
Aus dem Institut für klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Therapeutisches Drug Monitoring von
Immunsuppressiva: Vergleich
intrazellulärer Konzentrationsmessungen
mit Messungen in Vollblut**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Zahnheilkunde
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marie-Luise Bräuer

aus

Oberviechtach

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. J. Brockmüller
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. M. Oellerich
Drittreferent/in:	Prof. Dr. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 12. November 2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Therapeutisches Drug Monitoring: Vergleich intrazellulärer Konzentrationsmessungen mit Messungen in Vollblut." eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Organtransplantation in der Medizin	1
1.1.1 Spezielle Aspekte der Lebertransplantation	3
1.2 Immunsuppression im Rahmen von Organtransplantationen.....	4
1.2.1 Ciclosporin	6
1.2.2 Tacrolimus	8
1.2.3 Everolimus.....	12
1.3 Individualisierte Therapie und Therapeutisches Drug Monitoring.....	14
1.3.1 Ciclosporin	18
1.3.2 Tacrolimus.....	19
1.3.3 Everolimus.....	20
1.4 Intrazelluläres Therapeutisches Drug Monitoring.....	20
1.5 Aufgabenstellung.....	22
2 Untersuchte Patienten, Material und Methoden.....	23
2.1 Klinische Beobachtungsstudie.....	23
2.2 Übersicht über die wesentlichen analytischen Verfahren	27
2.2.1 Messung in Vollblut.....	28
2.2.2 Messung in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes	30
2.3 Statistische Auswertung.....	31
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Untersuchte Patienten	34
3.2 Konzentrations-Messwerte	36
3.2.1 Ciclosporin	37
3.2.2 Tacrolimus	38
3.2.3 Everolimus.....	40
3.3 Beziehung zu Dosierungen.....	42
3.3.1 Ciclosporin	42
3.3.2 Tacrolimus	45
3.3.3 Everolimus.....	48
3.4 Therapeutische Bereiche	51
3.4.1 Ciclosporin	51

3.4.2	Tacrolimus	52
3.4.3	Everolimus.....	53
3.5	Beziehung zu Rejektionen und Infektionen.....	54
3.5.1	Zahl der Rejektionen.....	54
3.5.2	Zahl der Infektionen.....	59
4	Diskussion.....	64
4.1	Ciclosporin	67
4.2	Tacrolimus	71
4.3	Everolimus.....	74
4.4	Variabilität.....	75
4.5	Limitationen: was hätte besser gemacht werden können?.....	76
4.6	Alternative Biomarker für die individuell optimierte Dosiseinstellung	76
4.7	Perspektiven für die Zukunft	78
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literaturverzeichnis	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines HPLC-MS-Gerätes.	28
Abb. 2: Probenvorbereitung für die Messung in Vollblut.	28
Abb. 3: Ablauf der Probenvorbereitung und HPLC-Trennung.	29
Abb. 4: Aufbau des Tandem-Massenspektrometers.	29
Abb. 5: Isolierung der PBMCs aus den Blutproben nach der Ficoll-Methode.	30
Abb. 6: Probenvorbereitung zur intrazellulären Immunsuppressiva-Konzentrationsmessung.	31
Abb. 7: Aufbau eines Boxplots.	33
Abb. 8: Altersverteilung der Patienten im Histogramm.	35
Abb. 9: Häufigkeitsverteilung des Körpergewichts der Transplantatpatienten.	35
Abb. 10: Ursachenverteilung für eine Lebertransplantation.	36
Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der CSA-Konzentrationen in Vollblut.	37
Abb. 12: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären CSA-Konzentrationen.	37
Abb. 13: Korrelation zwischen CSA-Konzentrationen in VB und PBMCs.	38
Abb. 14: Häufigkeitsverteilung der Tac-Konzentrationen in Vollblut.	39
Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären Tac-Konzentrationen.	39
Abb. 16: Korrelation zwischen Tac-Konzentrationen in VB und PBMCs.	39
Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der Eve-Konzentrationen in Vollblut.	40
Abb. 18: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären Eve-Konzentrationen.	40
Abb. 19: Korrelation zwischen Eve-Konzentration in VB und PBMCs.	41
Abb. 20 und 21: Häufigkeitsverteilung der dosisnormierten CSA-Konzentrationen.	42
Abb. 22 und 23: Korrelation zwischen Vortragsdosis und cCSA sowie icCSA.	43
Abb. 24 und 25: Zeitverlauf der dosisnormierten CSA-Konzentrationen.	44
Abb. 26: Zeitverlauf und Blutspiegel der CSA-Medikation am Beispiel eines Patienten.	45
Abb. 27 und 28: Häufigkeitsverteilung der dosisnormierten Tac-Konzentrationen.	45
Abb. 29 und 30: Korrelationen zwischen Vortragsdosis und cTac sowie iTac.	46
Abb. 31 und 32: Dosisnormierte Tac-Konzentrationen im Zeitverlauf.	47
Abb. 33: Zeitverlauf und Blutspiegel der Tac-Medikation am Beispiel eines Patienten.	48
Abb. 34 und 35: Häufigkeiten der dosisnormierten Eve-Konzentrationen.	48
Abb. 36 und 37: Korrelationen zwischen Vortragsdosis und cEve sowie icEve.	49
Abb. 38 und 39: Dosisnormierte Eve-Konzentrationen im Zeitverlauf.	50
Abb. 40: Übersicht über die tägliche Eve-Dosis, cEve und icEve.	51
Abb. 41: Korrelation von cCSA und icCSA mit Markierung des therapeutischen Bereiches.	52
Abb. 42: Regressionsdiagramm der cTac zur iTac mit therapeutischer Breite.	53
Abb. 43: Regressionsdiagramm der cEve zur icEve mit therapeutischer Breite.	53
Abb. 44: CSA-Konzentration in VB vor Rejektion.	56
Abb. 45: Boxplot zur CSA-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.	56
Abb. 46: Tac-Konzentration in VB vor Rejektion.	57
Abb. 47: Tac-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.	57
Abb. 48: Tac-Konzentration in VB vor Rejektion.	58
Abb. 49: Tac-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.	58
Abb. 50: Eve-Konzentration in VB vor Rejektion.	59
Abb. 51: Eve-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.	59
Abb. 52: CSA-Konzentration in VB vor Infektion.	61
Abb. 53: CSA-Konzentration in PBMCs vor Infektion.	61

Abb. 54: Tac-Konzentration in VB vor Infektion.	62
Abb. 55: Tac-Konzentration in PBMCs vor Infektion.	62
Abb. 56: Tac-Konzentration in VB vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.....	62
Abb. 57: Tac-Konzentration in PBMCs vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.....	63
Abb. 58: Eve-Konzentration in VB vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.	63
Abb. 59: Eve-Konzentration in PBMCs vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.....	63
Abb. 63: Stufen des therapeutischen Drug Monitoring.	77

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zahl der postmortalen Organspender in Deutschland.	2
Tab. 2: Mögliche Ursachen einer Leberzirrhose.....	3
Tab. 3: Typen immunsuppressiver Medikamente bei Organtransplantation.....	6
Tab. 4: CSA-Dosierungsempfehlung.....	7
Tab. 5: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Ciclosporin.....	8
Tab. 6: Tac-Dosierungsempfehlung.	9
Tab. 7: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Tacrolimus.	11
Tab. 8: Eve-Dosierungsempfehlung.....	13
Tab. 9: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Everolimus.....	14
Tab. 10: Wichtige Einflussfaktoren bei der Dosisbestimmung.....	16
Tab. 11: Beispiele für Arzneimittel, für welche ein TDM angewendet wird.	17
Tab. 12: Therapeutischer Bereich und Zielspiegel in VB für CSA.....	19
Tab. 13: Therapeutischer Bereich und Zielspiegel von Tac in VB.....	20
Tab. 14: Übersicht zum Visitenplan und den jeweiligen erhobenen Parametern.	26
Tab. 15: Übersicht über die verwendeten Verfahren.....	32
Tab. 16: Gesamtzahl der Transplantatempfänger mit Unterscheidung des transplantierten Organs und Geschlechterverteilung.	34
Tab. 17: Altersverteilung der Patienten.....	35
Tab. 18: Deskriptive Statistik der CSA-Konzentrationen in Vollblut und in den PBMCs.	38
Tab. 19: Deskriptive Statistik der Tac-Konzentrationen in Vollblut und intrazellulär.	40
Tab. 20: Deskriptive Statistik der Tacrolimus-Konzentrationen in Vollblut und intrazellulär.....	41
Tab. 21: Statistische Gesamtschau zu den dosisnormierten CSA-Konzentrationen.....	43
Tab. 22: Dosisnormierte CSA-Konzentrationen im Zeitverlauf.	44
Tab. 23: Statistische Gesamtschau zu den dosisnormierten Tac-Konzentrationen.	46
Tab. 24: Dosisnormierte Tac-Konzentrationen im Zeitverlauf.....	47
Tab. 25: Statistische Gesamtschau der dosisnormierten Eve-Konzentrationen.	49
Tab. 26: Darstellung der dosisnormierten Eve-Konzentrationen im Zeitverlauf.....	50
Tab. 27: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Ciclosporin-Spiegel.	52
Tab. 28: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Tacrolimus-Spiegel.....	52
Tab. 29: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Everolimus-Spiegel.	53
Tab. 30: Übersicht über beobachtete Rejektionen mit Fallzahlen.....	54
Tab. 31: Zahl der Rejektionen mit aussagekräftigen Immunsuppressiva-Spiegeln.....	55
Tab. 32: CSA-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe.	55
Tab. 33: Tac-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe.....	57
Tab. 34: Eve-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe.....	58
Tab. 35: Übersicht über beobachtete Infektionen mit Fallzahlen.	60
Tab. 36: CSA-Konzentrationen vor Infektion und in der Gesamtgruppe.....	60
Tab. 37: Tac-Konzentrationen vor Infektion und in der Gesamtgruppe.....	61
Tab. 38: Therapeutische Zielbereiche intrazellulär für CSA, Tac und Eve.....	64
Tab. 39: Vergleich der Mittelwerte vor Rejektion bzw. Infektion und in der Gesamtgruppe.	65
Tab. 40: Mittelwertvergleiche der Konzentrationen vor Rejektion bzw. Infektion.....	66
Tab. 41: Übersicht zu aktuellen Publikationen zum icTDM für CSA nach Organtransplantation.	67
Tab. 42: Studienergebnisse: CSA-Werte bei Patienten mit und ohne Rejektion.....	68
Tab. 43: Korrelation zwischen CSA-Konzentration und Dosis.	69

Tab. 44: Ciclosporin-Konzentrationen bei Patienten mit und ohne Rejektion.....	69
Tab. 45: Korrelation zwischen intra- und extrazellulärer Ciclosporin-Konzentration.....	70
Tab. 46: Übersicht über aktuelle Publikationen zum icTDM für Tac nach Organtransplantation.	71
Tab. 47: Tacrolimus-Konzentrationen vor Rejektion und ohne Rejektion.	72
Tab. 48: Tacrolimus-Konzentrationen im Zeitverlauf nach Han et al. 2016.....	73
Tab. 49: Übersicht über aktuelle Publikationen zum icTDM für Everolimus nach Organtransplantation.	74
Tab. 50: Korrelation zwischen intra- und extrazellulären Everolimus-Konzentrationen.....	74
Tab. 51: Korrelationen der intrazellulären Konzentrationen zu denen in Vollblut:.....	75
Tab. 52: Veränderung der intrazellulären Immunsuppressiva-Spiegel vor Rejektion.	76
Tab. 53: Übersicht über Biomarker nach Organtransplantation.	77

Abkürzungsverzeichnis

cCSA	Ciclosporin-Konzentration in Vollblut
cEve	Everolimus-Konzentration in Vollblut
CSA	Ciclosporin
cTac	Tacrolimus-Konzentration in Vollblut
CYP3A4	Code für das CYP3A4-Gen
Eve	Everolimus
f.	folgende
FK506	Tacrolimus
FKBP12	FK506-bindendes Protein 12
G1-	Gap1-
<i>GVHD</i>	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
IATDMCT	International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology
iATP	Intrazelluläres ATP
icCSA	Intrazelluläre Ciclosporin-Konzentration
icEve	Intrazelluläre Everolimus-Konzentration
icTac	Intrazelluläre Tacrolimus-Konzentration
<i>iTDM</i>	<i>Intracellular Therapeutic Drug Monitoring</i>
IL-2	Interleukin 2
IQR	interquartile range
KI	Konfidenzintervall
<i>LC-MS/MS</i>	<i>Light Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
Max.	Maximum
MD	Median
MDR1	Code für das MDR1-Gen
<i>MHC</i>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min.	Minimum
MW	Mittelwert
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
N	Anzahl
OP	Operation

<i>PBMCs</i>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PD	Pharmakodynamik
<i>pLTx</i>	<i>Post transplantationem</i> einer Lebertransplantation
PK	Pharmakokinetik
Q1	Erste Quartile
Q2	Zweite Quartile
S-	Synthese-
SD	Standardabweichung
Tac	Tacrolimus
<i>TDM</i>	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
VB	Vollblut

1 Einleitung

In dieser Arbeit geht es um die Optimierung des so genannten Therapeutischen *Drug Monitoring* (TDM) im Bereich der Transplantationsmedizin. Unter TDM versteht man die Messung der Blutkonzentrationen der Medikamente unter Therapie mit dem Ziel, für den individuellen Patienten die optimale Dosis zu finden. Die Einleitung führt zunächst in die Organtransplantation und die danach erforderliche Immunsuppression ein, sodann in die Möglichkeiten der individuellen Therapieoptimierung. Dort geht es speziell auch um das Drug Monitoring und wie es eingesetzt werden kann, um die Therapie zu verbessern. Aus diesem Bereich ergibt sich die Aufgabenstellung. Speziell galt es hier zu klären, ob Messungen der Immunsuppressiva in Leukozyten besser sind als die Messung im Gesamtblut.

1.1 Organtransplantation in der Medizin

In diesem Abschnitt werde ich auf die Indikation und Historie der Organtransplantation eingehen.

Die Organtransplantation ist ein modernes therapeutisches Verfahren, das nur dann in Betracht kommt, wenn die Funktion lebenswichtiger Organe in keiner anderen Weise aufrechterhalten werden kann. Grundsätzlich unterscheidet man hier zwischen der Knochenmarktransplantation und der Transplantation solider Organe. Zunächst gehe ich auf die Knochenmarktransplantation ein. Im Anschluss gebe ich eine Übersicht über die historischen Anfänge der Organtransplantationen beim Menschen für die Organe Niere, Leber und Herz. Abschließend werde ich auf die wesentlichen Komplikationen in Bezug auf die Immunreaktion bei diesen beiden Transplantationsformen eingehen.

Die Stammzelltransplantation kommt für Patienten dann in Frage, wenn sie an einer schweren Erkrankung des Blutes leiden oder wenn beispielsweise nach einer Chemotherapie das blutbildende System schwer geschädigt ist (Dempke 2006). Dabei wird dem Spender entweder Knochenmark direkt aus dem Beckenkamm entnommen oder zuvor mit Wachstumsfaktoren mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut abgenommen. Aus dem Blut-Stammzell-Gemisch werden die Stammzellen isoliert. Der Empfänger wird konditioniert und erhält die neuen Stammzellen intravenös. Eine der häufigsten Ursachen für ein Misslingen der allogenen Stammzelltransplantation ist die sog. Graft-versus-Host-Disease, kurz GVHD. Die neuen Stammzellen des Empfängers bauen somit ein fremdes Immunsystem auf, welches dann, vergleichbar mit einer Autoimmunerkrankung, Immunreaktionen gegen den Körper des Empfängers auslöst (Wolff et al. 2011).

Die weltweit erste erfolgreiche Organtransplantation bei Menschen wurde an der Niere 1954 von Dr. Joseph Edward Murray in Boston durchgeführt (Leeson und Desai 2015). Da es

sich bei dem Organspender um den eineiigen Zwilling des Empfängers handelte, blieb eine Abstoßungsreaktion aus.

Die ersten drei Lebertransplantationen gelangen Thomas Earl Starzl 1963 in Denver, wobei der zweite Transplantatempfänger mit 22 Tagen relativ lang überlebte (Starzl et al. 1963).

Die erste Herztransplantation beim Menschen wurde schließlich im Jahr 1967 durchgeführt (Hibbeler 2007). Der Patient überlebte allerdings nur 18 Tage und verstarb an den Folgen einer Abstoßungsreaktion (Tonsho et al. 2014).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten nach Organtransplantation war zur Zeit der ersten Organtransplantationen relativ gering. In den 1970er Jahren lag die Überlebensrate der Empfänger bei lediglich 30% in den ersten 12 Monaten nach Transplantation (Tonsho et al. 2014). Das größte Problem stellt nach wie vor die Abstoßungsreaktion dar, die sog. Rejektion. Dabei kommt es zu Abwehrreaktionen des Immunsystems des Organempfängers gegen das fremde Organ. Es kommt zu Schäden am Spenderorgan und die Überlebenswahrscheinlichkeit des Empfängers sinkt erheblich.

Mit der stetigen Verbesserung der Nachsorgebehandlung gewann die Transplantationsmedizin in den vergangenen Jahrzehnten an Routine. Die Überlebenswahrscheinlichkeit im ersten Jahr nach der Transplantation konnte bis in die 2000er Jahre auf knapp 90% gesteigert werden (Tonsho et al. 2014). In Deutschland wurden allein im Jahre 2015 3083 Organe transplantiert, darunter 846 Lebern, 1550 Nieren und 286 Herzen (DSO 2016).

Die Chance für einen potentiellen Organempfänger, ein passendes Organ zu finden, ist immer abhängig von der Spendenbereitschaft, von dem Angebot an verfügbaren Organen und den gesetzlichen Rahmenbedingungen der Transplantation. Während die Wartelisten immer länger werden, kann der Bedarf an Organen bei Weitem nicht gedeckt werden (Klinkhammer und Richter-Kuhlmann 2015). Die Transplantationszahlen werden dadurch rückläufig, obwohl der Bedarf steigt. Wie eine Statistik der Deutschen Stiftung für Organtransplantation zeigt, ist die Zahl der Organspender in Deutschland in den vergangenen Jahren stark zurückgegangen (Tab. 1).

Tab. 1: Zahl der postmortalen Organspender in Deutschland.

Jahr	2011	2012	2013	2014
Organspender*	1200	1046	876	864

Daten nach DSO 2016

1.1.1 Spezielle Aspekte der Lebertransplantation

Patienten, die eine Organtransplantation benötigen und auf die wir uns in dieser Studie hauptsächlich beziehen, sind neben einigen Nierentransplantationspatienten vor allem Empfänger von Lebertransplantaten. Die Leber gehört zu den lebenswichtigen Organen, ohne die ein Überleben nicht möglich ist. Sie dient als Speicherorgan, der Eliminierung von Giftstoffen und Stoffwechselprodukten, als Drüse, der Regulierung der Blutzusammensetzung und zur Unterstützung des Immunsystems.

Als Speicherorgan verwertet sie die Nahrungsbestandteile Glukose, Fett und Eiweiß: Sie speichert Glukose in Form von Glykogen und reguliert insulingesteuert die Blutglukosekonzentration. Bei Lipiden ist sie in der Lage, diese in Lipoproteine zur Speicherung umzuwandeln bzw. Energie daraus zu gewinnen. Des Weiteren bildet sie die Grundgerüste zur Synthese von Cholesterin und Gallensäuren. Sie bildet für das Blut wichtige Plasmaproteine, unter anderem Albumin und Gerinnungsfaktoren.

Zudem dient sie dem Abbau von Hämoglobin zu Bilirubin, der Eliminierung von Arzneistoffen und Hormonen und sie baut Giftstoffe ab, wie Ammoniak zu Harnstoff. Schließlich unterstützt sie das Immunsystem.

Die Ursachen und Krankheitsverläufe einer Leberfunktionsstörung sind vielseitig. In Deutschland liegt die Hauptursache in einer äthyltoxischen Fettlebererkrankung, dicht gefolgt von der non äthyltoxischen Fettleber, bedingt u. a. durch Adipositas und Diabetes mellitus (Wiegand und Berg 2013). Die folgende Tabelle stellt die wesentlichen möglichen Ursachen einer Leberzirrhose dar:

Tab. 2: Mögliche Ursachen einer Leberzirrhose.

Ursachen	Beispiele
Malnutrition	Äthyltoxische Fettleber
Viral	Hepatitis B/C
Kardiovaskulär	Budd-Chiari-Syndrom Rechtsherzinsuffizienz
Autoimmun	Autoimmunhepatitis Primär biliäre Zirrhose Primär sklerosierende Cholangitis
Chronische Gallenwegserkrankung	Rezidivierende bakterielle Cholangitis Gallenwegsstenose
Ursachen	Beispiele
Speicherekrankung	M. Wilson
Andere	Arzneimittel, z. B. Paracetamol

Daten nach Wiegand und Berg 2013

Sofern eine chronische Lebererkrankung nicht therapiert wird, entwickelt sich zunächst eine Leberfibrose, welche sich durch fibröse, die Portalfelder der Leber durchziehende Septen äußert. Schließlich entsteht daraus eine Leberzirrhose, welche in ein hepatozelluläres Karzinom übergehen kann (Wiegand und Berg 2013). Klinisch verschlechtert sich die Lebersyntheseleistung, u. a. fällt der Albuminwert ab, und die hepatische Detoxikation verschlechtert sich, was sich u. a. durch steigende Bilirubinwerte nachweisen lässt. Kann die Leber nicht mehr ausreichende Leistung erbringen, ist eine Transplantation indiziert. Dabei bleiben der Hauptgrund für eine Lebertransplantation Hepatitis B und C (Wiegand und Berg 2013).

1.2 Immunsuppression im Rahmen von Organtransplantationen

In diesem Abschnitt soll es zunächst um die Immunreaktion im Allgemeinen gehen, sodann um die Einwirkung der Immunsuppressiva auf diese. Schließlich werden die klinischen Endpunkte erläutert und die damit im Zusammenhang stehenden Therapiephasen nach Organtransplantation.

