden von der Firma Beckmann Coulter bezogen, wobei die Antikörper mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren:

Tab. 1: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	Farbstoffe	Anregung bei	Emission bei
Anti-CD3	PE-Cy7 (PC7)	480 nm	767 nm
Anti-CD4	Fluorescein isothiocynat (FITC)	-	494 nm
Anti-CD8	PE-TexasRed (ECD)	480 nm	615 nm
Anti-CD26	R-Phycoerythrin (PE)	480 nm	575 nm
Anti-CD45	PE-Cy5 (PC5)	480 nm	670 nm

Als Probenmaterial wurde EDTA-Vollblut verwendet, von dem 50 µl in ein Polypropylen-Röhrchen vorgelegt wurde. Anschließend wurden die Antikörper dazupipettiert: 5µl CD4-FITC, 5µl CD26-PE, 2,5 µl CD8-ECD, 2,5 µl CD45-PC5 und 2,5 µl CD3-PC7. Die Testansätze wurden auf dem Vortex gemischt und für

15 Minuten bei Raumtemperatur (+15 bis +25°C) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt im Gerät TQ-Prep[®] (Coulter) die Erythrozytenlyse durch das Lysereagenz (Versalyse + Fixative Solution im Verhältnis 40 + 1) und zweimaliges Waschen mit Isoton II. Die anschließende Resuspension wurde mit 600 µl Isoton II + Fixative Solution (im Verhältnis 40 + 1) durchgeführt, die Analyse des Testansatzes erfolgt dann im Durchflußzytometer FC500. Mittels des integrierten Argon-Lasers und des Photomultipliers im FC500 wurden die zu analysierenden Zellen im Vorwärts- (forward scatter) und Seitwärts- (side scatter) Diagramm eingegrenzt und die Zellen gemäß ihrer Fluoreszenzintensität und ihrer Häufigkeit (in Prozent, gemessen an der Gesamtzellzahl im Gate) im Achsengitter aufgetragen. Anhand von Leerwert und Negativkontrollen erfolgte die genaue Abgrenzung und Quantifizierung der Achsengitter.

2.6.2 Analyse der Immunsuppressiva

2.6.2.1 Tacrolimus-Talspiegel

Vor der täglichen Tacrolimus-Gabe erfolgte die Analyse des Tacrolimus-Talspiegels, damit die Dosis je nach Talspiegel individuell angepaßt werden konnte. Der angestrebte Tacrolimus-Talspiegel liegt in den ersten Monaten nach Nierentransplantation bei 6 - 8 µg/l.

Die Analyse des Talspiegels wurde mit einem LC/MSMS Anlage (Waters) durchgeführt, welches aus dem Alliance[®] 2695 LC-System und dem Quatro Micro[®] Massenanalysator besteht. Nach Präzipitation der Proben (EDTA-Vollblut) erfolgte die chromatographische Auftrennung und die Analyse der spezifischen Massenübergänge. Bei Tacrolimus wurde der Massenübergang 821.4 – 768.45 m/z für die Quantifizierung benutzt. Als interner Standard wird Ascomycin (Massenübergang 809.4 – 756.45 m/z) mitgeführt, der Messbereich liegt bei Tacrolimus zwischen 1 – 80 µg/L. (76)

2.6.2.2 Konzentration von MPA, AcMPAG und fMPA mittels HPLC

Zu Vorbereitung erfolgte die 10-minütige Zentrifugation (4000U/min, 20°C) von 2 ml EDTA-Vollblut. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bis zu

Analyse in einem 1,5 ml-Eppendorfgesäß bei -20°C tiefgefroren. Die Vorbereitung der Proben bestand aus vorheriger Präzipitation (MPA und AcMPAG) bzw. Ultrafiltration (fMPA), dann erfolgte die Analyse der jeweiligen Plasmakonzentration von MPA, AcMPAG und fMPA anhand einer etablierten HPLC-Methode (77).

2.6.3 DPP IV-Aktivität mittels Spektralphotometer

Die Aktivität der DPP IV im Serum wurde durch einen enzymatischen Assay mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen. Als Substrat wurde Gly-Pro-p-Nitroanilid (Sigma Chemie GmbH, Deinshofen, Deutschland) verwendet, wobei 20 µl Serum mit 10 µl Gly-Pro-p-Nitroanilid und 170 µl 0,1 M TRIS-HCl (pH-Wert 8,0) versetzt wurde. Die p-Nitroanilid-Abspaltung wurde über 10 min durch die entstehende Extinktionszunahme bei 405 nm kinetisch im Spektralphotometer gemessen. Abhängig davon, wieviel chromogenes Substrat (Gly-Pro-p-Nitroanilid) von der DPP IV umgesetzt wurde, kam es zu einem entsprechenden Extinktionsanstieg bei 405 nm. Die Enzymaktivität der DPP IV im Serum konnte dann wiederum von der Extinktionszunahme abgeleitet werden. (78)

2.6.4 Analyse der sCD26-Konzentration im Plasma mittels ELISA

Die quantitative Analyse des Proteins sCD26 im Plasma wurde mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) der Firma Bender MedSystems GmbH durchgeführt. Die Proben der Kontrollgruppe und der Patienten wurden bis zum Analysetag bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt. (79)

2.6.4.1 Testprinzip

Mit Anti-sCD26 beschichtete Mikrotiterplatten werden mit Patientenserum (oder Plasma) versetzt. Das im Patientenserum vorhandene sCD26 wird von den Anti-sCD26 Antikörpern gebunden. Durch Zugabe eines weiteren biotin-konjugierten Anti-sCD26 Antikörpers erfolgt die Bindung des Konjugats an das bereits an die Mikrotiterplatte gebundenen sCD26 aus der Patientenprobe. Durch einen Waschschrift werden nicht-gebundene Antikörper entfernt und

Streptavidin-HRP wird der Probe hinzugefügt. Das Streptavidin-HRP bindet an das Konjugat (biotin-konjugierter Anti-sCD26 Antikörper). Nach Inkubation wird durch einen Waschschritt das ungebundene Streptavidin-HRP entfernt und es wird ein Substrat (Tetramethyl-Benzidin) hinzugefügt. Das Substrat reagiert mit dem HRP des Streptavidin-HRPs und es entsteht ein farbiges Produkt, proportional zur sCD26-Konzentration der Patientenprobe. Durch Zugabe von Säure wird die enzymatische Reaktion gestoppt und die Messung der Extinktion erfolgt bei 450 nm. Anhand einer Standardkurve kann nun die sCD26-Konzentration der Patientenprobe ermittelt werden.

2.6.4.2 Auswertung

Anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe mit vorgefertigten Standards wurde eine Standardkurve angefertigt. Es wurde die Einheit ng/ml verwendet. Anhand der angefertigten Standardkurve wurde für jeden Probanden die jeweilige sCD26-Konzentration im Plasma ermittelt.

Laut Herstellerangaben liegt die zu erwartende sCD26-Konzentration bei gesunden Erwachsenen zwischen 296 – 1110 ng/ml, mit einem Mittelwert von 591 ng/ml und einer Standardabweichung von 179 ng/ml.

2.7 Statistik

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm MedCalc (Mariakerke, Belgien) verwendet. Bei unabhängiger Variablen erfolgte die Berechnung durch den Mann-Whitney-U-Test, abhängigen Variablen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Test berechnet. Ein Unterschied mit $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Mit Hilfe des Spearman's Korrelationskoeffizienten wurde die Korrelationsanalysen durchgeführt.

Die Graphiken wurden entweder mit Microsoft[®] Excel oder durch das Software-Programm MedCalc erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollgruppe und Patientenkollektiv

3.1.1 Kontrollgruppe

Von den 49 Blutspendern waren 23 Frauen und 26 Männer. Die Altersverteilung lag bei den Frauen zwischen 25 und 69 Jahren, bei den Männern zwischen 21 und 66 Jahren. Der Median lag sowohl bei Männern als auch bei Frauen bei 44 Jahren. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Die Analyse der Blutspender-Proben ergaben folgende Ergebnisse:

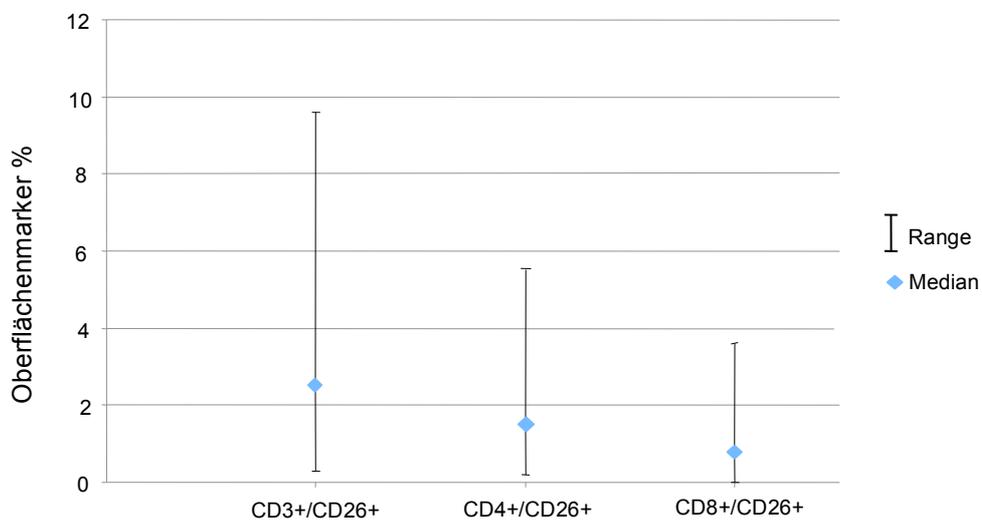


Abb. 2: Oberflächenmarker bei Blutspendern

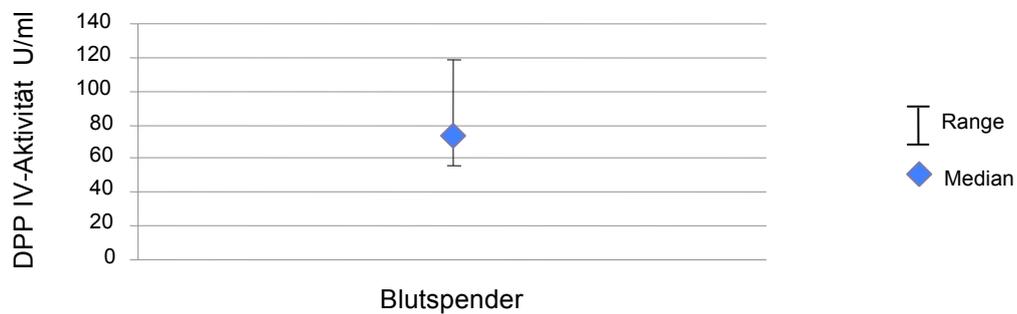


Abb 3: DPP IV-Aktivität bei Blutspendern

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Alter der Blutspender und dem prozentualen Anteil der CD4+/CD26+ Lymphozytenpopulation ($r = -0,145$, $p > 0,05$). Auch die Aktivität der DPP IV zeigte keine Korrelation mit dem Alter der Blutspender ($r = -0,066$, $p > 0,05$).

Eine schwache Korrelation zeigte sich von CD3+/CD26+ ($r = -0,283$, $p < 0,05$) und CD8+/CD26+ ($r = -0,350$, $p < 0,05$) Lymphozyten mit dem Alter der Probanden. Je älter die Blutspender waren, desto geringere Werte von CD3+/CD26+ und CD8+/CD26+ Lymphozyten wurden gemessen.

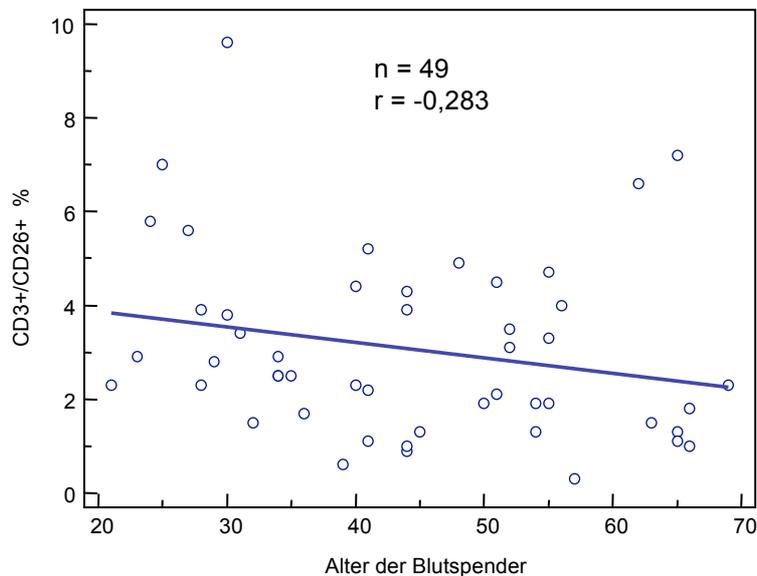


Abb.4: Expression von CD3+/CD26+ bei Blutspendern in Abhängigkeit vom Alter

Des weiteren zeigten sich bei Frauen und Männern keine signifikanten Unterschiede in den Lymphozytenpopulationen CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+.

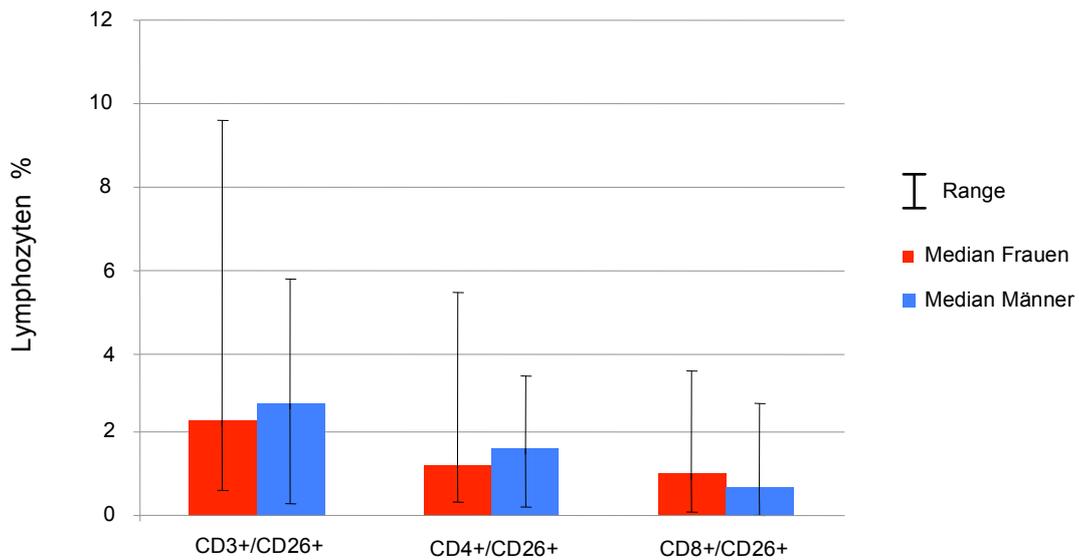


Abb. 5: Oberflächenmarker bei Blutspendern, Unterschied zwischen Männern und Frauen

Betrachtet man die Aktivität der DPP IV bei Männern und Frauen, so ist auch hier der Unterschied zwischen den Geschlechtern nicht signifikant.

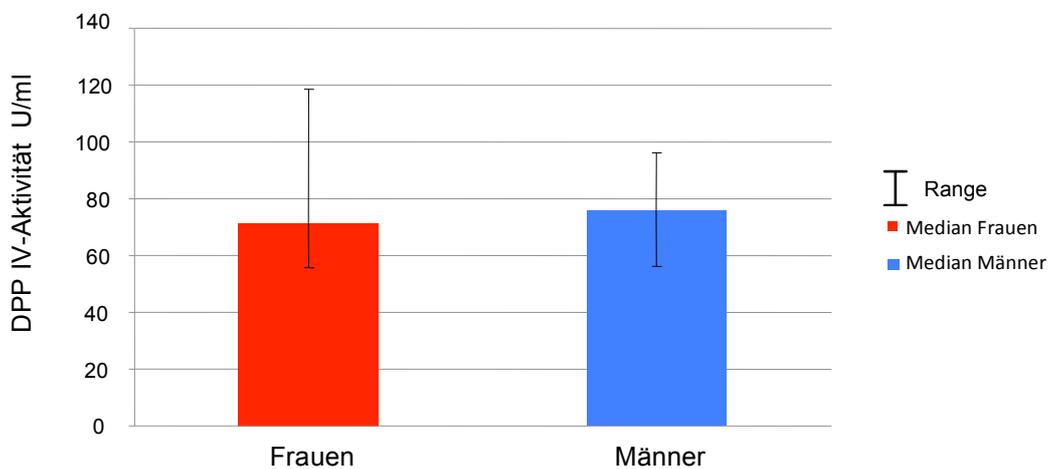


Abb. 6: DPP IV-Aktivität bei weiblichen und männlichen

Außerdem korrelierte bei den Blutspendern die Aktivität der DPP IV weder mit der Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ ($r = -0,047$, $p > 0,05$), noch mit der Expression von CD4+/CD26+ ($r = -0,064$, $p > 0,05$) oder CD8+/CD26+ ($r = 0,141$, $p > 0,05$).

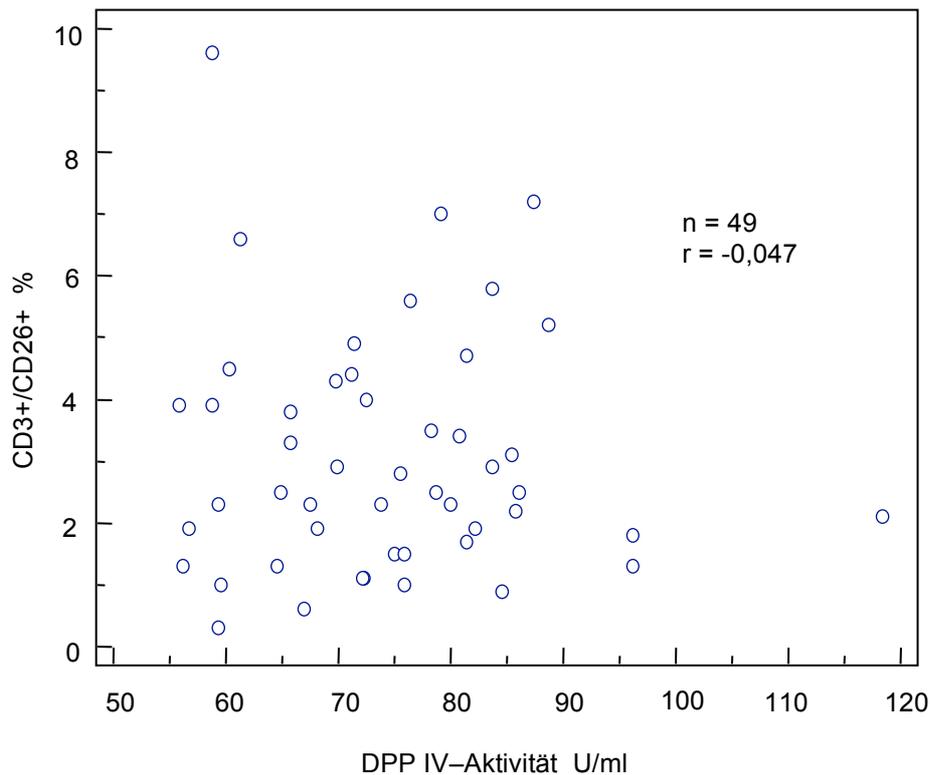


Abb. 7: Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der CD3+/CD26+ Zellen und der DPP IV-Aktivität bei Blutspendern

3.1.2 Patienten an Tag 0

Bei 81 von 87 Patienten konnte eine Blutprobe an Tag 0 gesichert werden. Es gab 50 männliche und 37 weibliche Patienten. Die Altersverteilung lag zwischen 20 und 72 Jahren, mit einem Median bei 52 Jahren.

Tab.2: Alter, Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten vor Transplantation

Tag 0	Probenanzahl	Median	Minimum	Maximum	95% Konfidenzintervall
Alter	87	52,0	20,0	72,0	46 - 56,1
CD3+/CD26+ %	81	8,2	0,8	34,0	7,3 - 9,6
CD4+/CD26+ %	81	6,2	0,5	30,0	4,7 - 7,2
CD8+/CD26+ %	81	1,8	0,1	5,2	1,5 - 2,2
DPPIV-Aktivität U/ml	81	74,9	39,1	125,5	67,5 - 82,0

Die Ergebnisse von 77 Patienten (bei 4 der 81 Patienten waren die Analysenparameter unvollständig) wurden auf eine Korrelation hin zwischen dem Kreatinin-Wert an Tag 0 und den Oberflächenmarkern sowie der DPP IV-Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Kreatinin-Wert an Tag 0 und dem prozentualen Anteil der CD3+/CD26+ Lymphozyten ($r = 0,027$, $p > 0,05$), der CD4+/CD26+ Lymphozyten ($r = -0,043$, $p > 0,05$), der CD8+/CD26+ Lymphozyten ($r = 0,113$, $p > 0,05$) oder der DPP IV-Aktivität ($r = 0,093$, $p > 0,05$).

Bei 75 Patienten wurde eine Korrelation des CRP-Wertes bezüglich der Oberflächenmarker und der DPP IV-Aktivität untersucht. Keine Korrelation zeigte sich zwischen dem CRP-Wert an Tag 0 und dem prozentualen Anteil der CD3+/CD26+ Lymphozyten ($r = 0,042$, $p > 0,05$) und der CD4+/CD26+ Lymphozyten ($r = -0,078$, $p > 0,05$). Eine schwache Korrelation fand sich zwischen dem CRP-Wert an Tag 0 und dem prozentualen Anteil der CD8+/CD26+ Zellen ($r = -0,267$, $p < 0,05$) sowie der DPP IV-Aktivität ($r = -0,269$, $p < 0,05$). Bei höheren CRP-Werten zeigten sich niedrigere CD8+/CD26+ Messwerte sowie eine niedrigere DPP IV-Aktivität.

3.1.3 Blutspender vs. Patientenkollektiv

Im Vergleich zwischen den 81 Patientenwerten an Tag 0 und den Werten der Kontrollgruppe (49 Blutspender) zeigten sich signifikante Unterschiede bei dem prozentualen Anteil der Lymphozyten mit den Oberflächenmarkern CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+. Die Patienten zeigten an Tag 0 höhere Expressionen bei allen oben genannten Oberflächenmarker als die Blutspender.

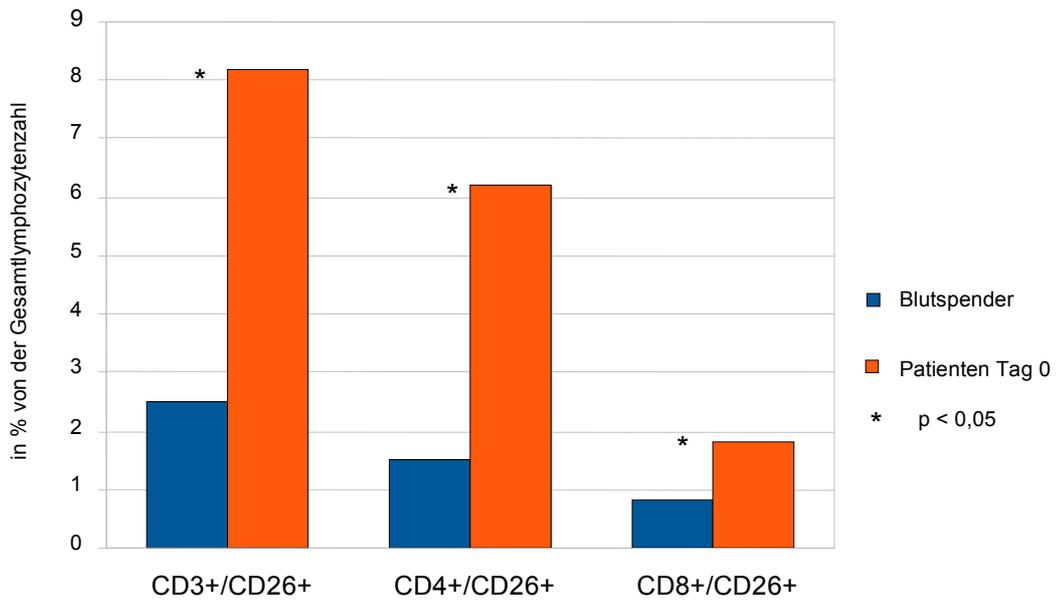


Abb. 8: Vergleich der Oberflächenmarker von Blutspendern und Patienten

Jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede bei der DPP IV-Aktivität der Blutspender und der Patienten an Tag 0.

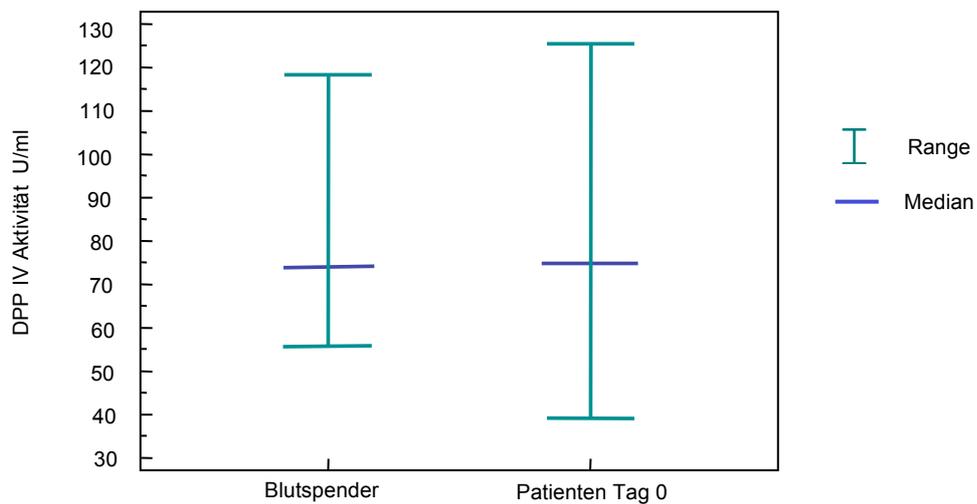


Abb. 9: Vergleich der DPP IV-Aktivität bei Blutspendern und Patienten an Tag 0

Untersucht man bei den Patienten den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Lymphozytenanteil an CD3+/CD26+ Zellen an Tag 0 und der gemessenen DPP IV-Aktivität am Tag 0, so stellt man fest, dass die beiden Parameter nicht miteinander korrelieren ($r = 0,128$, $p > 0,05$).

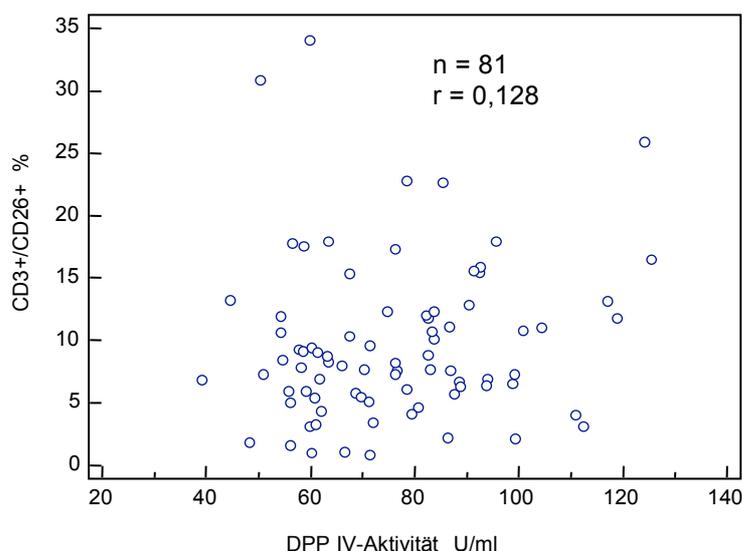


Abb. 10: Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der CD3+/CD26+ Zellen und der DPP IV-Aktivität bei Patienten an Tag 0

Betrachtet man die Plasmakonzentration des sCD26 der Blutspender, und der Patienten an den Tagen 0 und 7, so findet man signifikante Unterschiede zwischen der sCD26-Konzentration der Blutspender und der Patienten an Tag 0 vor der Transplantation, der sCD26-Konzentration der Blutspender und der Patienten an Tag 7 nach Transplantation, sowie der sCD26-Konzentration der Patienten vor und nach Transplantation. Die Werte der Blutspender waren niedriger als die der Patienten vor der Transplantation, nach der Transplantation zeigten die Patienten jedoch niedrigere Werte als die Blutspender.

Tab. 3.1: sCD26-Konzentration in der Subpopulation bei Blutspendern, und Patienten präTx und postTx

sCD26 ng/ml	Probenanzahl	Median	Minimum	Maximum	95% Konfidenzintervall
Blutspender	31	368	170	525	330 - 407
präTX	34	456	259	935	391 - 527
postTX	34	296	171	693	240 - 361

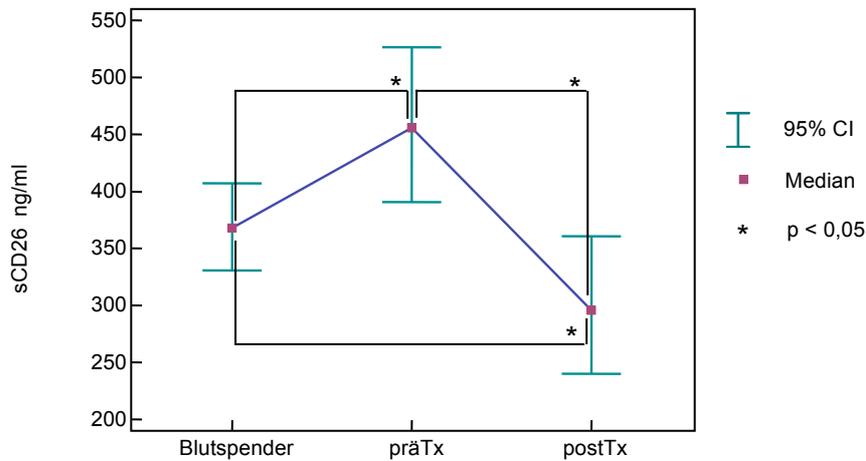


Abb. 11.1: sCD26 in der Subpopulation bei Blutspendern und Patienten präTx und postTx

Der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ wies in der Subpopulation bei den Blutspendern signifikante Unterschiede zu den Patienten vor und nach Transplantation auf. Die Expression von CD3+/CD26+ war bei den Patienten präTX 4,5-mal höher als die Expression bei den Blutspendern. Nach Transplantation lag die Expression bei den Patienten immernoch 3,8-mal höher als bei den Blutspendern. Keine signifikanten Unterschiede in der Expression zeigten sich bei den Patienten vor Transplantation im Vergleich zur Expression nach Transplantation.