In diesem Abschnitt wird zunächst der physiologische Ablauf der Immunreaktion beschrieben, um im nächsten auf die Wirkmechanismen der immunsuppressiven Therapie einzugehen.

Im Rahmen einer Abwehrreaktion beim gesunden Menschen reagiert zunächst die angeborene Immunabwehr. Dazu zählen Makrophagen und natürliche Killerzellen. Die natürlichen Killerzellen erkennen erkrankte Zellen, wenn diese ihr MHC-I-Molekül auf der Oberfläche verloren haben und somit als krank identifiziert werden können. Sie zerstören erkrankte Zellen, indem sie zytotoxische Granula ausschütten. Makrophagen hingegen nehmen Krankheitserreger auf und zerlegen sie in ihre Peptide. Einzelne Peptide präsentieren die Makrophagen als Antigene auf ihrer Oberfläche über MHC-II-Komplexe und können so die T-Helferzellen aus der spezifischen Immunabwehr aktivieren. Die T-Helferzellen ihrerseits aktivieren über Lymphokine die Antikörperproduktion.

Immunsuppressiva greifen in diesen Prozess an unterschiedlichen Stellen ein. In dieser Studie konzentrieren wir uns insbesondere auf Calcineurin- und mTOR-Inhibitoren. Dazu werde ich im Folgenden die regulären Funktionen von Calcineurin und mTOR erläutern.

Calcineurin ist eine Phosphatase und befindet sich in T-Helfer-Lymphozyten. Es dephosphoryliert das sog. *NFAT*, *nuclear factor of activated T-cells*. NFAT gelangt somit in den Zellkern und fördert die Transkription von Zytokinen, u. a. Interleukin-2 (IL-2). IL-2 aktiviert die T-Lymphozyten. Durch Calcineurin-Inhibitoren wird letztlich weniger IL-2 produziert und entsprechend weniger T-Lymphozyten-Aktivierung findet statt (Lüllmann et al. 2010). Für die vorliegende Studie betrachten wir zwei Calcineurin-Inhibitoren: Ciclosporin und Tacrolimus. Diese beiden inhibieren Calcineurin nicht direkt, sondern jeweils in einem

Komplex. Ciclosporin bindet intrazellulär an Cyclophilin, Tacrolimus an FKBP12 (Lüllmann et al. 2010).

Der zweite Angriffspunkt der Immunsuppressiva, welcher in dieser Studie eine wichtige Rolle spielt, ist die Kinase *mTOR*, *mammalian target of rapamycin*. Diese Kinase ist Teil eines Signaltransduktionsweges, welcher dafür sorgt, dass der Lymphozyt während seines Zellzyklus von der G1- in die S-Phase übergeht. mTOR-Inhibitoren unterbrechen den Signaltransduktionsweg und der Lymphozyt bleibt im Zellzyklus stehen. Wir interessierten uns vor allem für den mTOR-Inhibitor Everolimus. Auch dieses Medikament inhibiert mTOR nicht direkt, sondern im Komplex mit FKBP12 (Lüllmann et al. 2010).

Sobald der Empfänger sein neues Organ transplantiert bekommt, reagiert sein Immunsystem auf das fremde Organ mit einer Abstoßungsreaktion. Das Immunsystem erkennt die Antigene auf den körperfremden Zellen und greift diese an. Es unterscheidet dabei nicht, ob es sich um Krankheitserreger, Bakterien oder eben die Zellen des Spenderorgans handelt. Es leitet eine Abstoßungsreaktion gegen das Spender-Organ ein, eine sog. Rejektion. Dies stellt für das transplantierte Organ, aber auch für den Empfänger eine große Gefahr dar. Aus diesem Grund wird seit den ersten allogenen Organtransplantationen intensiv an immunsuppressiven Therapiemöglichkeiten geforscht. Ziel ist es, das Immunsystem kontrolliert zu unterdrücken. Wird die Dosis der Immunsuppressiva zu hoch gewählt, ist das Immunsystem nicht mehr imstande, Infektionserreger ausreichend zu eliminieren. Zudem besteht unter Immunsuppression ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms (EB 2003). Daher ist es von besonderer Bedeutung, das Immunsystem kontrolliert zu unterdrücken und auf die einzelnen Therapiephasen nach der Transplantation gezielt einzugehen. Diese werde ich im folgenden Abschnitt aufzählen.

Die Auswahl an immunsuppressiven Medikamenten ist inzwischen groß und sollte je nach Therapiephase ausgewählt werden, wie Tab. 3 übersichtlich zeigt. Besonders hoch ist die Rejektionsgefahr direkt nach der Transplantation. Daher wird im Rahmen der initialen *Induktionstherapie* die Dosis der immunsuppressiven Medikamente sehr hoch gewählt (Beimler et al. 2014). Im Anschluss folgt die *Erhaltungstherapie*: hier werden die Immunsuppressiva in einer reduzierten Dosis dauerhaft gegeben. Kommt es dennoch zu einer Abstoßungsreaktion, wird eine *Rejektionstherapie* eingeleitet und die Dosis der Immunsuppressiva vorübergehend erhöht (Beimler et al. 2014). Für den Patienten kann über die medikamentöse Einstellung mit Immunsuppressiva eine Akzeptanz des Organs und eine gute Lebensqualität wiederhergestellt werden. Andererseits wird der Organismus nicht nur anfälliger für Infektionen. Auch die Entwicklung eines malignen Tumors wird begünstigt. Hinzu kommt das Auftreten unerwünschter Wirkungen der Arzneimittel. Zudem erhöht sich die Lichtempfindlichkeit der Patienten bei Einnahme von Immunsuppressiva (Astellas 2015b). Genauer auf die unerwünschten Wirkungen werde ich in den folgenden Abschnitten zu den jeweiligen Immunsuppressiva eingehen.

Tab. 3: Typen immunsuppressiver Medikamente bei Organtransplantation.

Medikamente	Gruppe	Typisches Anwendungsgebiet
Ciclosporin	Calcineurin-Inhibitor	Rejektionstherapie, wenn zuvor andere Immunsuppressiva verabreicht wurden, Induktions- und Erhaltungstherapie
Tacrolimus	Calcineurin-Inhibitor	Rejektionstherapie, wenn zuvor andere Immunsuppressiva verabreicht wurden Induktions- und Erhaltungstherapie
Everolimus	mTOR-Inhibitor	Induktions- und Erhaltungstherapie nach Herz- und Nierentransplantation (in Kombination mit Ciclosporin und Kortikosteroid) oder Lebertransplantation (in Kombination mit Tacrolimus und Kortikosteroiden)
Mycophenolat-mofetil	Anti-Metabolit der DNA-Synthese	Nach Nierentransplantation in Kombination mit Ciclosporin und Kortikosteroiden
Prednisolon	Glukokortikoid	Rejektionstherapie nach Nierentransplantation
Basiliximab	Interleukin2-Antikörper	De-novo-Nierentransplantation in Kombination mit Ciclosporin oder Kortikosteroiden

Daten nach Astellas 2015a, 2015b, Merck 2013; Novartis 2014, 2015, 2016a, 2016b

1.2.1 Ciclosporin

Ciclosporin zählt unter den Immunsuppressiva zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Gewonnen wurde es ursprünglich aus dem Pilz *Polycladum inflatum* (Aktories 2009). Seit den 1980er Jahren wird es als Immunsuppressivum eingesetzt (Barbarino et al. 2013; Vogeser et al. 2014). Seit den 2000ern wird Ciclosporin immer weiter durch Tacrolimus verdrängt. Dennoch bleibt Ciclosporin ein wichtiges Immunsuppressivum nach Organtransplantation, da es, im Gegensatz zu Tacrolimus, bestimmte unerwünschte Wirkungen wie Diabetes mellitus weniger häufig auslöst (Vogeser et al. 2014). Der weltweite Anteil an Ciclosporin zur Medikation nach Organtransplantation liegt immerhin bei 20% (Vogeser et al. 2014). Es hemmt die Freisetzung von Interleukin 2 und somit die Produktion von T-Lymphozyten. Intrazellulär bindet es an den Rezeptor Cyclophilin. Der Komplex hemmt die Proteinphosphatase Calcineurin und hindert somit einige Transkriptionsfaktoren, darunter NFAT, daran, in den Kern zu translozieren. Somit findet die Genexpression von Interleukin 2 nicht statt, welche sonst die T-Lymphozyten aktivieren würde. Insgesamt erfolgt demnach eine Hemmung der zellulären Immunantwort (Lemmer et al. 2010). Mit der Einnahme sollte innerhalb von 12 Stunden vor der Transplantation begonnen werden. Zur initialen Induktionstherapie wird für 1-2 Wochen eine Tagesdosis von 10-15 mg/kg KG empfohlen, welche auf zwei Einzeldosen aufgeteilt werden sollte. Im Anschluss sollte die Dosis

allmählich reduziert werden bis zu einer Erhaltungsdosis von 2-6 mg/kg KG, wiederum als zwei gleichmäßig aufgeteilte Einzeldosen (Novartis 2015). Diese Angaben beziehen sich auf eine Monotherapie mit Ciclosporin und müssen für eine Kombinationstherapie entsprechend reduziert werden (Novartis 2015). Besondere Vorsicht ist bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion geboten. Ciclosporin wird zwar nur zu einem geringen Teil über die Niere eliminiert, daher ist es von einer eingeschränkten Nierenfunktion unabhängig, allerdings kann es zu unerwünschten nephrotoxischen Wirkungen kommen. Eine regelmäßige Kontrolle der Nierenfunktion wird daher unter Ciclosporin-Gabe empfohlen (Novartis 2015). Ciclosporin wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert. Eine eingeschränkte Leberfunktion kann zu einem erheblichen Anstieg der Plasmakonzentration von Ciclosporin führen, da es in der Leber metabolisiert wird. Um kontinuierliche Medikamentenspiegel zu erreichen, wird ein striktes Therapeutisches Drug Monitoring empfohlen. Bei älteren Patienten sollte die Initialdosis im unteren Dosisbereich gewählt werden und diese unter strengem Drug Monitoring eingestellt werden.

Tab. 4: CSA-Dosierungsempfehlung.

CSA	Initialtherapie	Erhaltungstherapie
	Dosis [mg/kg KG /Tag]	Dosis [mg/kg KG /Tag]
LTx	10-15	2-6

Daten nach Novartis 2015

Bei der Anwendung von Ciclosporin sind einige Wechselwirkungen bekannt, bei denen mit besonderer Vorsicht umgegangen werden sollte. Dazu zählen Medikamente mit hemmender oder induzierender Wirkung auf CYP3A4. Diese können die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin verstärken oder abschwächen. Zu CYP3A4-Induktoren, welche den Ciclosporin-Spiegel in Vollblut tendenziell vermindern, zählen unter anderem Barbiturate; Phenytoin und Johanniskraut. Rifampicin erhöht den Bedarf an Ciclosporin beispielsweise um das 3-5fache, damit dieselbe CSA-Konzentration im Blut erreicht wird.

Auf der anderen Seite können CYP3A4-Inhibitoren oder Hemmer des P-Glykoproteins die Konzentration an Ciclosporin stark erhöhen. Dazu zählen verschiedene Antibiotika, welche die Konzentration um ein Vielfaches erhöhen: Makrolid-Antibiotika können die Ciclosporin-Konzentration auf das 4-7fache anheben, Clarithromycin verdoppelt diese. Azol-Antimykotika wie Fluconazol oder Voriconazol können die Ciclosporin-Konzentration ebenso erhöhen. Auf Grapefruitsaft sollte unter Ciclosporin-Therapie gänzlich verzichtet werden.

Bei Kombinationstherapien mit anderen nephrotoxischen Medikamenten muss beachtet werden, dass diese das nephrotoxische Potential von Ciclosporin verstärken können. Aus diesem Grund ist eine Kontrolle der Nierenwerte indiziert.

Umgekehrt kann Ciclosporin die Bioverfügbarkeit anderer Medikamente verändern. Insbesondere Statine sollten vorsichtig dosiert werden, da deren Konzentration sich um das bis zu 10fache erhöhen kann.

Neben Wechselwirkungen sind auch einige Nebenwirkungen von Ciclosporin bekannt. Insbesondere Tremor, Nierenfunktionsstörungen, Hirsutismus, Hypertonie, Diarrhoe, Anorexie und Erbrechen. Die meisten Nebenwirkungen sind nach Dosisanpassung reversibel. Wie bei allen Immunsuppressiva können Infektionen und parasitäre Erkrankungen auftreten, ebenso erhöht sich das Risiko auf Neoplasien.

Tab. 5: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Ciclosporin.

Wechselwirkungen	Bekannte Nebenwirkungen
CYP3A4-Induktoren:	Nephrotoxizität,
Antibiotika (z. B. Rifampicin)	Hepatotoxizität,
Johanniskraut	Neurotoxizität,
	Hyperlipidämien,
Stoffwechsellinhibitoren:	Tremor,
Antimykotika (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol)	Hypertonie,
Antibiotika (z. B. Erythromycin, Clarithromycin)	Hirsutismus
HCV-Proteasehemmer (z. B. Telaprevir)	Infektionserkrankungen,
HIV-Preoteasehemmer (z. B. Ritonavir, Indinavir)	Neoplasie
Glukokortikoide (z. B. Methylprednisolon)	

Daten nach Novartis 2015

1.2.2 Tacrolimus

Tacrolimus, oder auch FK506, wird aus dem Pilz *streptomyces tsukubaensis* gewonnen (Wehling et al. 2011). Seit 1994 ist es von der *Food and Drug Administration* als adäquate Alternative zu Ciclosporin in der immunsuppressiven Therapie anerkannt (Barbarino et al. 2013). Es wirkt intrazellulär in den T-Lymphozyten, indem es dort an FKBP12 kompetitiv bindet. Der Komplex aus Tacrolimus und FKBP12 inhibiert Calcineurin. Somit wird eine Translation von NFAT gehemmt und damit die Genexpression von Interleukin 2 reduziert. Insgesamt erfolgt also eine Hemmung der T-Zell-Antwort. Ein Unterschied zum Ciclosporin besteht darin, dass es eine geringere Molekülgröße und eine ca. 50-100fach höhere Wirksamkeit aufweist (Wehling et al. 2011).

Tacrolimus gibt es in zwei Formen, welche entweder zweimal täglich unter dem Handelsnamen Prograf[®] (unmittelbare Freisetzung) oder einmal täglich als Advagraf[®] (retardierte Freisetzung) verabreicht werden. Die Tagesgesamtdosis ist dabei gleich, d. h., bei Prograf[®] wird zweimal die halbe Dosis gegeben und bei Advagraf[®] die Tagesdosis auf einmal. Eine Umstellung sollte jedoch nicht unkontrolliert durchgeführt werden, da es ansonsten zu einer Unter- oder Überimmunsuppression kommen kann (Astellas 2015b).

Für Prograf[®] gibt es empfohlene Standarddosen. Die empfohlenen Initialdosen sind jedoch nur Richtlinien. Entsprechend der Fachinformation sollten sich die tatsächlichen Dosen an Blutspiegelbestimmungen orientieren. Prograf[®] kann sowohl intravenös als auch oral verabreicht werden. Es ergeben sich folgende Standarddosen entsprechend der Fachinformation: Die erste Verabreichung sollte innerhalb von 24 Stunden nach der Transplantation stattfinden, empfohlen wird ca. 12 Stunden nach Abschluss der Transplantations-Operation (Astellas 2015b).

Während der Induktionstherapie werden 0,10-0,20 mg/kg KG nach Lebertransplantation und 0,20-0,30 mg/kg KG nach Nierentransplantation oral pro Tag verabreicht. Diese Dosis sollte auf zwei Einzeldosen (morgens und abends) gleichmäßig aufgeteilt werden. Ist eine orale Verabreichung nicht möglich, kann diese intravenös erfolgen. Dazu wird eine initiale Dosis von 0,01-0,05 mg/kg KG/Tag per Dauerinfusion nach Lebertransplantation bzw. 0,05-0,10 mg/kg KG/Tag nach Nierentransplantation empfohlen.

Die Dosierung wird während der Erhaltungstherapie in der Regel reduziert, sollte sich jedoch an den angestrebten Talspiegeln orientieren und wird in der Fachinformation nicht genau vorgegeben. Tacrolimus kann als Monotherapie angewendet werden oder als Kombinationstherapie mit anderen Immunsuppressiva. In allen Fällen ist ein dauerhaftes Therapeutisches Drug Monitoring sinnvoll, da sich die Pharmakokinetik des Medikaments verändern kann (Astellas 2015b). Ein Ende der Therapie sollte grundsätzlich nicht in Erwägung gezogen werden, da auch sehr lange nach Transplantation eine Abstoßung des Transplantates stattfinden kann.

Tab. 6: Tac-Dosierungsempfehlung.

Tac	Initialtherapie	
	Dosis oral [mg/kg KG /Tag]	Dosis intravenös [mg/kg KG /Tag]
	0,10-0,20	0,01-0,02
	0,20-0,30	0,05-0,10

Daten nach Astellas 2015b

Da andere Immunsuppressiva, insbesondere Ciclosporin, über die Nieren abgebaut werden, sind Kombinationen von Tacrolimus mit Ciclosporin kontraindiziert. Bei einer Umstellung

von Ciclosporin auf Tacrolimus ist besondere Vorsicht geboten, da Ciclosporin unter Tacrolimus sehr schlecht abgebaut werden kann. Eine Pause von 12-24 Stunden nach der letzten Ciclosporin-Gabe sollte daher eingehalten werden.

Besonderen Umgang mit der Dosierung erfordern Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nicht. Allerdings kann es zu unerwünschten nephrotoxischen Wirkungen unter Tacrolimus kommen, weshalb eine sorgfältige Kontrolle der Nierenwerte empfohlen wird. Die nephrotoxische Wirkung kann sich verstärken durch die Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika.

Wie bei allen Immunsuppressiva gibt es auch bei Tacrolimus eine Reihe von unerwünschten Wirkungen, welche auftreten können:

Wechselwirkungen können auftreten mit Substanzen, die das Enzym CYP3A4 beeinflussen. CYP3A4-Inhibitoren wie Voriconazol und CYP3A4-Induktoren wie Rifampicin können den Tacrolimus-Blutspiegel stark verändern. Präparate wie Johanniskraut können zu einer Tacrolimus-Intoxikation führen (Astellas 2015b).

Ebenso können sich Stoffwechsellinhibitoren auf den Tacrolimus-Blutspiegel auswirken. Dazu zählen Antimykotika (Fluconazol etc.), verschiedene Antibiotika (z. B. Erythromycin), HCV-Proteasehemmer (z. B. Telaprevir) und HIV-Preteasehemmer (z. B. Ritonavir). Ebenso, aber wesentlich schwächer, können Wechselwirkungen zum Beispiel mit Omeprazol auftreten. In allen Fällen sollte der Medikamentenpass der Patienten genau überprüft werden. Zudem ist der Patient darauf hinzuweisen, dass er keinen Grapefruitsaft trinken sollte, da es Hinweise darauf gibt, dass sich dadurch der Tacrolimus-Spiegel signifikant erhöht.

Neben Stoffwechsellinhibitoren können auch Stoffwechselinduktoren Wechselwirkungen mit Tacrolimus hervorrufen. Gravierende Wechselwirkungen konnten unter Rifampicin und Johanniskraut festgestellt werden. Besonders für unsere Patienten wichtig ist, dass auch unter Methylprednisolon und Prednisolon Wechselwirkungen auftreten, welche zu erhöhten oder erniedrigten Tacrolimus-Spiegeln führen.

Besondere Vorsicht ist geboten bei Patienten mit Verdacht auf gastrointestinale Perforationen, da diese unter Tacrolimus auftreten können. Ebenso treten Kardiomyopathien wie Kammer- oder Septumhypertrophie insbesondere bei Patienten unter massiver Immunsuppression auf. Hier sollte eine regelmäßige Überwachung der Herzfunktion gewährleistet sein.

Lymphoproliferative Erkrankungen, wie das Epstein-Barr-Virus, treten gehäuft unter Prograf[®]-Therapie auf. Daher sollte bei Patienten unter Prograf[®] regelmäßig eine EBV-VCA-Serologie durchgeführt werden, zudem wird eine Antilymphozyten-Therapie prophylaktisch empfohlen. Des Weiteren kann es zur Entwicklung eines posterioren Enzephalopathie-Syndroms kommen, welches zu Sehstörungen führen kann, aber in der Regel durch adäquate Behandlung vollständig reversibel ist.

Nun werde ich noch kurz auf mögliche Nebenwirkungen von Tacrolimus eingehen. Typische Nebenwirkungen sind Infektionserkrankungen oder parasitäre Erkrankungen bei Überdosierung von Immunsuppressiva, so auch für Tacrolimus. Auch das Risiko für Neoplasien ist erhöht. Sehr häufig wird berichtet von Nierenfunktionsstörungen, hyperglykämischen Zuständen, der Entwicklung eines Diabetes mellitus sowie Hyperkaliämie, Durchfällen und Hypertonie. Hinzu kommen Schlafstörungen, Erkrankungen des Nervensystems wie Tremor oder Kopfschmerzen. Augenerkrankungen wie Photobien, Tinnitus, Tachykardie und Dyspnoe sowie Lebererkrankungen wie Cholangitis, aber auch Exantheme, Gliederschmerzen zählen zu häufigen Nebenwirkungen. Sehr häufig treten Diarrhoe sowie Hypertonie auf.

Tab. 7: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Tacrolimus.

Wechselwirkungen	Bekannte Nebenwirkungen
CYP3A4-Induktoren:	Infektionserkrankungen,
Antibiotika (z. B. Rifampicin)	parasitäre Erkrankungen
Johanniskraut	Neoplasien
	Nierenfunktionsstörungen
Stoffwechsellinhibitoren:	Hyperglykämie
Antimykotika (z. B. Fluconazol)	Schlafstörungen
Antibiotika (z. B. Erythromycin)	Neuropathien
HCV-Proteasehemmer (z. B. Telaprevir)	Photobien
HIV-Proteasehemmer (z. B. Ritonavir)	Tinnitus
Glukokortikoide (z. B. Methylprednisolon)	Tachykardie
	Dyspnoe
	Cholangitis
	Exantheme
	Gliederschmerzen

Daten nach Novartis 2015

Häufig werden Transplantatempfänger, welche Prograf® zweimal täglich erhalten, im Laufe der Erhaltungstherapie umgestellt auf Advagraf® oder sie erhalten Advagraf® von Beginn an. Dabei handelt es sich um die retardierte Formulierung des Calcineurin-Inhibitors zur einmal täglichen Einnahme. Vor einer unachtsamen Umstellung wird ausdrücklich gewarnt, da diese zu gefährlichen Unter- bzw. Überimmunsuppressionen führen kann mit Risiko des Transplantatverlustes. Advagraf® ist direkt nach der Transplantation vorgesehen für Kombinationstherapien mit anderen Immunsuppressiva. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei De-novo-Lebertransplantierten die AUC₀₋₂₄ am ersten Tag nach der Transplantationsoperation um 30%-50% niedriger ist als bei Prograf®, jedoch nähern sich die Werte der jeweiligen Talspiegel in den ersten vier Tagen an. Im Laufe der

immunsuppressiven Therapie kann auf eine Monotherapie mit Advagraf[®] umgestellt werden. Dabei ist insbesondere zu beachten, dass bei einer stabilen Umstellung von Prograf[®] auf Advagraf[®] die AUC₀₋₂₄ bis zu 10% niedriger wird. Die Talspiegel C₂₄ verhalten sich in Korrelation zur systemischen Exposition AUC₀₋₂₄ jedoch gleich. Nach einer Umstellung von Prograf[®] auf Advagraf[®] sollte über zwei Wochen hinweg der Konzentrationsspiegel kontrolliert werden, bis er im Steady State den Zielspiegel erreicht hat. Das Spektrum an unerwünschten Wirkungen von Advagraf[®] entspricht im Wesentlichen dem des Prograf[®].

1.2.3 Everolimus

Das dritte Immunsuppressivum in dieser Reihe ist Everolimus, in seiner früheren Form auch Rapamycin genannt, ist ein Makrolidlacton, welches aus den Ascomyceten *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird (Aktories 2009). Es bindet, ähnlich wie Tacrolimus, an FKBP12. Allerdings zeigt es eine hemmende Wirkung auf mTOR (mammalian target of rapamycin), eine Kinase, welche die Zellproliferation reguliert. Dadurch wird die Proliferation der T-Lymphozyten gehemmt und die Immunantwort unterdrückt. Everolimus wird oral verabreicht, sehr schnell absorbiert und erreicht nach bisherigen Forschungsergebnissen seine Maximalwerte im Blut nach 1,3 bis 1,8 Stunden. Es hat eine Halbwertszeit von 18-35 Stunden und eine Bioverfügbarkeit von 5%-26% (Wong et al. 2016). Es wird metabolisiert über CYP3A4, CYP3A5 und CYP2C8. Auf dem Markt existieren verschiedene Handelsnamen für Everolimus, in Europa ist es hauptsächlich Certican (Shipkova et al. 2016).

Everolimus wird ausschließlich oral verabreicht. Außerdem wird es nicht als Monotherapie, sondern als Kombinationstherapie angewendet (Novartis 2016a). Dabei sollte nach einer Nierentransplantation die Komedikation mit Ciclosporin und Kortikosteroiden erfolgen, nach Lebertansplantation mit Tacrolimus und Kortikosteroiden (Novartis 2016a). Die Dosierung sollte im Rahmen eines Therapeutischen Drug Monitoring überwacht werden und in Intervallen von vier bis fünf Tagen eingestellt werden. Nach Nierentransplantation wird empfohlen, neben Everolimus die volle Dosis Ciclosporin zu verabreichen. Nach Lebertransplantation sollte in der Kombinationstherapie eine geringere Tacrolimus-Dosis gewählt werden, um die nephrotoxischen Nebenwirkungen zu vermeiden.

Everolimus sollte zweimal täglich zu den Mahlzeiten eingenommen werden. Die erste Dosierung sollte nach Transplantation so bald wie möglich stattfinden (Novartis 2016a). Die Initialdosis für Nierentransplantatpatienten liegt bei 0,75 mg/kg KG zweimal täglich. Bei Lebertransplantatpatienten sollte die Initialdosis nach 1,0 mg/kg KG zweimal täglich betragen und zudem 4 Wochen nach Transplantation mit einer Tacrolimus-Medikation begonnen werden.

Tab. 8: Eve-Dosierungsempfehlung.

Everolimus	Initialtherapie
	Dosis oral [mg/kg KG /Tag]
LTx	2,0
NTx	1,5

Daten nach Novartis 2016a

Unter Everolimus sind folgende Nebenwirkungen beschrieben: Am häufigsten treten Infektionen auf, Anämie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Schlaflosigkeit, Kopfschmerzen, Hypertonie, Husten, Obstipation, Übelkeit, periphere Ödeme und Wundheilungsstörungen. Infektionen sind ein großes Risiko für immunsupprimierte Patienten, da häufig opportunistische Infektionen zu einer Erkrankung des Patienten führen. Auch von Hyperlipidämien wird häufig berichtet. Um eine Hyperlipidämie rechtzeitig zu erkennen, sollten die Serum-Cholesterin-Spiegel sowie die Triglycerid-Spiegel regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls therapiert werden. Da auch ein erhöhtes Risiko für ein Neuauftreten eines Diabetes mellitus besteht, sollten die Blutzuckerspiegel überwacht werden.

Zudem gibt es eine Reihe von Wechselwirkungen zu beachten. Besondere Vorsicht ist bei CYP3A4-Substraten geboten. Da Everolimus hauptsächlich in der Leber abgebaut wird, können CYP3A4-Inhibitoren oder –Induktoren die Everolimus-Blutspiegel gravierend verändern. Bei Kombination mit Ciclosporin wurde eine geringe Beeinflussung auf die Pharmakokinetik durch Everolimus beobachtet. Zu den CYP3A4-Inhibitoren zählen unter anderem Ketonocazol und Itraconazol. Zu den CYP3A4-Induktoren zählen unter anderem Phenytoin und Rifampicin. Bei Impfungen sollte beachtet werden, dass immunsupprimierte Patienten schlechter darauf ansprechen. Lebendimpfstoffe sollten vermieden werden (Novartis 2016a).

Bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen sind keine Besonderheiten in der Dosierung von Everolimus zu berücksichtigen. Bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen hingegen sind, abhängig vom Schweregrad der Funktionsstörung, Dosisanpassungen an Everolimus erforderlich. Der Schweregrad wird dabei in Child-Pugh-Klassen angegeben. Bei Leberinsuffizienz sollte die Dosis im oberen Dosisbereich gewählt werden.

Bei Komedikation von Tacrolimus oder Ciclosporin sollten regelmäßige Konzentrationsmessungen von Everolimus im Blut vorgenommen werden.

Tab. 9: Wechselwirkungen und Nebenwirkungen von Everolimus.

Wechselwirkungen	Bekannte Nebenwirkungen
CYP3A4-Induktoren: Antibiotika (z. B. Rifampicin) Johanniskraut	Infektionserkrankungen, Anämie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Schlaflosigkeit, Kopfschmerzen, Hypertonie, Husten, Obstipation, Übelkeit, periphere Ödeme, Wundheilungsstörungen
Stoffwechsellinhibitoren: Antimykotika (z. B. Voriconazol) Antibiotika (z. B. Erythromycin) HCV-Proteasehemmer (z. B. Telaprevir) HIV-Preteasehemmer (z. B. Ritonavir) Glukokortikoide (z. B. Methylprednisolon)	

Daten nach Novartis 2016a

1.3 Individualisierte Therapie und Therapeutisches Drug Monitoring

In diesem Abschnitt geht es zunächst um das Konzept des Therapeutischen Drug Monitoring allgemein, bevor ich im folgenden Abschnitt dann zum Drug Monitoring der Immunsuppressiva komme. Als Therapeutisches Drug Monitoring bezeichnet man die Messung von Medikamentenspiegeln in Vollblut bzw. im Blutplasma und eine daran angepasste medikamentöse Einstellung des Patienten (Burton 2006).

Zunächst komme ich zum allgemeinen Aspekt, warum nicht alle Patienten gleichbehandelt werden dürfen, sondern individuelle Faktoren berücksichtigt werden müssen:

In den vergangenen 40 Jahren wurde bereits intensiv daran geforscht, Patienten eine individuell angepasste medikamentöse Therapie zu ermöglichen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Kenntnisse aus den Bereichen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, darüber hinaus auch die Pharmakogenetik. Zunächst werde ich diese Begriffe definieren:

Pharmakokinetik: Unter Pharmakokinetik fasst man alle Auswirkungen eines Organismus auf das Pharmakon zusammen. Mit der Applikation eines Pharmakons beginnt dessen Pharmakokinetik. Ab dann durchläuft es folgende Stationen: Resorption, Verteilung und Speicherung (Invasion), Exkretion und Biotransformation (Elimination) (Aktories 2009). Unter *Resorption* versteht man die Aufnahme in die Blutbahn. Von dort aus wird das Pharmakon in sämtliche Gewebe *verteilt*. Somit gelangt es an seinen Wirkort. Zusätzlich kann es *gespeichert* werden. Dieser erste Teil der Pharmakokinetik wird als Invasion bezeichnet. Wenn ein Teil des Pharmakons unverändert ausgeschieden wird, wird dies als Exkretion bezeichnet, es kann auch über eine Biotransformation chemisch verändert werden. Beide Wege werden als Elimination bezeichnet (Aktories 2009).

Unter Pharmakodynamik fasst man die Wirkung des Pharmakons auf den Organismus zusammen. Ein Pharmakon kann über Rezeptoren wirken oder ohne Rezeptoren. In der Regel bindet das Pharmakon an einen primär spezifischen Rezeptor. Ohne Rezeptor wirkt beispielsweise konzentrierte Salzsäure, welche Proteine direkt denaturiert (Aktories 2009).

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit genetischer Variabilität von Patienten und wie sich diese auf die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik auswirkt. Dies kann durch unterschiedliche Enzymaktivitäten, verschiedene Aktivität von Transportproteinen oder Variabilität von Rezeptor-Proteinen der Fall sein (Lüllmann et al. 2010).

Jedes Medikament hat eine therapeutische Breite. Darunter versteht man den Bereich in der Dosis-Wirkungs-Kurve, in dem das Medikament bereits so hoch dosiert ist, dass es den gewünschten Effekt erzielt (Lüllmann et al. 2010) und noch nicht die toxische Dosis erreicht hat. Durch eine individualisierte Therapie soll erreicht werden, Risiken zu reduzieren und die Wirksamkeit der Arzneimittel zu verbessern. Häufig wird eine medikamentöse Therapie schon dadurch verbessert, dass weniger bis keine unerwünschten Wirkungen mehr für den Patienten auftreten. Andererseits ist eine Optimierung der Medikation wünschenswert, welche die therapeutische Wirksamkeit steigert. Zwischen diesen beiden Grenzen, also zwischen der zu niedrig gewählten, unwirksamen Dosis und der zu hohen Dosis, welche toxisch ist, liegt die therapeutische Breite. Mithilfe des Therapeutischen Drug Monitorings soll genau dieser Bereich exakt erreicht werden. Ist die therapeutische Breite eines Arzneimittels sehr groß und ist mit einer schwerwiegenden Toxizität erst bei sehr hohen Dosen eines Medikaments zu rechnen, wird es einfacher. In diesen Fällen haben wir einen großen Spielraum für die Dosierung und ein TDM ist nicht unbedingt erforderlich (Burton 2006). Ebenso, wenn der Effekt bei Medikamenten einfacher gemessen werden kann (Aktories 2009). Letzteres trifft z. B. auf Antidiabetika zu: hier kann eine Insulindosis in Abhängigkeit vom aktuellen Blutglukosespiegel angepasst werden. Die Messung kann der Patient zuhause durchführen und anhand einer Tabelle ablesen, wie viel Insulin injiziert werden muss. Das aufwändigere TDM ist hier entbehrlich.

Doch für viele Medikamente ist die Dosierung nicht so einfach anhand einer standardisierten Tabelle zu justieren. Pharmakokinetische Parameter, welche sich auf den Arzneimitteltransport und den Metabolismus beziehen, sind heute zwar weitgehend gut erforscht, jedoch werden sie beeinflusst von einem weiteren wichtigen Faktor, der Pharmakogenetik. Diese betrifft nicht den Weg des Arzneimittels, sondern seine Rezeptoren und Signalwege (Stingl und Brockmüller 2013). Individuelle Parameter des einzelnen Patienten sind sehr variabel, beeinflussen die Pharmakokinetik und zeigen, dass Medikationen nach standardisierten Tabellenwerten aus der Literatur teilweise zu Plasmakonzentrationen führen, welche weit vom Literaturwert abweichen.

Zu den Faktoren, welche die Pharmakokinetik beeinflussen, zählen u. a. das Lebensalter, Komedikationen und Wechselwirkungen, Körpergewicht, Geschlecht, Nieren- und Leberfunktion. Diese haben Auswirkungen auf den Arzneimitteltransport und den

Arzneimittelmetabolismus (Stingl und Brockmöller 2013). Das Alter des Patienten beeinflusst diese insofern, als ältere Menschen häufig sensibler auf Medikamente reagieren (Aktories 2009). Die Clearance verringert sich. Sie gibt an, in welcher Geschwindigkeit ein Stoff aus dem Blut vollständig eliminiert wird. Ist sie verringert, werden Arzneimittel langsamer eliminiert, und eine Überdosierung durch Akkumulation kann auftreten (Aktories 2009). Andererseits verringert sich die enterale Resorption, wodurch bei älteren Patienten ein größerer Teil des Arzneimittels unverändert ausgeschieden wird. Des Weiteren lässt sich mit dem TDM die Compliance des Patienten kontrollieren (Aktories 2009). Voraussetzung für das TDM solcher Medikamente ist, dass ein zuverlässiges Nachweisverfahren existiert. Tab. 10 soll beispielhaft einige Faktoren auflisten, welche für das Therapeutische Drug Monitoring zu berücksichtigen sind:

Tab. 10: Wichtige Einflussfaktoren bei der Dosisbestimmung.

Einflussfaktor	
Körpergewicht	Dosierung proportional zum Gewicht des Patienten
Geschlecht	Geschlechtsspezifische Dosierung
Alter	Unterschiedliche Dosierungstabellen für Kinder und Erwachsene
Nierenfunktion	Geringere Dosierung bei eingeschränkter Nierenfunktion
Leberfunktion	Geringere Dosierung bei eingeschränkter Leberfunktion
Compliance	Kontrolle der Compliance bei „Nicht-Anschlagen“ einer Therapie
Begleiterkrankungen	Funktionen von Leber und Niere können eingeschränkt sein
Genetische Polymorphismen	Nach der genetischen Veranlagung können Medikamente individuell unterschiedlich schnell metabolisiert werden
Patientenpräferenz	Der Wunsch des Patienten muss immer berücksichtigt werden
Bioverfügbarkeit	Bei oraler Applikation wird ein Teil des Wirkstoffs eliminiert, bevor er das Blut erreicht

Daten nach Wehling et al. 2011

Wichtige Parameter für das TDM: Es gibt bereits eine Vielzahl von Medikamenten, für welche ein Therapeutisches Drug Monitoring angewendet wird. In Tab. 11 sind einige beispielhaft aufgeführt.

Tab. 11: Beispiele für Arzneimittel, für welche ein TDM angewendet wird.

Kategorie	Arzneimittel
Antibiotika	Gentamycin
Antiarrhythmika	Lidocain Amiodaron
Antiepilektika	Phenytoin Carbamazepin
Herzglykoside	Digitoxin
Immunsuppressiva	Ciclosporin, Tacrolimus, Everolimus, Mycophenolsäure

Daten nach Wehling et al. 2011

Im Folgenden werde ich auf die Anwendung des TDM für Immunsuppressiva näher eingehen. Die Dosierung von Immunsuppressiva bei Organtransplantatempfängern wurde durch das TDM erheblich verbessert. Hier geht es darum, die Medikamentendosis so zu wählen, dass das Immunsystem des Empfängers ausreichend unterdrückt wird. Ist die Dosis zu gering, bleibt das Immunsystem imstande, das fremde Organ abzustößen, eine sog. Rejektion findet statt. Dabei kann das fremde Organ stark geschädigt und nicht zuletzt der Patient selbst lebensbedrohlich erkranken. Wird hingegen die Dosis der Immunsuppressiva zu hoch gewählt, treten unerwünschte Wirkungen in Erscheinung. Es kann zu Infektionen und parasitären Erkrankungen kommen, mit denen ein gesundes Immunsystem noch gut umgehen kann. Ein supprimiertes Immunsystem kann das jedoch nicht mehr leisten. Häufige Infektionen sind Hepatitis-Virus-Infektionen, Cytomegalievirus-Infektionen oder Infektionen mit Humanen Herpes-Viren (Cornberg et al. 2016). Zudem werden in der Literatur mögliche dosisabhängige toxische Wirkungen der Immunsuppressiva beschrieben: Hierzu gehören Nephrotoxizität, Lebertoxizität, Hypertonie, Hypokaliämie, Posttransplantationsdiabetes, Erhöhung der Blutlipide etc. Ziel des Therapeutischen Drug Monitoring ist es, den Mittelweg zwischen unwirksamer Dosis (Rejektion) und toxischer Dosis (Infektion, unerwünschte Wirkungen) zu finden.

Im Folgenden werde ich das praktische Vorgehen des TDM kurz vorstellen: der Patient nimmt eine Standarddosis des Medikaments ein. Anschließend wird die Plasmakonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen. Dabei kann es sich entweder um die maximale Serum- bzw. Plasma-Konzentration handeln, die sog. Peak-Konzentration, oder die minimale, sog. Tal-Konzentration. Dieser Wert wird mit empfohlenen Literaturwerten verglichen. Entsprechend der Abweichung wird die Dosis erhöht bzw. gesenkt (Aktories 2009). Für dauerhafte Behandlungen ist es wichtig, dass der Medikamentenspiegel konstant gehalten werden kann. Die erste Messung der Plasmakonzentration macht somit erst dann Sinn, wenn ein gleichbleibender Medikamentenspiegel erreicht ist. Dafür macht man sich

Überlegungen aus der Halbwertszeit der Medikamente zunutze: Die Halbwertszeit gibt an, in welcher Zeit die Hälfte der gegebenen Dosis aus dem Plasma eliminiert wurde. In dieser Zeit halbiert sich die Plasmakonzentration. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nach 5 Halbwertszeiten das Medikament nahezu vollständig eliminiert wurde, zu 97% (Wehling et al. 2011), sofern es nur einmalig verabreicht wurde. Wird das Medikament hingegen kontinuierlich verabreicht, erreicht es nach einem Zeitraum von 5 Halbwertszeiten ein sog. *Steady State*. Das heißt, die Plasmakonzentration bleibt vor dem Hintergrund der Eliminierung und der kontinuierlichen Medikation konstant.

Für die Dosierung der Medikamente unterscheidet man verschiedene Abschnitte der Therapie: Die Induktionstherapie, frühe Erhaltungstherapie, langfristige Erhaltungstherapie (Beimler et al. 2014).

In der Regel werden Patienten nach Organtransplantation mit einer Kombination aus verschiedenen Immunsuppressiva eingestellt, da sich so die Einzeldosis der Medikamente reduzieren lässt und dadurch auch das Auftreten von unerwünschten Wirkungen verringert werden kann (Beimler et al. 2014). Im Folgenden werde ich anhand von drei Immunsuppressiva auf das Therapeutische Drug Monitoring im Einzelnen eingehen. Dazu werde ich nacheinander Ciclosporin, Tacrolimus und Everolimus beschreiben.

1.3.1 Ciclosporin

Zunächst werde ich auf Ciclosporin eingehen. Ciclosporin ist wie Tacrolimus ein Calcineurin-Inhibitor. Wie bereits beschrieben, hemmt es die Freisetzung von Interleukin-2 und somit die Produktion von T-Lymphozyten. Intrazellulär bindet es an den Rezeptor Cyclophilin. Es hemmt die Proteinphosphatase Calcineurin und hindert somit NFAT daran, in den Kern zu translozieren. Somit findet die Genexpression von Interleukin-2 nicht statt, welche sonst die T-Lymphozyten aktivieren. Insgesamt erfolgt demnach eine Hemmung der zellulären Immunantwort (Lemmer et al. 2010). Bisher wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, um Ciclosporin im Rahmen eines Therapeutischen Drug Monitoring auf den einzelnen Patienten individuell anzupassen. Ziel des TDM von Ciclosporin ist es auch hier, die Effizienz und Sicherheit des Medikaments zu gewährleisten (Citterio 2004). Nachdem es nach Markteinführung zunächst als Standarddosis verabreicht worden war, führte man für Ciclosporin doch sehr bald das TDM-CyA ein. Unter anderem wurde in einer multizentrisch angelegten Studie mithilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassays die Konzentration an Ciclosporin in Vollblut mit passenden Antikörpern gemessen (Shipkova et al. 2014). Weitere Immunoassays (IAs) zur Konzentrationsbestimmung im Rahmen des TDM sind unter anderem die Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) (Koster et al. 2009).

Tab. 12: Therapeutischer Bereich und Zielspiegel in VB für CSA.