Tab. 3.2: CD3+/CD26+ Expression in der Subpopulation bei Blutspendern, und Patienten präTx und postTX

CD3+/CD26+ %	Probenanzahl	Median	Minimum	Maximum	95% Konfidenzintervall
Blutspender	31	2,3	0,6	5,8	1,8 - 3,6
präTX	34	10,4	0,8	34,0	6,9 - 12,1
postTX	34	8,7	2,9	62,3	6,0 - 12,7

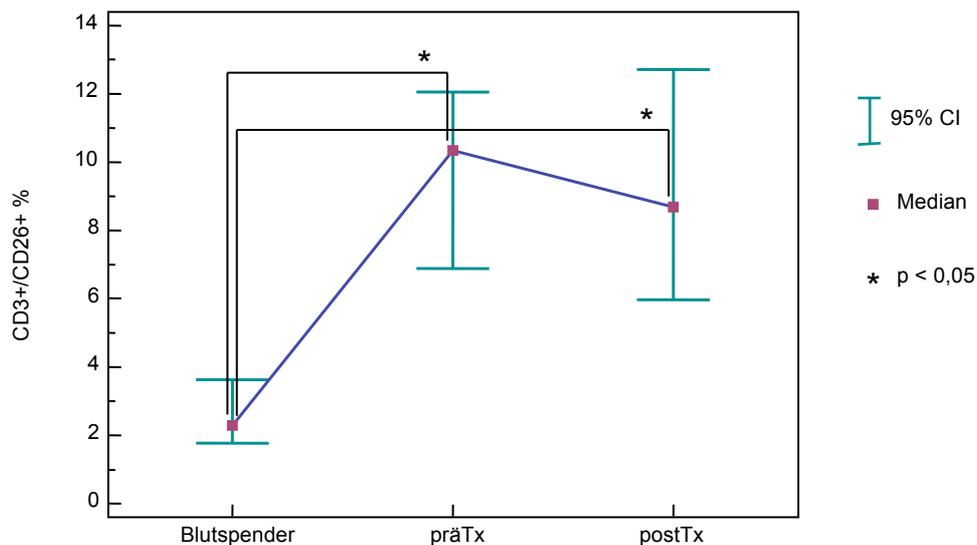


Abb. 11.2: CD3+/CD26+ in der Subpopulation bei Blutspendern und Patienten präTx und postTx

In dieser Subpopulation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der DPP IV-Aktivität der Blutspender und der Patienten an Tag 0 vor der Transplantation. Betrachtet man jedoch den Unterschied der DPP IV-Aktivität bei den Blutspendern und den Patienten nach Transplantation, sowie bei den Patienten vor und nach Transplantation, so findet man hier signifikante Unterschiede. Nach Transplantation zeigten die Patienten eine erheblich geringere DPP IV-Aktivität als vor der Transplantation oder als die Gruppe der Blutspender. Es zeigte sich sowohl bei den Blutspendern als auch bei den Patienten nach Transplantation eine Korrelation zwischen der sCD26-Konzentration und der DPP IV-Aktivität (Blutspender: $r = 0,471$, $p < 0,05$, postTx: $r = 0,344$, $p < 0,05$). Keine Korrelation fand sich bei den Patienten vor Transplantation (präTx: $r = 0,268$, $p > 0,05$).

Tab. 3.3: DPP IV-Aktivität in der Subpopulation bei Blutspendern, und Patienten präTx und postTX

DPP IV-Aktivität U/ml	Probenanzahl	Median	Minimum	Maximum	95% Konfidenzintervall
Blutspender	31	72,3	55,9	96,2	69,1 - 76,1
präTX	34	79,7	39,1	125,5	70,2 - 88,8
postTX	34	52,4	26,0	72,6	47,8 - 55,5

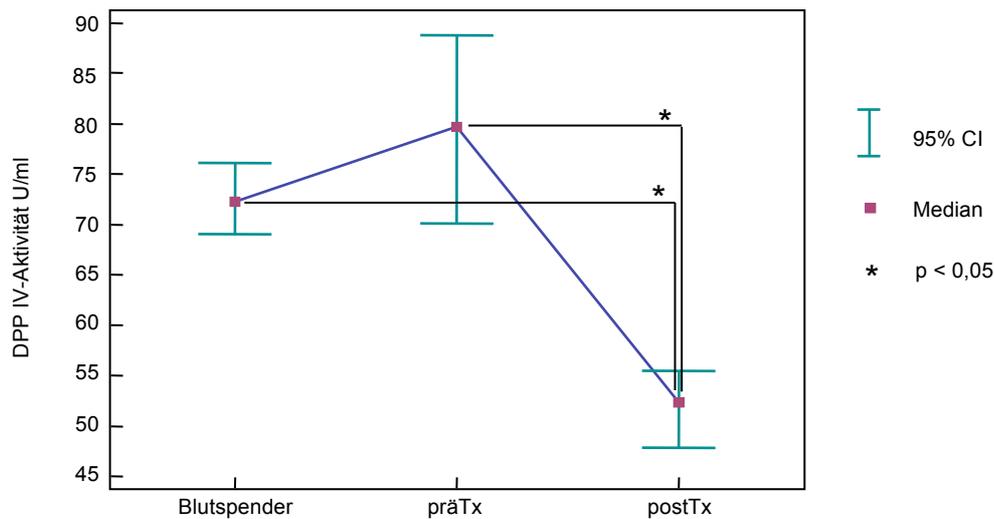


Abb. 11.3: DPP IV-Aktivität in der Subpopulation bei Blutspendern und Patienten präTx und postTx

Es wurde überprüft, ob die Unterschiede zwischen den Patienten vor und nach Transplantation aufgrund eines Abfalls der CD3+ Zellen nach Transplantation zustandekommen, jedoch konnte bei den CD3+ Zellen an Tag 0 und Tag 7 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tag 0: Median 973/ μ l, Range 407 – 2470/ μ l; Tag 7 1139/ μ l, Range 136 – 3203/ μ l).

3.1.4 Patientenwerte von Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14

Als nächstes wurde mit dem Wilcoxon-Test geprüft, ob sich die ermittelten Ergebnisse bei den einzelnen Patienten zwischen den Tagen 0, 3, 7 und 14 signifikant.

Für die Oberflächenmarker CD3+/CD26+ zeigte sich, dass sich die Meßwerte von Tag 0 und Tag 3 wie auch von Tag 0 und Tag 7 nicht signifikant unterschieden. Auch die Unterschiede der Ergebnisse zwischen Tag 3 und Tag 7 und zwischen Tag 7 und Tag 14 waren nicht signifikant.

Vergleicht man jedoch die Ergebnisse von Tag 0 und Tag 14 sowie von Tag 3 und Tag 14, so fand man hier signifikante Unterschiede in den ermittelten

Werten. Der prozentuale Anteil der CD3+/CD26+ Zellen, gemessen an der Gesamtlymphozytenzahl, ist an Tag 14 signifikant höher als an den Tagen 0 und 3.

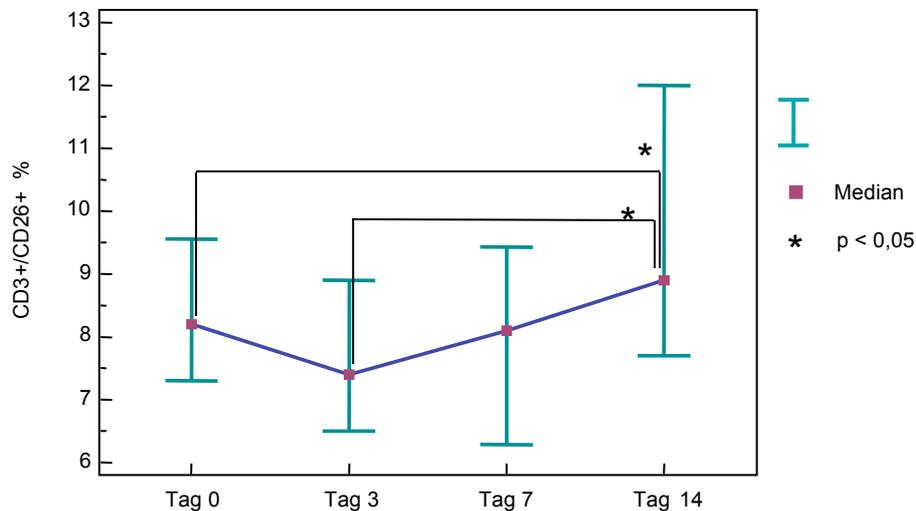


Abb. 12: Prozentualer Anteil der CD3+/CD26+ Lymphozyten an Tag 0, 3, 7 und 14

Vergleicht man die CD4+/CD26+ Expression zwischen den einzelnen Tagen, so findet man wie bei den CD3+/CD26+ Zellen nur zwischen den Tagen 0 und 14, und den Tagen 3 und 14 signifikante Unterschiede. Die Expressionen an Tag 14 lagen höher als die Expressionen an Tag 0 und Tag 3.

Zwischen den übrigen Tagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

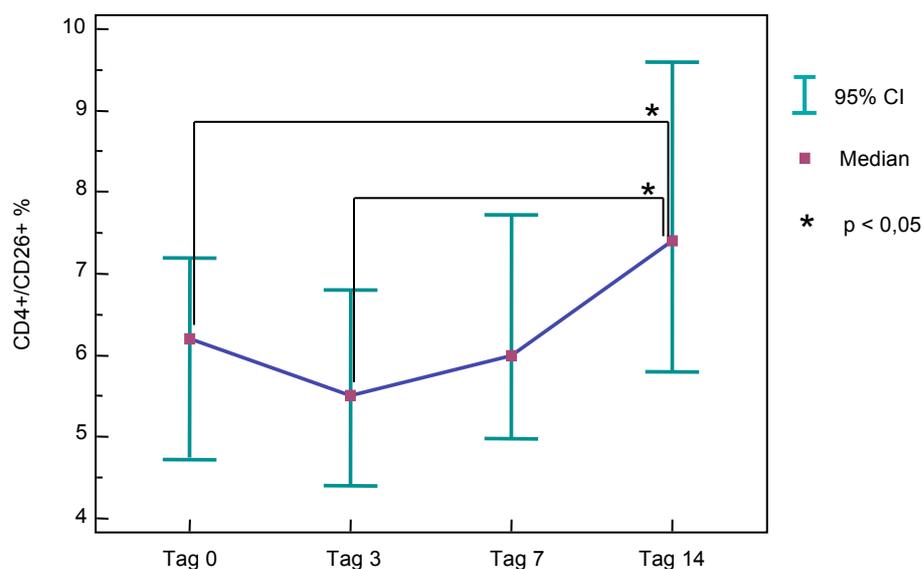


Abb. 13: Prozentualer Anteil der CD4+/CD26+ Lymphozytenpopulation an Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14

Ein etwas anderes Bild zeichnet sich ab, wenn man die Expression bei dem Oberflächenmarker CD8+/CD26+ an den einzelnen Tage untersucht. Wie schon bei CD3+/CD26+ und CD4+/CD26+ sind auch hier die Unterschiede der Meßwerte an Tag 3 im Vergleich zu denen an Tag 14 signifikant verschieden. Des Weiteren findet man signifikante Unterschiede zwischen der Expression von CD8+/CD26+ an Tag 0 zu Tag 3 und an Tag 0 zu Tag 7.

Im Gegensatz zur Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ und CD4+/CD26+ findet man bei der Expression von CD8+/CD26+ zwischen den Tagen 0 und 14 keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigen sich im Vergleich zwischen den Tagen 3 und 7 und den Tagen 7 und 14. Die Zahl der CD8+/CD26+ Lymphozyten fällt an Tag 3 ab und steigt an Tag 7 wieder an, um an Tag 14 annähernd den Ausgangswert von Tag 0 zu erreichen.

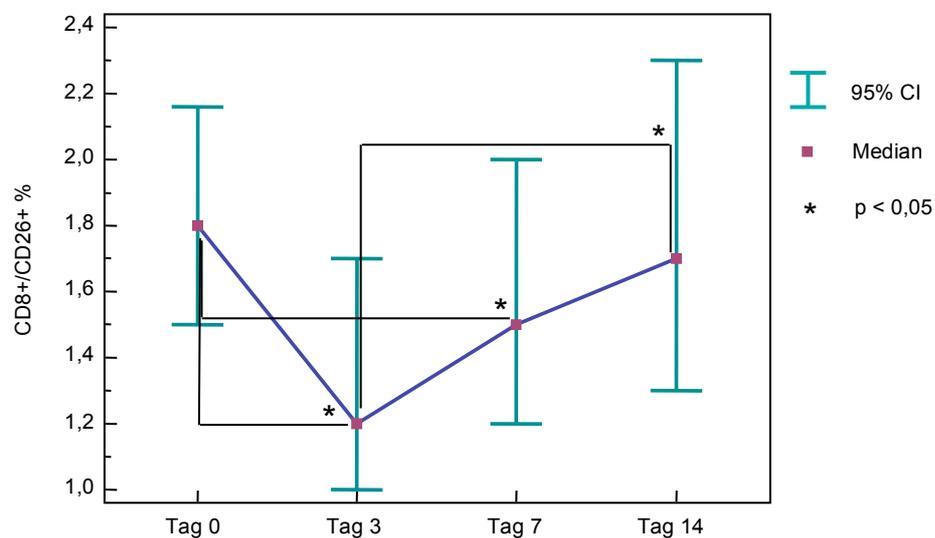


Abb. 14: Prozentualer Anteil der CD8+/CD26+ Lymphozytenpopulation an Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14

Hochsignifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen findet man bei der DPP IV-Aktivität (Tag 0/Tag 3, Tag 0/Tag 7, Tag 0/Tag 14, Tag 3/Tag 7, Tag 3/Tag 14 und Tag 7/Tag 14 $p < 0,01$). Die Aktivität sank über den gesamten Meßzeitraum hin immer weiter ab.

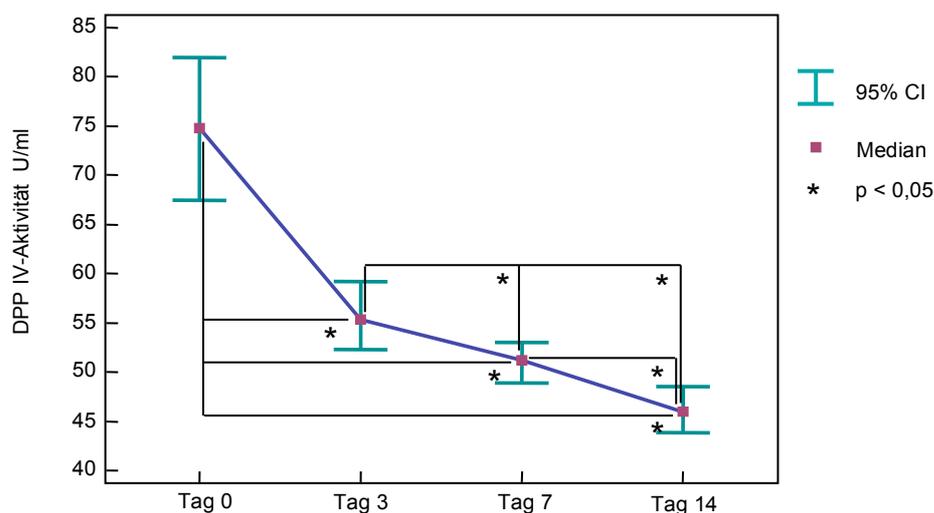


Abb. 15: Mediane der DPP IV-Aktivität an Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14

Untersucht man die Korrelation der Kreatinin-Konzentration zur DPP IV-Aktivität, so findet man weder an Tag 0 ($r = 0,093$, $p > 0,05$), noch an Tag 3 ($r = 0,170$, $p > 0,05$), noch an Tag 7 ($r = -0,015$, $p > 0,05$), noch an Tag 14 ($r = 0,000$, $p > 0,05$) eine signifikante Korrelation. Auch die Oberflächenmarker CD3+/CD26+ (Tag 0: $r = 0,027$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = -0,003$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = 0,026$, $p > 0,05$, Tag 14: $r = 0,080$, $p > 0,05$), CD4+/CD26+ (Tag 0: $r = -0,043$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = -0,066$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = 0,070$, $p > 0,05$, Tag 14: $r = 0,072$, $p > 0,05$) und CD8+/CD26+ (Tag 0: $r = 0,113$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = 0,031$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = -0,014$, $p > 0,05$, Tag 14: $r = -0,002$, $p > 0,05$) korrelieren an den einzelnen Tagen nicht signifikant mit der Kreatinin-Konzentration.

Ein weiterer Parameter, der auf eine Korrelation mit den Oberflächenmarkern CD3+/CD26+ und CD8+/CD26+ hin untersucht wurde, ist das CRP. Hierbei

wurden die Tage 0, 3 und 7 verwendet, Tag 14 wurde aufgrund fehlender CRP-Werte nicht untersucht.

Die Oberflächenmarker CD3+/CD26+ (Tag 0: $r = -0,155$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = 0,076$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = -0,049$, $p > 0,05$) und CD4+/CD26+ (Tag 0: $r = -0,078$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = 0,141$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = 0,004$, $p > 0,05$) zeigten keine Korrelation mit dem CRP-Wert. Der Oberflächenmarker CD8+/CD26+ zeigte eine sehr schwache Korrelation mit dem CRP-Wert (Tag 0: $r = -0,267$, $p = 0,02$, Tag 3: $r = -0,044$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = -0,244$, $p = 0,03$).

Um zu ermitteln, ob die Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ mit der Aktivität der DPP IV korreliert, wurden die Ergebnisse von Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14 analysiert. An keinem Tag zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern (Tag 0: $r = 0,128$, $p > 0,05$, Tag 3: $r = -0,021$, $p > 0,05$, Tag 7: $r = -0,017$, $p > 0,05$, Tag 14: $r = -0,108$, $p > 0,05$).

3.2 Vergleich zwischen unterschiedlichen Patientenkollektiven

3.2.1 Glomerulonephritis vs. Diabetische Nephropathie vs. ADPK

Um zu untersuchen, ob die Grunderkrankung der Patienten einen Einfluß auf die Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ oder auf die Aktivität der DPP IV hat, wurden die Werte von Tag 0 bei Patienten mit Glomerulonephritis (GN, $n=28$), diabetischer Nephropathie (DN, $n=4$) und Zystennieren (ADPKD, $n=9$) untereinander verglichen. Weder bei dem Oberflächenmarker CD3+/CD26+ noch bei der DPP IV-Aktivität zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Grunderkrankung scheint demnach keinen entscheidenden Einfluß auf die Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ oder auf die DPP IV-Aktivität zu haben.

Tab. 4: CD3+/CD26+ Expression und DPP IV-Aktivität bei unterschiedlichen Grunderkrankungen

Tag 0	Probenanzahl			Median			Minimum			Maximum			95% Konfidenzintervall		
	GN	DN	AD PKD	GN	DN	AD PKD	GN	DN	AD PKD	GN	DN	AD PKD	GN	DN	ADPKD
CD3+/CD26+ %	28	4	9	7,7	5,3	10,8	0,8	1,0	4,1	34,0	13,1	12,3	6,3 - 10,2	-	5,3 - 11,7
DPPIV-Aktivität U/ml	28	4	9	74,2	61,7	86,8	39,1	48,4	51,0	99,4	117,0	119,0	68,3 - 83,2	-	71,8 - 103,9

3.2.2 Ethnische Zugehörigkeit

Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus 85 Kaukasiern und 2 Asiatinnen. Trotz des kleinen asiatischen Kollektivs wurden die Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ sowie die DPP IV-Aktivität der beiden Kollektive miteinander verglichen. Jedoch müssen die Ergebnisse statistisch kritisch betrachtet werden, da es sich nur um ein sehr kleines asiatisches Kollektiv handelt.

An Tag 0 und Tag 7 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Mediane CD3+/CD26+: Tag 0 9,1 vs. 8,0, Tag 7 7,4 vs. 8,1, Mediane CD4+/CD26+: Tag 0 5,1 vs. 6,4, Tag 7 4,3 vs. 6,0, Mediane CD8+/CD26+: Tag 0 3,0 vs. 1,7, Tag 7 2,1 vs. 1,5, Mediane DPP IV-Aktivität: Tag 0 60,0 U/ml vs. 76,2 U/ml, Tag 7 37,3 U/ml vs. 51,4 U/ml). Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede an Tag 3 bei der Expression von CD3+/CD26+ (Mediane: 10,4 vs. 7,3) und CD4+/CD26+ (Mediane: 5,8 vs. 5,5) sowie bei der DPP IV-Aktivität (Mediane: 40,7 U/ml vs. 55,8 U/ml). Auch an Tag 14 zeigten sich bei der CD3+/CD26+ (Mediane: 18,7 vs. 8,8) und der CD4+/CD26+ Expression (Mediane: 19,6 vs. 7,4) keine signifikanten Unterschiede.

Eine signifikant höhere Expression von CD8+/CD26+ fand man jedoch bei den Asiatinnen an den Tagen 3 (Mediane: 4,3 vs. 1,2) und 14 (Mediane: 7,2 vs. 1,7), und die DPP IV-Aktivität zeigte an Tag 14 bei den Asiatinnen einen signifikant niedrigeren Wert (Mediane: 31,5 U/ml vs. 46,0 U/ml).

Eine der Asiatinnen entwickelte am 8. postoperativen Tag eine Transplantatglomerulitis, welche mit einer Kortisonstoßtherapie behandelt wurde. Die andere Asiatin litt an einer chronischen Hepatitis C - Infektion und bekam postoperativ einen Harnwegsinfekt. Ob die klinische Situation der Asiatinnen die Werte beeinflusst haben könnte, oder ob bei anderen ethnischen Zugehörigkeiten Unterschiede in der DPP IV-Aktivität und bei den Oberflächenmarkern vorliegen, müsste an einem größeren Kollektiv untersucht werden.

3.2.3 Lebendnierenspende vs. Leichennierenspende

Aufgrund der längeren kalten Ischämiezeit bei Leichennieren (Cadaver) im Vergleich zu der recht kurzen kalten Ischämiezeit bei Lebendnierentransplantationen (LSP), erfolgte ein Vergleich hinsichtlich der Expression der Oberflächenmarker und der DPP IV-Aktivität zwischen den Empfängern von Lebendnierentransplantaten (LSP) und den Empfängern von Leichennierentransplantaten (Cadaver). Da die Patienten sich vor der Transplantation (Tag 0) noch nicht hinsichtlich der kalten Ischämiezeit unterschieden, wurden die beiden Patientenkollektive (Cadaver vs. LSP) nur an den Tagen 3, 7 und 14 miteinander verglichen. An keinem der Tage zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede bei den Oberflächenmarkern CD3+/CD26+, CD4+/CD26+, CD8+/CD26+ oder bei der DPP IV-Aktivität.

Tab.5.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Leichen- und Lebendnierentransplantation, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP
CD3+/CD26+ %	53	32	7,3	7,8	1,4	2,0	41,7	70,4	5,6 - 9,6	5,0 - 9,0
CD4+/CD26+ %	53	32	6,1	5,5	1,1	0,9	30,9	67,1	4,3 - 7,4	4,1 - 8,1
CD8+/CD26+ %	53	32	1,2	1,4	0,3	0,3	12,1	7,5	1,0 - 1,7	0,9 - 2,0
DPPIV-Aktivität U/ml	54	33	58,1	53,5	35,2	31,2	87,4	90,3	52,5 - 61,6	49,2 - 59,3

Tab.5.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Leichen- und Lebendnierentransplantation, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP
CD3+/CD26+ %	54	33	8,1	8,1	0,9	1,6	62,3	38,3	6,0 - 10,0	5,3 - 11,0
CD4+/CD26+ %	54	33	6,1	5,8	0,7	0,6	50,5	33,8	4,9 - 8,6	4,2 - 9,1
CD8+/CD26+ %	54	33	1,4	2,0	0,2	0,2	9,8	27,8	1,0 - 1,8	1,1 - 2,6
DPPIV-Aktivität U/ml	54	33	52,0	50,5	34,2	26,0	100,0	80,8	48,8 - 57,1	46,2 - 53,0

Tab.5.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Leichen- und Lebendnierentransplantation, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP
CD3+/CD26+ %	52	33	11,1	7,7	0,3	2,0	54,6	39,3	8,3 - 13,0	6,6 - 10,6
CD4+/CD26+ %	52	33	9,5	5,8	0,4	1,1	46,0	29,5	6,6 - 11,3	4,8 - 8,2
CD8+/CD26+ %	52	33	1,7	1,9	0,0	0,4	17,9	28,5	1,3 - 2,4	1,2 - 2,8
DPPIV-Aktivität U/ml	53	32	46,0	46,2	21,3	26,7	100,6	73,9	43,8 - 48,7	39,8 - 51,8

3.2.4 Präemptive Transplantation vs. nicht-präemptive Transplantation

Um zu ermitteln, ob die Dialysepflicht vor Transplantation einen Einfluß auf die Expression der Oberflächenmarker oder die DPP IV-Aktivität hat, wurden die Werte der 9 Patienten, welche präemptiv transplantiert worden waren (präemptiv), mit denen der 72 Patienten verglichen, welche vor der Transplantation bereits dialysepflichtig waren (nicht-präemptiv). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im prozentualen Anteil der CD3+/CD26+ Zellen oder der CD4+/CD26+ Zellen der beiden Patientenkollektive. Auch der Vergleich der DPP IV-Aktivität zeigte bei den präemptiv transplantierten Patienten keinen signifikanten Unterschied zu der DPP IV-Aktivität bei den bereits vor der Transplantation dialysepflichtigen Patienten. Allein der prozentuale Anteil der CD8+/CD26+ Lymphozyten zeigte einen schwachen signifikanten Unterschied zwischen präemptiv transplantierten und dialysepflichtigen Patienten. Dialysepflichtige Patienten zeigten etwas geringere Anzahl an CD8+/CD26+ Lymphozyten als die Patienten, welche präemptiv transplantiert wurden. Der Median war bei den präemptiv transplantierten Patienten etwa doppelt so hoch wie der Median der dialysepflichtigen Patienten.

An den Tagen 3, 7 und 14 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Patientengruppen, sowohl in der Expression der Oberflächenmarker als auch in der DPP IV-Aktivität.

Tab.6.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei nicht-präemptiver und präemptiver Transplantation, Tag 0

Tag 0	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv
CD3+/CD26+ %	72	9	7,9	10,6	0,8	5,0	30,8	34,0	7,0 - 9,3	5,6 - 25,5
CD4+/CD26+ %	72	9	6,1	6,4	0,5	4,0	28,6	30,0	4,6 - 7,2	4,4 - 21,1
CD8+/CD26+ %	72	9	1,7	3,6	0,1	0,8	5,2	4,9	1,5 - 2,0	1,1 - 4,7
DPPIV-Aktivität U/mL	72	9	76,3	69,8	39,1	54,2	125,5	124,1	67,5 - 82,9	56,6 - 81,8

Tab.6.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei nicht-präemptiver und präemptiver Transplantation, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv
CD3+/CD26+ %	76	9	7,6	6,9	1,4	3,2	41,7	70,4	6,2 - 9,0	3,8 - 12,3
CD4+/CD26+ %	76	9	5,5	6,1	1,1	0,9	30,9	67,1	4,3 - 7,3	3,6 - 17,2
CD8+/CD26+ %	76	9	1,3	1,2	0,3	0,3	12,1	7,5	1,0 - 1,7	0,4 - 2,9
DPPIV-Aktivität U/mL	78	9	56,0	50,1	31,2	37,4	90,3	79,7	52,6 - 60,0	39,7 - 69,5

Tab.6.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei nicht-präemptiver und präemptiver Transplantation, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv
CD3+/CD26+ %	78	9	7,0	10,8	0,9	5,0	62,3	38,3	5,9 - 8,9	8,2 - 31,2
CD4+/CD26+ %	78	9	5,7	10,0	0,6	4,3	50,5	33,8	4,6 - 7,3	5,8 - 28,4
CD8+/CD26+ %	78	9	1,5	2,6	0,2	0,7	9,8	27,8	1,2 - 1,8	0,7 - 4,1
DPPIV-Aktivität U/mL	78	9	51,2	51,8	26,0	35,3	100,0	66,2	48,9 - 53,4	37,4 - 54,8

Tab.6.4: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei nicht-präemptiver und präemptiver Transplantation, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv
CD3+/CD26+ %	76	9	9,2	7,2	0,3	4,1	54,6	33,7	7,8 - 12,1	5,6 - 30,1
CD4+/CD26+ %	76	9	7,9	5,1	0,4	3,4	46,0	29,5	6,1 - 9,8	4,2 - 25,7
CD8+/CD26+ %	76	9	1,7	1,9	0,0	0,8	25,9	28,5	1,3 - 2,3	1,0 - 5,1
DPPIV-Aktivität U/mL	76	9	46,0	40,8	21,3	29,5	100,6	64,5	43,9 - 48,6	36,3 - 58,9

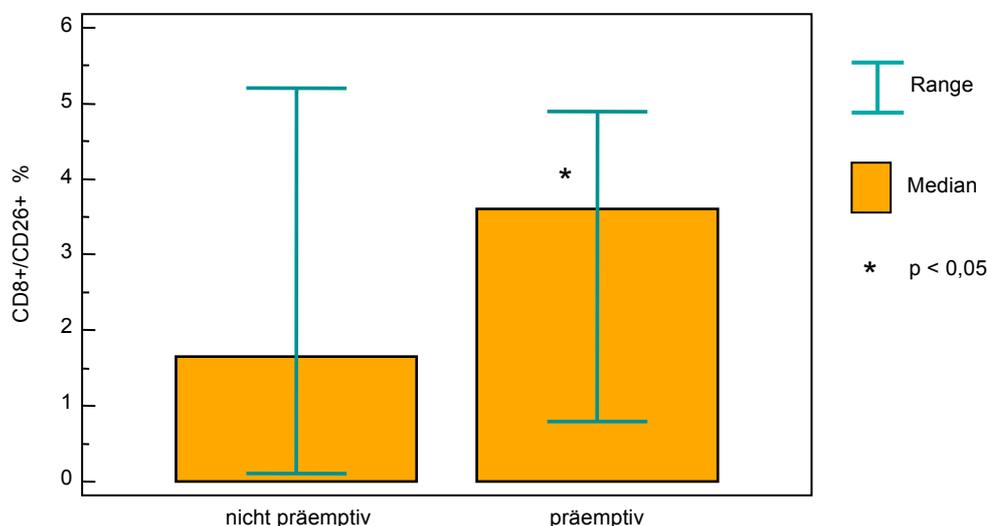


Abb. 16: CD8+/CD26+ Lymphozytenpopulation bei präemptiv und nicht-präemptiv transplantierten Patienten an Tag 0

3.2.5 Vortransplantierte Patienten vs. ersttransplantierte Patienten

Einige der rekrutierten Patienten (n = 11) waren bereits vortransplantiert und hatten bereits früher einmal ein Nierentransplantat erhalten. Um zu ermitteln, ob diese Patientengruppe (Vor-Tx) sich von den ersttransplantierten Patienten (1.TX) hinsichtlich der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+, CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität unterscheidet, wurden die Analysenwerte der Tage 0 bis 14 beider Gruppen miteinander verglichen. An

keinem der Tage zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede bezüglich der Oberflächenmarker oder der DPP IV-Aktivität.

Tab.7.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei erst- und vortransplantierten Patienten, Tag 0

Tag 0	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX
CD3+/CD26+ %	70	11	8,1	8,4	0,8	3,1	34,0	17,3	7,0 - 9,9	4,5 - 12,9
CD4+/CD26+ %	70	11	6,1	7,2	0,5	1,5	30,0	15,7	4,7 - 7,1	3,1 - 11,3
CD8+/CD26+ %	70	11	1,8	1,6	0,1	1,0	5,2	4,2	1,5 - 2,6	1,4 - 2,0
DPPIV-Aktivität U/ml	70	11	74,1	74,9	39,1	54,2	125,5	110,9	66,9 - 82,7	57,2 - 87,7

Tab.7.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei erst- und vortransplantierten Patienten, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX
CD3+/CD26+ %	74	11	6,9	8,8	1,4	2,6	70,4	18,3	5,6 - 8,9	6,1 - 17,0
CD4+/CD26+ %	74	11	5,4	6,6	0,9	1,7	67,1	15,8	4,1 - 6,8	4,5 - 13,8
CD8+/CD26+ %	74	11	1,2	1,7	0,3	0,8	12,1	3,8	0,9 - 1,6	1,1 - 2,3
DPPIV-Aktivität U/ml	76	11	54,9	57,8	31,2	32,9	90,3	86,5	50,6 - 59,1	40,7 - 68,9

Tab.7.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei erst- und vortransplantierten Patienten, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX
CD3+/CD26+ %	76	11	8,2	7,8	0,9	2,9	62,3	18,5	5,9 - 9,7	6,6 - 13,3
CD4+/CD26+ %	76	11	5,9	6,1	0,7	0,6	50,5	16,3	4,6 - 7,7	5,4 - 11,6
CD8+/CD26+ %	76	11	1,6	1,5	0,2	0,2	27,8	2,7	1,0 - 2,0	1,2 - 2,3
DPPIV-Aktivität U/ml	76	11	51,2	53,0	26,0	39,0	100,0	71,9	48,9 - 53,1	41,3 - 63,7

Tab.7.4: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei erst- und vortransplantierten Patienten, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX
CD3+/CD26+ %	74	11	8,9	9,2	0,3	3,5	54,6	33,3	7,7 - 12,1	5,6 - 16,8
CD4+/CD26+ %	74	11	7,4	7,7	0,4	2,6	46,0	27,3	5,8 - 9,8	3,1 - 14,4
CD8+/CD26+ %	74	11	1,8	1,6	0,0	0,7	28,5	17,9	1,3 - 2,4	1,2 - 2,6
DPPIV-Aktivität U/ml	74	11	46,2	45,8	21,3	36,9	100,6	73,1	43,9 - 50,3	37,1 - 65,3

3.2.6 AB0-inkompatible Lebendnierentransplantation vs. AB0-kompatible Nierentransplantation

Von den insgesamt 87 rekrutierten Patienten erhielten 6 AB0-inkompatible Lebendnierentransplantate (AB0i), 81 erhielten AB0-kompatible Lebendnieren- und Leichennierentransplantate (AB0c). Verglichen wurden die Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+, CD8+/CD26+ und die DPP IV-

Aktivität beider Gruppen (AB0i vs. AB0c) an den Tagen 0 bis 14. Es konnten signifikante Unterschiede in der DPP IV-Aktivität an allen Untersuchungstagen festgestellt werden. Patienten mit einer AB0i hatten eine niedrigere DPP IV-Aktivität (um ca. ein Drittel niedriger), als die Patienten mit AB0c. An Tag 7 und 14 war die Expression der Oberflächenmarker CD8+/CD26+ bei der Gruppe mit AB0i signifikant höher als bei der Gruppe mit AB0c, an Tag 7 etwa 2,5 Mal höher, an Tag 14 doppelt so hoch.