CSA	Initialtherapie		Erhaltungstherapie	
	Dosis [mg/kg /Tag]	Zielspiegel in VB [ng/mL]	Dosis [mg/kg /Tag]	Zielspiegel in VB [ng/mL]
LTx	10-15	225-300	2-6	100-150

Daten nach MHH 2016; Novartis 2015

1.3.2 Tacrolimus

Bei Tacrolimus handelt es sich um einen Calcineurin-Inhibitor. Tacrolimus wird seit den 1990er Jahren zur Immunsuppression nach Organtransplantation solider Organe angewendet. Tacrolimus bindet intrazellulär in den T-Lymphozyten und inhibiert dort die Calcineurinphosphatase. Dies hemmt wiederum die Produktion von Zytokinen, darunter IL-2 und γ -Interferon. Tacrolimus kann zu schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen führen. Dazu zählen Nephrotoxizität, Hypertonie, Posttransplantationsdiabetes, Neurotoxizität und Hyperkaliämie (Dasari et al. 2016). Um diese unerwünschten Wirkungen möglichst zu verhindern, ist ein Therapeutisches Drug Monitoring äußerst wichtig. Der Therapeutische Bereich liegt hier in der Regel bei 0,1-0,2 mg/kg KG nach Lebertransplantation und bei 0,2-0,3 mg/kg KG nach Nierentransplantation (Astellas 2015a). Die aktuelle Dosis richtet sich dabei nach der Plasmakonzentration, welche als Talspiegel gemessen wird. Für das Therapeutische Drug Monitoring existieren für Tacrolimus verschiedene Ansätze. Unter anderem wurde eine Methode entwickelt, die Konzentration von ungebundenem Tacrolimus und Tacrolimus gesamt in Vollblut nachzuweisen (Stienstra et al. 2016). Diese Methode beruht auf der Annahme, dass nur freies, ungebundenes Tacrolimus in Gewebe eindringen kann. Es besteht zudem die Vermutung, dass von den Tacrolimus-Gesamtkonzentrationen nicht darauf geschlossen werden kann, ob der Patient mit unerwünschten Wirkungen aufgrund einer Überdosierung zu rechnen hat. Eher sei dafür das freie Tacrolimus aussagekräftig, was mithilfe der Messmethode nun ermittelt werden konnte (Stienstra et al. 2016). In der Fachinformation werden Empfehlungen gegeben, wie häufig eine Blutspiegelbestimmung stattfinden sollte. In der Initialphase sollte diese zweimal pro Woche stattfinden. Aufgrund seiner niedrigen Clearance muss berücksichtigt werden, dass Dosisanpassungen erst mehrere Tage danach im Blutspiegel messbar werden (s. Tab. 13).

Tab. 13: Therapeutischer Bereich und Zielspiegel von Tac in VB.

Tac LTx	Induktionstherapie		Erhaltungstherapie	
	Dosis [mg/kg/Tag]	Zielspiegel in VB [ng/mL]	Dosis [mg/kg/Tag]	Zielspiegel in VB [ng/mL]
LTx	5-20 ng/ml	0,10-0,20	5-15 ng/ml	Einzelfall

Daten nach Astellas 2015a; MHH 2016

1.3.3 Everolimus

Zuletzt gehe ich noch auf Everolimus ein. Seit nunmehr 10 Jahren wird an einem optimierten TDM für Everolimus geforscht (Shipkova et al. 2016). Everolimus wird nach Leber-, Nieren- und/oder Herztransplantationen mit einer anfänglichen Dosis von 0,75 mg bei gleichzeitiger Gabe von Ciclosporin gegeben (Novartis 2015). Die aktuelle Dosis richtet sich üblicherweise hier nach der Plasmakonzentration, welche als Talspiegel gemessen wird. Übliche Marktnamen für Everolimus sind Certican® in Europa, in den USA wird es unter dem Namen Zotress® geführt (Wong et al. 2016). Studien haben gezeigt, dass Alter, Geschlecht und Körpergewicht keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Everolimus haben. Es erfüllt zugleich Kriterien, die ein Therapeutisches Drug Monitoring unabdingbar machen: es hat eine schmale Therapeutische Breite (Shipkova et al. 2016). Für das Therapeutische Drug Monitoring wurden bisher üblicherweise Talspiegelmessungen in Vollblut durchgeführt, der Wert C_0 wurde bestimmt. Dieser lässt sich am besten 1 Stunde vor der nächsten Medikamentenverabreichung messen. In Kombinationstherapien von Everolimus mit weiteren Immunsuppressiva wurde dann ein Zielspiegel von 3-8 ng/L angestrebt. Als alleiniges immunsuppressives Medikament sollte Everolimus einen Talspiegel von 6-10 ng/L erreichen. Für eine optimale Absorption der Medikamente ist es wichtig, sie außerhalb einer Mahlzeit einzunehmen und jeden Tag zur gleichen Uhrzeit (Shipkova et al. 2016). Wird Everolimus zusammen mit Lebensmitteln eingenommen, kommt es zwischen ihnen und dem Medikament zu Interaktionen an den Transportern, vor allem ABCB1 und CYP3A. Somit werden Pharmakodynamik und Pharmakokinetik beeinflusst. Die Pharmakokinetik von Everolimus ist laut bisherigen Forschungsergebnissen sehr schwer vorhersagbar. Mit seiner doch sehr langen Halbwertszeit von 18-35 Stunden erreicht es sein Steady State erst nach 4-7 Tagen (Shipkova et al. 2016).

1.4 Intrazelluläres Therapeutisches Drug Monitoring

Die personalisierte Dosierung der Immunsuppressiva Tacrolimus, Everolimus und Ciclosporin erfolgt entsprechend der Konzentrationsmessung in Vollblut oder Blutplasma. Diese Messungen der Immunsuppressiva wurden bereits vielfach zwischen Laborwissenschaftlern und Klinikern diskutiert und weiterentwickelt. Ziel ist es, geeignete Messmethoden zu finden und deren Ergebnisse richtig zu deuten (Holt et al. 2002). Die

LATDMD-CT (International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology) hat hierzu entsprechende Richtlinien veröffentlicht, auf die man sich geeinigt hatte. Zugleich ist diese dafür zuständig, aktuelle Neuerungen im TDM zu dokumentieren. Auch geht daraus hervor, dass die Methoden des Therapeutischen Drug Monitoring für Tacrolimus, Everolimus und Ciclosporin große Fortschritte machen. Der Goldstandard für die Konzentrationsmessung der Immunsuppressiva war bisher die HPLC-Messung in Vollblut (Holt et al. 2002). Mangelhaft an dieser Technik ist allerdings, dass die Messwerte laborabhängigen Differenzen unterliegen (Holt et al. 2002). Speziell bei den hier untersuchten Immunsuppressiva hat sich allerdings bereits früh gezeigt, dass es große Schwankungen gibt zwischen intrazellulären Messwerten und den Konzentrationen in Vollblut, welche unter anderem im Zusammenhang mit genetischen Polymorphismen der einzelnen Patienten stehen können (Crettol et al. 2008).

Daher sind seit einigen Jahren Verbesserungen bisheriger Verfahren des Therapeutischen Drug Monitoring, insbesondere bei Immunsuppressiva, gefragt (Falck et al. 2008). Mit erweiterten klinischen Studien in der immunsuppressiven Therapie wird erwartet, die Überlebensrate der organtransplantierten Patienten zu erhöhen und die riskanten Vorkommen einer Über- bzw. Unterdosierung zu reduzieren (Wieland und Shipkova 2014). Allerdings ist der Wirkort dieser Medikamente spezifisch in den weißen Blutzellen, sodass zu vermuten ist, dass eine Messung in den Zellen besser als die Messung im Blut mit den Wirkungen und Nebenwirkungen korreliert (Lemaitre et al. 2015). Man erhofft sich daraus ein besseres TDM und somit mehr Erfolg in der Therapie der lebertransplantierten Patienten (Binder 2015). Technisch allerdings sind diese Messungen sehr aufwendig, unter anderem weil beispielsweise freies Ciclosporin an Kunststoffoberflächen haften bleibt, sobald es nicht mehr proteingebunden ist. Zudem ist ein fest definiertes Volumen der Proben wichtig (Binder 2015).

Die Messqualitäten hängen von der Lagerung und Zentrifugation der Proben ab, weshalb diese Medikamente in der medizinischen Praxis gegenwärtig in der Regel im Gesamtblut (*Vollblut*) analysiert werden.

Das ist bereits an einigen Patienten von anderen untersucht worden. Im Rahmen einer Studie mit Nierentransplantationspatienten konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine enge Beziehung besteht zwischen der Everolimus-Konzentration in Vollblut und der intrazellulären Konzentration in den mononukleären Zellen des Blutes (Shipkova et al. 2016).

1.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden multizentrisch angelegten Studie ging es um die Frage, ob durch Messung intrazellulärer Konzentrationen der immunsuppressiven Medikamente nach Organtransplantation besser als bisher die optimale Dosis für den einzelnen Patienten gefunden werden kann. Dies wurde bei Patienten nach Lebertransplantation für die Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus und Everolimus untersucht. In diesem Rahmen war es meine Aufgabe, die gesamten für diese Frage relevanten Daten aus den Patientenunterlagen zu erfassen, in eine entsprechende Datenbank einzugeben, die Daten schließlich zusammenzustellen, übersichtlich darzustellen und wissenschaftlich auszuwerten. Die Behandlung der Patienten lag ausschließlich in den Händen der an den 3 beteiligten Kliniken angestellten Ärztinnen und Ärzte und die Konzentrationsmessungen selbst erfolgten im Labor des Instituts für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen. Daraus ergaben sich für meine Arbeit folgende Teilaufgaben:

- Die Messwerte der drei Immunsuppressiva im Gesamtblut und intrazellulär sollten für alle Patienten deskriptiv dargestellt werden
- Hier sollte insbesondere die Korrelation zwischen Gesamtblut- und intrazellulären Konzentrationen dargestellt werden
- Der Verlauf der Messwerte bei den einzelnen Patienten sollte für alle Patienten und im Einzelnen auch für Patienten mit Komplikationen (Rejektionen und schwere Infektionen) dargestellt werden
- Soweit möglich sollte untersucht werden, ob Gesamtblut- oder intrazelluläre Messungen besser eine Abstoßung oder eine schwere Infektion voraussagen könnten.

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Materialien, Methoden und die Patientenauswahl für die vorliegende Studie beschrieben.

2 Untersuchte Patienten, Material und Methoden

2.1 Klinische Beobachtungsstudie

In diesem Abschnitt werde ich kurz erläutern, um welche Studienform es sich handelt und welche Ziele mit der Studie verfolgt wurden. Danach werde ich die teilnehmenden Universitätskliniken mit Datum des ersten positiven Ethikvotums aufzählen, um im Anschluss zu berichten, wie die Patienten in die Studie eingeschlossen wurden und einen Überblick über den Ablauf geben. Daraufhin werde ich einen Überblick darüber geben, welche wesentlichen Ziele wir mit der Studie verfolgt haben und wie sich die Studie für die Patienten gestaltet hat. Zuletzt werde ich auflisten, welche Laborwerte für uns entscheidend waren.

Die Studie wurde als sogenannte nicht-interventionelle Beobachtungsstudie durchgeführt, das heißt, es wurde nicht in den Behandlungsablauf der Patienten eingegriffen. Diese Studienform wird auch als Kohortenstudie bezeichnet. Ziel der Studie ist es, Datenanalysen und ergänzende Laboranalysen von einer repräsentativen Anzahl an Patienten nach Lebertransplantation durchzuführen mit den folgenden Zielen:

- Definition therapeutischer Zielbereiche intrazellulärer Konzentrationen der Immunsuppressiva: Mit den neuen Zielwerten und den neuen Messmethoden soll es künftig gelingen, die Medikamentendosis noch präziser zu ermitteln
- Korrelation der intrazellulären Konzentration in den mononukleären Blutzellen (itc-TDM) mit den Konzentrationen im nicht fraktionierten Blut (TDM): Der Medikamentenspiegel wird immer parallel in Vollblut und intrazellulär gemessen. Dies ermöglicht einen Vergleich der beiden Werte. Letztlich sollte damit herausgefunden werden, welche Messmethode zuverlässiger ist.
- Exploration innovativer Biomarker für Immunzell-Aktivierungs-Monitoring und Immuntoleranz-Monitoring: Es wurden mehrere Biomarker untersucht. Im Laufe der Studie wird sich herausstellen, wie das TDM damit präziser gestaltet werden kann.

Neben diesen primären Zielen sollten weitere Aspekte statistisch erfasst werden: Infektionen und Rejektionen nach Lebertransplantation, klinische und labormedizinische Parameter, die Hinweise auf Unter- oder Überimmunsuppression geben und unerwünschte Wirkungen der Medikamente.

Die Referenzbereiche, die in der vorliegenden Studie identifiziert wurden und die Marker, die sich als informativ herausstellten, sollen dazu beitragen, die Immunsuppression von Patienten nach Lebertransplantation effektiver und vor allem sicherer und nebenwirkungsärmer zu gestalten.

Die Studie wurde parallel an drei Kliniken durchgeführt: an der Universitätsmedizin Göttingen, am Klinikum Hamburg-Eppendorf und an der Charité Berlin. Finanziell gefördert wurde sie durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen 01ES1102). Am 09.01.2012 erhielten wir die Zusage für Forschungsgelder in Höhe von € 1.431.366,00. Dabei handelte es sich um € 1.192.805,00 nicht rückzahlbare Zuwendung und um eine Projektpauschale in Höhe von € 238.561,00. Diese Gelder waren bewilligt für den Zeitraum von 01.02.2012 bis 31.01.2015. Am 13.11.2014 musste eine Laufzeitverlängerung beantragt werden, da bis dahin noch nicht genug Patienten rekrutiert werden konnten. Gründe dafür waren sicherlich unter anderem die Missstände in den Abteilungen der Transplantationsmedizin, welche aus den Medien bekannt sein dürften.

Für insgesamt vier Zentren wurden jeweils Ethikanträge gestellt. Für Hamburg erhielten wir das positive Ethikvotum am 13.08.2012. Göttingen erhielt dieses am 12.09.2012. Berlin wurde das positive Ethikvotum am 31.01.2013 erteilt. Für das Universitätsklinikum Heidelberg wurde die Zustimmung am 29.09.2014 ebenfalls gegeben, allerdings wurden hier keine Patienten mehr in die Studie eingeschlossen.

Die Patienten wurden nach der Lebertransplantation so früh wie möglich in die Studie eingeschlossen. Sofern ihr gesundheitlicher Zustand eine Einwilligungserklärung zuließ, wurden diese innerhalb der ersten zwei Wochen, maximal jedoch bis zum einschließlich neunten Monat nach Transplantation rekrutiert. Ab dann wurde der Patient für 1 Jahr (bzw. 12-14 Monate) beobachtet. Das heißt, der Patient wurde gebeten, bei seinen Kontrollterminen einen Fragebogen zu seinem Befinden auszufüllen. Zusätzlich wurden für die Studie wichtige Fragen zu Infektionen und Rejektionen sowie Krankenhausaufenthalten durch den behandelnden Arzt beantwortet. Im Anschluss wurde dem Patienten eine geringe Menge Blut abgenommen. Für das routinemäßige Therapeutische Drug Monitoring ist die Blutabnahme ohnehin notwendig. Im Rahmen der Studie erhöhte sich diese Menge geringfügig um 20 ml, dies war jedoch nötig, um Material für die umfangreichen Messungen zu erhalten.

Von besonderem Interesse waren die ersten Wochen nach der Transplantation, da es in dieser Zeit tendenziell am häufigsten zu Rejektionen und Infektionen kommt. Diese Phase eignete sich von daher besonders gut zur Erforschung innovativer Biomarker. Wichtig war, dass die Patienten unbeeinflusst von der Studie weiterbehandelt wurden. Ergänzend zu den im Rahmen der Krankenversorgung regelmäßig durchgeführten Laboruntersuchungen und dem regulären TDM wurden mithilfe innovativer Biomarker Immunreaktionen und die intrazellulären Spiegel der Immunsuppressiva gemessen. Zudem wurde frei zirkulierende DNA des Spenders und des Empfängers im Blut gemessen: Die Menge an freier DNA des Transplantatspenders im Blut des Empfängers ist ein Hinweis auf Abstoßungsreaktionen. Daneben ist frei zirkulierende DNA des Empfängers ein Zeichen für zu hohe Immunsuppression und damit verbundene Zellschäden bzw. Organschäden. Anhand der

ausgewerteten Daten soll es nun möglich werden, zu ermitteln, welche Parameter verwendet werden können, um in Zukunft die Medikamentendosis individuell noch besser zu steuern. Es ergäbe sich daraus auch die Möglichkeit, künftig Patienten mit einer verringerten Medikamentendosis ohne Komplikationen zu therapieren.

Das Studiendesign sah vor, primäre und sekundäre Endpunkte als wesentlichen Maßstab zu verwenden. Bei den primären Endpunkten handelt es sich derzeit im klinischen Alltag übliche Medikamentenkonzentration, welche als Konzentration in Vollblut gemessen werden. Anhand dieser Konzentrationen wurde bisher die Dosis der Immunsuppressiva reguliert.

Als sekundäre Endpunkte bezeichnen wir Infektionen und Rejektionen sowie alle klinischen Laborwerte, welche auf eine Über- oder Unterimmunsuppression hindeuten. Infektionen sind mögliche Folge einer Über-Immunsuppression. Unter Infektionen definieren wir im Rahmen der Studie Verschlechterungen des allgemeinen Gesundheitszustandes, welche für Infektionen typisch sind. Dabei stützen wir uns auf bestimmte infektionstypische Laborwerte und Autopsie-Ergebnisse, vor allem dann, wenn antiinfektive Medikamente gegeben wurden.

Als Rejektion werden alle Verschlechterungen der Gesundheit bzw. der Organfunktion gewertet, die zu einer Rejektionstherapie führen. Ein Todesfall, ein Verlust der Transplantatfunktion oder eine Re-Transplantation wird ebenfalls als Rejektion gewertet, wenn nach klinischer Einschätzung der behandelnden Ärzte und der beteiligten Pathologen die Rejektion die wahrscheinlichste Ursache ist. Natürlich sind histologisch belegte Abstoßungsreaktionen darin enthalten.

Um systematische Fehler zu vermeiden, welche die Aussagekraft der Studie beeinträchtigen könnten, war das Prinzip der Blindung entscheidend: Im Rahmen der gewöhnlichen Routineuntersuchungen wurden mithilfe der Blutproben Biomarker entworfen, welche frühzeitig Infektionen und Rejektionen erkennen ließen. Entsprechend des Prinzips der Blindung wurden die Marker jedoch ausschließlich für die Statistik zur Verfügung gestellt und nahmen keinerlei Einfluss auf die Therapie des Patienten.

Zur Durchführung der Studie wurden die Patienten circa 1 Jahr ab Transplantation beobachtet. Innerhalb dieses Jahres fanden Visiten und Hospitalisierungen statt. Aus den üblichen Visitenterminen wurden für die Studie geeignete Zeitpunkte für Visiten festgelegt. Dies ist wichtig, um vergleichbare Werte von allen Studienteilnehmern zu erhalten. Neben diesen festgelegten Visitenterminen kamen im Fall von Komplikationen wie Rejektionen oder Infektionen sogenannte Zusatzvisiten hinzu. Der Zeitplan sah wie folgt aus:

Ein wichtiger Parameter, welcher allerdings zeitlich unabhängig gemessen wurde, betrifft die Pharmakogenetik. Dabei wurde eine Genotypisierung der relevanten Transporter der Leukozyten vorgenommen (MDR1, CYP3A4, etc.), um gegebenenfalls relevante

Genvarianten zu erkennen. Zu jeder Visite wurden Events aufgezeichnet. Dazu zählten Krankenhausaufenthalte, Rejektionen und Infektionen.

Die wesentlichen erfassten Daten bestehen zum einen aus den routinemäßig durchgeführten Messungen der Immunsuppressiva-Spiegel in Vollblut und zum anderen aus den neu entwickelten Biomarkern. Routinemäßig gemessen werden:

- **cCSA:** Ciclosporin im Blut
- **cTac:** Tacrolimus im Blut
- **cEve:** Everolimus im Blut

Zusätzlich zu den routinemäßigen Visiten wurden 20 ml venöses Blut entnommen, um folgende Werte zu bestimmen:

- **icCSA:** Intrazelluläres Ciclosporin
- **icTac:** Intrazelluläres Tacrolimus
- **icEve:** Intrazelluläres Everolimus

Tab. 14: Übersicht zum Visitenplan und den jeweiligen erhobenen Parametern.

Visitennummer	Zeitraum nach LTx	TDM	Iic-TDM	B-Zell-Differenzierungsgene	CNA	Klin-Chemische Analysen	Klinische Daten	Aufzeichnung von Events	Pharmakoenergie
0	einmalig								X
1	0 – 10 Tage	X	X	X	X	X	X	X	
2	11 – 30 Tage	X	X	X	X	X	X	X	
3	1 – 2 Monate	X	X	X	X	X	X	X	
4	2 – 4 Monate	X	X	X	X	X	X	X	
5	4 – 8 Monate	X	X	X	X	X	X	X	
6	8 – 10 Monate	X	X	X	X	X	X	X	
7	10 – 14 Monate	X	X	X	X	X	X	X	
Bei Infektion oder Rejektion		X	X		X	X	X	X	
Seriell zur Verlaufsdokumentation		X	X		X	X	X	X	

2.2 Übersicht über die wesentlichen analytischen Verfahren

Für die Durchführung der Konzentrationsmessungen wurden den Patienten im Rahmen der Visiten zunächst Blutproben aus der peripheren Armvene entnommen. Für die labormedizinischen Untersuchungen müssen die Blutproben vorbereitet werden. Da es dabei Unterschiede gibt, je nachdem, ob Messungen in Vollblut oder intrazelluläre Messungen in den PBMCs vorgenommen werden, werde ich in den entsprechenden Abschnitten detaillierter darauf eingehen.