Tab.8.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei AB0-kompatiblen und AB0-inkompatiblen Patienten, Tag 0

Tag 0	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i
CD3+/CD26+ %	75	6	8,0	9,4	0,8	5,0	30,8	34,0	7,1 - 9,8	5,3 - 29,5
CD4+/CD26+ %	75	6	6,2	5,8	0,5	4,0	28,6	30,0	4,7 - 7,2	4,2 - 25,7
CD8+/CD26+ %	75	6	1,7	3,0	0,1	0,8	5,2	4,9	1,5 - 2,1	0,8 - 4,8
DPPIV-Aktivität U/ml	75	6	76,3	57,0	44,6	39,1	125,5	60,3	70,0 - 82,8	42,0 - 60,2

Tab.8.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei AB0-kompatiblen und AB0-inkompatiblen Patienten, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i
CD3+/CD26+ %	79	6	7,4	8,0	1,4	4,4	41,7	70,4	6,0 - 8,9	4,8 - 59,1
CD4+/CD26+ %	79	6	6,1	4,8	0,9	3,2	30,9	67,1	4,5 - 7,1	3,3 - 56,1
CD8+/CD26+ %	79	6	1,2	2,4	0,3	0,4	12,1	7,5	1,0 - 1,7	0,5 - 6,9
DPPIV-Aktivität U/ml	81	6	57,8	38,2	35,2	31,2	90,3	43,6	52,8 - 60,3	31,5 - 43,6

Tab.8.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei AB0-kompatiblen und AB0-inkompatiblen Patienten, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i
CD3+/CD26+ %	81	6	7,2	10,0	0,9	7,0	62,3	33,4	5,9 - 9,4	7,2 - 30,8
CD4+/CD26+ %	81	6	5,8	7,0	0,6	5,6	50,5	30,6	4,6 - 7,9	5,7 - 27,6
CD8+/CD26+ %	81	6	1,5	3,8	0,2	0,7	9,8	27,8	1,1 - 1,8	0,9 - 23,4
DPPIV-Aktivität U/ml	81	6	51,7	37,7	30,2	26,0	100,0	53,1	49,2 - 53,9	27,8 - 52,2

Tab.8.4: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei AB0-kompatiblen und AB0-inkompatiblen Patienten, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i	AB0c	AB0i
CD3+/CD26+ %	79	6	8,9n	18,8	0,3	5,5	54,6	31,8	7,6 - 11,7	5,8 - 29,7
CD4+/CD26+ %	79	6	7,4	12,0	0,4	4,1	46,0	27,3	5,8 - 9,5	4,4 - 25,3
CD8+/CD26+ %	79	6	1,6	3,2	0,0	1,4	25,9	28,5	1,3 - 2,1	1,5 - 25,1
DPPIV-Aktivität U/ml	79	6	47,4	36,4	21,3	29,5	100,6	46,4	44,2 - 50,4	29,5 - 45,1

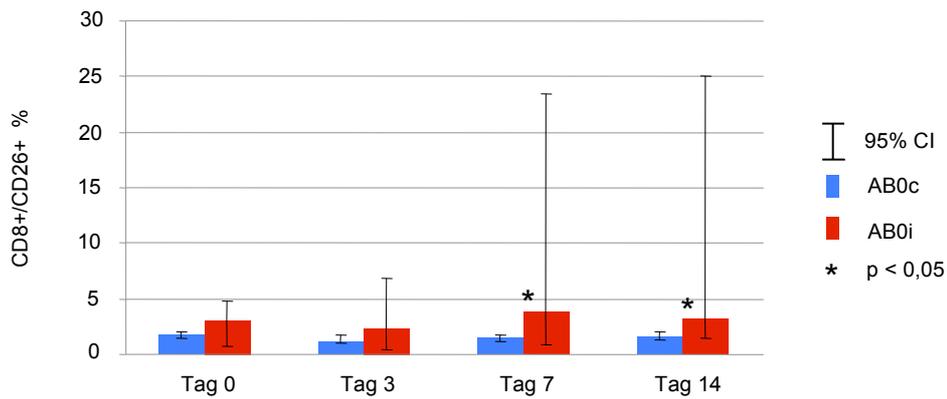


Abb. 17: Oberflächenmarker CD8+/CD26+ bei AB0i vs. AB0c

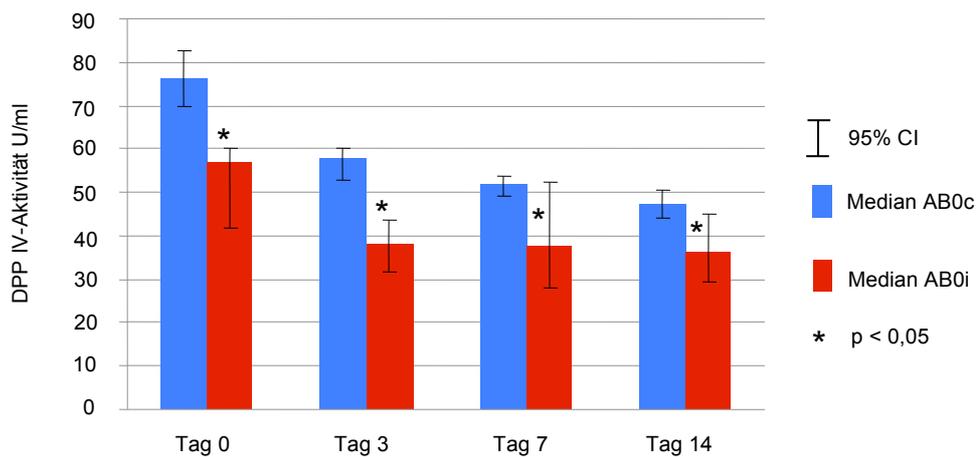


Abb. 18: Vergleich der DPP IV-Aktivität bei AB0i vs. AB0c

3.2.7 Delayed graft function vs. unmittelbare Funktionsaufnahme

Die verzögerte Transplantatfunktionsaufnahme (delayed graft function, DGF) wurde definiert als weiterhin bestehende Dialysepflicht aufgrund von unzureichender Nierentransplantatfunktion innerhalb der ersten Woche nach Transplantation (80, 81).

Bei 17 Patienten kam es nach der Transplantation zu einer DGF. Insgesamt mußten nach Transplantation 22 Patienten dialysiert werden, außer einer delayed graft function waren weitere Gründe für eine Dialyse z.B. eine Hyperkaliämie oder Kontrastmittelgabe.

Um zu ermitteln, ob Patienten mit delayed graft function (DGF) sich von den Patienten mit unmittelbarer Transplantatfunktion (non-DGF) hinsichtlich der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität unterschieden, wurden bei beiden Gruppen (DGF vs. non-DGF) die Werte von Tag 3, 7 und 14 miteinander verglichen.

Man stellte fest, dass sich weder an Tag 3, noch an Tag 7, noch an Tag 14 ein signifikanter Unterschied zeigt. Auch die DPP IV-Aktivität zeigte keinen Unterschied zwischen den Patienten mit delayed graft function und denen ohne delayed graft function.

Tab.9.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne DGF, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF
CD3+/CD26+ %	68	17	7,9	5,4	1,4	2,6	70,4	19,3	6,6 - 9,5	3,7 - 9,0
CD4+/CD26+ %	68	17	6,5	3,9	0,9	1,7	67,1	17,4	5,1 - 7,5	3,0 - 6,6
CD8+/CD26+ %	68	17	1,3	1,1	0,3	0,3	12,1	4,6	1,0 - 1,7	0,8 - 2,4
DPPIV-Aktivität U/ml	70	17	53,6	61,0	31,2	40,2	90,3	86,5	50,3 - 58,8	47,5 - 68,8

Tab.9.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne DGF, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF
CD3+/CD26+ %	70	17	7,7	8,7	0,9	3,5	62,3	18,8	6,1 - 9,4	5,6 - 12,7
CD4+/CD26+ %	70	17	5,9	6,1	0,6	2,6	50,5	17,0	4,7 - 8,0	4,6 - 10,1
CD8+/CD26+ %	70	17	1,5	1,8	0,2	0,4	27,8	5,2	1,0 - 1,9	1,2 - 2,3
DPPIV-Aktivität U/ml	70	17	51,3	50,2	26,0	34,3	100,0	71,9	48,8 - 53,1	42,4 - 60,7

Tab.9.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne DGF, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF	non-DGF	DGF
CD3+/CD26+ %	68	17	8,8	10,6	0,3	3,5	54,6	20,9	7,3 - 11,9	6,9 - 14,5
CD4+/CD26+ %	68	17	7,0	8,0	0,4	2,6	46,0	18,1	5,6 - 9,8	4,8 - 10,8
CD8+/CD26+ %	68	17	1,6	2,4	0,0	0,5	28,5	10,9	1,2 - 2,1	1,3 - 3,1
DPPIV-Aktivität U/ml	68	17	45,9	46,4	21,3	33,6	100,6	73,1	43,0 - 48,3	39,9 - 56,3

3.2.8 Kreatinin-Konzentration im Serum an Tag 0, Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 21:

Da die Transplantatfunktion unter anderem anhand der Kreatinin-Konzentration beurteilt wird, wurde dieser bei den Patienten an den Tagen 0 – 21 im Rahmen der Routine-Blutentnahmen ermittelt. Wie zu erwarten, zeigte sich bei den Medianen ein signifikanter Abfall der Kreatinin-Konzentration über die Tage 0 – 14, lediglich an Tag 21 kam es zu keinem weiteren signifikanten Abfall mehr.

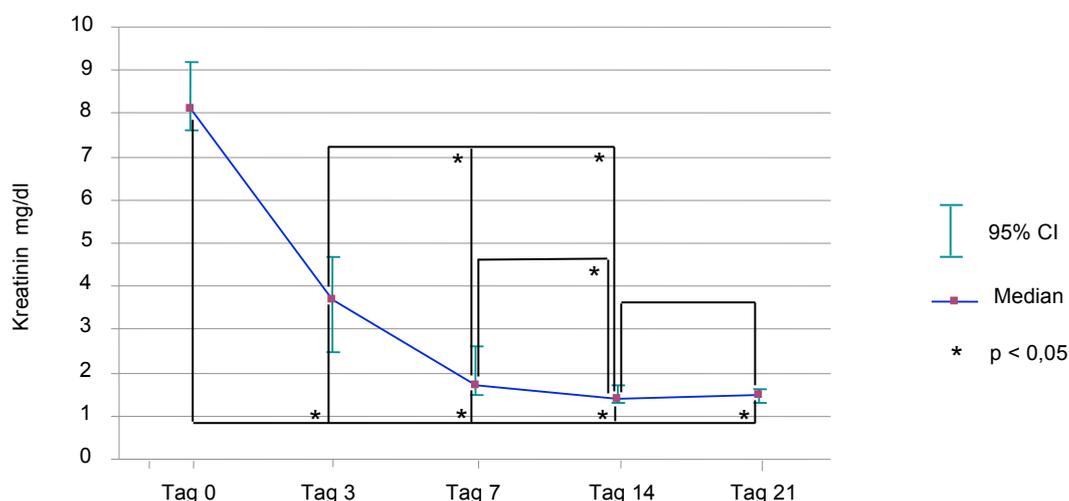


Abb. 19: Kreatinin-Wert an Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14

3.2.9 High-risk-Gruppe

Die Ergebnisse der Patienten der High-risk-Gruppe (high risk) wurden mit den Werten der übrigen Patienten (normal risk) verglichen. Es zeigten sich an keinem der Tage signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den Oberflächenmarkern CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität. Auch wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Oberflächenmarker und der DPP IV-Aktivität gefunden, wenn man beide Gruppen auf eine Abstoßungsreaktion bis zum Ende des 2. Monats hin untersucht. Auf eine Darstellung dieser Daten wurde verzichtet.

Tab.10.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit high und normal risk, Tag 0

Tag 0	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk
CD3+/CD26+ %	30	51	9,4	7,7	2,1	0,8	30,8	34,0	7,3 - 11,1	6,4 - 9,3
CD4+/CD26+ %	30	51	6,5	5,9	1,4	0,5	28,6	30,0	4,5 - 9,1	4,6 - 7,3
CD8+/CD26+ %	30	51	2,3	1,6	0,3	0,1	5,2	4,9	1,3 - 2,8	1,5 - 1,8
DPPIV-Aktivität U/ml	30	51	77,4	71,5	44,6	39,1	124,1	125,5	67,5 - 86,7	63,3 - 82,5

Tab.10.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit high und normal risk, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk
CD3+/CD26+ %	32	53	7,6	7,4	1,4	1,9	22,7	70,4	4,3 - 9,5	5,9 - 9,1
CD4+/CD26+ %	32	53	5,8	5,5	0,9	1,1	19,0	67,1	3,8 - 7,3	4,1 - 8,1
CD8+/CD26+ %	32	53	1,3	1,2	0,3	0,3	5,2	12,1	0,9 - 1,7	1,0 - 1,8
DPPIV-Aktivität U/ml	33	54	58,7	53,4	35,2	31,2	90,3	87,4	52,5 - 62,9	49,1 - 59,5

Tab.10.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit high und normal risk, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk
CD3+/CD26+ %	33	54	7,0	8,3	0,9	1,6	62,3	55,8	5,0 - 10,3	6,6 - 10,4
CD4+/CD26+ %	33	54	5,2	6,1	0,7	0,6	50,5	48,7	3,8 - 8,6	5,4 - 8,9
CD8+/CD26+ %	33	54	1,5	1,5	0,2	0,2	9,8	27,8	0,9 - 2,2	1,2 - 2,1
DPPIV-Aktivität U/ml	33	54	52,2	51,0	30,2	26,0	80,8	100,0	48,1 - 59,0	46,9 - 53,1

Tab.10.4: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit high und normal risk, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk	normal risk	high risk
CD3+/CD26+ %	31	54	8,7	9,2	0,3	2,0	51,2	54,6	6,6 - 12,8	7,3 - 12,4
CD4+/CD26+ %	31	54	6,1	7,9	0,4	0,7	42,5	46,0	5,1 - 11,0	5,9 - 10,5
CD8+/CD26+ %	31	54	1,7	1,8	0,0	0,3	7,7	28,5	1,2 - 2,5	1,3 - 2,4
DPPIV-Aktivität U/ml	32	53	48,3	45,1	21,3	29,5	73,9	100,6	43,9 - 52,9	41,0 - 47,9

3.3 Klinische Ereignisse

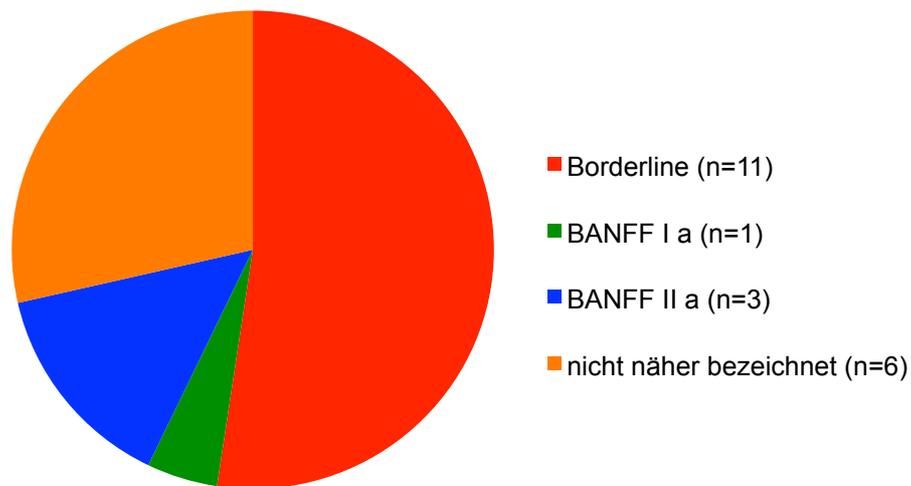
3.3.1 Akute Abstoßung bis zum Ende des zweiten Monats

Einige Patienten (n = 21) entwickelten bis zum Ende des zweiten Monats nach Transplantation eine oder mehrere akute Abstoßungsreaktionen. Es wurden nur biopsie-gesicherte akute Abstoßungen (BPAR) in die Studie einbezogen. Chronische oder humorale Abstoßungen traten während des Beobachtungszeitraums nicht auf.

Tab.11: Zeitpunkt der Abstoßungen

Art der Abstoßung	Zeitpunkt der einzelnen Abstoßungsreaktionen (Tag nach OP)
Borderline	9, 15, 21, 23, 24, 24, 25, 26, 29, 37, 43, 58
BANFF I a	8
BANFF II a	6, 7, 25
nicht näher bezeichnet	7, 8, 9, 13, 16, 19, 30, 33, 41, 53

Borderline-Abstoßungsreaktionen zeigten 10 Patienten, ein Patient zeigte nur eine Abstoßungsreaktion gemäß BANFF Ia, zwei Patienten zeigten Abstoßungsreaktionen gemäß BANFF IIa und bei fünf Patienten wurden die Abstoßungsreaktionen nicht näher bezeichnet. Ein Patient zeigte sowohl eine Borderline-Rejektion als auch nicht näher bezeichnete Abstoßungsreaktionen, er wurde in die Gruppe der Borderline-Rejektionen eingeteilt. Ein weiterer Patient zeigte sowohl eine Abstoßungsreaktion gemäß BANFF IIa als auch Abstoßungsreaktionen, welche nicht näher bezeichnet wurden. Er wurde in die Gruppe der BANFF IIa eingeteilt.



Pie-Chart 1: Einteilung der Patienten mit Abstoßungsreaktionen (n=21)

3.3.1.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Abstoßung

Um zu ermitteln, ob man mit Hilfe der Oberflächenmarkern CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität eine Voraussage treffen kann, bei welchen Patienten eine Abstoßung drohen könnte, wurden die Werte der Patienten mit Abstoßung (mitAbst) mit denen der Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst) verglichen. An den Tagen 3 und 7 zeigten die Patienten mit Abstoßung eine signifikant höhere CD8+/CD26+ Expression (doppelt so hoch) wie Patienten ohne Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation. Alle weiteren untersuchten Parameter zeigten an den Meßtagen 0, 3, 7 und 14 keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit Abstoßung verglichen mit den Patienten ohne Abstoßung. Als nächstes wurde ermittelt, ob der Schweregrad der Abstoßung einen Einfluß auf die Messwerte hat. Hierfür wurden die Messwerte des Oberflächenmarkers CD8+/CD26+ von den Patienten mit einer Borderline-Rejektion (n = 11) und Rejektionen ohne Einteilung in eine BANFF-Klassifikation (n=6), mit den Patienten verglichen, welche eine BANFF-Klassifikation Typ Ia (n = 1) oder IIa (n = 3) erhielten. Es zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede.

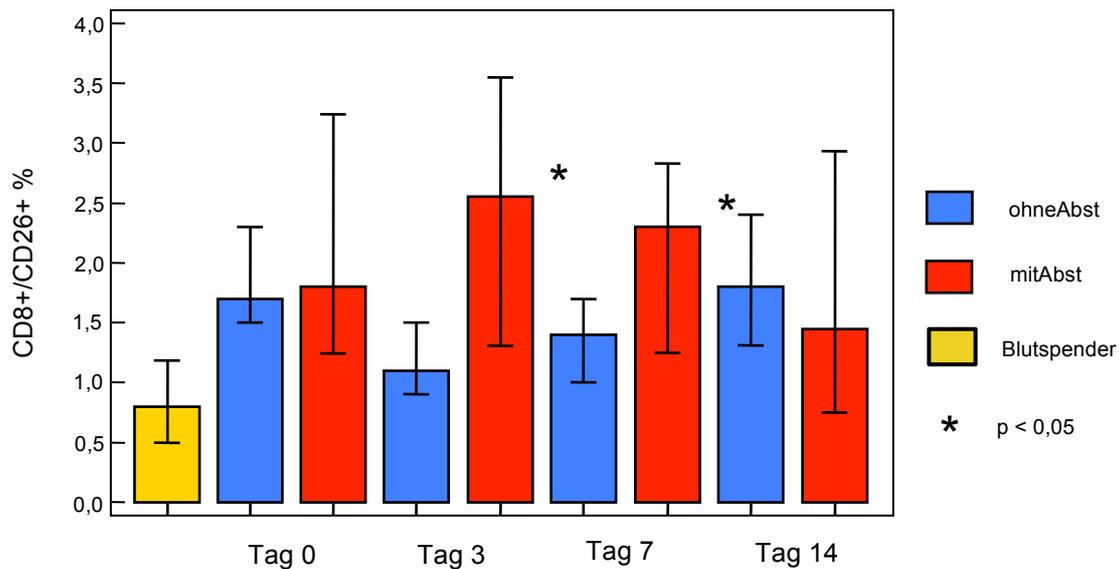


Abb. 20: Oberflächenmarker CD8+/CD26+ bei Patienten mit und ohne Abstoßung

Wie aus der Graphik ersichtlich wird, zeigten sich bei den Medianen der Oberflächenmarker CD8+/CD26+ der Patienten ohne Abstoßung eine unterschiedliche Tendenz zu den Patienten mit Abstoßung. An Tag 0 zeigten sich annähernd gleiche Ausgangswerte von CD8+/CD26+ bei Patienten mit und ohne Abstoßung. Während der Median der CD8+/CD26+ Zellen bei den Patienten ohne Abstoßung an Tag 3 abfällt, steigt der Median der CD8+/CD26+ Zellen bei den Patienten mit Abstoßung an Tag 3 an. Patienten mit Abstoßung weisen eine mehr als doppelt so hohe Expression auf als Patienten ohne Abstoßung. An Tag 7 steigt der Median der CD8+/CD26+ Zellen bei Patienten ohne Abstoßung an, während der Median der Patienten mit Abstoßung abfällt. Die CD26-Expression auf den CD8+ Zellen nähert sich bei beide Gruppen an Tag 14 dem Ausgangswert.

3.2.1.2 Tacrolimus-Talspiegel und Abstoßung

Bei den Patienten wurden an den Tagen 3, 7 und 14 nach Transplantation die Medikamenten-Talspiegel von Tacrolimus im Blut gemessen. Vergleicht man nun die gemessene Tacrolimus-Konzentration bei den Patienten mit Abstoßung

innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation (mitAbst) mit der Tacrolimus-Konzentration bei Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst), so findet man keine signifikanten Unterschiede. Auf eine Darstellung der Daten wurde verzichtet. Da das steady-state der Tacrolimus-Konzentration erst nach mehreren Tagen erreicht ist, wurden die Mediane der Tacrolimus-Konzentrationen zwischen Tag 3 und Tag 14 ermittelt. Die Mediane der Patienten mit Abstoßung (n=21, Median 7,0 µg/l, 95% CI 5,9 – 7,5) unterschieden sich nicht signifikant von den Medianen der Patienten ohne Abstoßung (n=66, Median 6,8 µg/l, 95% CI 6,3 – 7,0).

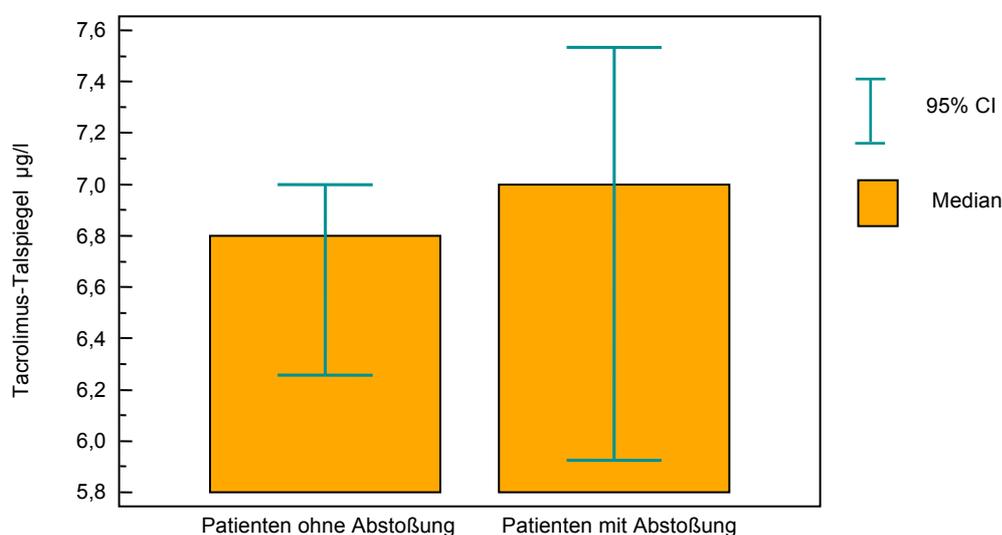


Abb. 21: Mediane des Tacrolimus-Talspiegels zwischen Tag 3 und Tag 14, bei Patienten ohne und mit Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation

3.3.1.3 Mycophenolsäure-Konzentration und Abstoßung

Die Messung der Mycophenolsäure-Konzentration (MPA) erfolgte an den Tagen 3, 7 und 14 nach Transplantation mittels HPLC. Da die Messung des Talspiegels von MPA unter Myfortic-Therapie aufgrund der Pharmakokinetik des Medikaments schwierig ist, wurden auch hier die Mediane der Messungen an Tag 3 bis 14 verwendet. Sowohl die Messungen der einzelnen Tage als auch der Median des Zeitraums Tag 3 bis Tag 14 zeigten bei Patienten mit

Abstoßung (n = 21, Median 1,8 mg/l, 95% CI 1,1 – 3,0) keine signifikanten Unterschiede zu den Werten der Patienten ohne Abstoßung (n = 66, Median 2,3 mg/l, 95% CI 2,0 – 3,0).

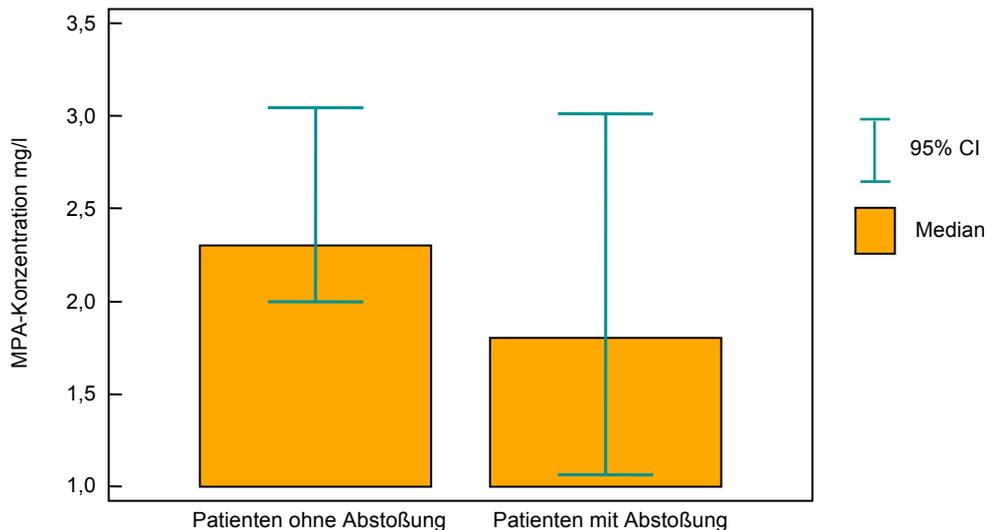


Abb. 22: Mediane der Myfortic-Konzentration (MPA) zwischen Tag 3 und Tag 14, bei Patienten ohne und mit Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation

Ebenfalls per HPLC wurde das freie MPA (fMPA) an den Tagen 3, 7 und 14 nach Transplantation gemessen. Auch hier zeigten sich weder an den einzelnen Analysentagen noch bei dem ermittelten Median zwischen Tag 3 und Tag 14 signifikante Unterschiede zwischen der Patientengruppe mit Abstoßungen (n = 21, Median 43,8 µg/l, 95% CI 13,8 – 54,2) zu den Patienten ohne Abstoßungen (n = 66, Median 43,1 µg/l, 95% CI 35,8 – 60,9).

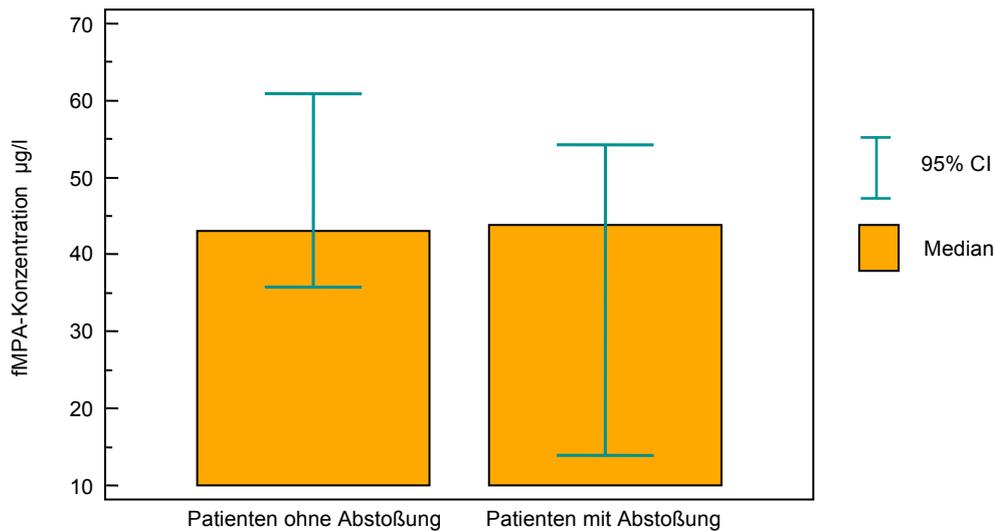


Abb. 23: Mediane der fMPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14, bei Patienten ohne und mit Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation

3.3.1.4 Immunsuppressiva-Konzentration und Abstoßung in der High-risk-Gruppe

Die High-risk-Gruppe (n = 54) wurde separat nochmals bezüglich der Immunsuppressiva-Konzentrationen bei Abstoßung untersucht. In der High-risk-Gruppe zeigten 16 Patienten bis zum Ende des 2. Monats nach Transplantation eine Abstoßung.

Der Tacrolimus-Talspiegel unterschied sich bei den Patienten mit Abstoßung (Abst) nicht von den Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst), weder an den einzelnen Meßtagen Tag 3, 7 und 14, noch bei den Medianen zwischen den Tagen 3 und 14.

Auch die MPA-Konzentration an den Tagen 3, 7 und 14, sowie der Median zwischen den Tagen 3 und 14 zeigte bei den Patienten mit Abstoßung (Abst) keinen Unterschied im Vergleich zur MPA-Konzentration der Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst).

Die fMPA-Konzentration zeigte an den Tagen 3 und 7, ebenso wie der Median zwischen Tag 3 und Tag 14, bei den Patienten mit Abstoßung (Abst) keine signifikanten Unterschiede zu den Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst).

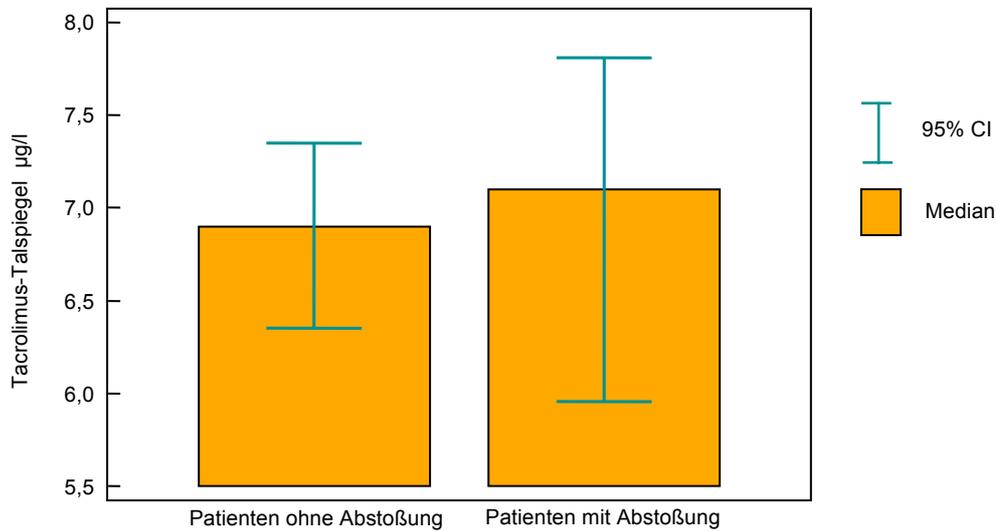


Abb. 24: Mediane des Tacrolimus-Talspiegels zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit und ohne Abstoßung

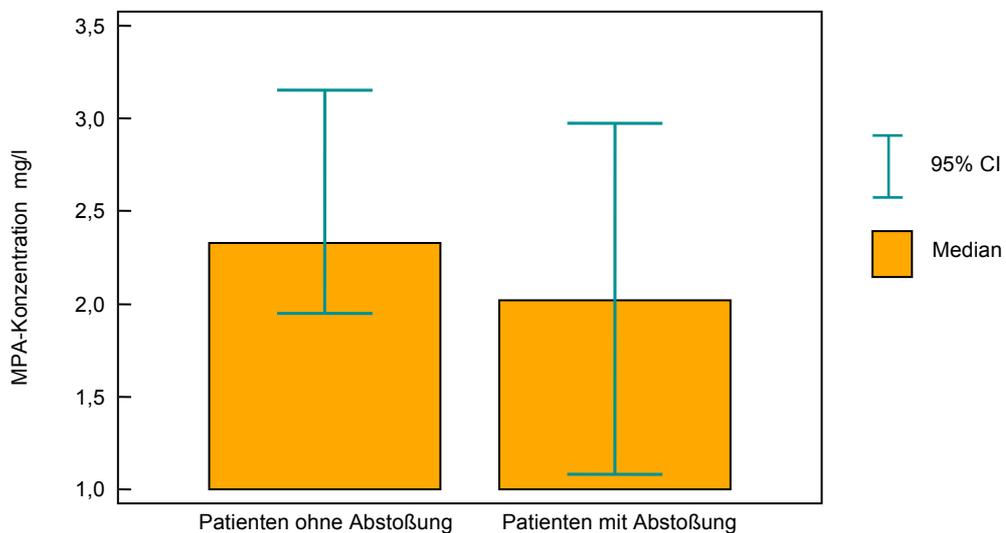


Abb. 25: Mediane der MPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit und ohne Abstoßung

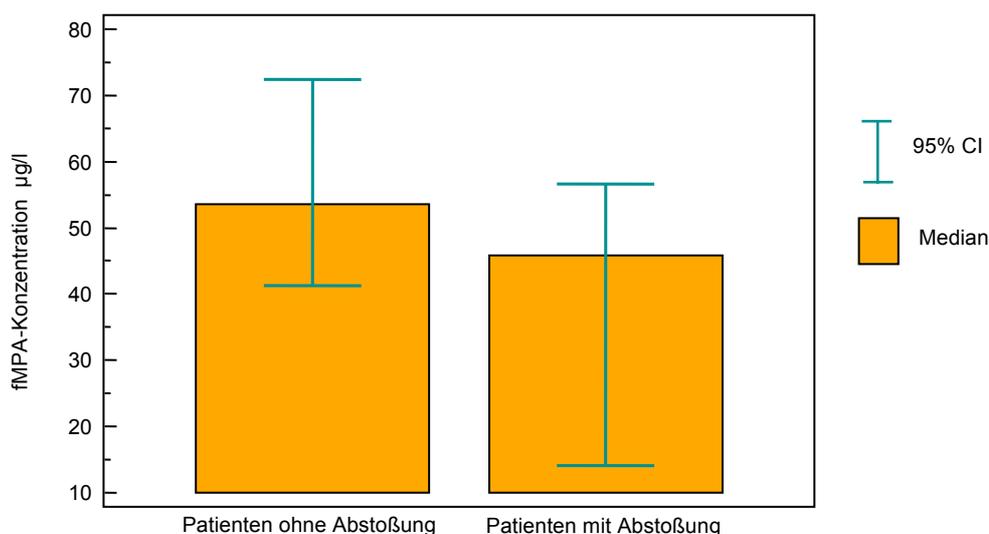


Abb. 26: Mediane der fMPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit und ohne Abstoßung

In der High-risk-Gruppe zeigten Patienten mit Abstoßung und/oder Transplantatfunktionsverschlechterung (TFV) im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßung oder TFV tendenziell niedrigere Werte bei Tacrolimus (Median 6,9µg/l, 95% CI 6,3 – 7,2 vs. Median 7,8µg/l, 95% CI 6,3 – 9,4, $p = 0,09$) und MPA (Median 2,2 mg/l, 95% CI 1,7 – 2,5 vs. Median 3,5 mg/l, 95% CI 2,0 – 3,8, $p = 0,08$), jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Der Median der fMPA-Konzentration zeigte hingegen keine Tendenz (Median 49,8 µg/l, 95% CI 37,0 – 63,0 vs. Median 54,0 µg/l, 95% CI 36,2 – 109,6, $p = 0,55$).

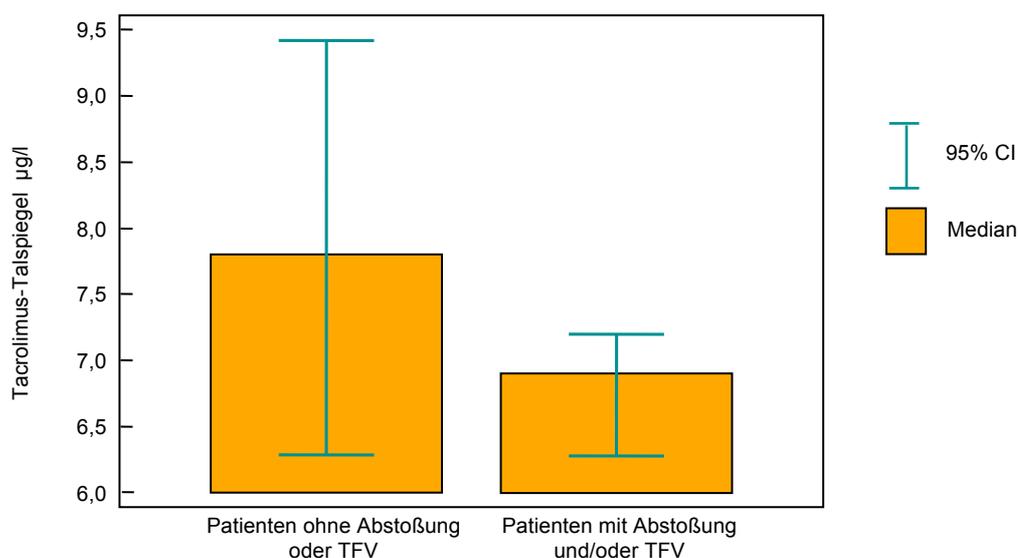


Abb. 27: Mediane des Tacrolimus-Talspiegels zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit Abstoßung und/oder TFV und Patienten ohne Abstoßung oder TFV

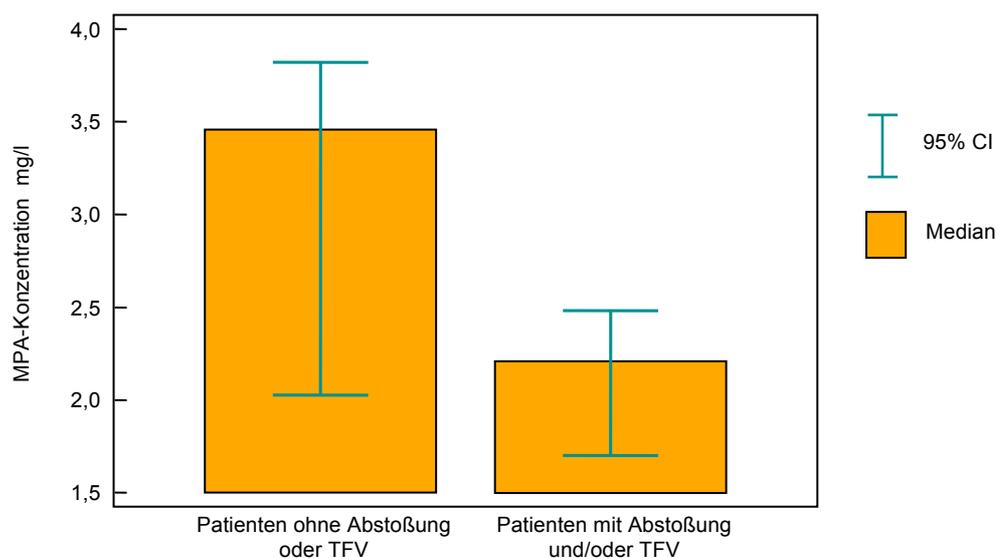


Abb. 28: Mediane der MPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit Abstoßung und/oder TFV und Patienten ohne Abstoßung oder TFV

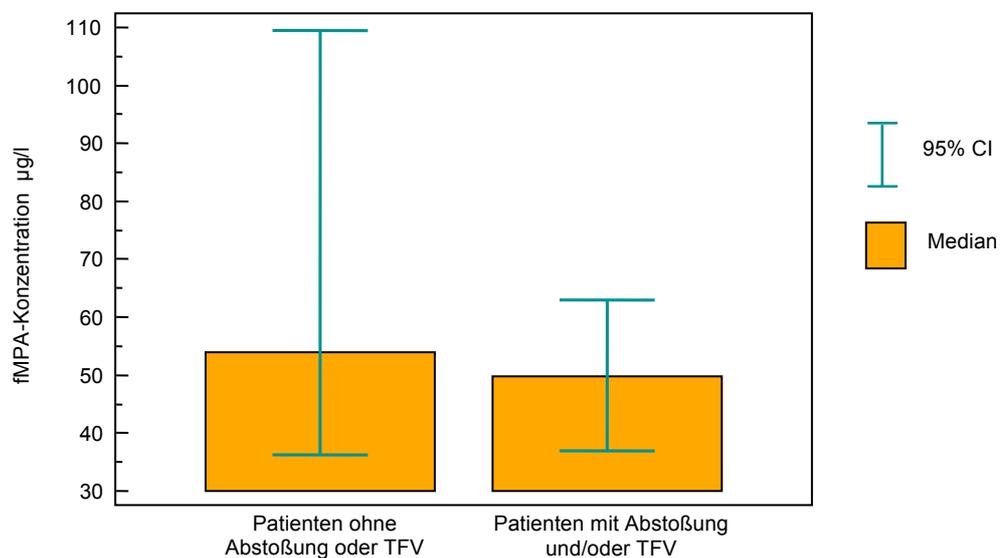


Abb. 29: Mediane der fMPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 in der High-risk-Gruppe, bei Patienten mit Abstoßung und/oder TFV und Patienten ohne Abstoßung oder TFV

3.3.1.5 ROC-Analyse

Anhand einer ROC-Analyse wurde ermittelt, bei welchem Wert des Oberflächenmarkers CD8+/CD26+ eine gute Diskriminierung zwischen Patienten mit und ohne Abstoßung erreicht werden konnte. Setzt man den Cut-off bei 2,2%, so ergab sich an Tag 3 nach Transplantation eine Vorhersage für eine Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation mit einer Sensitivität von 60% und einer Spezifität von 85% (AUC = 0,697). Der positiv prädiktive Wert lag bei 55%, der negativ prädiktive Wert bei 87%.

Betrachtet man die Werte des Oberflächenmarkers CD8+/CD26+ an Tag 7 nach Transplantation ebenfalls mit den Cut-off von 2,2%, so zeigte sich hier eine Voraussage bezüglich einer Abstoßung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation mit einer Sensitivität von 57% und einer Spezifität von 79%. Der positiv prädiktive Wert lag bei 46%, der negativ prädiktive Wert bei 85%. Auf eine Darstellung der ROC-Kurve für Tag 7 wurde verzichtet.

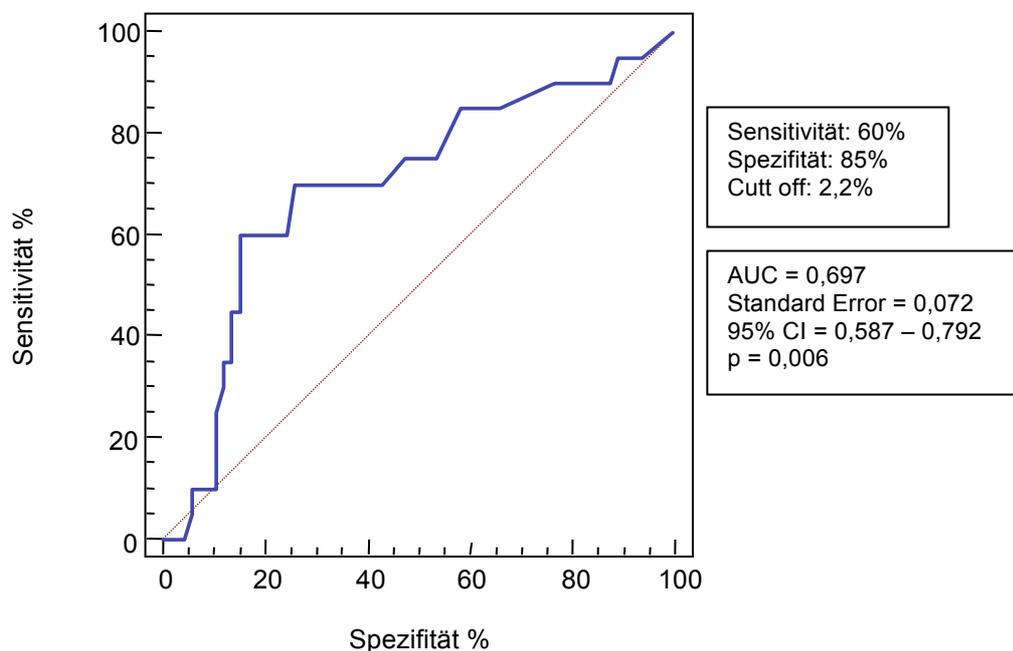


Abb. 30: ROC-Kurve von CD8+/CD26+ an Tag 3 nach Transplantation

3.3.1.6 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit CD8+/CD26+ >2,2%

Bei Patienten mit Abstoßung zeigten sich erhöhte Werte von CD8+/CD26+ an Tag 3 und Tag 7. Der mittels der ROC-Kurve ermittelte Cut-Off von 2,2% wurde nun verwendet, um Patienten im Kollektiv zu identifizieren, welche an Tag 3 oder Tag 7 einen erhöhten CD8+/CD26+ Wert hatten (n=35). Diese Patienten wurden nun in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe besteht aus Patienten, welche innerhalb des zweimonatigen Beobachtungszeitraumes eine Abstoßung erlitten haben (Abst) (n = 14), die andere aus Patienten ohne Abstoßung (ohneAbst) (n = 21). Nun wurde ermittelt, ob sich die beiden Gruppen hinsichtlich der ermittelten Immunsuppressiva-Werte unterschieden.

Vergleicht man die beiden Gruppen bezüglich des Tacrolimus-Talspiegels, so findet man weder bei den Einzelwerten an Tag 3, 7 und 14 (Daten nicht dargestellt), noch beim Median zwischen den Tagen 3 und 14 signifikante Unterschiede.

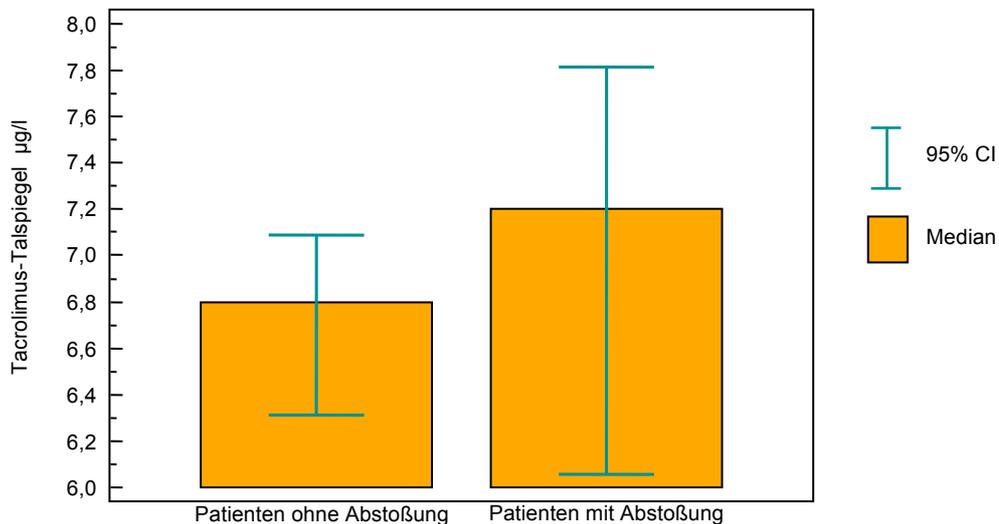


Abb. 31: Mediane des Tacrolimus-Talspiegels zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 oder Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

Auch bei der MPA-Konzentration und fMPA-Konzentration zeigten sich weder an Tag 3, 7 und 14 (Daten nicht dargestellt), noch beim Median zwischen Tag 3 und Tag 14 Unterschiede bei den Patienten mit Abstoßung (Abst) zu den Patienten ohne Abstoßung (ohne Abst).

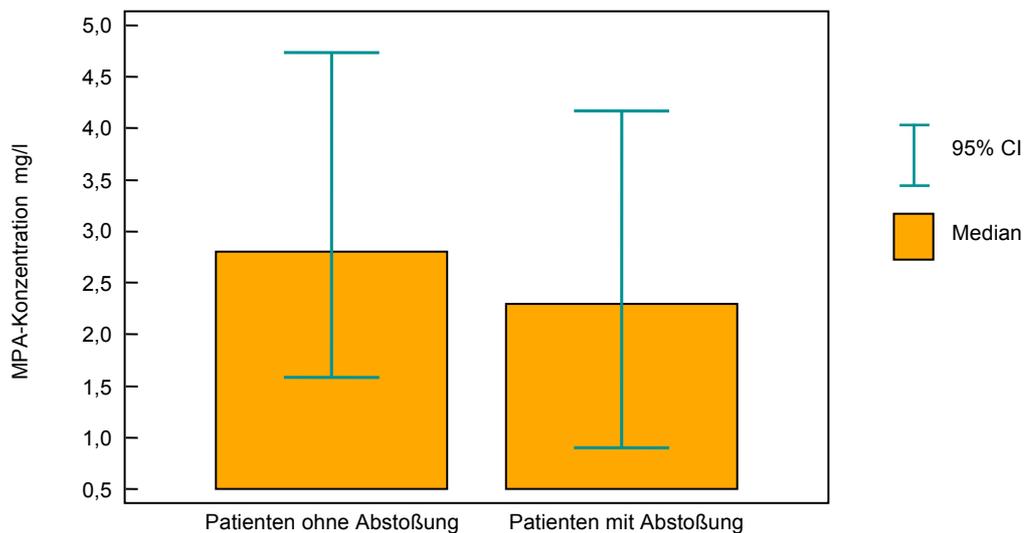


Abb. 32: Mediane der MPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 oder Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

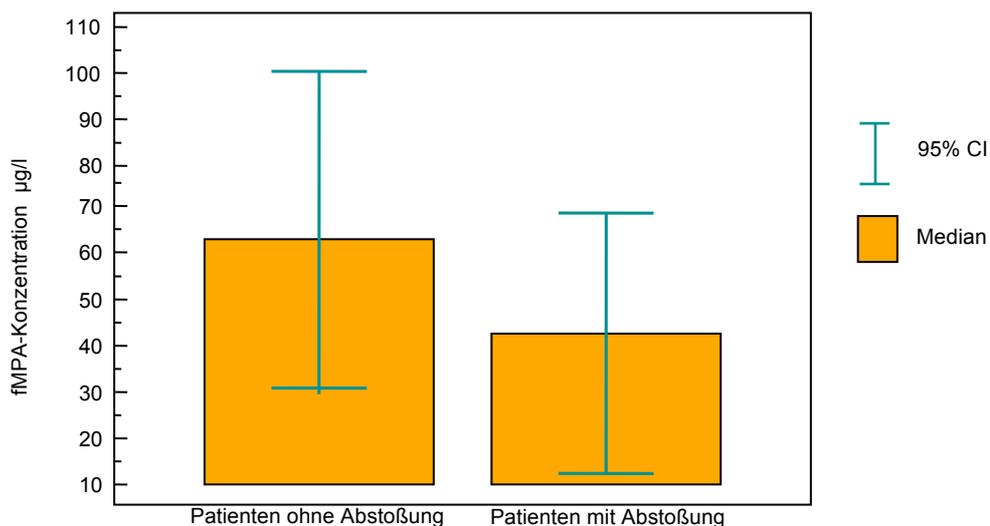


Abb. 33: Mediane der fMPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 oder Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

Patienten, bei denen der Oberflächenmarker CD8+/CD26+ an Tag 3 und Tag 7 über dem Cut-off von 2,2% lag (n=15), wurden unterteilt in Patienten mit Abstoßung innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 2 Monaten (Abst) (n = 11) und Patienten ohne Abstoßung innerhalb dieses Zeitraumes (ohne Abst) (n = 4).

Betrachtet man nun die Werte des Tacrolimus-Talspiegels, der MPA-Konzentration sowie der fMPA-Konzentration an den Tagen 3, 7 und 14, sowie den Median der Messwerte zwischen Tag 3 und Tag 14, so stellt man fest, dass sich die Werte bei Patienten mit Abstoßung nicht von den Werten der Patienten ohne Abstoßung signifikant unterscheiden. Allerdings muß bedacht werden, dass das Patientenkollektiv sehr klein war, und somit an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden muß.

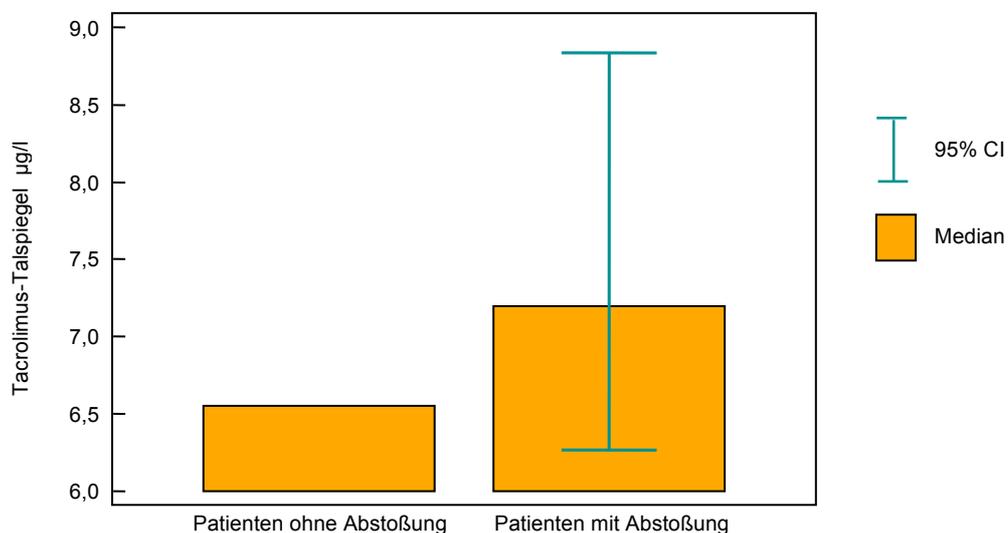


Abb. 34: Mediane des Tacrolimus-Talspiegels zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 und Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

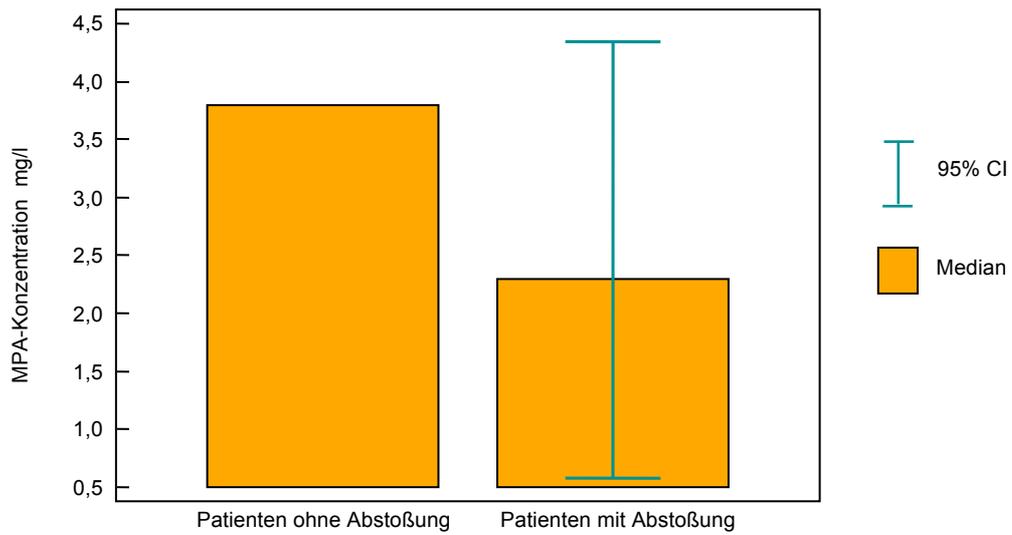


Abb. 35: Mediane der MPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 und Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

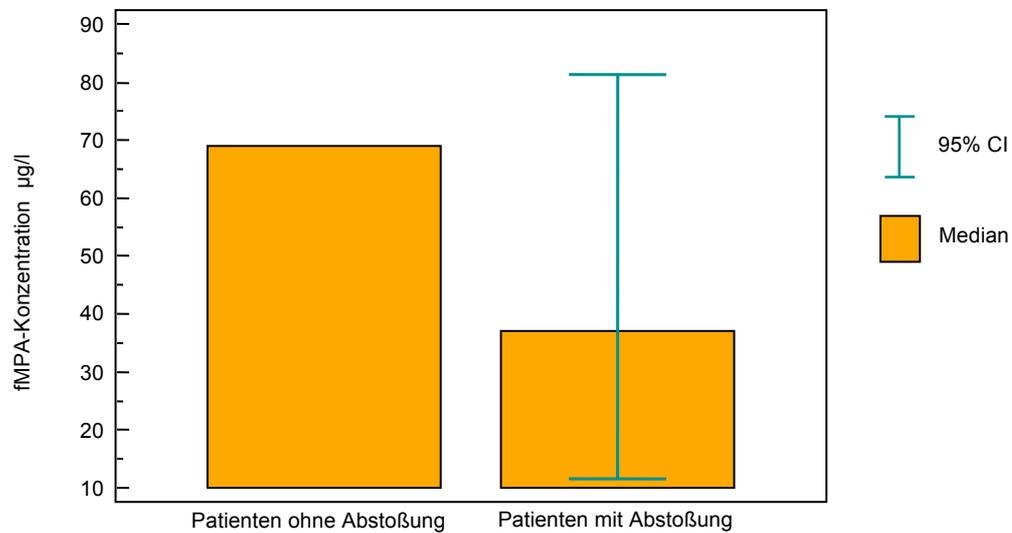


Abb. 36: Mediane der fMPA-Konzentration zwischen Tag 3 und Tag 14 bei Patienten mit CD8+/CD26+ > 2,2% an Tag 3 und Tag 7, mit Abstoßung und ohne Abstoßung

3.3.2 Transplantatfunktionsverschlechterung (TFV)

Einige der rekrutierten Patienten erlitten während der zweimonatigen Beobachtungszeit eine oder mehrere Transplantatfunktionsverschlechterung (TFV) (n = 50), andere zeigten keine Transplantatfunktionsaufnahme (keineTFA) (n = 8). Eine weitere Anzahl von Patienten zeigten eine stabile Transplantatfunktion ohne Transplantatfunktionsverschlechterung (keineTFV) (n = 29).

Eine TFV kann sehr unterschiedliche Ursachen haben. Eine prärenale Ursache war für 10 TFV verantwortlich, sechsmal aufgrund einer Hypovolämie und einmal aufgrund einer Transplantatarterienstenose, viermal konnte die genaue Ursache der prärenalen Genese nicht geklärt werden. Ein erhöhter Tacrolimus-Spiegel galt bei 9 TFV als Ursache, wobei einmal eine gesicherte Calcineurin-Inhibitor-Toxizität in der Biopsie nachgewiesen werden konnte. Eine Rejektion konnte bei 19 der TFV mittels Biopsie nachgewiesen werden. Bei 8 TFV war ein Infekt die Ursache. Ein Rezidiv der Grunderkrankung war verantwortlich für 3 TFV, zweimal war hier die Grunderkrankung eine IgA-Nephritis, einmal eine RPGN. Ein akutes Nierenversagen war bei einer TFV die Ursache, bei zwei TFV wurde ein bioptisch festgestellter chronisch tubulointerstitieller Schaden festgestellt. Harnstau war bei 3 TFV die Ursache, zweimal aufgrund von einer Lymphozele, einmal aufgrund von einer Nierenbeckenektasie des Transplantats. Ursache für eine TFV war eine Ureterstenose. Eine TFV entstand aufgrund einer bioptisch gesicherten Nephrosklerose mit Tubuloatrophie und interstitieller Fibrose des Transplantats. Nicht eindeutig erurierbar war die Ursache bei 14 TFV.

Ein Transplantatverlust innerhalb der ersten zwei Monate nach Transplantation trat bei einem Patienten auf. Grund hierfür war eine fehlende Funktionsaufnahme bei stark vorgeschädigtem Transplantat, die Nephrektomie erfolgte am 40. postoperativen Tag.

Keiner der rekrutierten Patienten verstarb innerhalb der ersten zwei Monate.

3.3.2.1 Kreatinin-Konzentration im Serum bei TFV

Da die Kreatinin-Konzentration im Serum als Indikator für eine TFV dient, wurde in allen 3 Gruppen (keineTFV, TFV, keineTFA) der Kreatininabfall über den Zeitraum von 21 Tagen (Meßpunkte: Tag 0, 3, 7, 14 und 21) hin untersucht. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Tests. Wie zu erwarten, zeigte die Kreatinin-Konzentration der Gruppe keineTFV einen signifikanten Abfall zwischen Tag 0 und 3, Tag 3 und 7, Tag 3 und 14 sowie Tag 3 und Tag 21. Auch die Gruppe TFV zeigte einen signifikanten Abfall der Kreatinin-Konzentration zwischen Tag 0 und 3, Tag 3 und 7, Tag 3 und 14 sowie Tag 3 und Tag 21. Dabei ist zu beachten, dass die Funktionsverschlechterung des Transplantats über einen Zeitraum von 2 Monaten aufgetreten ist, und diese nicht unbedingt mit den Meßzeitpunkten Tag 0, 3, 7, 14 und 21 zusammenfällt. Patienten ohne Funktionsaufnahme des Transplantats (keineTFA) zeigten ebenfalls, wie zu erwarten, keinen signifikanten Kreatinin-Abfall zwischen Tag 0 und 3, Tag 3 und 7 sowie Tag 3 und 14. Allein zwischen den Tagen 3 und 21 zeigte sich ein signifikanter Abfall der Kreatinin-Konzentration.