Im Grundprinzip werden für die Messungen 2 Verfahren kombiniert, die Chromatographie (LC für *liquid chromatography*) und die Massenspektrometrie (kurz MS). In der Chromatographie (heute als HPLC für *high performance liquid chromatography* durchgeführt) wird die Substanz, die analysiert werden soll, in Flüssigkeit gelöst über eine so genannte HPLC-Säule geleitet. Die HPLC-Säule ist ein Stahlrohr, das mit Granulat (meist Kieselgel) gefüllt ist, an dem sich Substanzen auftrennen. Grundsätzlich sind in einer HPLC-Säule zwei Phasen: eine stationäre Phase und eine mobile Phase. Die stationäre Phase ist das Kieselgel, die mobile Phase ist unsere Probe. An der Oberfläche des Kieselgels befinden sich funktionelle Gruppen, welche die einzelnen Substanzen aus der Probe unterschiedlich lange festhalten. Dies geschieht unter anderem über Van-der-Waals-Kräfte und Ionenaustausch. Somit findet eine Auftrennung unserer Probe entsprechend der unterschiedlichen Substanztypen (in unserem Fall die unterschiedlichen Immunsuppressiva) nach ihrer Ladung und Masse statt. Die Substanzen werden unterschiedlich schnell von der HPLC-Säule eluiert. Das, was dabei eluiert wird, wird direkt in den massenspektrometrischen Detektor weitergeleitet. Ein Massenspektrometer besteht aus folgenden drei Teilen: Einem Ionisationsgerät, einer Analyseeinheit und einem Detektor. Im ersten Abschnitt wird die Probe zunächst in ihre Gasphase überführt und danach ionisiert. Mithilfe eines elektrischen Feldes werden die Ionen beschleunigt und durchfliegen dann die Analyseeinheit des Gerätes. Hier werden die Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses sortiert. Schließlich werden im Detektor die Ionen entsprechend ihrer Sortierung registriert. Mit der Massenspektrometrie werden Substanzen (in der Regel Moleküle) nicht nur qualitativ nachgewiesen, sondern auch quantitativ bestimmt (Gross 2013). Werden mehrere Massenspektrometer hintereinandergeschaltet, wird dieses bildlich als Tandem-MS bezeichnet oder auch als MS/MS. Die Kombination aus der Flüssigkeitschromatographie und dem Tandemmassenspektrometer wird als LC-MS/MS bezeichnet. Zur Ermittlung der Immunsuppressiva-Konzentration aus den detektierten Proben werden Isotopen-markierte interne Standards verwendet. Dazu wird anfangs zur Blutprobe eine kleine, definierte Menge an Medikament hinzugegeben, welches im Molekül einige Atome trägt, die ein höheres Atomgewicht haben. Da man immer die gleiche Menge davon zugibt, kann man die Analysen immer auf diese Isotopen-markierten so genannten internen Standards normieren.

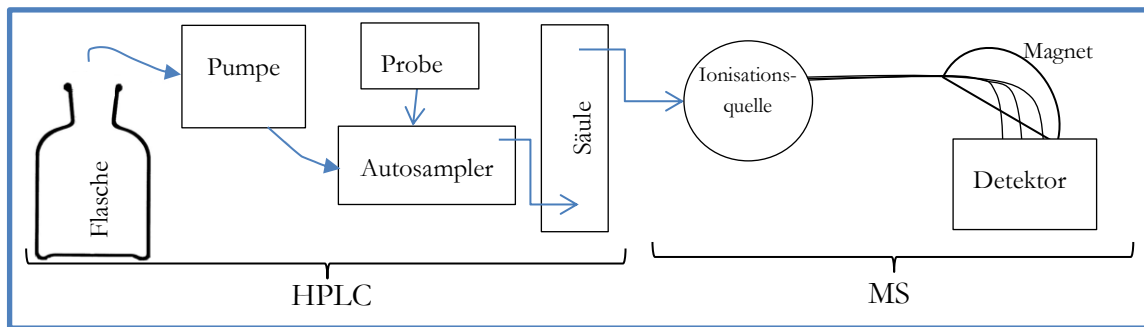


Abb. 1: Aufbau eines HPLC-MS-Gerätes.

2.2.1 Messung in Vollblut

Für die Messung der Immunsuppressiva-Spiegel in Vollblut wird die Blutprobe zunächst vorbereitet. Dazu führen wir eine Proteinfällung in einer Mikrotiterplatte durch. Die Blutprobe wird zunächst mit einem Fällungsreagenz versetzt, welches interne Standards enthält. Der genaue Ablauf findet wie folgt statt: Die Blutprobe und das Fällungsreagenz werden in der Mikrotiterplatte für 15 min bei einer Umdrehungszahl von 1050rpm auf einem Mix Mate (Fa. Eppendorf) gründlich vermischt. Im Anschluss werden die Feststoffe dieses Gemisches in der Zentrifuge für 15 min bei Raumtemperatur und einer Umdrehungszahl von 4400 rpm abgesetzt. Nachdem die Feststoffe abgetrennt wurden, verbleibt nur noch der sogenannte Überstand in der Mikrotiterplatte.

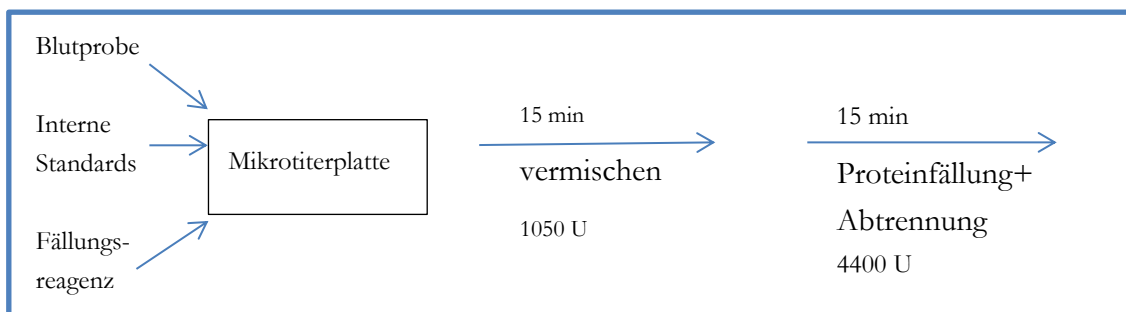


Abb. 2: Probenvorbereitung für die Messung in Vollblut.

U steht für Umdrehungen pro Minute.

Im nächsten Schritt werden 275 μl des Überstandes abgenommen und für die weitere Messung verwendet. Auf dem Weg zur HPLC-Säule (HPLC=High Performance Liquid Chromatography) gelangt der Überstand aus der Mikrotiterplatte über einen Autosampler zunächst in eine Extraktionskartusche und eine Vorsäulenkartusche. Diese dienen der Aufreinigung der Probe und sind der eigentlichen Säule vorgeschaltet. Die HPLC-Säule ist ein Stahlrohr, das mit Granulat (meist Kieselgel) gefüllt ist, an dem sich Substanzen auftrennen. Die Substanzen werden unterschiedlich schnell von der HPLC-Säule eluiert. Grundsätzlich sind in einer HPLC-Säule zwei Phasen: eine stationäre Phase und eine mobile Phase. Die stationäre Phase ist das Kieselgel, die mobile Phase ist unsere Probe. An der Oberfläche des Kieselgels befinden sich funktionelle Gruppen, welche die einzelnen

Substanzen aus der Probe unterschiedlich lange festhalten. Somit findet eine Auftrennung der Probe entsprechend der unterschiedlichen Substanztypen statt, in diesem Fall, entsprechend der unterschiedlichen Immunsuppressiva.

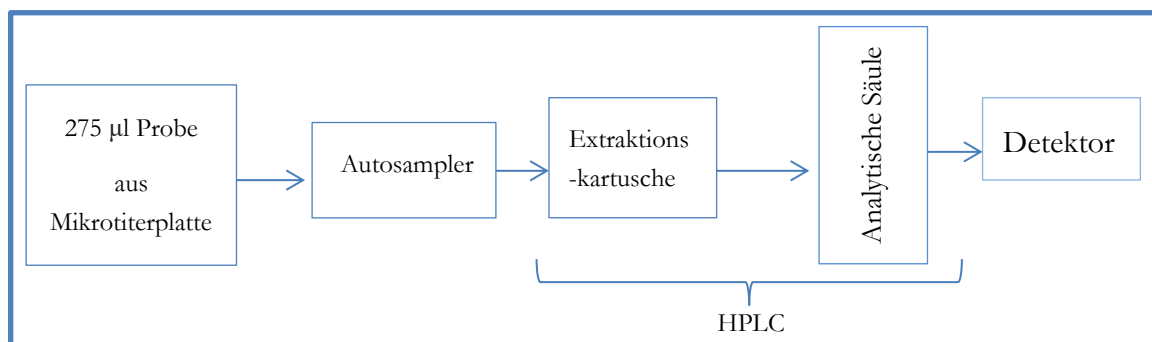


Abb. 3: Ablauf der Probenvorbereitung und HPLC-Trennung.

Nachdem die Probe nun aufgetrennt ist in die einzelnen Substanzen, gelangen diese in das Massenspektrometer. Dazu wird die Probe zunächst mithilfe eines Interfaces ionisiert und fragmentiert. Schließlich werden die einzelnen Massen der Immunsuppressiva detektiert. Ein Computer registriert die gesammelten Daten. Die Datenauswertung findet mithilfe der beigeführten internen Standards statt, welche im ersten Schritt zusammen mit dem Fällungsreagenz der Blutprobe beigemischt worden waren.

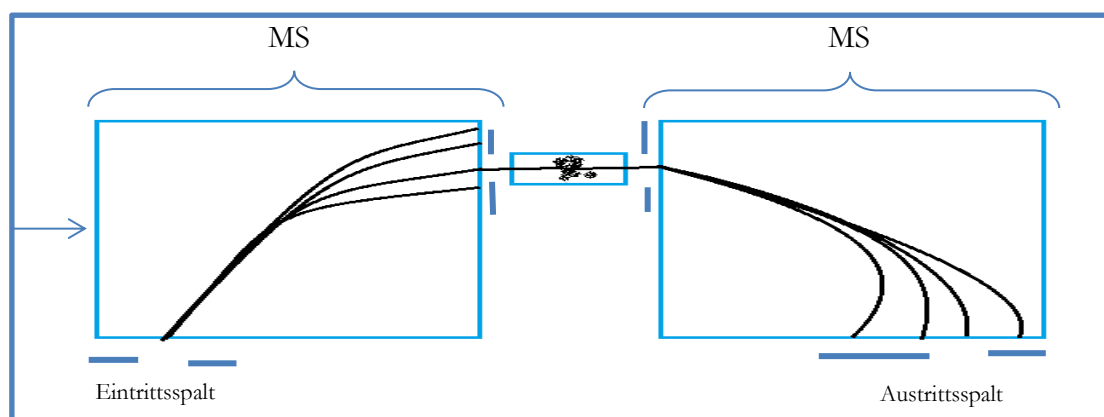


Abb. 4: Aufbau des Tandem-Massenspektrometers.

Links ist die erste massenspektrometrische Auftrennung nach Molekülgröße dargestellt, in der Mitte die weitere Fragmentierung in Fragmentionen und rechts die 2. massenspektrometrische Auftrennung, bevor die Ionen am Austrittsspalt gemessen werden.

Insgesamt erfolgte somit eine qualitative und quantitative Messung der jeweiligen Immunsuppressiva in Vollblut.

2.2.2 Messung in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes

In diesem Abschnitt werde ich die Messmethode für die intrazellulären Immunsuppressiva-Konzentrationen in den *PBMCs* (*PBMC=peripheral blood mononuclear cells*) erläutern.

Zunächst müssen aus den Blutproben die PBMCs isoliert werden. Dies funktioniert mithilfe eines Leucosep-Röhrchens in der Methode nach Ficoll: Die Isolierung von PBMCs mit der Ficoll-Methode beruht darauf, dass diese Zellen eine spezielle Dichte haben. Man füllt für diese Isolierung in ein Röhrchen eine bestimmte Menge an Ficoll (das eigens in der Universitätsmedizin Göttingen entwickelte Ficoll nennt sich Leucosep), einer Flüssigkeit mit relativ hoher Dichte aber geringem osmotischen Druck, und überschichtet diese Ficoll-Lösung mit Blut (aus technischen Gründen vorher 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt). Das wird dann zentrifugiert und die Schicht der PBMCs wird mit der Pipette vorsichtig abgesaugt (s. Abb. 5).

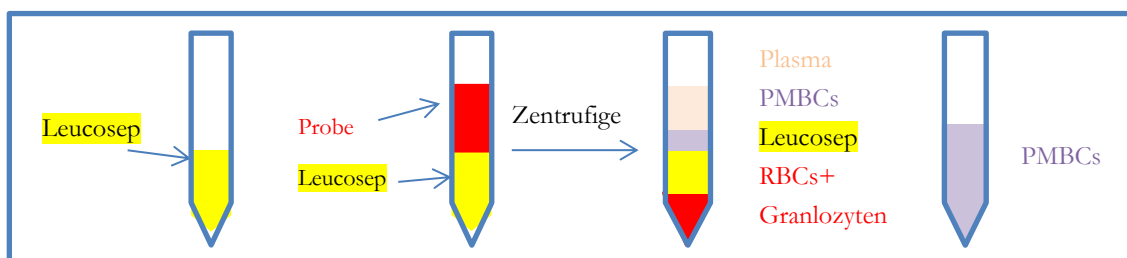


Abb. 5: Isolierung der PBMCs aus den Blutproben nach der Ficoll-Methode.

Diese Zellen werden dann noch einmal durch Zentrifugation vom restlichen Ficoll gewaschen und mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt, bevor definierte Portionen davon eingefroren bzw. gleich mithilfe des HPLC-MS-MS-Verfahrens gemessen wurden.

Nun folgt die Zählung der PBMCs in einer Neubauer-Zählkammer. Eine Neubauer-Zählkammer besteht aus zwei Glasplatten. In die Trägerplatte sind Vertiefungen in definierter Größe und Tiefe eingeschliffen. Darauf ist eine Deckplatte gelegt, wodurch eine Kammer zwischen den beiden Glasplatten entsteht. Nun werden die PBMCs seitlich auf das Glas zwischen die Platten pipettiert, wobei sich die Kammern durch den entstehenden Kapillardruck füllen. Indem nun die Zellen in einem Feld definierter Größe gezählt werden und die Höhe der Kammer genau definiert ist, kann ein Volumen berechnet und somit die Anzahl an Zellen ermittelt werden.

Wenn die Anzahl der Zellen pro Volumen bekannt ist, kann die Probe für die Messung im LC-MS/MS vorbereitet werden. Durch die aggressive Proteinfällung und Zentrifugation platzen die PBMCs, weshalb die Zählung vorher stattgefunden haben muss.

Zunächst wird die Probe mit Internen Standards und einem Fällungsreagenz zusammen in ein 2 ml Schraubgefäß pipettiert. Darin wird es für mindestens 30s vermischt. Im Anschluss wird es bei circa 20.000g für mindestens 5 Minuten zentrifugiert. Somit sind die Feststoffe abgesetzt, wie in Abb. 6 skizziert.

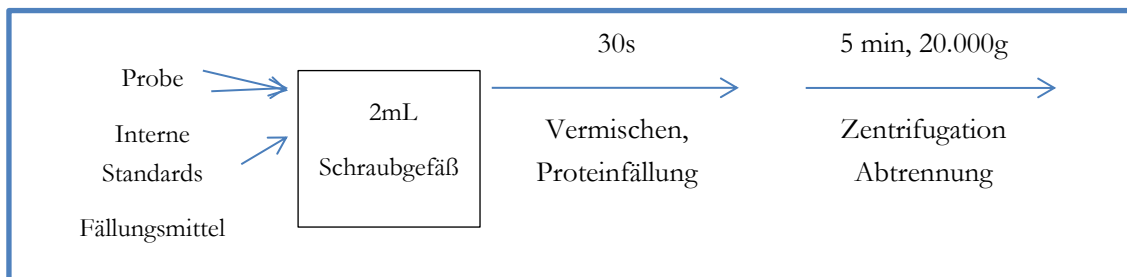


Abb. 6: Probenvorbereitung zur intrazellulären Immunsuppressiva-Konzentrationsmessung.

Nun wird der Überstand in eine Microtiterplatte pipettiert und im Anschluss automatisch über einen Autosampler in das LC-MS/MS-System injiziert. Über den Quotienten aus der PBMC-Probe und dem internen Standard wird schließlich die Menge des jeweiligen Immunsuppressivums ermittelt.

2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung war die Grundlage das Biomaterial aus den drei Zentren Hamburg (Zentrum 1), Göttingen (Zentrum 2) und Berlin (Zentrum 3). Bei den statistischen Auswertungen wurde ich von Herrn Markus Harden (Institut für Medizinische Statistik) unterstützt, das ist jeweils in den Legenden der entsprechenden Tabellen und Graphiken angegeben.

In den drei Zentren wurde für jeden Patienten ein sogenannter *Case Report Form (CRF)*, also ein Erhebungsbogen, der zu jeder Visite ausgefüllt wird, erstellt. Die gesamten Datenordner wurden in Göttingen gesammelt und mithilfe des Datenbankprogramms secuTrial® registriert. Schließlich wurden anhand von Datenbank-Exporten die Auswertungen durchgeführt.

Generell unterscheidet man bei den statistischen Verfahren die deskriptive (also beschreibende) Statistik, explorative Statistik (also eine breite die Daten erkundende Vorgehensweise) und schließlich die *schließende* bzw. induktive Statistik (Meißner und Wendler 2015).

Sowohl in der deskriptiven Statistik als auch in der induktiven Statistik gibt es parametrische und nicht-parametrische Verfahren.

Parametrische Verfahren beruhen einfach gesagt auf der Annahme, dass Messwerte normalverteilt sind. Nichtparametrische Verfahren benötigen keine Voraussetzungen, was die Verteilung der Messwerte angeht (Tab. 15):

Tab. 15: Übersicht über die verwendeten Verfahren.

	Parametrisch	Nicht-parametrisch
Deskriptiv	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mittelwert ▪ Standardabweichung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anteil [%] ▪ Median ▪ Minimum ▪ Maximum ▪ Quartile (1. und 3.) ▪ 95% Konfidenzintervall
Induktiv	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 Gruppen: t-test ▪ Mehrgruppen: Varianzanalyse ▪ Korrelationsanalyse nach Pearson ▪ Regressionsanalysen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Wilcoxon-Test ▪ Rangkorrelationsanalyse

Der Median ist der Wert, welcher exakt in der Mitte der Datenverteilung liegt, unabhängig davon, wie groß die einzelnen Werte sind (Meißner und Freidank 2004). Bei geraden Fallzahlen ist der Median der Mittelwert der mittleren beiden Werte. Es kommt dabei nur auf die Anzahl und den Rang der Werte an. Die Quartile ist, einfach erklärt, ein Wert, welcher auf einer Viertelung der Datenwerte beruht. Dementsprechend beschreibt die erste Quartile den Wert am oberen Ende der ersten 25% der Daten, die dritte Quartile entsprechend den Wert am oberen Ende der 75% der Daten.

Das Konfidenzintervall ist ein Bereich, der mit hoher Wahrscheinlichkeit einen bestimmten prozentualen Anteil der Werte einschließt. Ein Konfidenzintervall von 95% beschreibt einen Bereich, der bei unendlich vielen Messungen 95% der Messergebnisse mit enthält.

Zur Ermittlung des Mittelwertes dagegen wird die Summe aller Datenwerte durch die Anzahl der Werte geteilt. Die Standardabweichung gibt an, wie weit die einzelnen Werte der Datensammlung vom Mittelwert abweichen. Zur Ermittlung der Standardabweichung wird die Differenz aller Einzelwerte zum Mittelwert quadriert, sodann die Summe davon gebildet, danach durch die Anzahl der Messungen (minus 1) dividiert und schließlich davon die Wurzel berechnet.

Wenn es um den quantitativen Zusammenhang zwischen 2 Laborparametern geht, wird vielfach die Korrelations- bzw. Regressionsanalyse verwendet. Die SI-Einheit des Korrelationskoeffizienten in r^2 . Der Exponent 2 hat den Hintergrund, dass es keine negativen Werte ergeben darf. In dieser Arbeit wird r einheitlich als die Wurzel von r^2

angegeben. Mit diesen beiden Verfahren werden Zusammenhänge zwischen zwei metrischen Variablen analysiert. Ein Unterschied besteht darin, dass bei Regressionsanalysen einer der beiden Werte als der richtige angesehen wird, üblicherweise wird dieser auf der x-Achse aufgetragen, während der andere als Fehler-behaftet angesehen wird. Korrelationsanalysen können Zusammenhänge lediglich quantifizieren, ohne dass sie dabei tatsächlich nach dem Ursache-Wirkungs-Prinzip voneinander abhängen müssen. Wesentliche Parameter zur Darstellung der Korrelation und Regression sind der Korrelationskoeffizient nach Pearson: Dessen Wert kann zwischen -1 und +1 liegen, ein Wert von 0 bedeutet, dass kein Zusammenhang vorliegt. Je mehr sich der Korrelationskoeffizient an 1 oder an -1 annähert, desto geringer wird die Streuung um eine gedachte Gerade („Trendlinie“). Wichtig ist dabei zusätzlich die Steigung der Geraden und ihr Schnittpunkt mit der Y-Achse, der sog. Y-Achsenabschnitt.

In die obere Tabelle nicht einzuordnen sind statistische Analysen zum Vergleich der Häufigkeit.

Neben den statistischen Kenngrößen spielen in der statistischen Datenpräsentation und Analyse die graphischen Darstellungen eine große Rolle. Mit einer Häufigkeitsverteilung wird dargestellt, wie häufig eine bestimmte Klasse vorkommt. Mit einer Klasse wird die Eigenschaft der Werte festgelegt. Hier wurden insbesondere Streudiagramme und auch Box-Plots verwendet. Mit den Box-Plots, auch Kastengrafik genannt, werden Lage- und Streuung von Datenwerten anschaulich dargestellt. Dabei entspricht die Box dem Bereich, in dem sich die mittleren 50% der Werte befinden (Meißner und Freidank 2004). Die Box endet damit bei der ersten und dritten Quartile (s. o.). Zur Definition der beiden Ausläufer (Antennen) gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen, die hier im Detail nicht dargestellt sind. Man kann dieses über Minimum und Maximum definieren. Eine andere Methode ist, für diese das 1,5fache des Bereiches zwischen 1. und 3. Quartile nach oben und unten vom Median aufzutragen. Die gestrichelte Linie gibt den Median an, die beiden separaten Punkte sind sog. „Ausreißer“ (s. Abb. 7):

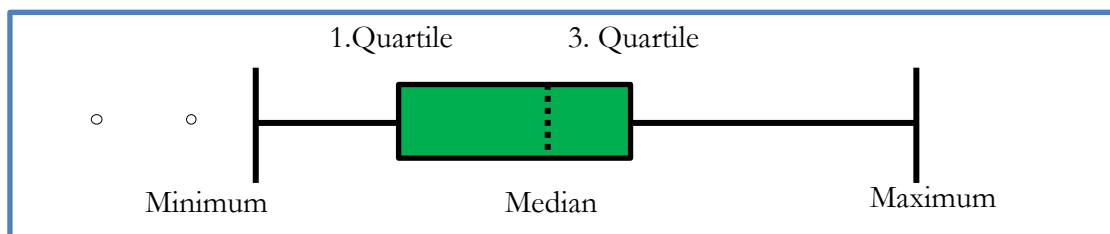


Abb. 7: Aufbau eines Boxplots.