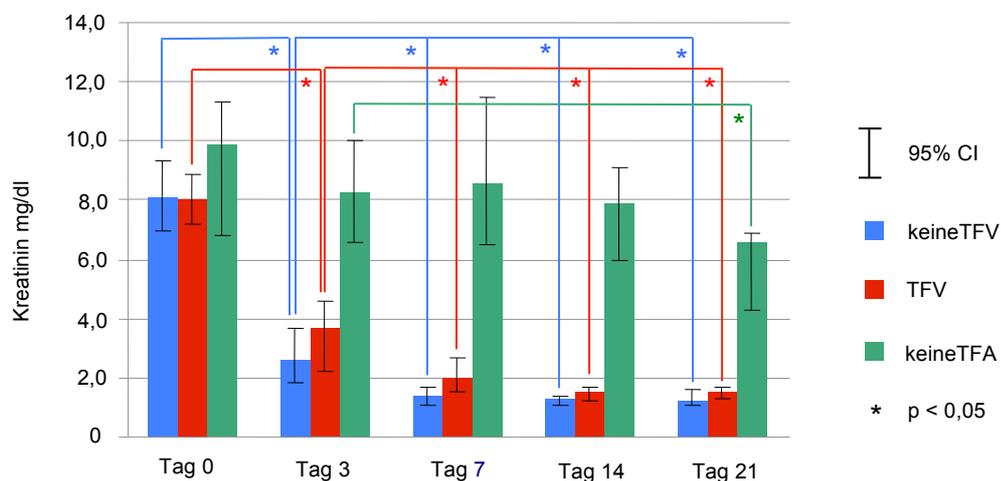


Abb. 37: Mediane der Kreatinin-Konzentration bei Patienten ohne TFV, mit TFV und ohne TFA

3.3.2.2 Expression der Oberflächenmarker und der DPP IV-Aktivität bei TFV

Vergleicht man die Ergebnisse der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ sowie die Ergebnisse der DPP IV-Aktivität an den Tagen 0, 3, 7 und 14 zwischen der Gruppe keineTFV und der Gruppe TFV, so findet man bei der Gruppe TFV an Tag 14 eine signifikant höhere Expression der Oberflächenmarker CD3+/CD26+ (1,8 mal höher) und CD4+/CD26+ (2,0 mal höher), verglichen mit der Expression der jeweiligen Oberflächenmarker bei den Patienten ohne TFV. Die CD8+/CD26+ Werte wiesen zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Die DPP IV-Aktivität war bei Patienten mit TFV an Tag 7 knapp signifikant ($p = 0,045$), und an Tag 14 signifikant niedriger als bei den Patienten ohne TFV.

Die Ergebnisse der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität der Gruppe keineTFA zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gruppe keineTFV.

Je nach Ursache der Transplantatfunktionsverschlechterung wurden unter anderem operative Maßnahmen, eine Erhöhung der Diurese durch vermehrte Flüssigkeitszufuhr sowie eine Anpassung der Immunsuppression durchgeführt.

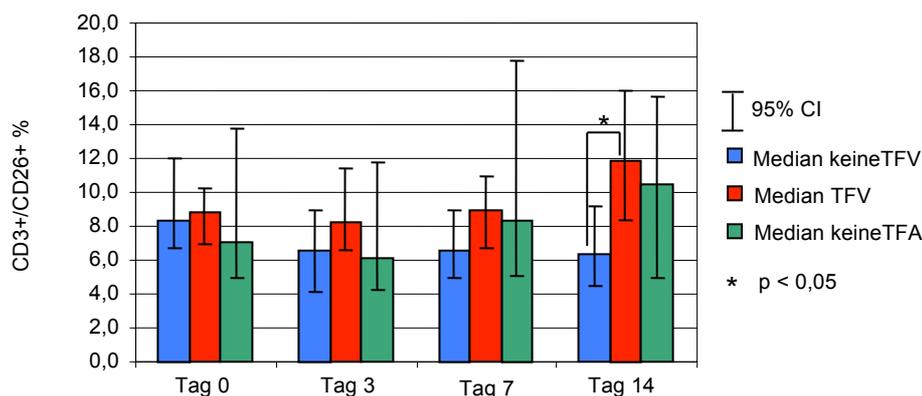


Abb 38: CD3+/CD26+ im Vergleich zwischen keineTFV, TFV und keineTFA

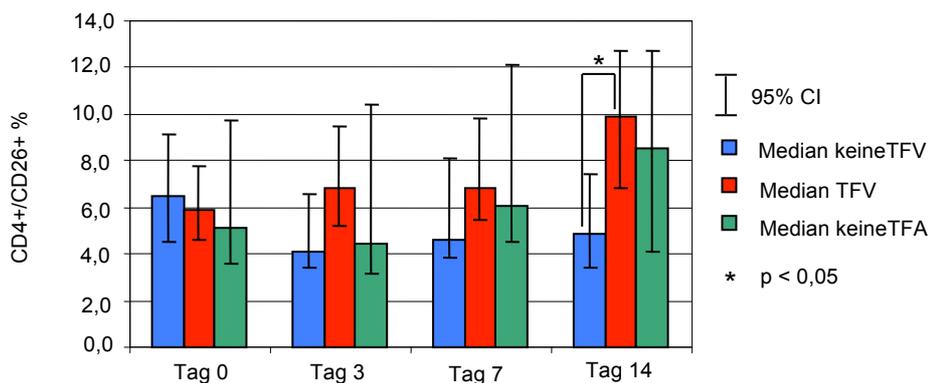


Abb 39: CD4+/CD26+ im Vergleich zwischen keineTFV, TFV und keineTFA

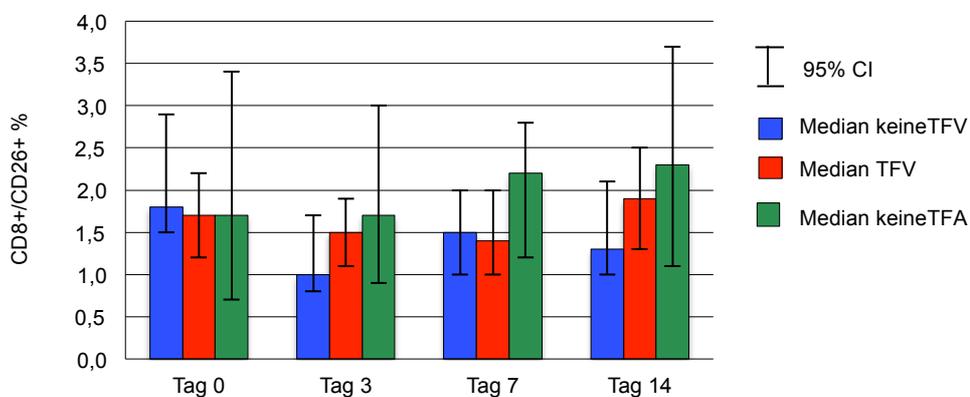


Abb 40: CD8+/CD26+ im Vergleich zwischen keineTFV, TFV und keineTFA

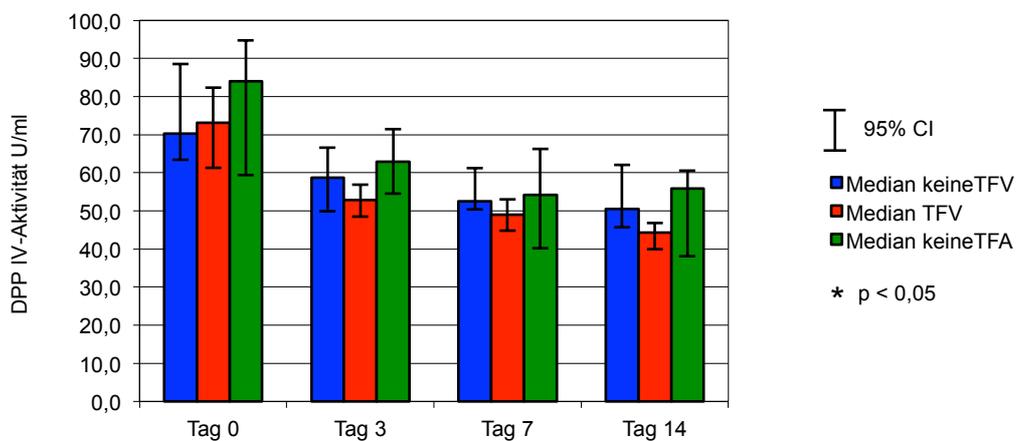


Abb 41: DPP IV-Aktivität (U/ml) im Vergleich zwischen keineTFV, TFV und keineTFA

3.3.2.3 Immunsuppressiva-Konzentration bei TFV

Betrachtet man die Mediane zwischen Tag 3 und Tag 14 der Tacrolimus-Konzentration, MPA-Konzentration und Konzentration von fMPA bei Patienten mit Transplantatfunktionsverschlechterung im Vergleich zu den Patienten, welche keine Transplantatfunktionsverschlechterung aufwiesen, so zeigten sich zwischen den beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Auf eine Auflistung der Daten wurde hier verzichtet.

Auch wenn man der Patientengruppe mit Abstoßung die Patienten hinzufügt, die innerhalb von 2 Monaten eine Transplantatfunktionsverschlechterung (TFV) zeigten, und diese Gruppe (Abst_TFV) mit der Patientengruppe ohne Abstoßung und ohne TFV (ohneAbst_TFV) vergleicht, so zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen hinsichtlich der Mediane zwischen Tag 3 und Tag 14 im Tacrolimus-Talspiegel, oder in der MPA-Konzentration, oder in der fMPA-Konzentration.

Tab.12: Median zwischen Tag 3 und Tag 14 der Tacrolimus-, MPA- und fMPA-Konzentration bei Patienten mit Abstoßung oder TFV vs. Patienten ohne Abstoßung oder TFV

Median zwischen Tag 3 und Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Abst_TFV	ohneAbst_TFV	Abst_TFV	ohneAbst_TFV	Abst_TFV	ohneAbst_TFV	Abst_TFV	ohneAbst_TFV	Abst_TFV	ohneAbst_TFV
Tacrolimus µg/l	58	29	6,9	6,8	3,5	4,5	13,0	10,8	6,3 - 7,2	6,1 - 7,2
MPA mg/l	58	29	2,2	2,9	0,4	0,6	12,5	10,7	1,8 - 2,8	1,8 - 3,5
fMPA µg/l	58	29	44,4	40,7	7,4	8,3	286,9	274,9	33,6 - 54,6	28,9 - 62,3

3.3.3 Infektionen nach Transplantation

Als Infektion wurden alle nachgewiesenen bakteriellen und viralen Infektionen angesehen. Parasitäre Infektionen waren innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht aufgetreten. Nach Transplantation entwickelten 40 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2 Monaten Infektionen, von denen 27 Patienten keinen Harnwegsinfekt aufwiesen. Aus dem Patientenkollektiv entwickelten 15 Patienten innerhalb der ersten zwei Monate

nach Transplantation eine CMV-Infektion (1 Neuinfektion, 3 Reaktivierungen), eine Polyomavirus-Infektion und/oder eine Herpesviren-Infektion.

3.3.3.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit Infektionen nach Transplantation

Infektionen nach einer Transplantation sind häufig ein Zeichen für eine Überimmunsuppression. Von den 87 rekrutierten Patienten kam es bei 40 Patienten zu einer Infektion innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation. Um zu ermitteln, ob sich die Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und die DPP IV-Aktivität in der Gruppe mit Infektion innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation (Infekt) von denen der Gruppe ohne Infektion (keinInfekt) unterschieden, wurden die Werte der beiden Gruppen mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen. Es zeigte sich an keinem Tag ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, weder bei den Oberflächenmarkern CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+, noch bei der DPP IV-Aktivität.

Da Harnwegsinfekte (HWI) eine häufige Infektion nach Nierentransplantationen sind und nicht unbedingt aufgrund einer Überimmunsuppression entstehen, wurden die Berechnungen erneut durchgeführt, diesmal ohne HWI als Infektion zu werten. Es zeigte sich weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität. Auf eine Auflistung dieser Daten wurde daher verzichtet.

Betrachtet man die Ratios zwischen den Meßwerten von CD3+/CD26+, CD4+/CD26+, CD8+/CD26+ und die DPP IV-Aktivität über die Tage 7 und 14, so kommt es zu keinem signifikanten Abfall oder Anstieg dieser Werte bei Patienten mit Infektion im Vergleich zu den Werten der Patienten ohne Infektion.

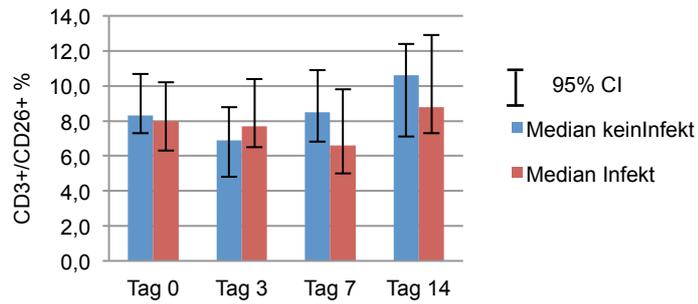


Abb. 42: CD3+/CD26+ bei Patienten mit und ohne Infekt

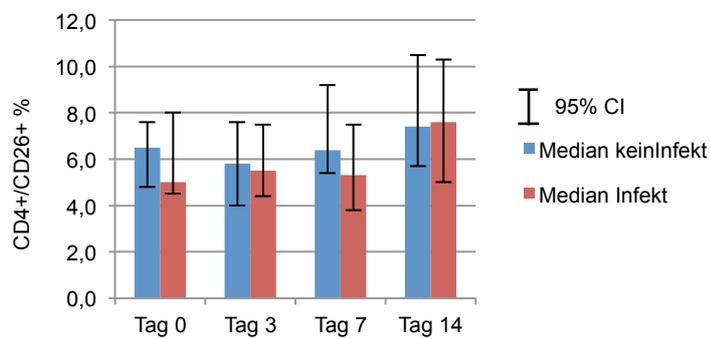


Abb. 43: CD4+/CD26+ bei Patienten mit und ohne Infekt

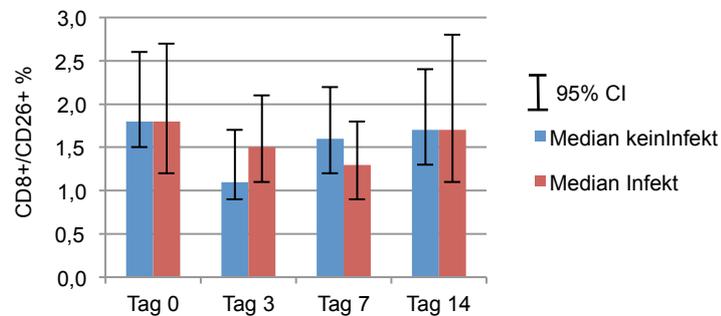


Abb. 44: CD8+/CD26+ bei Patienten mit und ohne Infekt

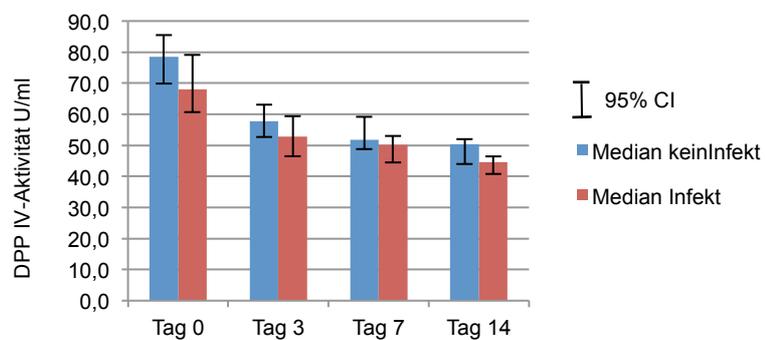


Abb. 45: DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne Infekt

Typische Infektionen, die mit Über-Immunsuppression einhergehen, sind Infektionen von CMV, BKV und Herpesviren. Daher wurde untersucht, ob die Werte der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität sich bei Patienten mit CMV- und/oder BKV- und/oder Herpesvirus-Infektionen (CMV/BKV/HV) (n = 23) von den Patienten ohne eine solche Infektion (keinCMV/BKV/HV) (n = 64) unterschieden. Von den 4 CMV-Infektionen war eine Infektion eine Neuinfektion mit CMV, die restlichen 3 Infektionen waren CMV-Reaktivierungen.

Es zeigte sich an keinem Tag ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+, auch nicht bei der DPP IV-Aktivität. Die CD26-Expression auf den CD8+ Zellen war zwar an Tag 0 bei den Patienten welche eine CMV- und/oder BKV- und/oder Herpesvirus-Infektion entwickelten niedriger als bei den Patienten welche keine CMV und/oder BKV- und/oder Herpesvirus-Infektion entwickelten, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

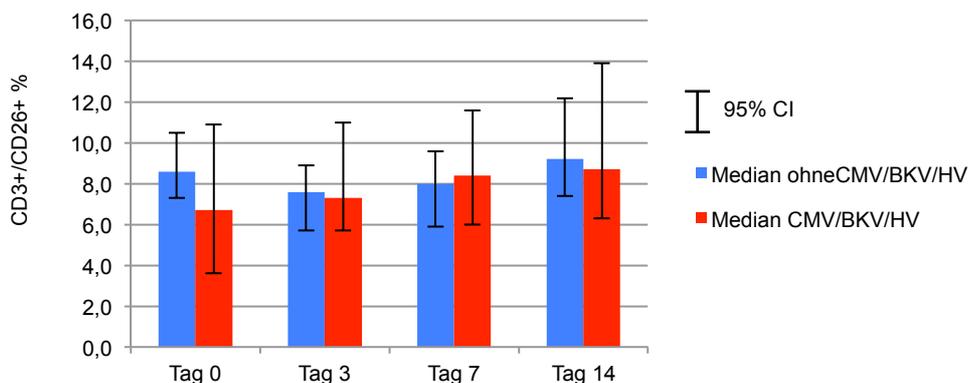


Abb. 46: CD3+/CD26+ bei Patienten mit und ohne CMV/BKV/HV Infektion

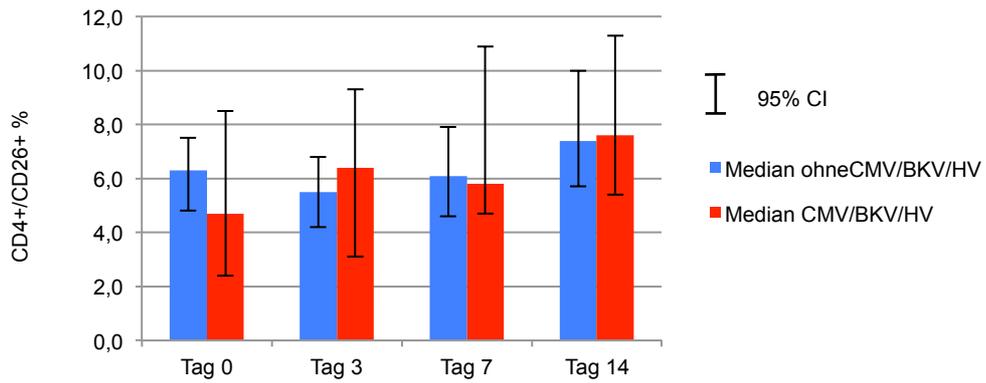


Abb. 47: CD4+/CD26+ bei Patienten mit und ohne CMV/BKV/HV Infektion

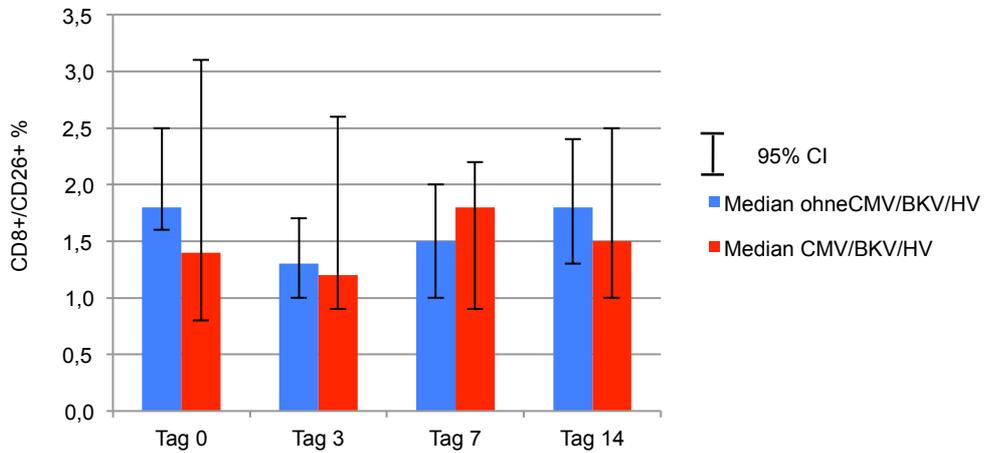


Abb. 48: CD8+/CD26+ bei Patienten mit und ohne CMV/BKV/HV Infektion

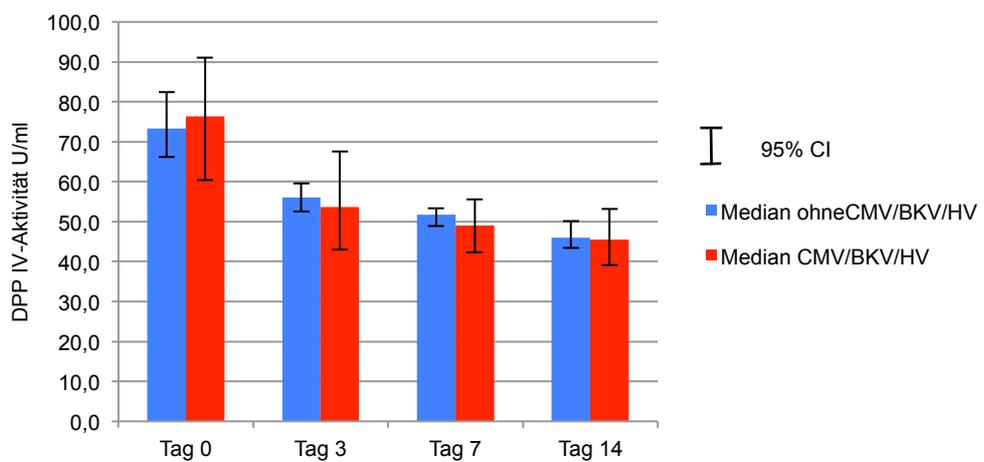


Abb. 49: DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne CMV/BKV/HV Infektion

3.3.3.2 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit Infektion nach Transplantation

Die Medianen zwischen Tag 3 und Tag 14 des Tacrolimus-Talspiegel, der MPA-Konzentration und der fMPA-Konzentration zeigten keine Unterschiede bei der Gruppe der Patienten mit Infektionen (Infekt) im Vergleich zu den Patienten ohne Infektionen (keinInfekt). CMV, BKV und Herpesviren rufen Infektionen hervor, welche typisch für eine Über-Immunsuppression sind. Daher wurden die Berechnungen erneut durchgeführt, diesmal wurden nur Patienten in die Infekt-Gruppe aufgenommen, welche eine Infektion mit CMV, BKV und/oder Herpesviren bekamen (n = 23). Im Vergleich zu der Patientengruppe ohne diese Infektionen (n = 64) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Auf eine Darstellung dieser Daten wurde verzichtet.

Tab.13: Median zwischen Tag 3 und Tag 14 der Tacrolimus-, MPA- und fMPA-Konzentration bei Patienten mit Infektionen vs. Patienten ohne Infektionen

Median zwischen Tag 3 und Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Infekt	keinInfekt	Infekt	keinInfekt	Infekt	keinInfekt	Infekt	keinInfekt	Infekt	keinInfekt
Tacrolimus µg/l	40	47	6,5	6,8	3,5	4,5	13,0	10,5	6,2 - 7,0	6,2 - 7,3
MPA mg/l	40	47	2,2	2,3	0,5	0,4	12,5	8,1	1,7 - 3,1	1,9 - 3,1
fMPA µg/l	40	47	46,8	41,9	8,3	7,4	286,9	274,9	26,2 - 66,7	34,1 - 54,3

3.3.4 Leukopenien:

3.3.4.1 Expression der Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit Leukopenien

Ein weiteres Zeichen einer Über-Immunsuppression ist die Leukopenie. Als Leukopenie wurden Leukozytenwerte von weniger als 4000 Leukozyten/µl definiert. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2 Monaten entwickelte sich bei 13 Patienten aus dem Patientenkollektiv eine Leukopenie (LP). Vergleicht man die Werte der Oberflächenmarker CD3+/CD26+, CD4+/CD26+ und CD8+/CD26+ und der DPP IV-Aktivität der Gruppe mit Leukopenie (LP) mit den

Werten der Gruppe ohne Leukopenie (keineLP), so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden.

Tab.14.1: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne Leukopenie, Tag 0

Tag 0	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP
CD3+/CD26+ %	68	13	8,4	7,7	0,8	1,0	34,0	12,3	7,1 - 10,2	5,7 - 10,9
CD4+/CD26+ %	68	13	6,5	4,7	0,5	1,0	30,0	10,6	4,8 - 7,4	3,0 - 9,2
CD8+/CD26+ %	68	13	1,8	1,6	0,1	0,1	5,2	3,6	1,5 - 2,5	1,5 - 2,8
DPPIV-Aktivität U/ml	68	13	71,8	80,8	39,1	59,9	125,5	104,4	64,8 - 81,0	63,8 - 91,1

Tab.14.2: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne Leukopenie, Tag 3

Tag 3	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP
CD3+/CD26+ %	73	12	6,8	9,8	1,4	2,0	70,4	18,3	5,8 - 8,2	5,1 - 16,3
CD4+/CD26+ %	73	12	5,4	7,1	0,9	1,3	67,1	15,8	4,2 - 6,8	2,9 - 12,5
CD8+/CD26+ %	73	12	1,2	1,8	0,3	0,3	12,1	4,7	1,0 - 1,7	0,8 - 4,0
DPPIV-Aktivität U/ml	74	13	55,5	53,2	31,2	36,4	87,4	90,3	50,1 - 59,1	41,1 - 68,9

Tab.14.3: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne Leukopenie, Tag 7

Tag 7	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP
CD3+/CD26+ %	74	13	8,3	7,0	0,9	2,6	55,8	62,3	6,0 - 9,7	5,4 - 15,5
CD4+/CD26+ %	74	13	5,9	6,1	0,6	1,4	48,7	50,5	4,8 - 7,9	4,2 - 13,5
CD8+/CD26+ %	74	13	1,5	1,5	0,2	0,4	27,8	9,8	1,0 - 2,0	1,1 - 2,8
DPPIV-Aktivität U/ml	74	13	51,0	59,5	26,0	36,5	100,0	71,9	48,1 - 53,0	40,5 - 65,0

Tab.14.4: Oberflächenmarker und DPP IV-Aktivität bei Patienten mit und ohne Leukopenie, Tag 14

Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP	keineLP	LP
CD3+/CD26+ %	72	13	8,7	11,6	0,3	2,2	54,6	51,2	7,4 - 11,9	4,5 - 20,7
CD4+/CD26+ %	72	13	7,2	10,1	0,4	1,1	46,0	42,5	5,5 - 9,5	5,3 - 21,0
CD8+/CD26+ %	72	13	1,8	1,7	0,0	0,3	28,5	17,9	1,3 - 2,3	1,0 - 4,5
DPPIV-Aktivität U/ml	73	12	45,9	46,9	21,3	32,0	100,6	66,3	43,1 - 49,1	41,5 - 58,9

3.3.4.2 Immunsuppressiva-Konzentration bei Patienten mit Leukopenie

Die Mediane zwischen Tag 3 und Tag 14 unterschieden sich bei Patienten mit Leukopenie (LP) weder bei dem Tacrolimus-Talspiegel, noch der MPA-Konzentration, noch der fMPA-Konzentration signifikant im Vergleich zu Patienten ohne Leukopenie (ohneLP). Auch an den einzelnen Untersuchungstagen zeigten die beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Tacrolimus-Talspiegels, der MPA-Konzentration oder der fMPA-Konzentration. Auf eine Darstellung dieser Daten wurde verzichtet.

Tab.15: Median zwischen Tag 3 und Tag 14 der Tacrolimus-, MPA- und fMPA-Konzentration bei Patienten mit Leukopenie vs. Patienten ohne Leukopenie

Median zwischen Tag 3 und Tag 14	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	LP	ohneLP	LP	ohneLP	LP	ohneLP	LP	ohneLP	LP	ohneLP
Tacrolimus µg/l	13	74	6,1	6,9	3,5	4,5	10,2	13,0	5,5 - 7,3	6,5 - 7,2
MPA mg/l	13	74	2,0	2,3	0,6	0,4	5,3	12,5	0,9 - 3,0	1,9 - 3,0
fMPA µg/l	13	74	41,9	44,1	10,0	7,4	203,8	286,9	16,1 - 86,0	35,5 - 53,8

3.4 Protein sCD26-Konzentration bei Blutspendern und Patienten

Da nicht von allen Blutspendern und Patienten genügend Probenmaterial vorhanden war, um mittels ELISA die Konzentration des im Serum bzw. Plasma gelösten Proteins CD26/DPPIV (sCD26) zu ermitteln, erfolgte die Analyse nur bei einem Teil der Blutspender und Patienten. Diese Subpopulation umfaßte 31

Blutspender und 34 Patienten. Von den 34 Patienten waren 16 Lebendnierentransplantationen und 7 präemptive Transplantationen.

Tab.16: Altersverteilung der Patienten und Blutspender in der Subpopulation

Alter	Probenanzahl	Median	Minimum	Maximum	95% Konfidenzintervall
Blutspender	31	44	23	69	39,6 - 50,4
Patienten	34	47,5	26	72	42,3 - 57,3

Als Untersuchungszeitpunkte wurde bei den Patienten Tag 0 (präTX) und Tag 7 (postTX) gewählt, die Blutspender hatten nur einen Entnahmetag. Bezüglich des Geschlechts fanden sich weder bei den Blutspendern noch bei den Patienten signifikante Unterschiede bei sCD26.

Tab.17: sCD26-Konzentration bei Blutspendern und Patienten vor und nach Transplantation

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Blutspender	16	15	391,5	321,0	259,0	170,0	479,0	525,0	350,2 - 436,7	243,3 - 428,7
Patienten präTX	20	14	506,5	437,5	259,0	281,0	935,0	696,0	369,3 - 583,2	359,3 - 494,6
Patienten postTX	20	14	327,0	248,5	171,0	173,0	693,0	518,0	241,3 - 367,6	216,1 - 383,8

Keine Korrelation zeigte sich zwischen der Plasmakonzentration von sCD26 und dem Alter der Blutspender ($r = -0,070$, $p > 0,05$) und Patienten präTX ($r = 0,272$, $p > 0,05$). Die sCD26-Konzentration bei Patienten postTX korrelieren sehr schwach mit dem Alter ($p < 0,05$, $r = 0,391$). Die Korrelation muß allerdings aufgrund der kleinen Fallzahl kritisch beurteilt werden.

In der Subpopulation wurden folgende Patientengruppen hinsichtlich der sCD26-Konzentration hin untersucht: Patienten mit Vortransplantationen (Vor-TX) vs. ohne Vortransplantationen (1.TX), Lebendnierentransplantation (LSP) vs. Leichennieren-transplantation (Cadaver), Patienten mit präemptiver Transplantation (präemptiv) vs. dialysepflichtige Patienten (nicht-präemptiv), Patienten mit autoimmunen Grunderkrankungen (autoimmun) vs. Patienten ohne autoimmune Grunderkrankungen (nicht-autoimmun), Patienten mit

Posttransplantationsdiabetes (PTD) vs. Patienten ohne Posttransplantationsdiabetes (keinPTD), Patienten mit delayed graft function (DGF) vs. Patienten ohne delayed graft function (nonDGF) und Patienten mit vier oder mehr HLA-Mismatches (≥ 4 HLM-MM) vs. Patienten mit drei oder weniger HLA-Mismatches (≤ 3 HLA-MM). Zwischen keiner der oben genannten Patientengruppen zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der sCD26-Konzentration.

Tab.18: sCD26-Konzentration bei Patienten mit und ohne Vortransplantationen

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX	1. TX	Vor-TX
präTX	29	5	438,0	487,0	259,0	309,0	935,0	596,0	389,2 - 527,9	-
postTX	29	5	250,0	369,0	171,0	250,0	693,0	518,0	229,6 - 352,6	-

Tab.19: sCD26-Konzentration bei Patienten mit Leichennieren- und Lebendnieren transplantation

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP	Cadaver	LSP
präTX	18	16	455,5	459,5	281,0	259,0	935,0	662,0	362,8 - 618,3	359,6 - 546,2
postTX	18	16	334,5	242,0	173,0	171,0	693,0	450,0	250,0 - 377,8	222,5 - 361,0

Tab.20: sCD26-Konzentration bei präemptiv transplantierten Patienten und dialysepflichtigen Patienten

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv	nicht-präemptiv	prä-emptiv
präTX	27	7	422,0	507,0	259,0	360,0	935,0	590,0	360,0 - 524,7	398,1 - 570,2
postTX	27	7	279,0	361,0	171,0	199,0	693,0	426,0	233,9 - 350,9	211,9 - 408,7

Tab.21: sCD26-Konzentration bei Patienten mit autoimmuner und nicht-autoimmuner Grunderkrankung

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	auto-immun	nicht-auto-immun	auto-immun	nicht-auto-immun	auto-immun	nicht-auto-immun	auto-immun	nicht-auto-immun	auto-immun	nicht-auto-immun
präTX	14	20	416,5	477,5	259,0	281,0	662,0	935,0	348,6 - 544,6	415,2 - 589,9
postTX	14	20	237,0	334,5	171,0	173,0	410,0	693,0	216,1 - 361,0	247,5 - 380,8

Tab.22: sCD26-Konzentration bei Patienten mit und ohne Posttransplantationsdiabetes

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	PTD	keinPTD	PTD	keinPTD	PTD	keinPTD	PTD	keinPTD	PTD	keinPTD
präTX	24	9	429,5	506,0	259,0	353,0	935,0	696,0	360,0 - 548,1	366,9 - 617,8
postTX	24	9	264,5	350,0	173,0	171,0	693,0	426,0	233,2 - 363,0	205,7 - 406,3

Tab.23: sCD26-Konzentration bei Patienten mit und ohne delayed graft function

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	DGF	nonDGF	DGF	nonDGF	DGF	nonDGF	DGF	nonDGF	DGF	nonDGF
präTX	8	26	451,0	455,5	281,0	259,0	935,0	696,0	303,7 - 792,3	382,9 - 532,5
postTX	8	26	309,0	281,0	192,0	171,0	693,0	518,0	199,3 - 568,1	232,6 - 361,0

Tab.24: sCD26-Konzentration bei Patienten mit vier oder mehr HLA-Mismatchen vs. Patienten mit drei oder weniger HLA-Mismatchen

sCD26 ng/ml	Probenanzahl		Median		Minimum		Maximum		95% Konfidenzintervall	
	≥4HLA- MM	≤3HLA- MM	≥4HLA- MM	≤3HLA- MM	≥4HLA- MM	≤3HLA- MM	≥4HLA- MM	≤3HLA- MM	≥4HLA- MM	≤3HLA- MM
präTX	15	19	437,0	473,0	259,0	298,0	935,0	759,0	369,5 - 557,4	359,8 - 555,3
postTX	15	19	330,0	279,0	192,0	171,0	450,0	693,0	205,5 - 385,4	241,0 - 352,4

4. Diskussion

4.1. Beantwortung der aufgestellten Fragen

4.1.1 Bestätigt sich der Zusammenhang zwischen der Expression von CD26 auf T-Zellen und einer akuten Abstoßung nach Nierentransplantation, wenn CD26 direkt aus EDTA-Vollblut bestimmt wird, ohne dass vorher eine Zellisolation oder eine Stimulation wie in der Vorgängerstudie stattgefunden haben?

In der Vorgängerstudie von Wieland *et al.* (32) wurden bei 35 Patienten, welche eine Nierentransplantation erhielten, Blutproben entnommen. Nach Isolation der mononukleären Zellen wurden diese 72 Stunden lang in Zellkulturen mit Phytohämagglutinin stimuliert. Bei der anschließenden Messung zeigte sich, dass die T-Zellen bei Patienten, die eine Abstoßung innerhalb von 90 Tagen nach Transplantation entwickelten, im Vergleich zu den Patienten ohne Abstoßung eine deutlich erhöhte CD26-Expression in der ersten Woche nach Transplantation aufwiesen. Dieses Ergebnis ließ hoffen, dass die CD26-Expression auf T-Zellen ein guter Biomarker sein könnte, um ein erhöhtes Abstoßungsrisiko bei transplantierten Patienten frühzeitig zu erkennen. Da sich diese Unterschiede in der CD26-Expression unabhängig davon zeigten, ob vorher eine Stimulation der T-Zellen stattgefunden hatte oder nicht, entstand die Idee, die CD26-Expression auf T-Zellen bei Nierentransplantpatienten direkt aus EDTA-Vollblut zu messen, ohne die zeitaufwendige vorherige Zellisolation und Stimulation. In dieser Folgestudie wurde die Anzahl der Nierentransplantpatienten auf 87 Probanden erhöht und zusätzlich die CD3+ Zellen weiter in CD4+ und CD8+ Zellen differenziert.

Bei Patienten, welche innerhalb des Beobachtungszeitraums von 60 Tage eine Abstoßung erlitten, zeigte sich ebenso wie in der Vorgängerstudie eine höhere Expression von CD26 auf CD3+ Zellen, auch wenn das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht wurde. Am deutlichsten erkennbar war der Unterschied in der Expression von CD26 zwischen den Patienten mit und ohne Abstoßung an

Tag 3. Interessanterweise zeigte sich nach Differenzierung der CD3+ Zellen in CD4+ und CD8+ Zellen, dass sich bei den CD4+/CD26+ Zellen zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Abstoßung ergaben, die zytotoxischen CD8+ Zellen jedoch sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 bei den Patienten mit Abstoßung eine signifikante und deutlich erhöhte CD26-Expression aufwiesen. An Tag 3 zeigten Patienten mit Abstoßung sogar eine mehr als doppelt so hohe Expression von CD26 auf CD8+ Zellen als Patienten, welche keine Abstoßung innerhalb des Beobachtungszeitraums erlitten.

Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die Vorgängerstudie, sie weisen auch darauf hin, dass es lohnenswert sein könnte, die CD26-Expression auf den zytotoxischen CD8+ Zellen als künftigen Biomarker für eine akute Abstoßung in Betracht zu ziehen. Eine niedrige CD26-Expression hat hinsichtlich einer eventuellen Abstoßung einen hohen negativ prädiktiven Wert. Allerdings hat sich gezeigt, dass im Umkehrschluß eine hohe CD26-Expression zu unspezifisch ist, um auf eine zukünftige akute Abstoßung hinweisen zu können. Aufgrund der Möglichkeit, die Expression von CD26 auf T-Zellen mittels Durchflußzytometrie aus EDTA-Vollblut bestimmen zu können, kommt diese Methode auch für die Routine in der Klinik in Betracht, da eine langwierige und zeitaufwendige Zellisolation und Stimulation nicht notwendig ist. Vom Zeitpunkt der Ankunft des EDTA-Vollbluts im Labor bis zum Ergebnis der Untersuchung vergehen etwa zwei Stunden.

CD8+ Zellen wurden bereits mehrfach in der Literatur mit Abstoßungen in Verbindung gebracht (82). Bueno *et al.* (83) beschreiben in ihrer Arbeit dass sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen mit Transplantatabstoßungen assoziiert sind. Eine Publikationen von Schowengerdt *et al.* (84) berichtet anhand von Herztransplantat-Empfängern (n=22) die Korrelation von Abstoßung und CD8+/CD69+ Zellen, wenn CD8+/CD69+ mehr als 15% aller T-Zellen ausmachen.

In früheren Publikationen wurde bereits der Zusammenhang zwischen CD26/DPP IV und Abstoßungen beschrieben. Korom *et al.* zeigten anhand ihrer

Studie (85) mit Ratten, dass CD26/DPP IV eine Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei akuter Abstoßung spielt. In einer weiteren Arbeit von Korom *et al.* (86) konnte nachgewiesen werden, dass bei Ratten eine akute Abstoßung von Herztransplantaten sowohl mit einem Anstieg der DPP IV-Aktivität im Serum als auch mit einer vermehrten Expression von CD26 assoziiert war. Des Weiteren zeigten Korom *et al.* in dieser Studie, dass die Inhibition der DPP IV mit Prodin eine akute Abstoßung verhindern kann und damit zu einem verlängerten Transplantatüberleben führt.

Nicht nur CD26 sondern auch weitere co-stimulatorische Oberflächenmarker wurden in der Literatur im Zusammenhang mit Abstoßungen beschrieben. G. Schlaf *et al.* diskutieren in ihrem Review (87) die Anwendung von sCD30 als prädiktiven Marker vor oder nach Transplantation von soliden Organen und berichten, dass Patienten mit einer hohen Konzentration von sCD30 im Serum ein höheres Risiko für Abstoßungen haben. Höhere sCD30-Konzentrationen vor Nierentransplantation scheinen laut mehreren Studien (88, 89) mit einem erhöhten Risiko für eine akute Abstoßung assoziiert zu sein, wobei es jedoch widersprüchliche Resultate bezüglich der Relevanz von sCD30 als prä-Transplantations-Marker gibt. Pelzl *et al.* zeigten in einer retrospektiven Multicenter-Studie anhand von vor Transplantation entnommenen Serumproben bei 844 Leichennieren-Empfängern (88), dass eine hohe sCD30-Serum-Konzentration mit Transplantat-Abstoßung assoziiert war. Weiterhin fiel auf, dass bei Patienten mit hohen sCD30-Konzentrationen die 2-Jahres-Überlebensrate des Transplantats am schlechtesten war, gefolgt von Patienten mit mittleren sCD30-Konzentrationen. Am besten war die 2-Jahres-Transplantatüberlebensrate bei Patienten mit niedrigen sCD30-Konzentrationen. Süsal *et al.* fanden in ihrer Studie (89) ähnliche Resultate in vor Transplantation entnommenen Sera von 3899 Leichennieren-Empfängern. Weitere Studien (90, 91) weisen jedoch darauf hin, dass eine hohe sCD30-Konzentration nach Transplantation ein Indikator für eine stattfindende akute Abstoßung zu sein scheint.

In einer Publikation von Boleslawski *et al.* (92) konnte gezeigt werden, dass der Oberflächenmarker CD28 auf T-Zellen, wie CD26 in dieser Studie, mit akuter Abstoßung assoziiert ist. CD28 ist wie CD26 ein co-stimulatorisches Molekül, welches auf T-Zellen exprimiert wird. Anhand von 52 Patienten hatten Boleslawski *et al.* (92) nachgewiesen, dass eine vermehrte Expression von CD28 und CD38 auf Lymphozyten an Tag 14 nach Lebertransplantation mit einer akuten Abstoßung innerhalb von 6 Monaten nach Transplantation assoziiert ist.

Es könnte von Vorteil sein, in einer weiteren Studie bei Patienten sowohl die sCD30-Konzentrationen zu bestimmen als auch die CD26-Expression auf CD8+ Zellen, um zu ermitteln, ob die Kombination dieser beiden Marker eine noch genauere Voraussage bezüglich einer zu erwartenden Abstoßung zulässt. Ein weiterer Ansatz wäre die Bestimmung der Expression von CD26 und CD28, wobei hier von Vorteil ist, dass CD26 und CD28 in einem Ansatz parallel gemessen werden können. Ein weiterer Vorteil der Analyse der Expression von Oberflächenmarkern ist, dass das Ergebnis schneller vorliegt als bei einem ELISA-Ansatz, welcher die lösliche Form der Oberflächenmarker messen würde.

4.1.2 Korreliert die Aktivität der DPP IV im Plasma mit der CD26-Expression auf T-Zellen und kann somit DPP IV als Marker für eine akute Abstoßung verwendet werden?

Das Molekül CD26 wird auf T-Zellen exprimiert und als lösliche Form sCD26 ins Plasma abgegeben. Dieses sCD26-Molekül zeigt eine DPP IV-Aktivität, welche kinetisch gemessen werden kann (38).

Böhler T *et al.* untersuchten in ihrer Studie (93) unter anderem auch die Auswirkung der Aufbewahrung von Blutproben bei Raumtemperatur und den Effekt auf die Expression des Oberflächenmarker CD25. Die Antikoagulation

der Blutproben erfolgte mit Li-Heparinat. Die Analyse der CD25-Expression erfolgte zunächst 1-3 Stunden nach der Probennahme, anschließend wurden 24 Blutproben 24 Stunden lang bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die erneute Analyse des Oberflächenmarkers zeigte keine signifikanten Unterschiede in der CD25-Expression im Vergleich zur Analyse des Oberflächenmarkers direkt nach Blutentnahme. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur (n=4) zeigte sich jedoch ein signifikanter Abfall der CD25-Expression.

Auch bei der Validierung der CD26-Methode in unserem Labor konnte die Stabilität der CD26-Expression nur für 72 Stunden nach Blutentnahme demonstriert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu verhindern, dass eine längere Aufbewahrung der Patientenprobe das Ergebnis des zu analysierenden Parameter verfälscht, ist ein stabiler Parameter von Vorteil. Im Gegensatz zu den CD26-exprimierenden Lymphozyten im EDTA-Vollblut würde die DPP IV-Aktivität im Serum einen stabilen Parameter darstellen, was im klinischen Alltag von großer Bedeutung wäre. Für die Klinik ist dieser Zusammenhang sehr interessant, da DPP IV die Aktivität auch nach dem Einfrieren und Auftauen nicht verliert (94), und es somit ein Enzym darstellt, welches auch nach längerer Zeit nach Blutentnahme noch gemessen werden kann. Daher stellte sich für uns die Frage, ob die DPP IV-Aktivität mit der CD26-Expression auf den Lymphozyten korreliert. Hierzu wurde bei den Patienten zusätzlich zur Expression der Oberflächenmarker auf T-Zellen auch die DPP IV-Aktivität im Plasma gemessen.

Korom *et al.* (95) zeigten anhand von Blutproben von 56 Patienten vor Nierentransplantation, dass die CD26-Expression auf Lymphozyten nach Transplantation für 18 Monate abfiel. Auch in unserer Studie zeigten die Patienten auf CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen an Tag 3 nach Transplantation einen starken Abfall der CD26-Expression, jedoch stieg die Expression von CD26 an Tag 7 bereits wieder an, um an Tag 14 wieder annähernd den Ausgangswert zu erreichen.

Diese unterschiedlichen Resultate können mit der unterschiedlich starken Immunsuppression der beiden Studien zusammenhängen. In unserer Studie erhielten die Patienten eine minimierte Calcineurin-Inhibitor-Therapie, es lag somit ein geringerer Tacrolimus-Talspiegel vor als in der Studie von Korom *et al.*

Korom *et al.* (95) beschrieben in ihrer Publikation ebenfalls, dass bei den dort untersuchten Patienten die DPP IV-Aktivität im Serum für mindestens 12 Monate reduziert war. Auch die Ergebnisse unserer Studie ergaben, dass sich im Plasma eine immer geringere Aktivität findet, je länger Immunsuppressiva eingenommen wurden. Die DPP IV-Aktivität nach Transplantation fiel an Tag 3, Tag 7 und Tag 14 immer weiter ab.

Darüber hinaus beobachteten Korom *et al.* (96) 56 Nierentransplantat-Empfänger zwei Jahre lang nach erfolgter Transplantation. Die Expression von CD26 auf mononukleären Zellen im Blut sank nach Transplantation signifikant ab und blieb für bis zu 18 Monate nach Transplantation erniedrigt. Die DPP IV-Aktivität sank ebenfalls nach Transplantation stark ab und blieb für mindestens 12 Monate auf einem niedrigen Niveau, manche Patienten zeigten sogar während der gesamten 24 Monate eine erniedrigte DPP IV-Aktivität im Serum.

Im Gegensatz zu der von Korom *et al.* (86) gefundenen Korrelation zwischen CD26-Expression und DPP IV-Aktivität in der frühen Phase nach Herztransplantation bei Ratten konnte in dieser Studie keine Korrelation zwischen der DPP IV-Aktivität und der CD26-Expression auf den T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch zeigte sich in dieser Studie keine Korrelation zwischen der DPP IV-Aktivität im Plasma und klinischen Events, wie z. B. Abstoßungen. Während man an Tag 3 nach Transplantation bei der CD26-Expression auf den CD8+ Zellen signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Abstoßung fand, zeigte sich hinsichtlich der DPP IV-Aktivität bei den Patienten mit und ohne Abstoßung an Tag 3 keine signifikanten Unterschiede. Die DPP IV-Aktivität scheint also nicht als Marker für eine Abstoßung verwendbar zu sein. Die fehlende Korrelation zwischen der CD26-Expression und der DPP IV-Aktivität im Serum könnte auch an der

verminderten Sekretion von sCD26 während der Einnahme von Immunsuppressiva liegen. Wie bereits in einer früheren Publikation (38) berichtet wurde, fiel sowohl die Konzentration von sCD26 im Serum als auch die DPP IV-Aktivität im Serum an Tag 7 nach Transplantation signifikant ab, wohingegen die CD26-Expression auf den CD3+ Zellen keine signifikanten Unterschiede vor und nach Transplantation aufwies.

Außerdem muß bedacht werden, dass außer T-Lymphozyten noch weitere Organe CD26 exprimieren. In mehreren Publikationen (33 - 36) wird beschrieben, dass unter anderem auch Lunge, Gehirn, Melanozyten, Endothel, Herz und Niere CD26 exprimieren, und damit auch diese Organe sCD26 ins Serum abgeben und somit zur DPP IV-Aktivität im Serum beitragen.

4.1.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen der CD26-Expression auf T-Zellen und der Konzentration von MPA, AcMPAG, fMPA und Tacrolimus, oder ein Zusammenhang zwischen der DPP IV-Aktivität und den Konzentrationen von MPA, AcMPAG, fMPA und Tacrolimus?

Weiterhin wird eine Möglichkeit gesucht, mit der man im klinischen Alltag die Konzentration von MPA, dem pharmakologisch wirksamen Metaboliten AcMPAG sowie von fMPA individuell einstellen kann. Die Immunsuppression hat eine individuelle Auswirkung auf den Organismus, daher ist es allein aufgrund von Konzentrationsmessungen nicht möglich, die optimale individuelle Dosis zu bestimmen.

In mehreren Publikationen (97, 98) konnte gezeigt werden, dass es bei gleicher Dosis-Gabe von MMF hinsichtlich der Exposition von MPA große Unterschiede zwischen einzelnen Patienten gibt. Van Hest *et al.* beschreiben in ihrer Publikation (98) auch große Unterschiede (bis zu 38%) in der MPA-Exposition innerhalb eines Patienten. Die Daten stammten von 468 Nierentransplantatempfänger aus 6 unterschiedlichen Studien, wobei der Zeitpunkt der Probennahme bei den Patienten nach Transplantation stark

variierte, von Tag 1 nach Transplantation bis über 10 Jahre nach Transplantation. Die verabreichte Dosis von MMF lag zwischen 2 x 250 mg/Tag und 2 x 2200 mg/Tag. Innerhalb des ersten Monats nach Transplantation konnten 884 Konzentration-Zeit-Kurven erstellt werden.

In einer weiteren Studie von Mourad *et al.* (99) konnte anhand von 51 Nierentransplantatempfängern gezeigt werden, dass bei der Gabe von 2 x 500mg/Tag MMF es eine Korrelation zwischen Plasmakonzentration von MPA und Toxizität gibt. Hohe Konzentrationen bei c(min), c(30) und c(60) und auch hohe AUC₍₀₋₁₂₎ waren mit einem höheren Risiko für Nebenwirkungen assoziiert.

Weitere Publikationen (100 - 103) berichten bei Herz- und Nierentransplantatempfängern von einer Korrelation zwischen der MPA-Plasma-Konzentration und der Wahrscheinlichkeit eine akute Abstoßung zu erleiden, und dass ein Therapeutic Drug Monitoring (TDM) von MMF das Outcome der Transplantationen verbessern könnte. De Meur *et al.* untersuchten in ihrer Studie (103) bei 137 Nierentransplantatempfängern die Unterschiede zwischen einer festen Dosis-Gabe von 2 g MMF pro Tag und einer durch AUC-Analyse von MPA konzentration-angepaßten MMF-Gabe. Die Zielkonzentration lag bei 40 mg x h/l, die Patienten erhielten zudem CsA als weiteres Immunsuppressivum. Die Patienten, welche in der konzentration-angepaßten Gruppe waren, erreichten im ersten Monat nach Transplantation eine höhere MPA-Exposition und hatten signifikant weniger akute Abstoßungen, bei gleichzeitig nicht erhöhtem Vorkommen von Nebenwirkungen.

Unerwünschte Nebenwirkungen von MPA sind unter anderem gastrointestinale Störungen, Störungen in der Hämatopoese (Leukopenie und Anämie) und opportunistische Infektionen, wobei es kontroverse Studien bezüglich dem Zusammenhang von der MPA-Exposition und dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen gibt (11).

Borrows *et al.* beschrieben in ihrer Studie (104) anhand von 121 Nierentransplantatempfängern, dass ein Anstieg der Plasma-Talspiegel auf 1 mg/l mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Anämie, Leukopenie, Diarrhoe und viralen Infektion assoziiert ist, wobei die Analyse des Talspiegels

30 Tage vor Eintritt des Events gemessen wurde. Patienten mit einem Talspiegel von mehr als 3 mg/l zeigten häufiger unerwünschte Nebenwirkungen als Patienten, dessen Talspiegel unterhalb von 3 mg/l lag.

In einer anderen Studie (105) wurde jedoch berichtet, dass ein TDM von MMF anscheinend keinen Vorteil hat.

Aufgrund seiner geringen therapeutischen Breite ist es notwendig, dass bei der Gabe von Tacrolimus eine engmaschige Kontrolle des Plasmaspiegels erfolgt (106). Ekberg *et al.* zeigten in ihrer Studie (107) anhand von 998 Nierentransplantatempfängern, dass niedrigere Tacrolimus-Plasmaspiegel ($7,2 \pm 2,54$ µg/l) bei gleichzeitig höherer MMF Dosis ($1,5 \pm 0,61$ g/Tag) mit einer signifikant besseren Nierenfunktion assoziiert waren. Jedoch birgt ein niedriger Tacrolimus-Talspiegel auch das Risiko einer Unterimmunsuppression und damit das Auftreten einer akuten Abstoßung.

Tacrolimus hat als Calcineurin-Inhibitor bei Überdosierung die typischen Calcineurin-Inhibitor-Toxizität. Darunter fallen Nephrotoxizität, Diabetes mellitus, Neurotoxizität (Tremor bis hin zu irreversiblen Schädigungen der Hirnsubstanz), Hyperlipidämie und gastrointestinale Beschwerden (106, 108).

Die Notwendigkeit einer engmaschigen Kontrolle des Plasmatalespiegels von Tacrolimus ist bekannt und wird auch im Klinikum Stuttgart durchgeführt.

In einer früheren Studie von Shipkova *et al.* (109) wurde anhand von *in vitro* Zellkulturen der Einfluß von Cyclosporin A, Tacrolimus, Everolimus, Sirolimus und Mycophenolsäure auf die CD26-Expression bei CD3+ Zellen untersucht. Nach Isolation der mononukleären Zellen von gesunden Blutspendern wurden die Zellen bis zu 72 Stunden lang mit dem entsprechenden Immunsuppressivum in unterschiedlichen Immunsuppressiva-Konzentration inkubiert, bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit Phythämagglutinin. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Analyse der CD26-Expression auf CD3+ Zellen mittels FACS. Es zeigte sich bei den mit 1 nM Tacrolimus inkubierten Zellen und den mit 100nM Mycophenolsäure inkubierten Zellen nach 72 Stunden ein signifikanter Abfall der CD26-Expression auf CD3+ Zellen.

Böhler *et al.* untersuchten in ihrer Studie (93) *in vitro* die Expression von CD25 und CD71 auf CD3+ Zellen bei Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Methylprednisolon und Mycophenolsäure. Tacrolimus und MPA zeigten beide eine dosisabhängige Inhibition der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 auf den CD3+ Zellen.

Auch Barten *et al.* konnten in ihrer *in vitro* Studie (110) wiederum zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von den Immunsuppressiva Sirolimus, Tacrolimus, Cyclosporin A und Mycophenolsäure, und der Expression von Oberflächenmarker wie zum Beispiel CD25 gibt. Den stärksten inhibitorischen Effekt auf Lymphozyten scheint gemäß der Studie Sirolimus zu haben, gefolgt von Tacrolimus, Cyclosporin A und Mycophenolsäure.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen *in vitro* Studien konnten die Ergebnisse bezüglich eines Abfalls der Expression von Oberflächenmarker in Abhängigkeit der Immunsuppressivkonzentration in unserer *in vivo* Studie nicht bestätigt werden.

In unserer Studie wurde überprüft, ob die CD26-Expression auf T-Zellen oder die DPP IV-Aktivität in irgendeiner Weise mit den gemessenen Plasmakonzentrationen von Tacrolimus, MPA, AcMPAG und fMPA korreliert. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von CD26 auf T-Zellen oder der DPP IV-Aktivität im Plasma mit den pharmakokinetischen Daten von Tacrolimus, MPA, AcMPAG und fMPA. Hinsichtlich klinischer Zeichen einer Unterimmunsuppression (Abstoßung, Transplantatfunktionsverschlechterung) oder einer Überimmunsuppression (Leukopenie, opportunistische Infektionen) zeigten die pharmakokinetischen Marker ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Dies traf sowohl auf die Konzentration der Immunsuppressiva an den einzelnen Beobachtungstagen zu, als auch auf die Mediankonzentrationen der Immunsuppressiva in den ersten 14 Tagen nach der Transplantation.

Ein signifikanter Unterschied zu den *in vitro* Studien (93, 109) ist die direkte Verwendung von nicht isolierten und nicht stimulierten Zellen aus Vollblut. Während in *in vitro* Studien weitere Störfaktoren wie metabolische Vorgänge und zusätzliche Medikation ausgeschlossen werden, fallen *in vivo* eine Fülle von weiteren Faktoren ins Gewicht, welche sich ebenfalls auf die Expression von CD26 auf T-Zellen auswirken können.

Weitere Aspekt bezüglich der hohen Variabilität der Plasma-Konzentration sowie der individuellen Exposition von Immunsuppressiva sind die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik. Die Bestimmung der Plasma-Konzentration von Immunsuppressiva scheint nicht auszureichen, um für jeden Patienten die jeweils optimale Dosis zu ermitteln. Grund hierfür ist die individuelle Auswirkung, die die Immunsuppressiva auf das Immunsystem des einzelnen Patienten haben. Genetische Faktoren scheinen hier eine maßgebliche Rolle zu spielen.

Xie *et al.* (26) beschrieben in ihrem Review, dass es aufgrund von genetischen Polymorphismen von Enzymen und Transportern zu Unterschieden zwischen einzelnen Patienten im klinische Outcome, der Blutkonzentration sowie der Nebenwirkungen von MMF kommen kann. In einer Publikation von Obmann *et al.* (111) wurden 61 pädiatrische Herztransplantat-Patienten beobachtet, welche entweder Mycophenolmofetil (MMF) oder MMF und Tacrolimus (n = 56) als Immunsuppressiva erhielten. Von diesen 61 Patienten entwickelten 36% gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Diarrhoe, Erbrechen, Übelkeit oder abdominelle Schmerzen, welche dazu führten, dass MMF für mehr als 48h ausgesetzt oder ganz abgesetzt werden mußte. Ebenfalls 36% der Patienten entwickelten eine Knochenmarkstoxizität wie Leukopenie oder Neutropenie, welche ebenfalls zu einem Aussetzen oder Absetzen von MMF führte. MRP2 spielt in der renalen Ausscheidung des aktiven Metaboliten AcMPAG eine wichtige Rolle (28, 112, 113). Obmann *et al.* (111) fanden daraufhin heraus, dass die genetische Variante MRP2-24C/T mit einer größeren gastrointestinalen Intoleranz assoziiert war, was letztendlich bei den Patienten zum Absetzen von MMF führte. Naesens *et al.* (12) und Miura *et al.* (114)

fanden bei Nierentransplantat-Patienten (Naesens: n=95, Miura: n=87), welche Tacrolimus und MMF als Immunsuppressiva erhielten, dass die Variante -24C/T in der MRP2-Promotor-Region mit einer höheren MPA-Exposition im Blut und einer geringeren oralen Clearance assoziiert war, vermutlich durch einen verstärkten enterohepatischen Kreislauf von MPA.

Xie *et al.* beschrieben in ihrer Publikation (26) weiterhin, dass Tacrolimus ein Substrat für das Enzym CYP3A5 und den ABC-Transporter P-gp ist, und somit genetische Varianten der Gene für CYP3A5 und P-gp einen Einfluß auf die Tacrolimus-Verfügbarkeit haben. Thervet *et al.* (28) faßten in ihrem Review mehrere Studien zusammen die zeigten, dass es eine Assoziation zwischen dem Gen CYP3A5*3 und der benötigten Tacrolimus-Dosis bei Empfänger von Nieren-, Leber-, Lunge- oder Herz-Transplantaten gab. Transplantat-Empfänger, welche homozygot für das Allel CYP3A5*3 waren, zeigten höhere Tacrolimus-Talspiegel als homozygote CYP3A5*1 Wildtyp-Träger oder heterozygote Transplantatempfänger.

Wang *et al.* (115) konnten in ihrer Publikation anhand von 91 Lungen-transplantat-Patienten zeigen, dass die ABCB1-Haplotypen, welche den ABC-Transporter P-gp kodieren, mit der Tacrolimus-Dosis/Konzentration assoziiert sind. Dies läßt vermuten, dass der Polymorphismus von P-gp zur individuellen Variation in der Tacrolimus-Disposition beiträgt.

Auch wenn die Unterschiede das Signifikanzniveau knapp nicht erreichten, so zeigten sich bei den Hochrisikopatienten (delayed graft function, vier oder mehr HLA-Mismatches, Vortransplantationen, PRA > 15%, Patienten mit schwarzer Hautfarbe) mit Abstoßung oder Transplantatfunktionsverschlechterung niedrigere Plasmaspiegelkonzentrationen von Tacrolimus und dem MPA-Talspiegel. Ein ähnliches Ergebnis beschrieben van Gelder *et al.* (62). In ihrer Studie wurde bei Nierentransplant-Patienten die MPA-AUC an Tag 3 nach Transplantation auf eine Assoziation mit Abstoßungen innerhalb des ersten Monats hin untersucht. Von den insgesamt 901 Nierentransplantat-Empfängern wurden 549 (61%) in die High-risk-Gruppe eingeteilt. Bei den 549 Hochrisikopatienten erhielten 265 zusätzlich Tacrolimus, 284 bekamen

zusätzlich Ciclosporin A. Betrachtete man die gesamte Patientenpopulation, so hatten Patienten mit einem MPA-AUC von weniger als 30 mg*hr/L eine fast doppelt so hohe Abstoßungsrate innerhalb des ersten Monats (11,4%) wie Patienten mit einem MPA-AUC von mindestens 30 mg*hr/L (6,4%). High-risk-Patienten zeigten bei einem MPA-AUC von weniger als 30mg*hr/L signifikant mehr Abstoßungen (14,3%) als High-risk-Patienten mit einem MPA-AUC von 30mg*hr/L oder mehr (10,4%). Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied bei High-risk-Patienten, welche als zusätzliches Immunsuppressivum Tacrolimus erhielten.

Die Hochrisikopatienten mit Tacrolimus und einem MPA-AUC unter 30mg hr/L (n=67) hatten ein deutlich erhöhtes Abstoßungsrisiko gegenüber Hochrisikopatienten mit Tacrolimus und einem MPA-AUC von 30mg hr/L oder mehr (23,9% vs. 10,4%).