Streudiagramme, auch Korrelationsdiagramme genannt, stellen zwei Variablen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dar. Daran kann die Beziehung zwischen den Variablen erkannt werden. Wenn keinerlei Beziehung besteht, sind die Werte gleichmäßig oder in Form eines runden Punktehaufens verteilt.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden zunächst die wesentlichen demographischen und medizinischen Daten der Patienten dargestellt. Im Anschluss folgt eine deskriptive Darstellung der primären Zielparameter (Vollblut- und intrazelluläre Konzentrationen) und ihre Korrelationen, die Unterschiede je nach Zeitpunkt nach Transplantation sowie eine Zusammenstellung der Laborwerte von Patienten mit und ohne Infektionen oder Rejektionen. Schließlich werden intrazelluläre Zielparameter definiert.

3.1 Untersuchte Patienten

Es wurden von insgesamt 164 Patienten nach Organtransplantation erfolgreich in die Studie eingeschlossen und verwertbare Daten erhoben. Wie in Tab. 14 aufgelistet, waren davon 45,5% Frauen und 55,5% Männer. Die Art der Transplantationen verteilte sich von insgesamt 164 (100%) Transplantationspatienten auf 144 (87,7%) Lebertransplantatempfänger, 3 (1,8%) kombinierte Leber- und Nierentransplantatempfänger und 17 (10,4%) Nierentransplantatempfänger (s. Tab. 16).

Tab. 16: Gesamtzahl der Transplantatempfänger mit Unterscheidung des transplantierten Organs und Geschlechterverteilung.

	N	Anteil [%]
Gesamt	164	100
Transplantiertes Organ		
Leber	144	87,8
Niere	17	10,4
Leber und Niere	3	1,8
Geschlecht		
Männlich	91	55,5
Weiblich	73	45,5
Zentrum		
Göttingen	76	46,3
Hamburg	31	18,9
Berlin	57	34,8

Bei 5 Patienten mussten Re-Transplantationen durchgeführt werden. Dadurch fielen diese 5 Patienten vorzeitig aus, und es waren nur Daten von 159 Patienten auswertbar. Diese große Zahl

an Patienten war erforderlich, um die Studie repräsentativ zu gestalten. Es sollten für jeden Patienten 7 Visitertermine für die Studie aufgezeichnet werden. Für einige Patienten war es jedoch nicht möglich, an allen sieben Visiten teilzunehmen. Zudem wurde die Rekrutierung von Patienten gestört durch den überraschenden Rückgang an Transplantationszahlen. Das war vor allem eine Folge der Datenmanipulationen an einigen Transplantationszentren, welche auch aus den Medien bekannt sein dürften.

Die Altersverteilung gestaltete sich folgendermaßen: Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 18 und 84 Jahre alt. Der Median lag bei 55 Jahren, der Mittelwert bei 53,2 Jahren.

Tab. 17: Altersverteilung der Patienten.

	N	Min	MW	MD	Max
Alter	164	18.0	53.2	55.00	84.0

N gibt die Anzahl der Patienten insgesamt an. Min das Alter des jüngsten, Max das Alter des ältesten Patienten. Mittelwert (MW) und Median (MD) wurden ergänzend angegeben.

Wie Abb. 8 zeigt, war ein deutlicher Peak in der Altersverteilung bei 51-60 Jahren.

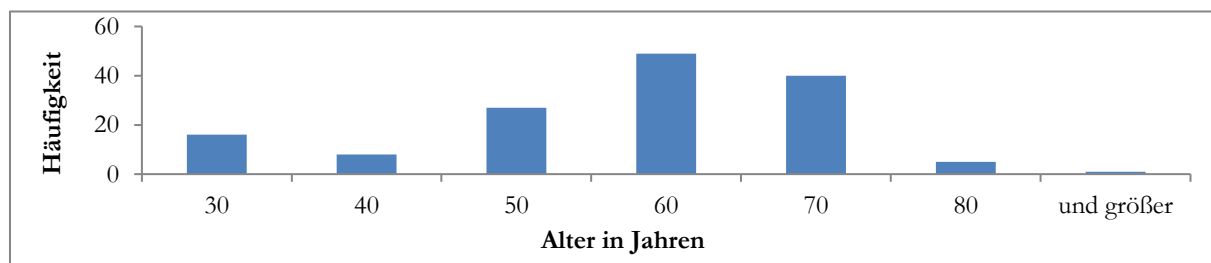


Abb. 8: Altersverteilung der Patienten im Histogramm.

Einen weiteren demographischen Aspekt stellt die Gewichtsverteilung dar. Die meisten Patienten hatten ein Körpergewicht von ca. 80 kg (s. Abb. 9).

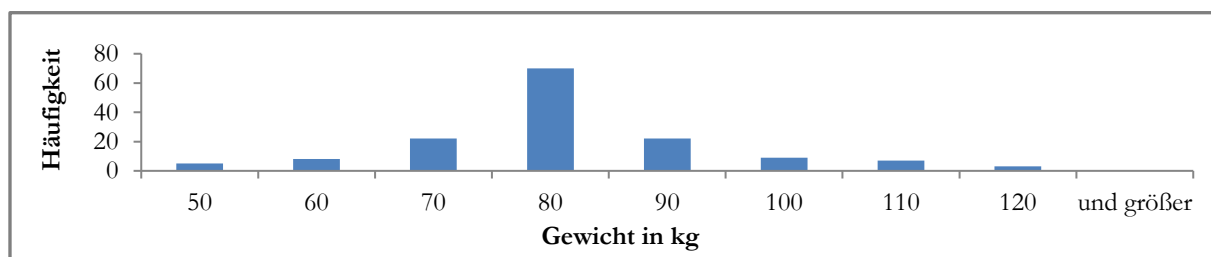


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung des Körpergewichts der Transplantatpatienten.

Die Gründe für eine Lebertransplantation waren vielfältig: Allen voran waren die Hauptursachen Autoimmunerkrankungen (30%), dem folgten Leberzirrhose aufgrund von Alkoholtoxizität (27%), kongenitale Ursachen (17%) sowie Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus (17%). Die restlichen 17% umfassten Hepatitis-B-Virus-Infektionen, ernährungsbedingte Toxizität, toxische Wirkungen von Medikamenten (z. B. Paracetamol) sowie weitere unbekannte Ursachen für ein Leberversagen bzw. eine Leberzirrhose (s. Abb. 10).

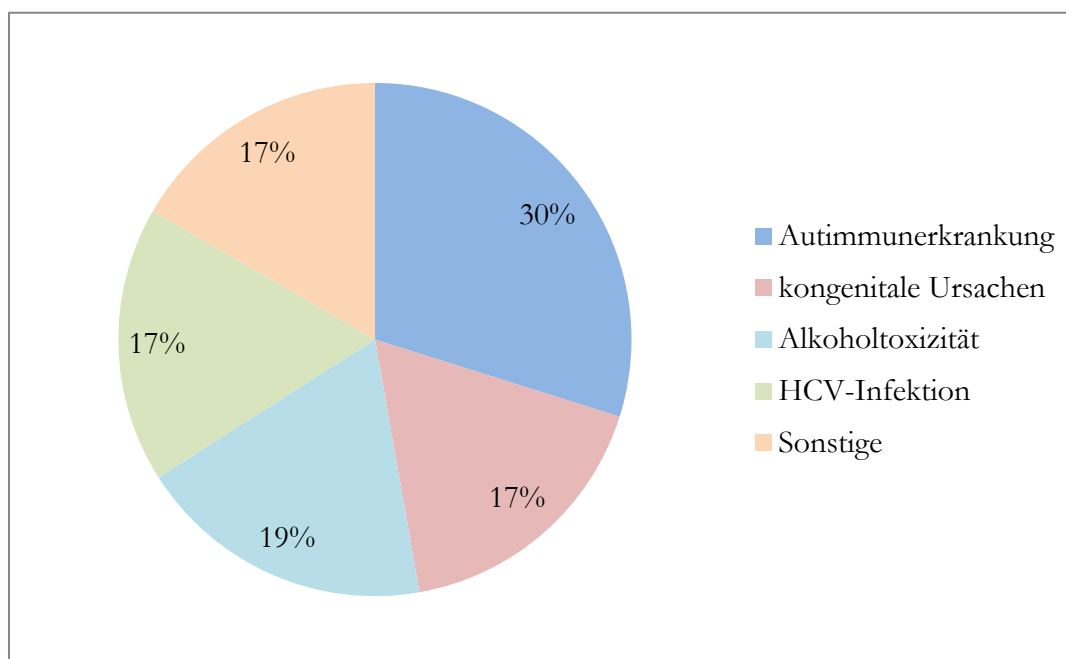


Abb. 10: Ursachenverteilung für eine Lebertransplantation.

3.2 Konzentrations-Messwerte

Insgesamt ergaben sich für die drei Immunsuppressiva 889 Blutproben (Ciclosporin 84, Tacrolimus 641, Everolimus 168), für welche Messwerte in Vollblut und in den PBMCs parallel registriert wurden. Darüber hinaus wurden wesentlich mehr Messwerte erhoben, jedoch wurden nicht alle berücksichtigt, weil entweder nur intrazelluläre oder nur extrazelluläre Messwerte vorlagen. Gründe dafür waren labortechnische Herausforderungen wie zu wenig Probenmaterial oder Messfehler. Zudem wurden zwei Extremwerte bei Tacrolimus gestrichen, da diese Werte in keinem realistischen Zusammenhang zum Rest der Messungen standen. Im Folgenden werde ich auf die drei Immunsuppressiva in gehabter Reihenfolge eingehen. Dabei stelle ich zunächst die Häufigkeitsverteilungen der Medikamentenspiegel in Vollblut dar. Anschließend gehe ich auf die Korrelationen zwischen intrazellulären und extrazellulären Messwerten ein. Schließlich werde ich diese in Beziehung zu den Dosierungen setzen und zuletzt in Beziehung zu den therapeutischen Endpunkten Rejektion und Infektion setzen.

3.2.1 Ciclosporin

Häufigkeitsverteilung der Ciclosporin-Konzentrationen

Insgesamt 32 der Patienten, welche für unsere Studie rekrutiert werden konnten, wurden mit Ciclosporin therapiert. Die Konzentrationen des Ciclosporins in Vollblut lagen zwischen 27 und 290 ng/ml. Entsprechend des unten dargestellten Diagramms waren Konzentrationen >60 und bis 100 ng/ml weit am häufigsten (s. Abb. 11).

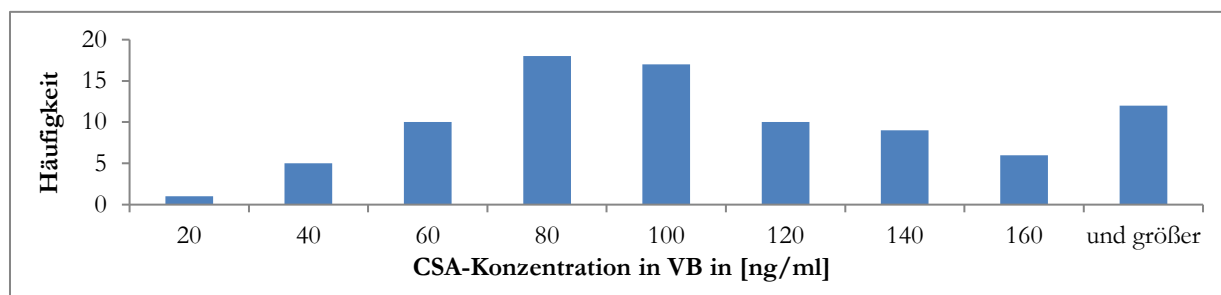


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der CSA-Konzentrationen in Vollblut. Die Balken lassen sich im Histogramm so verstehen: Der höchste Balken über dem Wert 80 ng/ml schließt alle Werte von >60 bis einschließlich 80 ng/ml ein.

Die intrazellulären Ciclosporin-Konzentrationen lagen zwischen 121,81 und 3396,42 pg/1Mio. Zellen. Meist lagen die Werte im Bereich >700 bis 800 pg/1 Mio. Zellen, wie Abb. 12 zeigt.

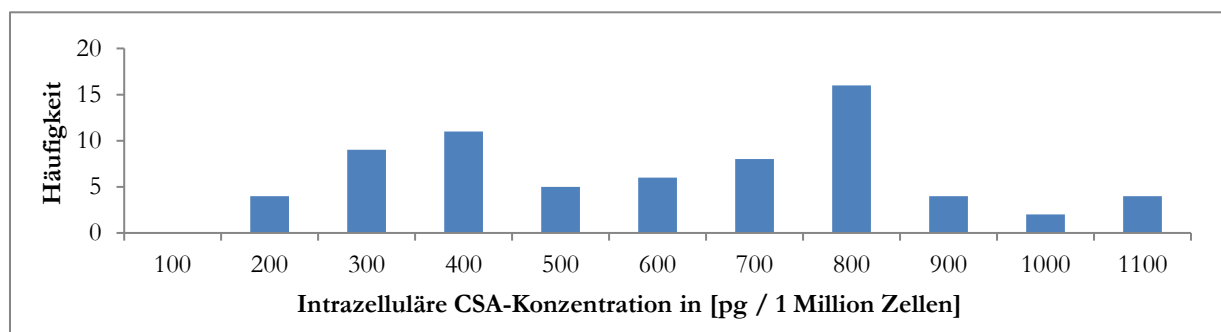


Abb. 12: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären CSA-Konzentrationen.

An dieser Stelle folgt ein Vergleich der in Vollblut gemessenen Spiegel mit den Werten in den mononukleären Zellen. Aus insgesamt 80 Blutproben konnten gleichzeitige Werte in Vollblut und in den PBMCs für Ciclosporin ausgewertet werden. Werden die intrazellulären Ciclosporin-Konzentrationen in Korrelation zu den extrazellulären gesetzt, lässt sich eine Trendlinie ermitteln. Die Steigung liegt bei Faktor 7. Der Korrelationskoeffizient zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Spiegel lag bei $r = 0,41$.

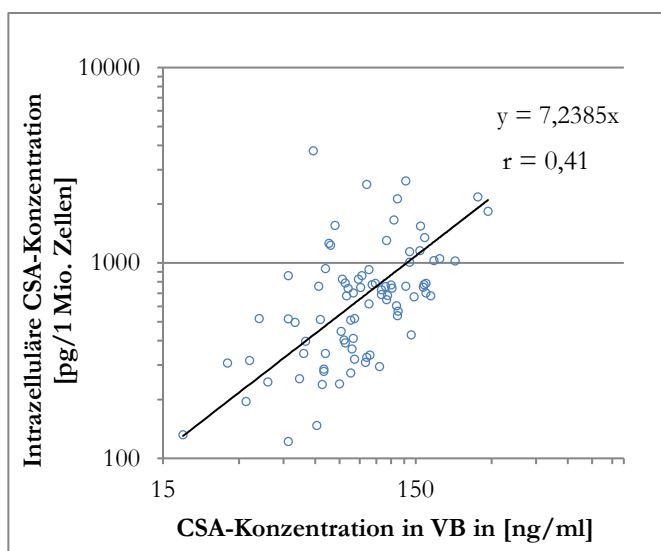


Abb. 13: Korrelation zwischen CSA-Konzentrationen in VB und PBMCs. Die Trendlinie beschreibt die Korrelation zwischen den beiden Konzentrationen. Die CSA-Konzentrationen wurden auf beiden Achsen logarithmisch zur Basis 10 aufgetragen.

Die Ciclosporin-Konzentrationen in Vollblut lagen zwischen 18 und 290 ng/ml, in den mononukleären Zellen lagen sie zwischen 121,8 und 3748,8 pg/1 Mio. Zellen, wie Tab. 18 zusammenfasst.

Tab. 18: Deskriptive Statistik der CSA-Konzentrationen in Vollblut und in den PBMCs.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	KI 95%
cCSA [ng/ml]	84	18,0	66,0	91,5	127,0	290,0	61,0	101,6	49,3	91,1 - 112,2
icCSA [pg/1 Mio. Zellen]	84	121,8	383,4	685,8	877,6	3748,8	811,6	788,83	605,0	659,5 - 918,2

cCSA=Ciclosporin-Konzentration in Vollblut, icCSA=intrazelluläre Ciclosporin-Konzentration, Q1=Erste Quartile; MD=Median; Q3=Dritte Quartile; IQR=Interquartile Rate; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; KI: Konfidenzintervall. Bezüglich der Streuung sind die Werte wegen der unterschiedlichen absoluten Werte nicht direkt vergleichbar, der Variationskoeffizient (SD/MM) war für cCSA 0,49 und für icCSA 0,77, was auf eine größere Streuung der intrazellulären Messungen hinweist.

3.2.2 Tacrolimus

Tacrolimus war das Immunsuppressivum, welches im Verlauf dieser Studie am häufigsten verabreicht wurde. Insgesamt 151 rekrutierte Patienten wurden damit therapiert. Aus der Häufigkeitsverteilung in Abb. 14 geht hervor, dass Tacrolimus-Konzentrationen in Vollblut meist bei >6 bis 8 ng/ml lagen, wobei ein deutlicher Peak bei >6 bis 7 ng/ml liegt.

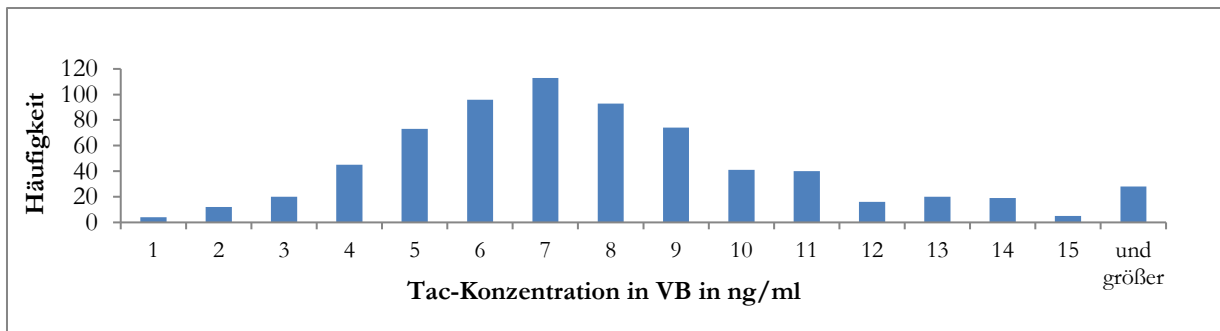


Abb. 14: Häufigkeitsverteilung der Tac-Konzentrationen in Vollblut.

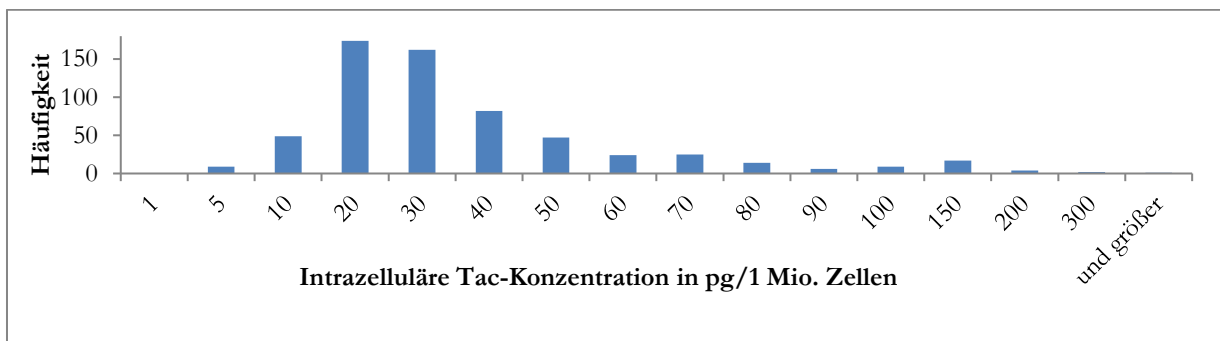


Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären Tac-Konzentrationen. Diese lag in den PBMCs meist bei >10 bis 30 pg/1 Mio. Zellen.

Insgesamt gelang es, für 662 Blutproben zeitgleiche Messungen für Tacrolimus intra- und extrazellulär zu registrieren. Für die Korrelation zwischen der Tacrolimus-Konzentration extra- zu intrazellulär ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,58$, wie in Abb. 16 dargestellt ist.

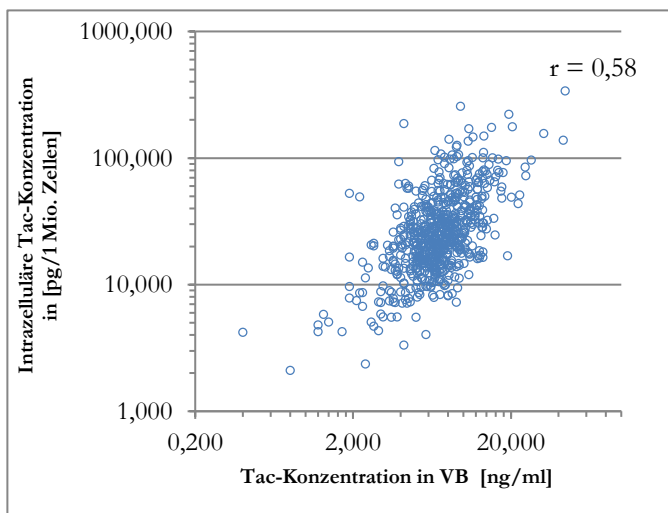


Abb. 16: Korrelation zwischen Tac-Konzentrationen in VB und PBMCs. Die Tac-Konzentrationen wurden auf beiden Achsen logarithmisch zur Basis 10 aufgetragen

In Vollblut lagen die Tacrolimus-Konzentrationen zwischen 0,40 und 44,0 ng/ml, in den PBMCs zwischen 2,0 und 338,7 pg/1 Mio. Zellen, wie Tab. 19 zusammenfasst.

Tab. 19: Deskriptive Statistik der Tac-Konzentrationen in Vollblut und intrazellulär.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	KI 95%
cTac [ng/ml]	662	0,4	5,3	6,9	9,0	44,1	3,7	7,7	4,1	7,4 – 8,0
icTACb [pg/1 Mio. Zellen]	662	2,1	15,8	24,3	38,5	338,7	22,7	33,4	31,4	31,0 - 35,8

Bezüglich der Streuung sind die Werte wegen der unterschiedlichen absoluten Werte nicht direkt vergleichbar, der Variationskoeffizient (SD/MM) war für cTac 0,53 und für icTac 0,94, was auf eine sehr viel größere Streuung der intrazellulären Messungen hinweist.

3.2.3 Everolimus

Insgesamt 62 der rekrutierten Patienten wurden mit Everolimus therapiert. Die Everolimus-Konzentration in Vollblut lag am häufigsten bei >3 bis 5 ng/ml. Ein Peak ist in Abb. 17 bei >3,5 bis 4 ng/ml zu sehen.

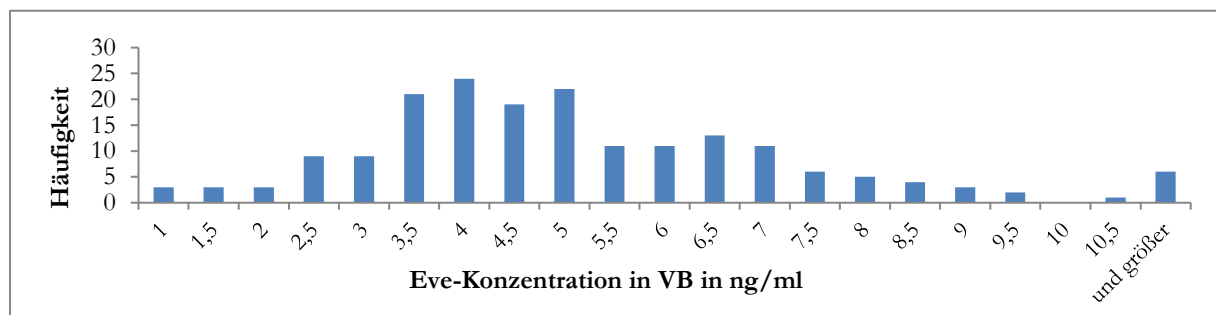


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der Eve-Konzentrationen in Vollblut.

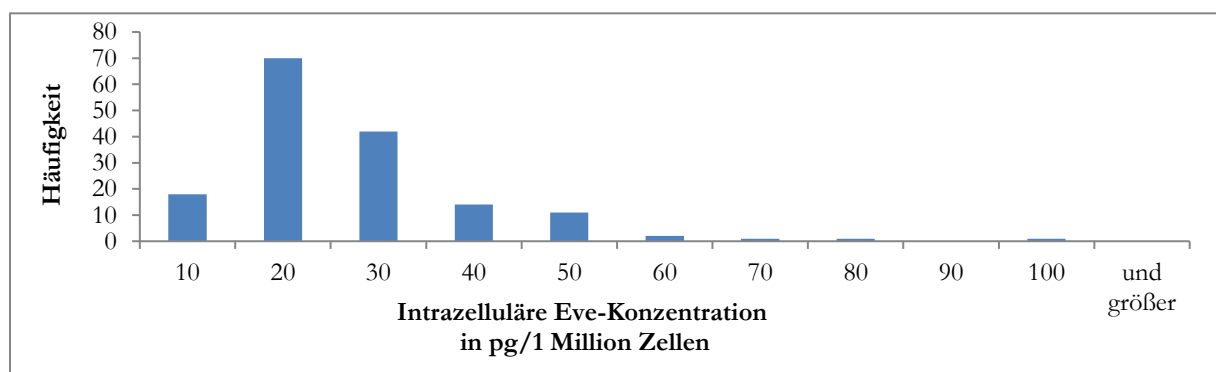


Abb. 18: Häufigkeitsverteilung der intrazellulären Eve-Konzentrationen. Die intrazelluläre Everolimus-Konzentration lag am häufigsten zwischen >10 und 30 pg/1 Million Zellen. Ein Peak ist bei >10 bis 20 pg/1Mio. Zellen zu sehen.

Die Regressionsanalyse zwischen der intrazellulären und der extrazellulären Everolimus-Konzentration ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,50$, wie Abb. 19 demonstriert.

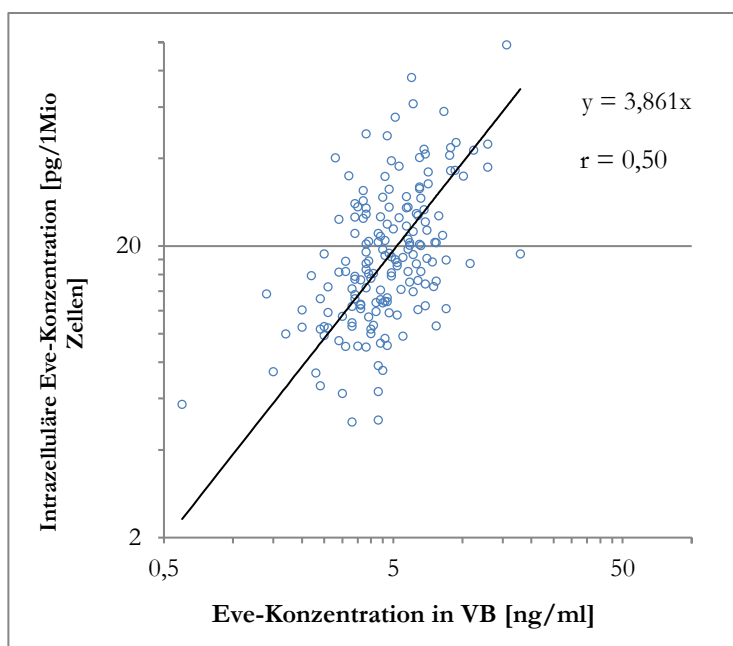


Abb. 19: Korrelation zwischen Eve-Konzentration in VB und PBMCs. Die Trendlinie beschreibt die Korrelation der beiden Konzentrationen. Die Eve-Konzentrationen wurden auf beiden Achsen logarithmisch zur Basis 10 aufgetragen.

In Vollblut lagen die Everolimus -Konzentrationen zwischen 0,6 und 17,9 ng/ml, in den PBMCs zwischen 4,98 und 98,0 pg/1 Mio. Zellen, wie Tab. 20 zusammenfasst.

Tab. 20: Deskriptive Statistik der Everolimus-Konzentrationen in Vollblut und intrazellulär.

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR	MW	SD	KI 95%
cEve [ng/ml]	171	0,6	3,6	4,6	25,7	17,9	22,0	5,2	2,4	4,8 - 5,5
icEve [pg/1 Mio. Zellen]	171	5,0	12,7	17,9	25,7	98,0	13,0	21,2	13,1	19,3 - 23,2

Bezüglich der Streuung sind die Werte wegen der unterschiedlichen absoluten Werte nicht direkt vergleichbar, der Variationskoeffizient (SD/MM) war für cEVE 0,46 und für icEVE 0,62, was auf eine geringfügig größere Streuung der intrazellulären Messungen hinweist.

3.3 Beziehung zu Dosierungen

In diesem Abschnitt wird näher auf die Medikamentendosierung und deren Auswirkung auf den Konzentrationsspiegel eingegangen. Dabei ist von Interesse, ob eine Veränderung der Medikamentendosis eine gleichartige Veränderung sowohl in der Medikamentenkonzentration innerhalb der mononukleären Zellen des peripheren Blutes als auch in Vollblut hervorruft. Immunsuppressiva gehen häufig mit einer großen Variabilität im Blutspiegel einher. Ziel ist es, diese Variabilität möglichst gering zu halten und einen möglichst konstanten Medikamentenspiegel innerhalb des therapeutischen Bereichs zu erhalten. Im Folgenden werden die intra- und extrazellulären Messwerte in Relation zur Dosis gesetzt. Wesentliche Überblicke sollen die dosisnormierten Konzentrationen geben. Dazu werden zunächst die Häufigkeitsverteilungen, die statistische Gesamtschau sowie die dosisnormierten Konzentrationen im Zeitverlauf vorgestellt. Jeweils ein Patientenbeispiel für jedes Immunsuppressivum wird aufgeführt.

3.3.1 Ciclosporin

Zunächst wurde ermittelt, in welcher Relation sich die Ciclosporin-Konzentrationen zur Dosis verhalten. Dazu wurden die Konzentrationen auf die Vortagsdosis normiert und deren Häufigkeitsverteilung statistisch aufgearbeitet. Bei insgesamt 77 der gemessenen Ciclosporin-Spiegeln war es möglich, die entsprechende Vortagsdosis zu registrieren. Die Häufigkeitsverteilung in Abb. 20 zeigt, dass die dosisnormierten Konzentrationen in Vollblut meist einen sehr kleinen Faktor von $>0,3$ bis $0,5$ annehmen. Für die intrazellulären Konzentrationen hingegen fällt eine große Variabilität des Faktors auf (s. Abb. 20f.).

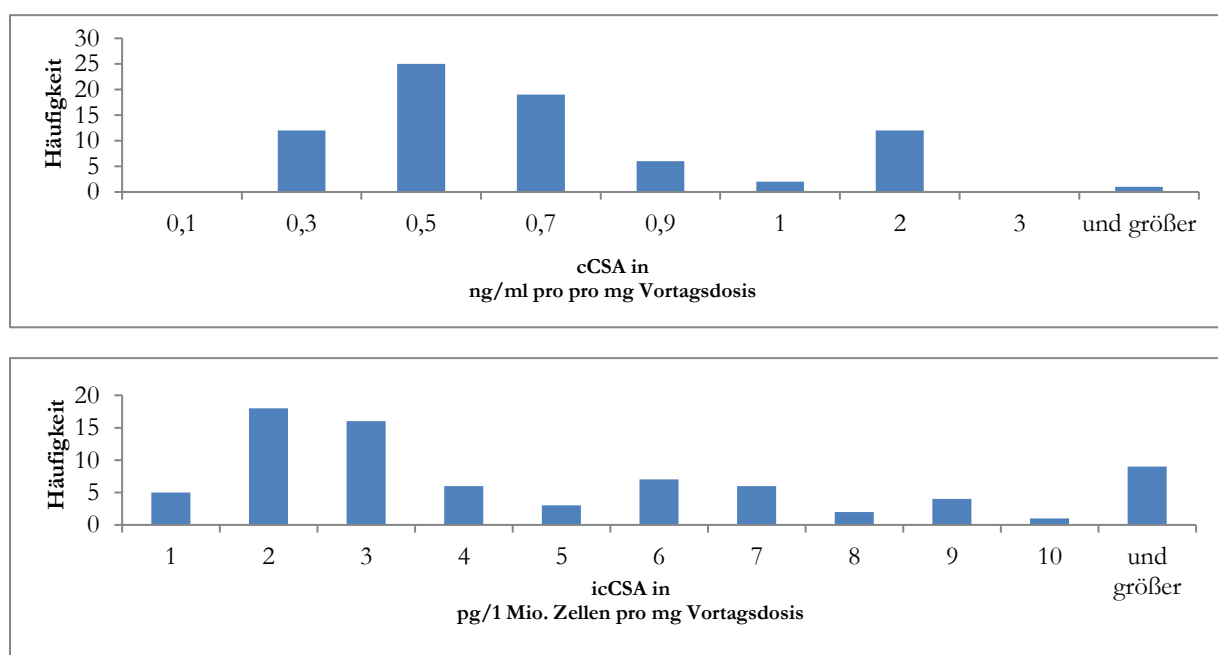


Abb. 20 und 21: Häufigkeitsverteilung der dosisnormierten CSA-Konzentrationen.

Die Variabilität zwischen Dosis und intrazellulärer Konzentration liegt bei dem bis zu 20,6fachen, in Vollblut um den Faktor 3,5 (s. Tab. 21).

Tab. 21: Statistische Gesamtschau zu den dosisnormierten CSA-Konzentrationen.

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
CSA/Dosis [ng/ml pro mg Dosis]	77	0,1	0,6	0,5	0,7	3,5	0,1
icCSA/Dosis [pg/1 Mio. Zellen pro mg Dosis]	77	0,8	1,9	2,8	6,4	20,6	4,5
	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
CSA-Konzentration in VB [ng/ml]	84	18,0	66,0	91,5	127,0	290,0	2,8
CSA-Konzentration intrazellulär [pg/1 Mio. Zellen]	84	121,8	383,4	685,8	877,6	3748,8	13,0

Bei der Betrachtung der Ciclosporin-Konzentrationen im Zeitverlauf in Abb. 22f entsprach Tag 1 bis Tag 500 nach Transplantation dem Umfang aller 7 Visiten. Zwischen der Vortagsdosis und der Ciclosporin-Konzentration in Vollblut ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,20$, für die intrazellulären Konzentrationen lag er lediglich bei $r = 0,02$.

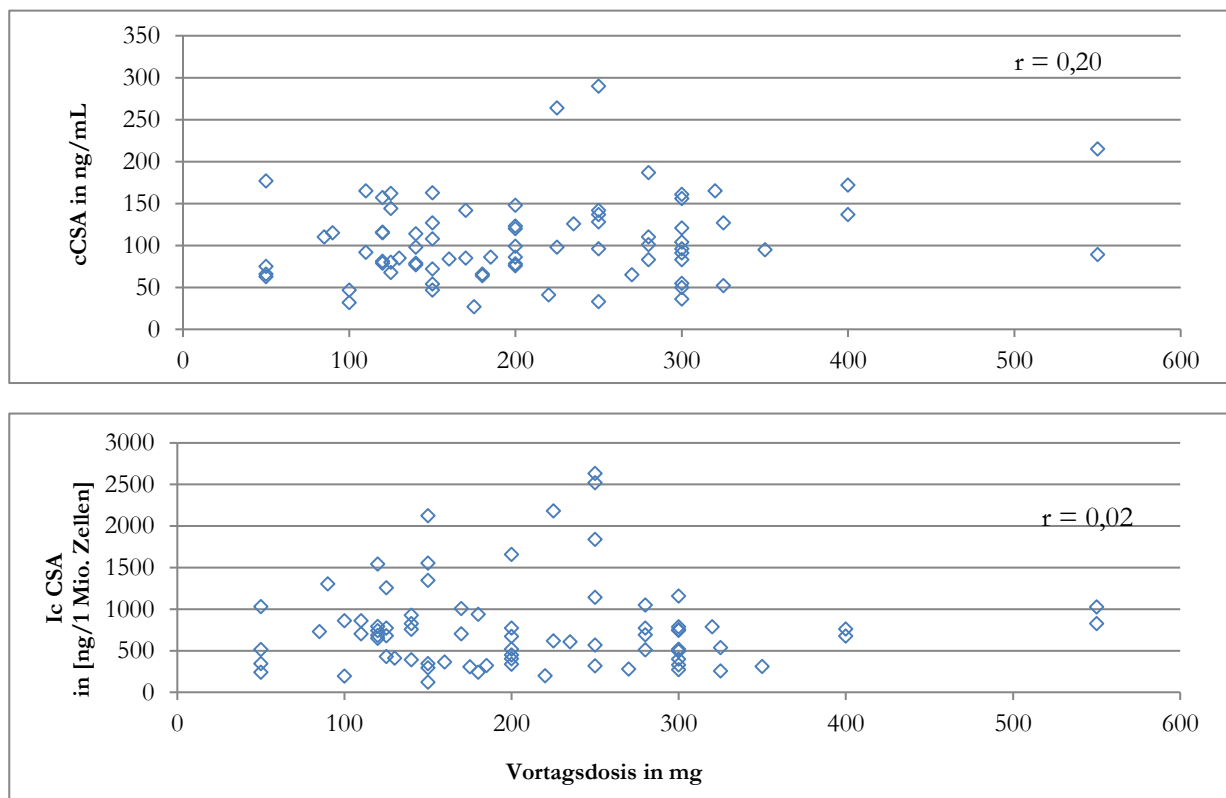


Abb. 22 und 23: Korrelation zwischen Vortagsdosis und cCSA sowie icCSA.

Große Variabilität der dosisnormierten Konzentrationen war lediglich in den ersten Wochen nach Transplantation zu beobachten. Mit der Zeit stabilisierte sich die Relation dessen, was von der Vortagsdosis tatsächlich das Vollblut bzw. den intrazellulären Raum der PBMCs erreicht hatte.

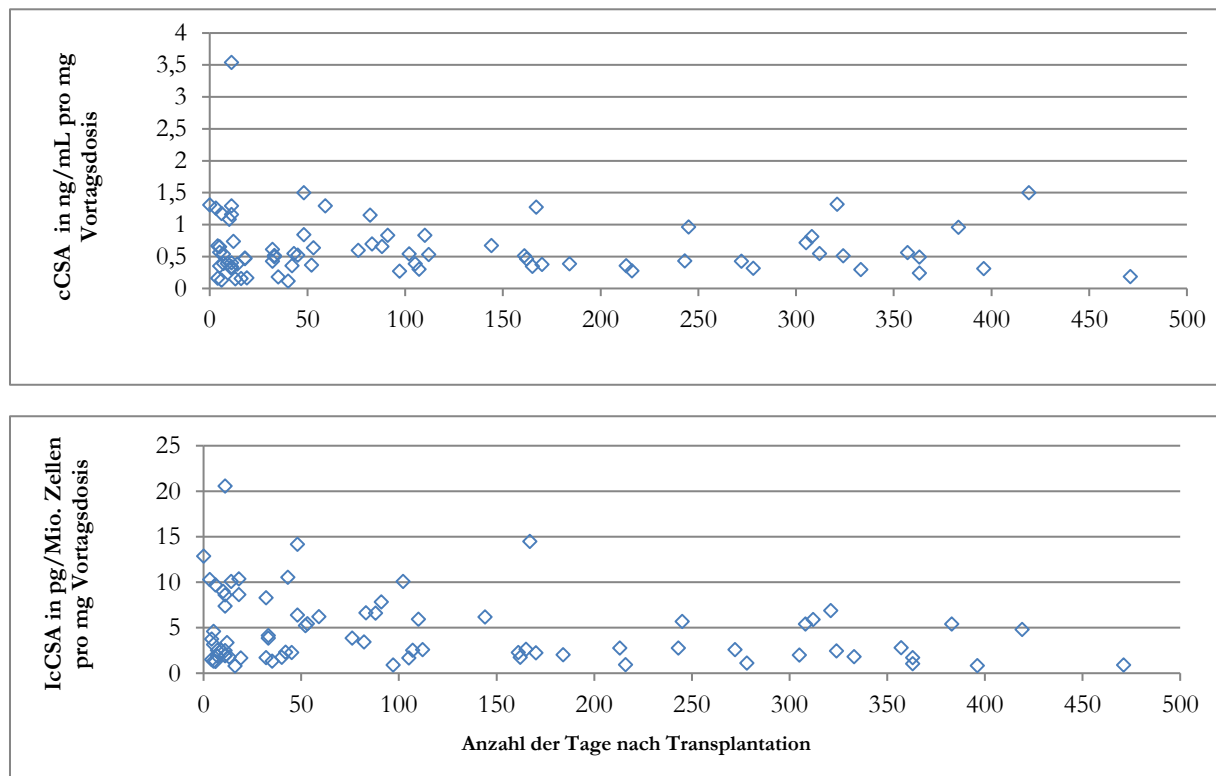


Abb. 24 und 25: Zeitverlauf der dosisnormierten CSA-Konzentrationen.

Tab. 22: Dosisnormierte CSA-Konzentrationen im Zeitverlauf.

cCSA/Dosis in	Zeitspanne	0 - 7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
[ng/ml]	Min	0,1	0,2		0,1		0,3	
	Median	0,6	0,4		0,5		0,5	
	Mittelwert	0,7	0,9		0,6		0,6	
	Max	1,3	3,5		1,5		1,3	
icCSA/Dosis in	Zeitspanne	0 - 7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
[pg/1 Mio. Zellen]	Min	1,3	1,8		1,32		1,7	
	Median	3,2	3,4		4,13		2,5	
	Mittelwert	4,8	6,3		5,18		4,5	
	Max	12,9	20,6		14,16		14,5	

Abschließend zeigt Abb. 26 beispielhaft einen Patienten nach Lebertransplantation, welcher mit Ciclosporin immunsupprimiert wurde. Der Patient erhielt in den ersten 400 Tagen nach Transplantation Everolimus und Ciclosporin zur Rejektions-Prophylaxe. Auffällig ist, dass sich die Vollblutspiegel teilweise konträr zu den intrazellulären Spiegeln verhalten:

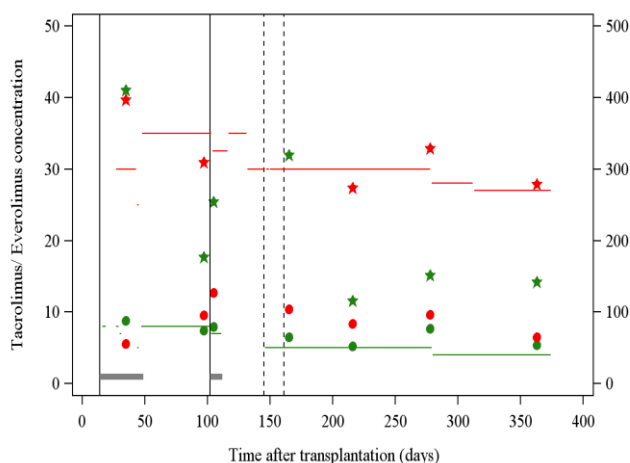


Abb. 26: Zeitverlauf und Blutspiegel der CSA-Medikation am Beispiel eines Patienten. Die roten Markierungen beziehen sich auf Ciclosporin. Die Linien zeigen die Tagesdosis an, die Punkte die CSA-Konzentration in Vollblut und die Sterne die CSA-Konzentration intrazellulär. Die grünen Markierungen beziehen sich in gleicher Weise auf Everolimus. Die Graphik wurde freundlicherweise von Herrn Markus Harden erstellt.