Ein weiterer Punkt in Bezug auf MPA ist, dass oftmals davon ausgegangen wird, dass die Pharmakokinetik von MPA linear ist und man somit mit dem Verdoppeln der MPA-Dosis auch ein Verdoppeln der Serum-Konzentration von MPA und des immunsuppressiven Effekts erreicht. De Winter *et al.* (116) zeigten in ihrer Studie mit 241 Nierentransplant-Patienten (n=140 erhielten zusätzlich Ciclosporin A, n=101 erhielten zusätzlich Tacrolimus), dass MPA keine lineare Pharmakokinetik besitzt. Die Bioverfügbarkeit sank sogar mit dem Anheben der Dosis von MPA.

Alleinige Messungen des Tacrolimus-Spiegels und des MPA-Talspiegels scheinen nicht auszureichen, um Abstoßungen und Nebenwirkungen von Immunsuppressiva verhindern zu können. Gerade bei Hochrisikopatienten sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um die Medikamentenspiegel für diese Gruppe genauer einzustellen. Hochrisikopatienten würden sehr von einer individuellen Immunsuppression profitieren. Hier wäre eventuell eine Studie von Vorteil, bei der eine Kombination von Biomarkern, z. B. die Expression von CD26 und CD28 auf T-Zellen, untersucht wird.

4.2 Weitere Beobachtungen

4.2.1 Präemptiv transplantierte Patienten vs. dialysepflichtige Patienten

In der Publikation von Nakao *et al.* (117) konnte aufgezeigt werden, dass Patienten mit Hämodialyse (n=47) niedrigere sCD26-Plasma-Konzentrationen hatten als die gesunde Kontrollgruppe (n=10). Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Serum-Kreatinin-Konzentration mehr als 2 mg/dl), welche keine Hämodialyse bekamen (n=13), hatten zwar eine niedrigere sCD26-Konzentration im Plasma als die gesunde Kontrollgruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Des Weiteren zeigten Patienten, welche erst seit weniger als einem Jahr Hämodialysen benötigten, niedrigere sCD26-Konzentrationen als Patienten, welche bereits länger (seit 1 bis 10 Jahren) hämodialysepflichtig waren.

Bei einem Teil der Patienten (Subpopulation) konnten in unserer Studie ebenfalls Untersuchungen des sCD26 vorgenommen werden. Von diesen Patienten waren vor der Transplantation 27 dialysepflichtig (Hämodialyse und Peritonealdialyse) gewesen, 7 Transplantationen erfolgten präemptiv. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Nakao *et al.* lagen in unserer Studie sowohl die sCD26-Mediane der dialysepflichtigen als auch die der präemptiv transplantierten Patienten vor Transplantation höher als der sCD26-Median der 31 Blutspender, jedoch ist zu beachten, dass diese Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$) waren. Ebenfalls nicht signifikant, aber dennoch eine erkennbare Tendenz zeigte sich bei den sCD26-Konzentrationen an Tag 0 sowie an Tag 7. Bei den Patienten mit Dialyse lagen die Konzentrationen des sCD26 niedriger als bei den präemptiv transplantierten Patienten, was im Einklang mit der Studie von Nakao *et al.* ist. Die Mehrzahl der Patienten in unserer Studie waren vor Transplantation schon mehrere Jahre lang dialysepflichtig, wobei sowohl Hämodialysen als auch Peritonealdialysen durchgeführt wurden.

Die CD3+ Zellen zeigten an Tag 0 bei den bereits dialysierten Patienten eine geringere CD26-Expression als die CD3+ Zellen der präemptiv transplantierten

Patienten, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Differenziert man die CD3+/CD26+ Zellen jedoch weiter in CD4+ und CD8+ Zellen, so erkennt man einen signifikanten Unterschied zwischen den bereits dialysierten und den präemptiv transplantierten Patienten. Patienten mit Hämodialyse vor Transplantation hatten eine niedrigere CD26-Expression auf CD8+ Zellen als Patienten, welche präemptiv transplantiert wurden. Der Median der CD26+/CD8+ Zellen lag an Tag 0 bei den präemptiv transplantierten Patienten mit 3,6% etwa doppelt so hoch wie der Median der dialysierten Patienten (1,7%).

Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz haben aufgrund ihrer Urämie und der daraus resultierenden Faktoren ein verändertes Immunsystem. Einerseits führt die durch Urämie verursachte Immunstörung zu einer Immunsuppression, welche zu vermehrten Infektionen bei Dialysepatienten führt, andererseits kommt es zu einer Immunaktivierung mit resultierender Inflammation, welche wiederum zu den bekannten kardiovaskulären Erkrankungen dieser Patientengruppe führt (118).

Kato *et al.* beschreiben in ihrem Review (118) die Unterschiede in der angeboren und erworbenen Immunität bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz. Eine durch Urämie hervorgerufene Veränderung in der angeborenen Immunität ist zum Beispiel die Hyperzytokinämie. Einerseits werden aufgrund von urämischen Toxinen, welche aufgrund der gestörten Nierenfunktion nicht ausgeschieden werden können, vermehrt Zytokine (anti-inflammatorische und pro-inflammatorische) gebildet, andererseits können die produzierten Zytokine nicht über die Niere ausgeschieden werden und akkumulieren im Körper des Patienten. Die durch die Urämie erhöhten pro-inflammatorischen Zytokine begünstigen wiederum das Entstehen einer Arteriosklerose und weiteren kardiovaskulären Erkrankungen. Die genauen Mechanismen, wie Zytokine bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz zur Entstehung von Arteriosklerose beitragen, sind jedoch noch nicht endgültig geklärt.

Auch das erworbene Immunsystem ist bei diesen Patienten verändert. Hinweis darauf geben die erhöhte Infektionsrate der Patienten im Endstadium der

Niereninsuffizienz, sowie die häufig vorkommende unzureichende Immunantwort auf diverse Impfungen. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass es im urämischen Milieu zu einer reduzierten T-Zell-Proliferation kommt (119, 120). Die T-Helferzellen spielen eine entscheidende Rolle in der Immunantwort, wobei die Th2-Zellen die humorale Immunantwort fördern. Patienten mit Peritoneal-Dialyse zeigten im Vergleich zu Patienten mit Hämodialyse und gesunden Menschen sowohl bei den Th1-Zellen als auch bei den Th2-Zellen eine verminderte Reifung. Obwohl bei Patienten mit Hämodialyse die Helferzellen keine verzögerte Reifung zeigten, konnten erhöhte Th1-Level bei diesen Patienten gefunden werden, was die Th1/Th2-Ratio vergrößerte (121, 122). Des Weiteren beschreiben Kato *et al.* (118), dass bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz eine reduzierte Expression des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) gefunden wurde, was mit einer reduzierten Produktion von Interleukinen (IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α) auf einen bakteriellen Stimulus assoziiert war. Dies wiederum begünstigt die Entstehung von Harnwegsinfekten, was bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz häufig vorkommt. Da TLR die Expression von den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 reguliert, welche wiederum für die Antigen-Präsentation von dendritischen Zellen und Makrophagen fördern, kommt es aufgrund der reduzierten Expression von TLR bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz zu einer verminderten Antigen-Präsentation.

Auch Hauser *et al.* weisen in ihrer Arbeit (123) auf das durch Urämie und Dialyse veränderte Immunsystem bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hin. Die urämischen Toxine bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sind heterogene Substanzen, wie zum Beispiel organische Verbindungen und Peptide, und haben einen pro-inflammatorischen Effekt. Aufgrund der herabgesetzten Nierenfunktion akkumulieren die Toxine und sind auch mit modernen Dialyseverfahren nur schwer zu eliminieren.

Galli diskutiert in seinem Review (124) die bei Urämie vorkommenden Entzündungsreaktionen und Proteinschädigungen. Die Produkte der Proteinschädigung, welche zum Beispiel durch Hydroxylierung von Proteinen hervorgerufen werden, lagern sich im Blut und in soliden Organen an und

scheinen eine relevante Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen und vaskulären Schädigungen zu sein. Die Akkumulation der Produkte kann zu einer chronischen Aktivierung von inflammatorische und vaskulären Zellkomponenten führen. Galli weist darauf hin, dass eine Transplantation das Problem der Proteinschädigung fast vollständig löst, im Gegensatz dazu aber weiterhin Dialyseverfahren fehlen, die eine Akkumulation der Produkte von Proteinschädigungen verhindern.

4.2.2 AB0-inkompatible vs. AB0-kompatible Transplantationen

Da im Klinikum Stuttgart bereits seit mehreren Jahren erfolgreich AB0-inkompatible Lebendnierentransplantationen durchgeführt werden, wurde diese Patientengruppe in der Studie hinsichtlich unterschiedlicher Ergebnisse zu AB0-kompatibel transplantierten Patienten untersucht. Vor Durchführung der Transplantation erfolgt bei AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen eine Reduktion der AB0-Blutgruppen-inkompatiblen IgG und IgM Antikörper aus dem Blutkreislauf der Patienten, teilweise erfolgt die Reduktion bis unterhalb der Nachweisgrenze der Antikörper. Im Klinikum Stuttgart erfolgt dies durch Immunadsorptionen, beginnend meist eine Woche vor Transplantation, abhängig vom Ausgangstitel und der damit verbunden benötigten Immunadsorptionsanzahl. Aufgrund der unterschiedlichen Vorbereitung auf die Transplantation bei AB0-kompatiblen und AB0-inkompatiblen Transplantationen, wurden die Ergebnisse der Patienten mit AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen (n=6) mit den Ergebnissen der AB0-kompatiblen Transplantationen (Lebendnierentransplantationen und Leichennierentransplantationen) verglichen. An den Tagen 0 und 3 nach Transplantation war die CD26-Expression auf CD8+ Zellen bei den AB0-inkompatibel transplantierten Patienten höher als bei den AB0-kompatibel transplantierten Patienten, allerdings waren die Unterschiede hier nicht signifikant. Es ist zu beobachten, dass bei beiden Gruppen die CD26-Expression auf den CD8+ Zellen von Tag 0 zu Tag 3 zunächst leicht abfällt, dann jedoch wieder ansteigt. Es zeigt sich

bereits an Tag 0 und Tag 3 die Tendenz, dass Patienten mit AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen eine höhere Expression von CD26 auf CD8+ Zellen haben als Patienten mit AB0-kompatible Transplantationen. Diese Tendenz erreicht an Tag 7 schließlich das Signifikanzniveau. An Tag 7 und Tag 14 nach Transplantation wiesen die Patienten mit einer AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantation eine etwa doppelt so hohe CD26-Expression auf CD8+ Zellen auf wie Patienten mit einer AB0-kompatiblen Transplantation. Bemerkenswert ist, dass die CD26-Expression auf den CD8+ Zellen bei den Patienten mit einer AB0i Transplantation an allen Untersuchungstagen über dem Cutoff von 2,2% lagen, im Gegensatz zu den Patienten mit einer AB0-kompatiblen Transplantation, welche an allen Tagen unter dem Cutoff von 2,2% lagen.

Dem entgegengesetzt zeigten Patienten mit einer AB0-inkompatiblen Transplantation an allen Untersuchungstagen signifikant niedrigere DPP IV-Aktivitäten im Plasma als Patienten, welche AB0-kompatible transplantiert wurden. Eine verstärkte Expression mit einer gleichzeitig verminderten Aktivität könnte auf die durch die Blutgruppeninkompatibilität noch zusätzlich verstärkte Stimulation des Immunsystems bei gleichzeitiger starker Immunsuppression zurück zu führen sein. Mit einer Abstoßungsrate von ca. 33% hatten Patienten mit einer AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantation eine höhere Abstoßungsrate als Patienten mit einer AB0-kompatiblen Transplantation (24%), allerdings ist zu bedenken, dass es sich hier um eine sehr geringe Anzahl von AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationen (n=6) handelt. Da nach Transplantation keiner der AB0-inkompatibel transplantierten Patienten innerhalb des Untersuchungs- und Beobachtungszeitraums einen Titeranstieg der AB0-Blutgruppenantikörper erfuhr, waren auch keine Immunsadsorptionen nach Transplantation notwendig. Allerdings muß auch berücksichtigt werden, dass die noch in der Zirkulation des Patienten verbliebenen Blutgruppen-Antikörper sich nach Transplantation auf die transplantierte Niere mit den entsprechenden darauf exprimierten Blutgruppen-Antigenen binden und so eine Immunstimulation auslösen können, ohne dass es im peripheren Blut zu einem Titeranstieg kommt. Vielleicht wäre die Bestimmung von Biomarkern wie CD26

bei AB0-inkompatibel transplantierten Patienten eine weitere Möglichkeit, eine drohende Abstoßung zu detektieren, allerdings wären hierzu weitere Studien mit einem größeren AB0-inkompatibel transplantierten Patientenkollektiv nötig.

4.2.3 Transplantatfunktionsverschlechterung

Die Ursachen für eine Transplantatfunktionsverschlechterung sind vielfältig. Prärenale Ursachen können zum Beispiel eine ungenügende Trinkmenge oder Gefäßstenosen der Transplantatgefäße sein. Als renale Ursachen kommen unter anderem sowohl Infektionen, wie die bei Transplantationspatienten häufig vorkommenden Harnwegsinfekte, als auch eine durch die Nephrotoxizität der Medikamente (zum Beispiel Calcineurin-Inhibitoren) verursachte Nephropathie oder akute Abstoßungen in Betracht. Aufgrund des großen Spektrums der Ursachen, ist es wichtig, die jeweilige Ursache der Transplantatfunktionsverschlechterung zeitnah herauszufinden. Auch durch akute Abstoßungen verursachte Transplantatfunktionsverschlechterungen müssen so früh wie möglich erkannt werden, damit eine medikamentöse Intervention so bald wie möglich beginnen kann um das Transplantat und dessen Funktion zu erhalten. Die histologische Untersuchung einer Nierenbiopsie dauert mitunter mehrere Tage, daher kann mit der Therapie nicht auf das abschließende Ergebnis der Nierenbiopsie gewartet werden. Harnwegsinfekte können ebenso wie ein prärenales Geschehen schnell diagnostiziert werden und die Therapie kann eingeleitet werden. Besteht allerdings der Verdacht auf eine Calcineurin-Inhibitor-Toxizität oder eine Abstoßung, wird die Diagnostik schwieriger. Die Analyse der Serumkonzentration der Immunsuppressiva kann einen Hinweis auf eine eventuell zu hohe Calcineurin-Inhibitor-Konzentration geben, jedoch gilt es zu bedenken, dass es aufgrund von genetischer inter-individueller Variabilität zu starken Schwankungen bei der intrazellulären Tacrolimus-Konzentration kommen kann (28, 115), was wiederum zu einer Schädigung des Transplantats führen kann. Borra *et al.* wiesen in ihrer Publikation (125) darauf hin, dass es einen

Zusammenhang zwischen der hohen Variabilität der Tacrolimus-Clearance bei Nierentransplantat-Patienten (n=297) und dem Langzeit-Transplantat-funktionsverlust gibt.

Die Therapie bei Calcineurin-Inhibitor-bedingter Nierenschädigung unterscheidet sich verständlicherweise von der einer akuten Abstoßung. Während bei einer Calcineurin-Inhibitor-Toxizität diese Immunsuppressiva reduziert werden, erfolgt bei einer akuten Abstoßung die Erhöhung der Immunsuppression durch eine Steroid-Stoß-Therapie über einige Tage, gegebenenfalls zusätzlich eine ATG-Gabe. Da die Untersuchungen dieser Studie zeigten, dass eine akute Abstoßung mit einem Anstieg der CD26-Expression auf CD8+ Zellen einhergeht, wäre es von diagnostischem Vorteil, wenn man durch diese Analyse das Vorliegen einer Abstoßung bei Transplantatfunktionsverschlechterung bestätigen könnte, oder eine prognostische Aussage treffen könnte, welche Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Transplantatfunktionsverschlechterung aufgrund einer Abstoßung haben. Dann könnten eventuell mit therapeutischen Maßnahmen im Vorfeld einige Transplantatfunktionsverschlechterungen verhindert werden.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten, welche eine Transplantatfunktionsverschlechterung innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation entwickelten, eine signifikant höhere CD26-Expression auf CD3+ Zellen und CD4+ Zellen an Tag 14 nach Transplantation aufwiesen, verglichen mit der Expression bei Patienten ohne Transplantatfunktionsverschlechterung. Die CD26-Expression auf CD4+ Zellen stieg von Tag 0 bis Tag 7 bei Patienten mit Transplantatfunktionsverschlechterung an und erreichte an Tag 14 im Vergleich zu Patienten ohne Transplantatfunktionsverschlechterung das Signifikanzniveau. Die CD26+/CD8+ Zellen zeigten an keinem Tag einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Patienten mit Transplantatfunktionsverschlechterung wiesen an Tag 3, 7 und 14 eine niedrigere DPP IV-Aktivität auf, wobei die Unterschiede an Tag 3 nicht signifikant waren.

Die Expression von CD26 auf CD4+ Zellen sowie die DPP IV-Aktivität könnte sich als besserer Parameter für Transplantatfunktionsverschlechterungen sein. Da der Unterschied der CD26+/CD4+ und der DPP IV-Aktivität zwischen Patienten mit und ohne Transplantatfunktionsverschlechterung an Tag 14 am deutlichsten war, sollte dieses Phänomen in einer weiteren Studie zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation untersucht werden.

Unsere Studie zeigte, dass CD26+/CD8+ Zellen mit akuter Abstoßung assoziiert sind, während CD26+/CD4+ Zellen bei Transplantatfunktionsverschlechterung signifikant erhöht waren. Erklären lässt sich dies mit den unterschiedlichen Funktionen dieser Zellen. Bueno *et al.* (83) weisen in ihrer Publikation darauf hin, dass T-Zellen sich durch Expression von CD4 und CD8 auf ihrer Zelloberfläche in zwei Unterformen unterteilen lassen. Im peripheren Blut exprimieren ca. 65% der T-Zellen CD4 und 35% CD8. CD4+ T-Zellen agieren bei mehreren Immunantworten als Helferzellen und binden an MHC II-Moleküle, CD8+ T-Zellen erkennen Antigene, welche von MHC I-Molekülen präsentiert werden, und differenzieren sich zu zytotoxischen Effektorzellen. Die frühere Annahme, dass CD8+ T-Zellen eine homogene CD4-abhängige Population sind, hat sich nicht bestätigt. Es hat sich vielmehr gezeigt, dass CD8+ Zellen auch ohne CD4-vermittelte Hilfe zu einer Immunantwort fähig sind. Nankivell *et al.* erklärten in ihrem Review (18), dass CD4+ T-Zellen inflammatorische Cytokine produzieren. Interferon γ und Interleukin-2 aktivieren die zelluläre Immunantwort, Interleukin-4, -5 und -13 sind für die humorale Immunantwort zuständig. CD8+ T-Zellen verursachen die Zytotoxizität am Erfolgsorgan, wobei sich jedoch die Effektor-Funktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen zu überlappen scheint.

CD4+ Zellen wurden bereits als Marker für Transplantatfunktionsverschlechterung beschrieben und scheinen bei Fibrosierung, wie sie bei der chronischen Transplantatnephropathie vorkommt, ins Geschehen involviert zu sein.

Studer *et al.* (126) beschrieben in ihrer Studie mit 65 Lungentransplantierten, dass eine verminderte Expression von CD28 auf CD4+ Zellen mit dem Bronchiolitis-obliterans-Syndrom und einem schlechteren Transplantationserfolg assoziiert ist. CD4+CD28^{null} scheint außerdem wichtig bei der Entstehung von Transplantatfunktionsverschlechterung zu sein. Muluk *et al.* beschrieben in ihrer Studie (127) mit 42 Nierentransplantatempfängern die Korrelation zwischen CD4+ Zellen und Transplantat-Abstoßung. Hier wurde unter anderem der Pfad der Aktivierung von CD4+ T-Helferzellen durch körpereigene Antigen-präsentierende Zellen untersucht. Das Ergebnis der Studie legt nahe, dass die Unterdrückung dieses Aktivierungspfades eine adäquate Immunsuppression repräsentiert, und dass Patienten, bei denen dieser Aktivierungspfad nicht unterdrückt wurde, ein erhöhtes Risiko sowohl für akute als auch für chronische Abstoßungen haben. Niedermeier *et al.* zeigten in ihrer Studie (128) anhand von Mäusen, dass die Aktivierung von CD4+ Zellen in Gegenwart von Calcineurin-Inhibitoren das Wachstum von Fibrozyten und die Ablagerung von Kollagen I in der Niere fördert. Die Langzeit-Einnahme von Calcineurin-Inhibitoren sowie Abstoßungsepisoden vergrößern das Risiko, eine chronischen Transplantatdysfunktion und Fibrose bei Nierentransplantat-Empfängern entwickeln (128).

Weitere Analysen und Studien sind notwendig, um einen Zusammenhang zwischen CD26 und Transplantatfunktionsverschlechterung zu bestätigen. Korom *et al.* (96) beobachteten in ihrem Studienmodell bei herztransplantierten Ratten einen Anstieg der DPP IV-Aktivität im Serum während einer Transplantatfunktionsverschlechterung, was wir auch in unserer Studie beobachten konnten. In unserer Studie waren die Gründe für eine Transplantatfunktionsverschlechterung sehr vielfältig, was zu einer sehr inhomogenen Patientengruppe führte. Schließt man Patienten, welche nur aufgrund von einer Abstoßung eine Transplantatfunktionsverschlechterung hatten, aus der Gruppe der Patienten mit Transplantatfunktionsverschlechterung aus, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der neu erstellten Gruppe der Patienten mit Transplantatfunktions-

verschlechterung und den Patienten ohne Transplantatfunktionsverschlechterung, weder in der CD26-Expression auf CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen, noch in der DPP IV-Aktivität.

Es wäre für die Klinik interessant zu erfahren, welche Patienten ein höheres Risiko für eine Transplantatfunktionsverschlechterung haben, um dementsprechend diese Patienten bezüglich der Transplantatfunktion engermaschiger zu überwachen oder die Immunsuppression bei diesen Patienten anzupassen.

4.2.4 Vortransplantation vs. Ersttransplantation

In Studie von Andree *et al.* (129) mit 41 Dialysepatienten fiel auf, dass Dialysepatienten, welche früher bereits einer Antigen-Exposition wie zum Beispiel einer Vortransplantation ausgesetzt waren, hohe panel-reaktive T-Zellen (PRT) hatten.

Auch wenn sich in einer Subpopulation des Patientenkollektivs (38) erwies, dass vortransplantierte Patienten an Tag 0 eine niedrigere CD26-Expression auf CD8+ Zellen hatten, so konnte dies nach Auswertung der Ergebnisse des gesamten Patientenkollektivs nicht bestätigt werden. Hinsichtlich der CD26-Expression auf CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede bei Patienten mit und ohne Vortransplantationen. Ebenso unterschieden sich die beiden Patientengruppen nicht in der DPP IV-Aktivität oder in der sCD26-Konzentration, welche in der Zwischenauswertung vorgenommen wurde.

4.2.5 Grunderkrankung

In mehreren Publikationen (39, 130 - 134) wird berichtet, dass CD26/DPP IV bei Patienten mit autoimmunen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht bzw. erniedrigt ist. Dies gab die Motivation zu überprüfen, ob sich diese

Beobachtung auch bei den Patienten in dieser Studie bestätigt. Die Ergebnisse von Tag 0 der Patienten mit der autoimmunen Grunderkrankung Glomerulonephritis wurden mit den Ergebnissen der Patienten verglichen, welche aufgrund einer diabetischen Nephropathie oder von kongenitalen Zystennieren dialysepflichtig wurden. Die Patienten zeigten hinsichtlich der DPP IV-Aktivität keine signifikanten Unterschiede. Gründe für diese abweichende Beobachtung könnten eine zu geringe Patientenzahl (Glomerulonephritis n=28, diab. Nephropathie n=4, Zystennieren n=9) sein, sowie auch die Tatsache, dass bei den transplantationspflichtigen Patienten die Grunderkrankung und damit auch das autoimmune Geschehen bereits sehr weit fortgeschritten ist und damit die akute Phase der Autoimmunerkrankung bereits beendet ist.

4.2.6 LSP vs. Cadaver

Ein großer Unterschied zwischen Lebend- und Leichennierentransplantation besteht in der kalten Ischämiezeit. Eine längere kalte Ischämiezeit, wie sie bei Leichennieren oft nicht zu umgehen ist, beeinflusst den Transplantationserfolg. Nankivell *et al.* weisen in ihrer Publikation (18) darauf hin, dass das Transplantat bereits vor der Transplantation durch den Hirntod des Spenders oder durch die perioperativ auftretende Ischämie des Transplantats mit anschließender Reperfusion Schaden nehmen kann. Durch die Ischämie des Transplantats mit anschließender Reperfusion kommt es zu einer verstärkten Expression von HLA-Antigenen, was zu einer Freisetzung von Chemokinen, Cytokinen und Adhäsionsmolekülen des Transplantats führt. Dies wiederum verstärkt die Immunantwort und die zelluläre Infiltration des Transplantats, mit dem erhöhten Risiko einer Abstoßung (135, 136). Weiterhin beschreiben Nankivell *et al.* (18), dass verglichen mit Transplantaten von Leichennierenspendern, Transplantate von Lebendnierenspendern, welche unter optimalen Bedingungen und unter kürzester kalter Ischämiezeit

entnommen wurden, zu exzellenten Resultaten führten, trotz größerer Unterschiede in den HLA-Antigenen (8).

Auch Joosten *et al.* (6) berichten in ihrer Publikation, dass nicht nur der Hirntod des Spenders zu einer Aktivierung der Entzündungsreaktion führt. Auch eine längere kalte Ischämiezeit bei der Transplantation von Leichen-Organen trägt zu einer verminderten Funktion dieser Transplantate bei, verglichen mit Transplantaten von Lebendnierentransplantaten unter Verwandten.

In dieser Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CD26-Expression sowie in der DPP IV-Aktivität bei Patienten, welche eine Lebendniere spende bekamen, zu den Patienten, die eine Leichennierenspende erhielten. Man könnte daraus schließen, dass die kalte Ischämiezeit die Qualität des Spenderorgans zwar beeinflusst, die Aktivierung der T-Zellen aber gemäß den Ergebnissen unserer Studie nicht über eine CD26-Expression geschieht, und man demnach auch keine Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen in der CD26-Expression oder der DPP IV-Aktivität erkennen kann. Eine weitere Überlegung wäre, dass die Immunsuppression so intensiv ist, dass Unterschiede in der Immunantwort nicht in der CD26-Expression oder der DPP IV-Aktivität zum Ausdruck kommen.

4.2.7 Delayed Graft Function

Die Arbeit von Koo *et al.* (137) beschreibt, dass Hirntod und Ischämie mit anschließender Reperfusion durch Aktivierung der Entzündungskaskade verursacht durch die Hochregulation von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und HLA-DR-Antigenen zu einer schlechteren Transplantatfunktion führen kann. Des Weiteren berichten Boom *et al.* (138) anhand von Leichennierenempfängern (n=734), dass unter anderem eine verlängerte Ischämiezeit von über 28 Stunden zu einem häufigeren Auftreten von verzögerter Transplantatfunktionsaufnahme führt, welche wiederum ein

Risikofaktor für das Entwickeln einer reduzierten Transplantatfunktion innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation ist.

Eine verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats (DGF) scheint den Ergebnissen dieser Studie nach weder mit einer höheren noch mit einer niedrigeren CD26-Expression auf T-Zellen einherzugehen. Die Untersuchungen zeigten bei Patienten mit DGF ähnliche CD26-Expressionen wie bei Patienten ohne DGF. Auch die DPP IV-Aktivität unterschied sich nicht in den beiden Patientengruppen. Außerdem korrelierte die CD26-Expression auch nicht mit der Kreatinin-Konzentration im Serum. Die Ergebnisse sind allerdings plausibel, wenn man bedenkt, dass DGF selten im Rahmen einer Abstoßung erfolgt. Viel häufiger liegt die Ursache einer DGF in einer akuten Tubulusschädigung, welche durch den Schock der Niere aufgrund der Transplantation hervorgerufen wird. Prädisponierende Faktoren für eine akute Tubulusschädigung im Rahmen einer DGF sind unter anderem der Gefäßstatus des Empfängers sowie die Ischämiezeit des Spenderorgans und etwaige Vorerkrankungen des Spenders. Die akute Tubulusschädigung ist häufig reversibel, wobei für das Outcome wichtig ist, dass nicht zusätzlich zur akuten Tubulusnekrose eine akute Abstoßung hinzukommt. Daher wäre auch bei einer DGF die Überwachung der CD26-Expression auf CD8+ Zellen hilfreich, um frühestmöglich eine akute Abstoßung zu erkennen.

4.2.8 High-risk Gruppe

Da einige Patienten aufgrund von unterschiedlichen Voraussetzungen (z.B. ABO-inkompatible Lebendnierentransplantationen, Vortransplantationen, 4 oder mehr HLA-Mismatches, DGF, LCT PRA >15%) ein höheres Risiko besitzen (62, 63), eine akute Abstoßung zu erleiden, wurde in dieser Studie überprüft, ob solche Patienten eine unterschiedliche CD26-Expression oder DPP IV-Aktivität aufwiesen. Anhand der Ergebnisse der Studie zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten der High-risk-Gruppe und

den Patienten, die nicht die Kriterien der High-risk-Gruppe erfüllten. Da bekannt ist, dass Patienten mit den oben genannten Voraussetzungen ein größeres Risiko haben, eine akute Abstoßung zu erleiden, erhalten diese Patienten eine intensivere Immunsuppression wie zum Beispiel Rituximab bei ABO-inkompatiblen Transplantationen, um eine Abstoßung zu verhindern. Jedoch werden Patienten, welche einen LCT PRA < 85%, 4 oder mehr HLA-Mismatche, DGF sowie eine Vortransplantation haben, nicht generell mit einer intensiveren Immunsuppression behandelt. Erst wenn es zu einer Abstoßungsepisode kommen sollte wird die Tacrolimus-Talspiegel auf 8-10 µg/L erhöht. Patienten mit einem sehr hohen Risiko erhalten zudem eine Induktionstherapie mit ATG (Anti-Thymoglobulin), und wurden aufgrund der daraus resultierenden T-Zell-Reduzierung aus unserer Studie ausgeschlossen. Dadurch wäre erklärlich, dass sich die beiden Gruppen auch hinsichtlich der Abstoßungsreaktionen nicht unterschieden. Jedoch waren die Medikamentenspiegel bei Patienten der High-risk-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich gegenüber denen der übrigen Patienten. Jedoch läßt sich eine Tendenz erkennen, dass in der High-risk-Gruppe Patienten mit Abstoßung eine niedrigere MPA- und fMPA-Konzentration aufwiesen als Patienten ohne Abstoßung. Noch deutlicher wird der Unterschied, wenn man Transplantatfunktionsverschlechterungen mit hinzu nimmt. Patienten mit einer Abstoßung und/oder einer Transplantatfunktionsverschlechterung wiesen eine deutlich niedrigere MPA-Konzentration auf, und auch die fMPA- und Tacrolimus-Konzentration war bei diesen Patienten erniedrigt, wenn auch nicht so deutlich wie die MPA-Konzentration.

Eine adäquate Immunsuppression und Vorbereitung scheint ein wichtiger Bestandteil bei der Verhinderung von Abstoßungen bei High-risk-Patienten zu sein, wie unter anderem van Gelder *et al.* in ihrer Publikation (62) bereits berichtet haben.

4.2.9 Überimmunsuppression

In dieser Studie hat sich gezeigt, dass Abstoßungen als Ausdruck einer unzureichenden Immunsuppression mit der CD26-Expression auf CD8+ Zellen assoziiert ist. Auch die typischen Anzeichen einer Über-Immunsuppression (opportunistische Infektionen mit CMV, Herpes- und Papilloma-Viren, sowie Leukopenie) wurden bei einigen Patienten beobachtet, daher wurde untersucht, ob im Gegensatz zu einer Unter-Immunsuppression bei einer Über-Immunsuppression die CD26-Expression auf T-Zellen eventuell reduziert wäre. Patienten mit einer oder mehreren der für Über-Immunsuppression typischen Infektionen zeigten vor Transplantation sowie an Tag 3 und Tag 14 eine geringere CD26-Expression auf CD8+ Zellen, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Patienten, welche innerhalb von 2 Monaten nach Transplantation eine Leukopenie entwickelten, zeigten hinsichtlich der CD26-Expression keinerlei Unterschiede zu Patienten, welche keine Leukopenien entwickelten. Die DPP IV-Aktivität zeigte bei Patienten mit Infektionen oder Leukopenien keine Unterschiede zu den übrigen Patienten. Anscheinend eignet sich CD26 nicht als Marker für eine Über-Immunsuppression in der frühen Phase nach Transplantation. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Patienten in der frühen Phase eine intensive Immunsuppression erhalten. In den ersten Wochen nach Transplantation findet die initiale Immunreaktion zwischen Empfänger und Transplantat statt, daher ist eine adäquate Immunsuppression in der Zeit direkt nach der Transplantation sehr wichtig (62, 105, 139). Die Immunsuppression wird erst in der späteren stabilen Phase individuell reduziert, daher wäre eine Auswertung der CD26-Expression und der DPP IV-Aktivität in der stabilen Phase nach Transplantation eine interessante weiterführende Studie. In der späten Phase nach Lebertransplantation untersuchten Boleslawski *et al.* bei 134 Patienten die Expression von CD28 auf CD8+ Zellen (140). Sie fanden heraus, dass Patienten mit einer höheren Expression von CD28 ($\geq 40\%$) signifikant weniger de novo Malignitäten entwickelten als Patienten mit einer niedrigeren CD28-Expression auf CD8+ Zellen.

4.3 CD26-Expression, sCD26 und DPP IV-Aktivität

Wie in unserer Studie gezeigt werden konnte, und was bereits in früheren Publikationen berichtet wurde, haben gesunde Menschen eine niedrige CD26-Expression auf T-Zellen (38 - 40), im Gegensatz zu Patienten im Endstadium einer Niereninsuffizienz, welche eine höhere CD26-Expression aufweisen (38). Die DPP IV-Aktivität unterschied sich allerdings nicht zwischen gesunden Personen und den Patienten vor Nierentransplantation. Das Immunsystem scheint demnach bei Patienten vor Nierentransplantation stimuliert zu sein, wobei jedoch die enzymatische Aktivität des CD26 nicht, wie zu erwarten wäre, ebenfalls erhöht ist. Die Messung des löslichen sCD26 im Plasma einiger Blutspender (n=31) und einiger Patienten vor Transplantation (n=34) zeigte, dass auch die sCD26-Konzentration bei gesunden Menschen, analog zur CD26-Expression auf den T-Lymphozyten, niedriger ist als bei Patienten im Endstadium der Niereninsuffizienz. Nach Transplantation sank die Konzentration von sCD26 im Plasma ab, sogar unter die sCD26-Konzentration bei gesunden Menschen. Analog zum Absinken der sCD26-Konzentration nach Nierentransplantation sank nach Transplantation auch die DPP IV-Aktivität ab, während die Expression von CD26 auf T-Lymphozyten weiter anstieg. Anscheinend kommt es als Reaktion auf die Transplantation zwar zu einer Stimulation des Immunsystems mit Zunahme der Expression von CD26 auf den T-Zellen, jedoch kommt es nicht parallel zum Anstieg der Expression zu einem Anstieg des Proteins CD26 und damit der DPP IV-Aktivität im Plasma. Des Weiteren wäre es möglich, dass die verstärkte Expression von CD26 auf der Zelle ohne gleichzeitigem sCD26-Anstieg im Plasma ein rein regulatorisches Phänomen darstellt, was im Rahmen der Immunantwort auftritt. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Immunsuppressiva auch die DPP IV-Aktivität des ins Plasma abgegebenen sCD26 hemmen, oder das exprimierte CD26 an den T-Zellen bereits in seiner Funktion gehemmt wird. Dadurch kann das CD26 nicht mehr ins Plasma abgegeben werden und die sCD26-Konzentration sinkt.

Die Korrelation zwischen der Konzentration von sCD26 und der DPP IV-Aktivität bei Blutspendern und Patienten nach Transplantation unterstützt die Theorie, dass die Sekretion des Proteins sCD26 im Blut reguliert wird. Die nicht signifikante Korrelation zwischen sCD26 und der DPP IV-Aktivität vor Transplantation könnte auf die Urämie zurückzuführen sein, welche die Aktivität der DPP IV auf funktioneller Ebene beeinflussen könnte.

Das Zusammenspiel zwischen CD26-Expression, sCD26 und der DPP IV-Aktivität wäre bei der Entwicklung neuer Immunsuppressiva von Interesse. Shipkova *et al.* haben in ihrer Studie (109) gezeigt, dass verschiedene Immunsuppressiva wie Tacrolimus und MPA einen dosis- und zeitabhängigen inhibitorischen Effekt auf die CD26-Expression bei CD3+ Zellen haben.

Bereits frühere Studien (42, 86, 141 - 143) haben gezeigt, dass der Einsatz von CD26-Antikörpern und DPP IV-Inhibitoren eine Aktivierung des Immunsystems verhindern können.

5. Zusammenfassung

Bereits seit längerer Zeit ist bekannt, dass der Oberflächenmarker CD26 bei einer Aktivierung des Immunsystems erhöht ist. Da eine Transplantatabstoßung mit einer Aktivierung des Immunsystems einher geht wurde untersucht, ob CD26 als prädiktiver Marker für eine Abstoßung herangezogen werden kann. Mit dieser Studie konnten die Ergebnisse der Vorgängerstudie bestätigt werden, dass die Expression von CD26 auf T-Zellen mit akuter Abstoßung assoziiert ist. Patienten, welche innerhalb von 2 Monaten nach Nierentransplantation eine akute Abstoßung erlitten, zeigten an Tag 3 und Tag 7 eine höhere CD26-Expression auf CD8+ Zellen als Patienten, welche keine akute Abstoßung erlitten. Der negativ prädiktive Wert der Vorgängerstudie wurde ebenfalls bestätigt, auch ohne vorherige Isolation und Stimulation der Zellen. Die Sensitivität und Spezifität waren bei den direkt aus EDTA-Vollblut gemessenen Analysen zwar schlechter als bei vorheriger Zell-Isolation und Zell-Stimulation, jedoch waren diese Abweichungen zu erwarten, da *in vivo* weitere Störfaktoren hinzukommen, welche die Ergebnisse beeinflussen können.

Die Einteilung in verschiedene Patientengruppen wie präemptiv/dialysiert, AB0i/AB0c, LSP/Cadaver etc. hat interessante Ergebnisse gezeigt, welche mit größeren Patientenkollektiven überprüft werden müssen.

Des Weiteren sollte die CD26-Expression auf T-Zellen in einer späteren Phase nach Transplantation erneut ermittelt werden und mit klinischen Ereignissen in Verbindung gebracht werden. Die Ergebnisse von Tag 14 weisen darauf hin, dass es eine Assoziation zwischen der CD26-Expression und Überimmunsuppression geben könnte. Da die meisten klinischen Ereignisse der Überimmunsuppression erst einige Monate nach Transplantation auftreten, wäre die Analyse der Parameter zu einem späteren Zeitpunkt zu empfehlen. Erst dann kann eine Aussage bezüglich der Assoziation von CD26 und Überimmunsuppression gemacht werden. Ein weiterer Punkt ist, dass Patienten in den ersten drei Monaten nach Transplantation eine sehr starke Immunsuppression erhalten. Erst später wird die Dosierung von Myfortic® individuell angepaßt, und auch der Tacrolimus-Talspiegel wird erst nach 3 Monaten gesenkt. Daher würde man erst in der stabilen Phase nach

Transplantation, welche erst mehrere Monate nach der Transplantation eintritt, durch individuelle Anpassung der Immunsuppressiva bei den Patienten eine Assoziation zwischen CD26 und Überimmunsuppression erkennen können.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 100(2): 297-302; discussion 303-304.
- 2) http://news.bbc.co.uk/olmedia/1945000/images/_1949073_mouse_ear300.jpg
- 3) Kirchner G, Krämer B, Schlitt HJ (2007) Immunsuppression nach Nierentransplantation. Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 14-17
- 4) Eurotransplant International Foundation, Annual Report, 2010.
- 5) Kirchner G, Krämer B, Schlitt HJ (2007) Immunsuppression nach Nierentransplantation. Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 70-74
- 6) Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. (2005) Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 68(1):1-13
- 7) Weitz J, Koch M, Mehrabi A, Schemmer P, Zeier M, Beimler J, Büchler M, Schmidt J. (2006) Living-donor kidney transplantation: risks of the donor--benefits of the recipient. *Clin Transplant.* 20 Suppl 17:13-16.
- 8) Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. (1995) High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 333(6):333-336
- 9) Wieland E, Olbricht CJ, Süsal C, Gurrageha P, Böhler T, Israeli M, Sommerer C, Budde K, Hartmann B, Shipkova M, Oellerich M. (2010) Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit.* 32(5):560-572.
- 10) Kirchner G, Krämer B, Schlitt HJ (2007) Immunsuppression nach Nierentransplantation. Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 51-54
- 11) Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, Tönshoff B, Holt DW, Chapman J, Gelder T (2010) Transplantation Society (TTS) Consensus Group on TDM of MPA. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5(2):341-358.
- 12) Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. (2006) Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 82(8):1074-1084
- 13) Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. (1998) Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet.* 34(6):429-455.
- 14) Neumayer HH, Budde K, Waiser J. (2008) Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin, Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 76-78

- 15) Neumayer HH, Budde K, Waiser J. (2008) Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin, Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 80-81
- 16) Keller C, Geberth S. (2010) Praxis der Nephrologie, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 303-307
- 17) Neumayer HH, Budde K, Waiser J. (2008) Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin, Uni-Med Verlag AG, Bremen, S. 42-55
- 18) Nankivell BJ, Alexander SI. (2010) Rejection of the kidney allograft, *N Engl J Med* 363(15):1451-1462
- 19) Benet LZ. (1999) Relevance of pharmacokinetics in narrow therapeutic index drugs. *Transplant Proc.* 31(3):1642-1644; discussion 1675-1684.
- 20) Lindholm A, Säwe J. (1995) Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Ther Drug Monit.* 17(6):570-573.
- 21) Jones TE. (1997) The use of other drugs to allow a lower dosage of cyclosporin to be used. Therapeutic and pharmacoeconomic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 32(5):357-367.
- 22) Plosker GL, Foster RH. (2000) Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 59(2):323-389.
- 23) Fulton B, Markham A. (1996) Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs.* 51(2):278-298.
- 24) Barraclough KA, Lee KJ, Staats CE. (2010) Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy. *Pharmacogenomics.* 11(3):369-390.
- 25) Zaza G, Granata S, Sallustio F, Grandaliano G, Schena FP. (2010) Pharmacogenomics: a new paradigm to personalize treatments in nephrology patients. *Clin Exp Immunol.* 159(3):268-280.
- 26) Xie HG. (2010) Personalized immunosuppressive therapy in pediatric heart transplantation: Progress, pitfalls and promises. *Pharmacol Ther.* 126(2):146-158.
- 27) Evans WE, McLeod HL. (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 348(6):538-549.
- 28) Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. (2008) Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit.* 30(2):143-150.
- 29) Schmitz G, Endres S, Götte D. (2008) Biomarker- Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. Schattauer-Verlag, Stuttgart, S. 41, Tabelle 3-1
- 30) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 349(24):2326-2333.

- 31) Long E, Wood KJ. (2009) Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation*. 88(9):1050-1056.
- 32) Wieland E, Shipkova M, Martius Y, Hasche G, Klett C, Bolley R, Olbricht CJ. (2011) Association between pharmacodynamic biomarkers and clinical events in the early phase after kidney transplantation: a single-center pilot study. *Ther Drug Monit*. 33(3):341-349.
- 33) Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. (1994) Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics* 40(5):331-338
- 34) Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. (1993) A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med* 177(4):1135-1143
- 35) Stange T, Kettmann U, Holzhausen HJ. (2000) Immunoelectron microscopic demonstration of the membrane proteases aminopeptidase N/CD13 and dipeptidyl peptidase IV/CD26 in normal and neoplastic renal parenchymal tissues and cells. *Eur J Histochem* 44(2):157-164
- 36) Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Prigeon RL, D'Alessio DA. (2003) Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88(4):1772-1779
- 37) Blanco J, Nguyen C, Callebaut C, Jacotot E, Krust B, Mazaleyra JP, Wakselman M, Hovanessian AG. (1998) Dipeptidyl-peptidase IV-beta--further characterization and comparison to dipeptidyl-peptidase IV activity of CD26. *Eur J Biochem*. 256(2):369-378.
- 38) Leicht S, Shipkova M, Klett C, Gert H, Krizan E, Wilhelm J, Bolley R, Ender A, Luz B, Olbricht C, Wieland E. (2011) CD26/Dipeptidyl Peptidase IV: a comparative study of healthy persons and kidney transplant recipients, before and after transplantation. 12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology 2011, Abstract P196
- 39) Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. (2008) Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 13:2299-2310
- 40) Maes M, Scharpé S, De Meester I, Goossens P, Wauters A, Neels H, Verkerk R, De Mayer F, D'Hondt P, Peeters D, Schotte C, Cosyns P. (1994) Components of biological variation in prolyl endopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV activity in plasma of healthy subjects. *Clin Chem* 40(9):1686-1691
- 41) Mattern T, Scholz W, Feller AC, Flad HD, Ulmer AJ. (1991) Expression of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) on resting and activated human T-lymphocytes. *Scand J Immunol*. 33(6):737-748.
- 42) von Bonin A, Hühn J, Fleischer B. (1998) Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol Rev* 161:43-53

- 43) Ibegbu CC, Xu YX, Fillos D, Radziewicz H, Grakoui A, Kourtis AP. (2009) Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology*. 126(3):346-353.
- 44) Morimoto C, Torimoto Y, Levinson G, Rudd CE, Schrieber M, Dang NH, Letvin NL, Schlossman SF. (1989) 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J Immunol*. 143(11):3430-3439.
- 45) Fleischer B. (1987) A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. *J Immunol*. 138(5):1346-1350.
- 46) Dang NH, Torimoto Y, Deusch K, Schlossman SF, Morimoto C. (1990) Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways. *J Immunol*. 144(11):4092-4100.
- 47) Dang NH, Torimoto Y, Schlossman SF, Morimoto C. (1990) Human CD4 helper T cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, 1F7 and VLA integrin family. *J Exp Med*. 172(2):649-652.
- 48) Schön E, Ansorge S. (1990) Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Cytofluorometric evidence for induction of the enzyme on activated T lymphocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 371(8):699-705.
- 49) Flentke GR, Munoz E, Huber BT, Plaut AG, Kettner CA, Bachovchin WW. (1991) Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(4):1556-1559.
- 50) Muñoz E, Blazquez MV, Madueño JA, Rubio G, Peña J. (1992) CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation. *Immunology*. 77(1):43-50.
- 51) Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C. (1993) The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(10):4586-4590.
- 52) Dang NH, Torimoto Y, Shimamura K, Tanaka T, Daley JF, Schlossman SF, Morimoto C. (1991) 1F7 (CD26): a marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation. *J Immunol*. 147(9):2825-2832.
- 53) Torimoto Y, Dang NH, Vivier E, Tanaka T, Schlossman SF, Morimoto C. (1991) Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol*. 147(8):2514-2517.
- 54) Hegen M, Kameoka J, Dong RP, Schlossman SF, Morimoto C. (1997) Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology*. 90(2):257-264.
- 55) Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D. (1999) Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med*. 4(1):3-15.

- 56) Morimoto C, Schlossman SF. (1998) The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev.* 161:55-70.
- 57) Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, Dahlberg HN, Schlossman SF, Morimoto C. (1992) Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol.* 149(2):481-486.
- 58) Ansorge S, Bühling F, Kähne T, Lendeckel U, Reinhold D, Träger M, Wrenger S. (1997) CD26/dipeptidyl peptidase IV in lymphocyte growth regulation. *Adv Exp Med Biol.* 421:127-140.
- 59) De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S. (1999) CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today.* 20(8):367-375.
- 60) Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S. (1998) Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw.* 9(3 Suppl):12-16.
- 61) D'Elis MM, Josien R, Manghetti M, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, Blancho G, Buzelin F, del Prete G, Souillou JP. (1997) Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int.* 51(6):1876-1884.
- 62) van Gelder T, Tedesco Sliva H, de Fijter JW, Budde K, Kuypers D, Arns W, Souillou JP, Kanellis J, Zelvys A, Ekberg H, Holzer H, Rostaing L, Mamelok RD. (2010) Renal transplant patients at high risk of acute rejection benefit from adequate exposure to mycophenolic acid. *Transplantation* 89(15):595-599
- 63) Uchida J, Machida Y, Iwai T, Kuwabara N, Iguchi T, Naganuma T, Kumada N, Kawashima H, Nakatani T. (2011) Clinical outcome of ABO-incompatible living unrelated donor kidney transplantation, *Urol Int.* 86(3):307-314
- 64) Desschans B, Van Gelder F, Van Hees D, de Rocy J, Monbaliu D, Aerts R, Coosemans W, Pirenne J. (2008) Evolution in allocation rules for renal, hepatic, pancreatic and intestinal grafts. *Acta Chir Belg.* 108(1):31-34.
- 65) Mayer G. (2007) Organ allocation systems and management of the renal transplant waiting list. *Prilozi.* 28(1):283-290.
- 66) Claas FH, Doxiadis II. (2009) Management of the highly sensitized patient. *Curr Opin Immunol.* 21(5):569-572.
- 67) Doxiadis II, Claas FH. (2009) Transplantation of highly sensitized patients via the acceptable mismatch program or desensitization? We need both. *Curr Opin Organ Transplant.* 14(4):410-413.
- 68) Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. (2004) The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation.* 78(2):190-193.
- 69) Giessing M, Conrad S, Schönberger B, Huland H, Budde K, Neumayer HH, Loening SA. (2004) Nierenspende und Nierentransplantation im Alter. *Urologe A.* 43(8):947-954.

- 70) Frei U, Noeldeke J, Machold-Fabrizii V, Arbogast H, Margreiter R, Fricke L, Voiculescu A, Kliem V, Ebel H, Albert U, Lopau K, Schnuelle P, Nonnast-Daniel B, Pietruck F, Offermann R, Persijn G, Bernasconi C. (2008) Prospective age-matching in elderly kidney transplant recipients--a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program. *Am J Transplant.* 8(1):50-57.
- 71) Kirste G (2003) Abstoßungsprophylaxe nach Organtransplantation. UniMed-Verlag AG, Bremen, S. 17-19
- 72) Kirchner G, Krämer B, Schlitt HJ (2007) Immunsuppression nach Nierentransplantation. UniMed-Verlag AG, Bremen, S. 77-79
- 73) Shin M, Kim SJ. ABO (2011) Incompatible Kidney Transplantation-Current Status and Uncertainties. *J Transplant.* 2011: 970421.
- 74) Hwang JK, Kim SI, Choi BS, Yang CW, Kim YS, Moon IS, Kim JI. (2011) Short-term results of ABO-incompatible living donor kidney transplantation: comparison with ABO-compatible grafts. *J Korean Surg Soc.* 81(1):10-18.
- 75) Röcker L, Maute I, Altenkirch HU, Sundermann AB et al. (2006) MDRD-Formel. Abschätzung der GFR mit der endogenen Clearance. *Labor-Info* (28), Februar 2006:140
- 76) Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. (2002) Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in whole blood. *Clinical Chemistry* 48(6):955-958
- 77) Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW. (1998) Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide in human plasma using a simple high-performance liquid chromatography procedure. *Clin Chem.* 44;1481-1488
- 78) Hildebrandt M, Rose M, Mayr C, Schüler C, Reutter W, Salama A, Klapp BF. (1999) Alterations in expression and in serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) in patients with hyporectic eating disorders. *Scand J. Immunol.* 50;536-540
- 79) Product Information and Manual. Human sCD26 ELISA. BMS235 and BMS235TEN. Bender MedSystem; 17.08.09
- 80) Keller C, Geberth S. (2010) Praxis der Nephrologie, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 301-303
- 81) Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL, Devarajan P. (2006) Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant.* 6(7):1639-1645.
- 82) Babel N, Reinke P, Volk HD. (2009) Lymphocyte markers and prediction of long-term renal allograft acceptance. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(6):489-494
- 83) Bueno V, Pestana JO. (2002) The role of CD8+ T cells during allograft rejection. *Braz J Med Biol Res* 35(11):1247-1258

- 84) Schowengerdt KO, Fricker FJ, Bahjat KA, Kuntz ST. (2000) Increased expression of the lymphocyte early activation marker CD69 in peripheral blood correlates with histologic evidence of cardiac allograft rejection. *Transplantation* 69(10):2102-2107
- 85) Korom S, De Meester I, Coito AJ, Graser E, Pratschke J, König S, Grimm H, Volk HD, Scharpé S, Kupiec-Weglinski JW. (1999) CD26/DPP IV-mediated modulation of acute rejection. *Transplant Proc* 31(1-2):873
- 86) Korom S, De Meester I, Stadlbauer TH, Chandraker A, Schaub M, Sayegh MH, Belyaev A, Haemers A, Scharpé S, Kupiec-Weglinski JW. (1997) Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in vivo prolongs cardiac allograft survival in rat recipients. *Transplantation* 63(10):1495-1500
- 87) Schlaf G, Altermann WW, Rothhoff A, Seliger B. (2007) Soluble CD30 serum level – an adequate marker for allograft rejection of solid organs? *Histol Histopathol* 22(11):1269-1279
- 88) Pelzl S, Opelz G, Wiesel M, Schnülle P, Schönemann C, Döhler B, Süsal C. (2002) Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome, *Transplantation* 73(1):3-6
- 89) Süsal C, Pelzl S, Döhler B, Opelz G. (2002) Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pretransplant soluble CD30. *J A. Soc Nephrol* 13(6),1650-1656
- 90) Roy R, Dugre FJ, Berube L, Langlois S, Lachance JG. (2002) CD30 and TNF-alpha serum level as indicators of ongoing acute kidney graft rejection. *Hum Immunol* 63:75
- 91) Slavcev A, Lácha J, Honsová E, Lodererová A, Vitko S, Skibová J, Striz I. (2005) Soluble CD30 and HLA antibodies as potential risk factors for kidney transplant rejection. *Transpl Immunol* 14(2):117-121
- 92) Boleslawski E, BenOthman S, Grabar S, Correia L, Podevin P, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. (2008) CD25, CD28 and CD38 expression in peripheral blood lymphocytes as a tool to predict acute rejection after liver transplantation. *Clin Transplant* 22(4):494-501
- 93) Böhler T, Nolting J, Kamar N, Gurragehaa P, Reisener K, Glander P, Neumayer HH, Budde K, Klupp J. (2007) Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Ther Drug Monit* 29(1):77-86
- 94) Scharpé S, De Meester I, Vanhoof G. (1990) Serum dipeptidyl peptidase IV activity in transplant recipients. *Clin Chem* 36:984
- 95) Korom S, De Meester I, Maas E, Stein A, Wilker S, Jung F, Weimer R, Brendel MD, Ernst W, Friemann S, Linder R, Grimm H, Padberg W, Scharpé S, Kupiec-Weglinski JW, Schwemmler K. (2002) CD26 expression and enzymatic activity in recipients of kidney allografts. *Transplant Proc* 34(5):1753-1754
- 96) Korom S, De Meester I, Belyaev A, Schmidbauer G, Schwemmler K. (2003) CD26/DPP IV in experimental and clinical organ transplantation. *Adv Exp Med Biol* 524:133-143

- 97) Shaw LM, Korecka M, Venkataramana R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KL. (2003) Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am J Transplant* 3;534-542
- 98) Van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, et al. (2006) Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: A population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 17;871
- 99) Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, De Meyer M, König J, Schepers R, Squifflet JP, Wallemacq P. (2001) Pharmacokinetic basis for the efficient and safe use of low-dose mycophenolatemofetil in combination with tacrolimus in kidney transplantation. *Clin Chem.* 47(7):1241-1248.
- 100) Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RE, Hené R, Hoitsma A, Squifflet JP, Weimar W, Vanrenterghem Y, Van de Woude FJ, Verpooten GA. (1998) The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 64(6):672-83.
- 101) Van Gelder T. (2005) Mycophenolate mofetil: how to further improve using an already successful drug? *Am J Transplant.* 5(2):199-200.
- 102) Bennett WM. (2003) Immunosuppression with Mycophenolic Acid: One Size Does Not Fit All. *J Am Soc Nephrol.* 14(9):2414-2416
- 103) Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, Etienne I, Westeel PF, Hurault de Ligny B, Rostaing L, Thervet E, Szlag JC, Rérolle JP, Rousseau A, Touchard G, Marquet P. (2007) Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant.* 7(11):2496-2503
- 104) Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Lee J, Tromp JV, Owen J, Cairns T, Griffith M, Hakim N, McLean A, Palmer A, Papalois V, Taube D. (2006) Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant.* 6(1):121-128.
- 105) van Gelder T, Silva HAT, de Fijter JW, Budde K, Kuypers D, Tyden G, Lohmus A, Sommerer C, Hartmann A, Le Meur Y, Oellerich M, Holt DW, Tönshoff B, Keown P, Campbell S, Mamelok RD. (2008) Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation* 86(8):1043-1051
- 106) Kirste G (2003) Abstoßungsprophylaxe nach Organtransplantation. UniMed-Verlag AG, Bremen, S. 74-76
- 107) Ekberg H, van Gelder T, Kaplan B, Bernasconi C. (2011) Relationship of tacrolimus exposure and mycophenolate mofetil dose with renal function after renal transplantation. *Transplantation.* 92(1):82-87.
- 108) Kirchner G, Krämer B, Schlitt HJ (2007) Immunsuppression nach Nierentransplantation. UniMed-Verlag AG, Bremen, S. 53-54

- 109) Shipkova M, Krizan E, Klett C, Leicht S, Wieland E. (2009) Effect of immunosuppressants on CD26/dipeptidyl peptidase IV expression on CD3 in vitro. *Ther Drug Monit* 31:660
- 110) Barten MJ, Dhein S, Chang H, Bittner HB, Tarnok A, Rahmel A, Mohr FW, Gummert JF. (2003) Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood. *J Immunol Methods*. 283(1-2):99-114.
- 111) Obmann E et al., (2009), Impact of Inosine 5-monophosphate dehydrogenase 1,2 and multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms on mycophenolate mofetil related adverse events in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 27, S181
- 112) Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Gröne HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E. (2001) Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br J Pharmacol* 132(5):1027-1034
- 113) Rosso Felipe C, de Sandes TV, Sampaio EL, Park SI, Silva HT Jr, Medina Pestana JO. (2009) Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzymes involved in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 41(5):1441-1455
- 114) Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Suzuki T, Habuchi T. (2007) Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 und ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 63(12):1161-1169
- 115) Wang J, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Zheng H, Iacono A, McDade K, Zaldonis D, Webber S, Watanabe RM, Burchart GJ. (2006) Impact of ABCB1 (MDR1) haplotypes on tacrolimus dosing in adult lung transplant patients who are CYP3A5*3/*3 non-expressors. *Transpl Immunol* 15(3):235-240
- 116) De Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, Vulto AG, van Gelder T. (2011) Nonlinear relationship between mycophenolate mofetil dose and mycophenolic acid exposure: implications for therapeutic drug monitoring. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(3):656-663
- 117) Nakao K, Nagake Y, Okamoto A, Ichikawa H, Yamamura M, Makino H. (2002) Serum levels of soluble CD26 and CD30 in patients with hemodialysis. *Nephron* 91(2):215-221
- 118) Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. (2008) Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 3(5):1526-1533.
- 119) Meuer SC, Hauer M, Kurz P, Meyer zum Büschenfelde KH, Köhler H. (1987) Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses. *J Clin Invest*. 80(3):743-749.
- 120) Stachowski J, Pollok M, Burrichter H, Spithaler C, Baldamus CA. (1993) Signalling via the TCR/CD3 antigen receptor complex in uremia is limited by the receptors number. *Nephron*. 64(3):369-375.

- 121) Ando M, Shibuya A, Yasuda M, Azuma N, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K. (2005) Impairment of innate cellular response to in vitro stimuli in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 20(11):2497-2503.
- 122) Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Köhler H, Girndt M. (2000) T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 15(8):1217-1223.
- 123) Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Buchares S, Aita C, Yuzawa Y, Pecoits-Filho R. (2008) Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int*. 28 Suppl 3:183-187.
- 124) Galli F. (2007) Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 22 Suppl 5:v20-36.
- 125) Borra LC, Roodnat JI, Kal JA, Mathot RA, Weimar W, van Gelder T. (2010) High within-patient variability in the clearance of tacrolimus is a risk factor for poor long-term outcome after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 25(8):2757-2763
- 126) Studer SM, George MP, Zhu X, Song Y, Valentine VG, Stoner MW, Sethi J, Steele C, Duncan SR. (2008) CD28 down-regulation on CD4 T cells is a marker for graft dysfunction in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 178(7):765-773
- 127) Muluk SC, Clerici M, Via CS, Weir MR, Kimmel PL, Shearer GM. (1991) Correlation of in vitro CD4+ T helper cell function with clinical graft status in immunosuppressed kidney transplant recipients. *Transplantation* 52(2):284-291
- 128) Niedermeier M, Reich B, Rodriguez Gomez M, Denzel A, Schmidbauer K, Göbel N, Talke Y, Schweda F, Mack M. (2009) CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24):17892-17897
- 129) Andree H, Nickel P, Nasiadko C, Hammer MH, Schönemann C, Pruss A, Volk HD, Reinke P. (2006) Identification of dialysis patients with panel-reactive memory T cells before kidney transplantation using allogeneic cell bank, *J Am Soc Nephrol* 17(2):573-580
- 130) Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. (2011) Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. *Adv Clin Chem* 53:51-84
- 131) Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Steinbrecher A, Brocke S, Kähne T, Wrenger S, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S. (2000) Dipeptidyl peptidase IV (CD26): role in T cell activation and autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 477:155-160
- 132) Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S, Brocke S. (2000) Dipeptidyl peptidase IV in inflammatory CNS disease. *Adv Exp Med Biol* 477:145-153
- 133) Varljen J, Mijandrusić-Sincić B, Baticic L, Varljen N, Detel D, Lekic A. (2005) Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *CCACCA* 78(3):427-432

- 134) Busso N, Wagtmann N, Herling C, Chobaz-Péclat V, Bischof-Delaloye A, So A, Grouzmann E. (2005) Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Path* 166;433-442
- 135) Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. (1998) Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 10(5):525-531
- 136) Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG. (2008) Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. *Transplantation* 86(7):889-894
- 137) Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. (1999) Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int* 56(4);1551-1559
- 138) Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. (2000) Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int* 58(2):859-866
- 139) Kiberd BA, Lawen J, Fraser AD, Keough-Ryan T, Belitsky P. (2004) Early adequate mycophenolic acid exposure is associated with less rejection in kidney transplantation. *Am J Transplant* 4(7):1079-1083
- 140) Boleslawski E, Othman SB, Aoudjehane L, Chouzenoux S, Scatton O, Soubrane O, Calmus Y, Delhem N, Conti F. (2011) CD28 expression by peripheral blood lymphocytes as a potential predictor of the development of de novo malignancies in long-term survivors after liver transplantation. *Liver Transpl* 17(3): 299-305
- 141) Jung FJ, Yang L, De Meester I, Augustyns K, Cardell M, Hillinger S, Vogt P, Lardinois D, Scharpé S, Weder W, Korom S. (2006) CD26/dipeptidylpeptidase IV-targeted therapy of acute lung rejection in rats. *J Heart Lung Transplant* 25(9):1109-1116
- 142) Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S, Brocke S. (2001) Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol* 166(3):2041-2048
- 143) Tanaka S, Murakami T, Horikawa H, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. (1997) Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Immunopharmacol* 19(1):15-24

7. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Wieland für die Überlassung des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung. Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. Olbricht und Frau Dr. Luz, die es mir ermöglichten, sowohl Nierentransplantat-Patienten als auch Blutspender für die Studie zu rekrutieren.

Ganz herzlichen Dank für die hervorragende Betreuung meiner Studien auch an Frau Dr. Shipkova, die mir mit ihrem Wissen und ihrer Fähigkeit, mich zu begeistern, stets äußerst hilfreich zur Seite stand.

Auch an Frau Dr. Ender, Herrn Kalus und Frau Schreiber ein herzliches Dankeschön für ihre freundliche Unterstützung und organisatorische Hilfestellung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Transplantationszentrums, des Zentralinstituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und des Zentralinstituts für Transfusionsmedizin und Blutspendedienst für ihre freundliche Unterstützung und hilfsbereite Zusammenarbeit.