3.3.2 Tacrolimus

Für insgesamt 608 Messungen des Tacrolimus-Spiegels wurde die entsprechende Vortagsdosis registriert. Wie in den Abb. 27f. gut zu sehen ist, variierte (von Extremwerten abgesehen) die Vollblut-Konzentration um das etwa 5fache, während die intrazelluläre Konzentration um das 20fache variierte.

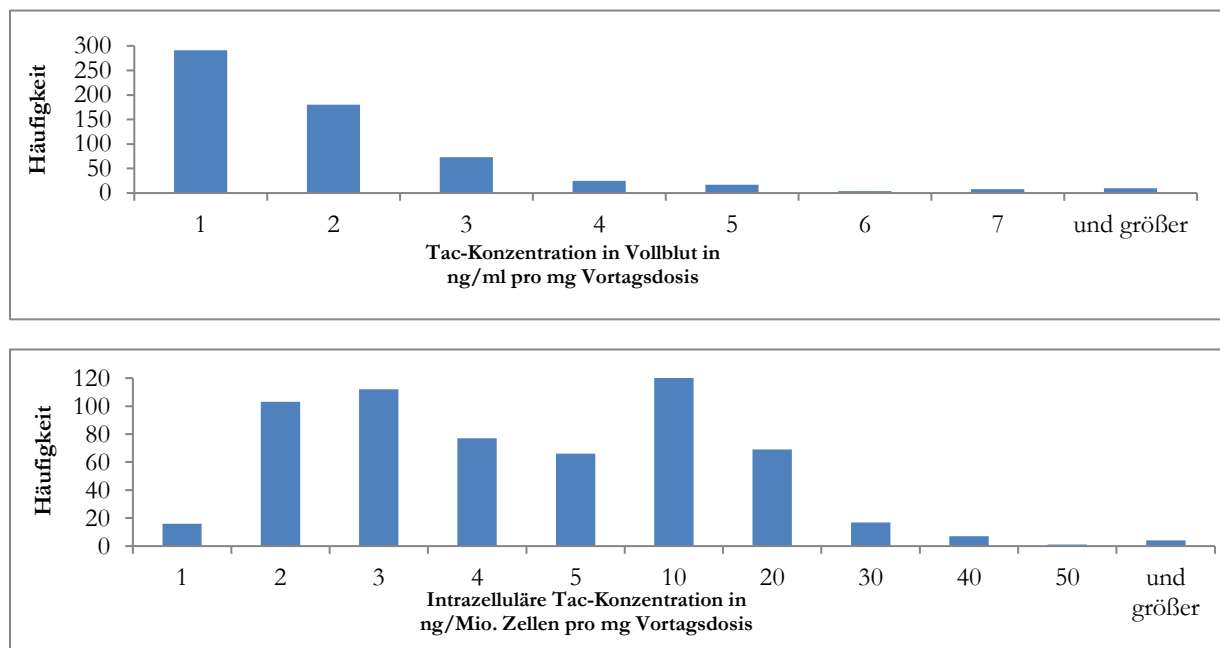


Abb. 27 und 28: Häufigkeitsverteilung der dosisnormierten Tac-Konzentrationen. Wie auch bei Ciclosporin, liegen hier die Werte in Vollblut meist bei 1, weniger oft bei 2 und sehr selten darüber. Für die intrazellulären Werte dagegen ergibt sich eine sehr große Variabilität zwischen Vortagsdosis und gemessenem Spiegel.

Die Gesamtschau zu den dosisnormierten Tacrolimus-Spiegeln zeigt, dass die Variabilität hier intrazellulär um das 94,9fache variiert, in Vollblut um das 18,7fache. Die Korrelationen zwischen Vortagsdosis und cTac lag bei $r = 0,07$ sowie zwischen Dosis und icTac bei $r = 0,16$.

Tab. 23: Statistische Gesamtschau zu den dosisnormierten Tac-Konzentrationen.

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
cTac/Dosis [ng/ml pro mg Dosis]	608	0,0	0,7	1,0	1,9	18,7	1,2
icTac/Dosis [pg/1 Mio. Zellen pro mg Dosis]	608	0,3	2,3	4,0	7,2	94,9	4,9
	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
cTac in VB [ng/ml]	662	2,1	15,8	24,3	38,5	338,7	22,7
icTacrolimus [pg/1 Mio. Zellen]	662	0,4	5,3	6,9	9,0	44,1	3,7

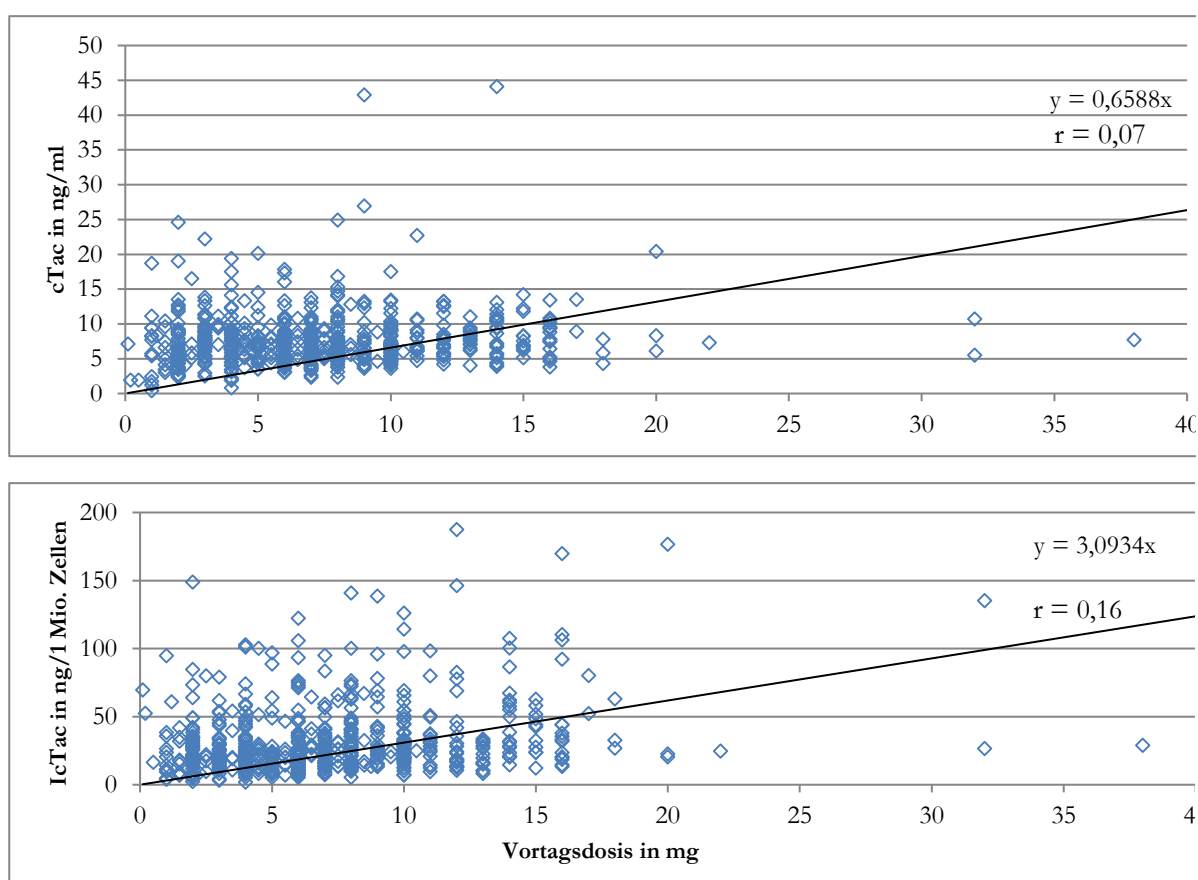


Abb. 29 und 30: Korrelationen zwischen Vortagsdosis und cTac sowie icTac.

Für die Beschreibung des Zeitverlaufs der dosisnormierten Tacrolimus-Konzentrationen wurden aus Gründen der Anschaulichkeit zwei unrealistisch hohe Messwerte gestrichen (icTac/Dosis=698,11 und 263,16 pg/1 Mio. Zellen pro mg Vortagsdosis). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um fehlerhafte Werte handelte. Aus den beiden Zeitverläufen wird deutlich, dass sich die große Variabilität vor allem direkt nach der Transplantation einordnen lässt. Im Laufe der Zeit stabilisieren sich die Spiegel, wie die Abb. 31f. zeigen.

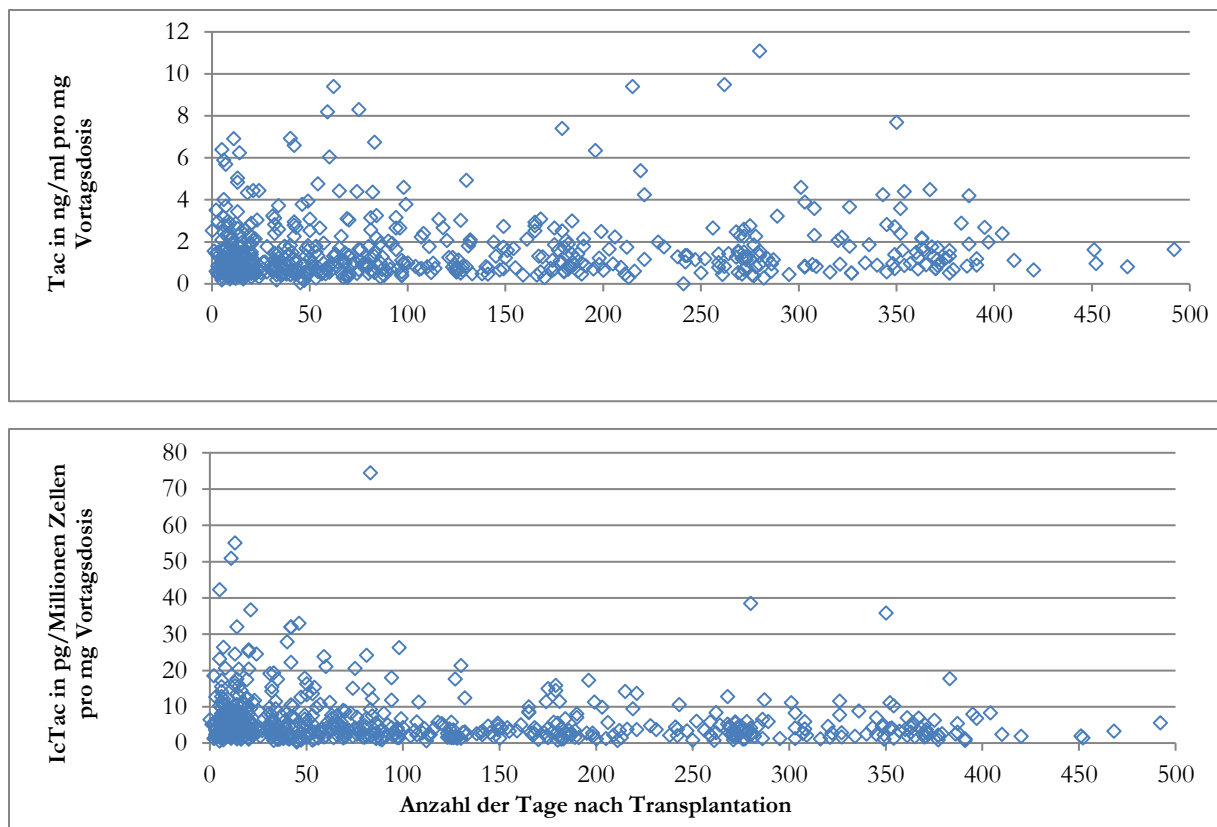


Abb. 31 und 32: Dosisnormierte Tac-Konzentrationen im Zeitverlauf.

In der Gesamtschau der Tacrolimus-Konzentrationen in den jeweiligen Zeitabschnitten wird ersichtlich, dass in den Tagen 8-14 die größte Variabilität der Konzentrationen vorliegt:

Tab. 24: Dosisnormierte Tac-Konzentrationen im Zeitverlauf.

Tac/Dosis in [ng/ml]	Zeitspanne	0 - 7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
Min		0,5	0,9	1,0	0,3	0,9	0,6	0,7
Mittelwert		7,3	8,5	7,5	7,0	6,6	4,6	4,8
Median		4,9	4,6	5,2	4,5	4,0	2,9	3,6
Max		42,3	94,9	36,7	33,0	74,5	21,4	38,5
icTac/Dosis [pg/1 Mio. Zellen]	Zeitspanne	0 - 7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
Min		0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,0
Mittelwert		1,7	1,5	1,3	1,6	1,6	1,6	1,7
Median		1,0	0,9	1,0	0,9	1,1	1,1	1,3
Max		12,3	18,7	4,5	9,4	8,3	9,4	11,1

Anhand eines Beispiels werde ich nun auf den Zusammenhang zwischen Dosis, extrazellulärer und intrazellulärer Konzentration für Tacrolimus eingehen. In Abb. 33 ist ein Patient dargestellt während der ersten 400 Tage ab Transplantation. Die Tagesdosis an Tacrolimus wurde regelmäßig

angepasst. Interessant ist hier, dass der intrazelluläre Spiegel sehr stark schwankt, obwohl nur wenig an der Dosis verändert wurde.

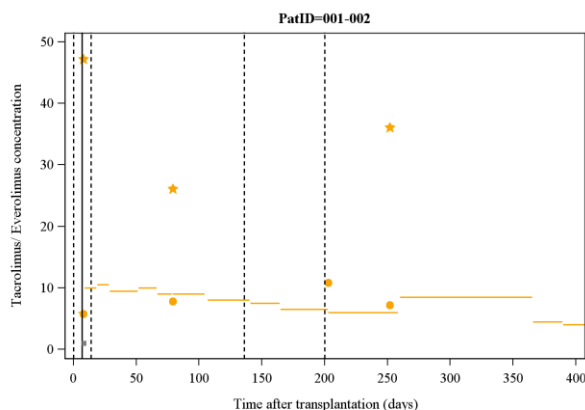


Abb. 33: Zeitverlauf und Blutspiegel der Tac-Medikation am Beispiel eines Patienten. Die gelben Linien zeigen die Tagesdosis an, die Punkte die Tac-Konzentration in Vollblut und die Sterne die Tac-Konzentration in den PBMCs.

3.3.3 Everolimus

Zu insgesamt 154 Patienten konnten Konzentrationsmessungen der gleichen Blutprobe in Vollblut und intrazellulär durchgeführt werden. Wie man in den folgenden Abb. 34f. sieht, variierte die Vollblutkonzentration von Everolimus ähnlich wie diejenige von Ciclosporin und Tacrolimus, während sich bei der intrazellulären Konzentration nach Dosisnormierung eine interessante zweigipflige (bimodale) Verteilung abzeichnete.

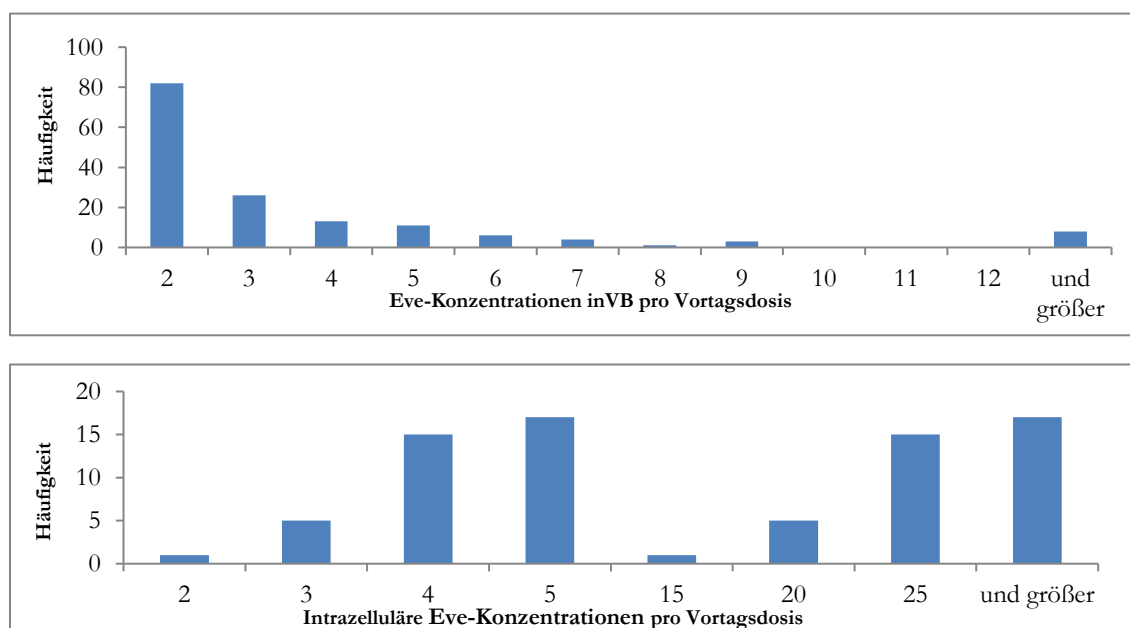


Abb. 34 und 35: Häufigkeiten der dosisnormierten Eve-Konzentrationen. Auch hier liegt der Faktor der extrazellulären Konzentration zur Vortagsdosis mit einem Peak bei 2 deutlich einheitlicher. Im Gegensatz dazu weichen die intrazellulären Everolimus-Konzentrationen von den Vortagsdosen sehr weit ab.

Die folgende Gesamtschau der Everolimus-Konzentrationen in Tab. 25 zeigt, dass die Relation von intrazellulärer Konzentration zur Dosis um das bis zu 315,2fache variiert, in Vollblut um das 31,2fache. Die Korrelationen zwischen Vortagsdosis und cEve lag bei $r = 0,26$ sowie zwischen Dosis und icEve bei $r = 0,03$.

Tab. 25: Statistische Gesamtschau der dosisnormierten Eve-Konzentrationen.

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
Eve/Dosis [ng/ml pro mg Dosis]	154	0,3	1,2	1,9	3,4	31,2	2,2
icEve/Dosis [pg/1 Mio. Zellen pro mg Dosis]	154	0,6	4,1	7,8	14,3	315,2	10,2
	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR
cEve [ng/ml]	171	0,6	3,6	4,6	6,4	17,9	2,8
icEve [pg/1 Mio. Zellen]	171	5,0	12,6	17,8	25,3	98,0	13,0

Eve=Everolimus; icEve=Everolimus in den peripheren mononukleären Zellen

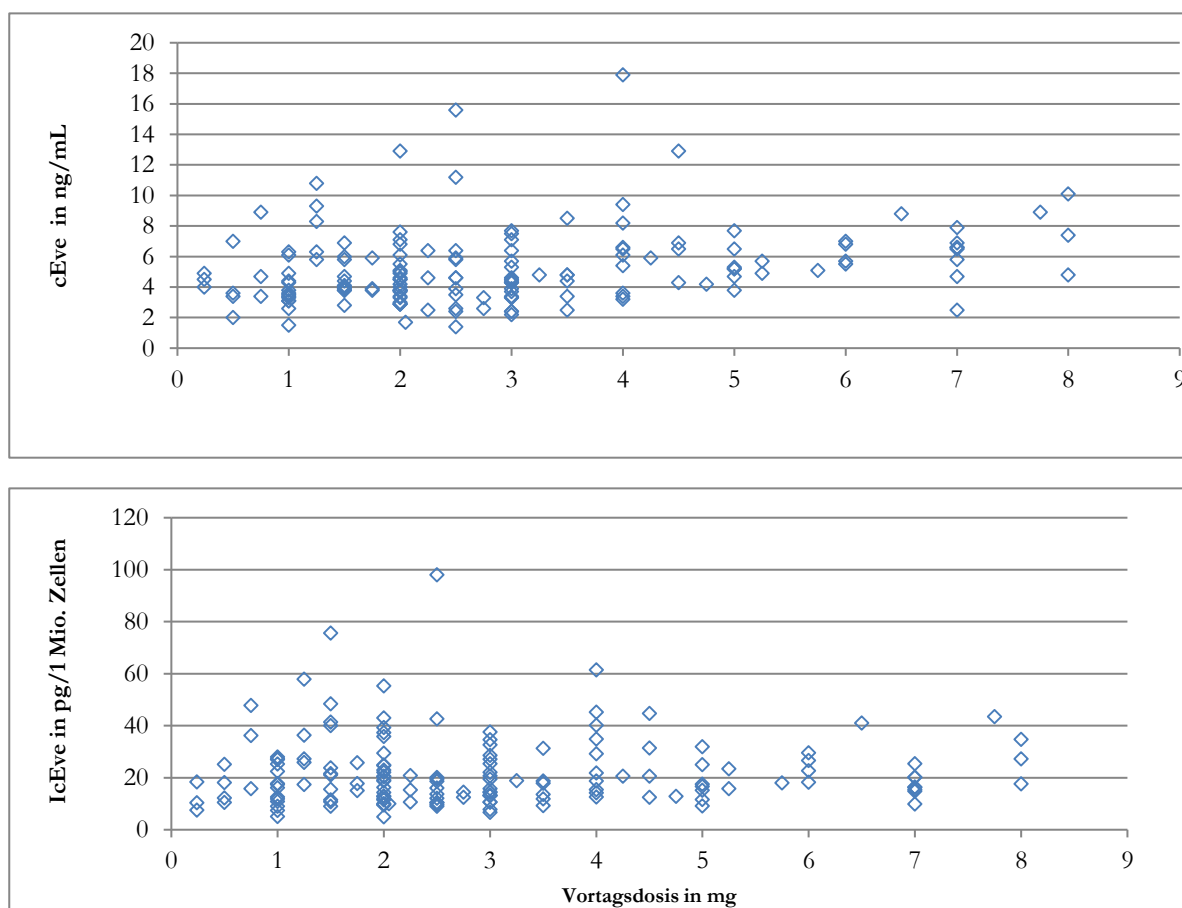


Abb. 36 und 37: Korrelationen zwischen Vortragsdosis und cEve sowie icEve.

Aus den dosisnormierten Zeitverläufen der Everolimus-Konzentrationen wird ersichtlich, dass die Werte bis auf einige Ausnahmen auch ein Jahr nach Transplantation noch um dieselben Faktoren variieren:

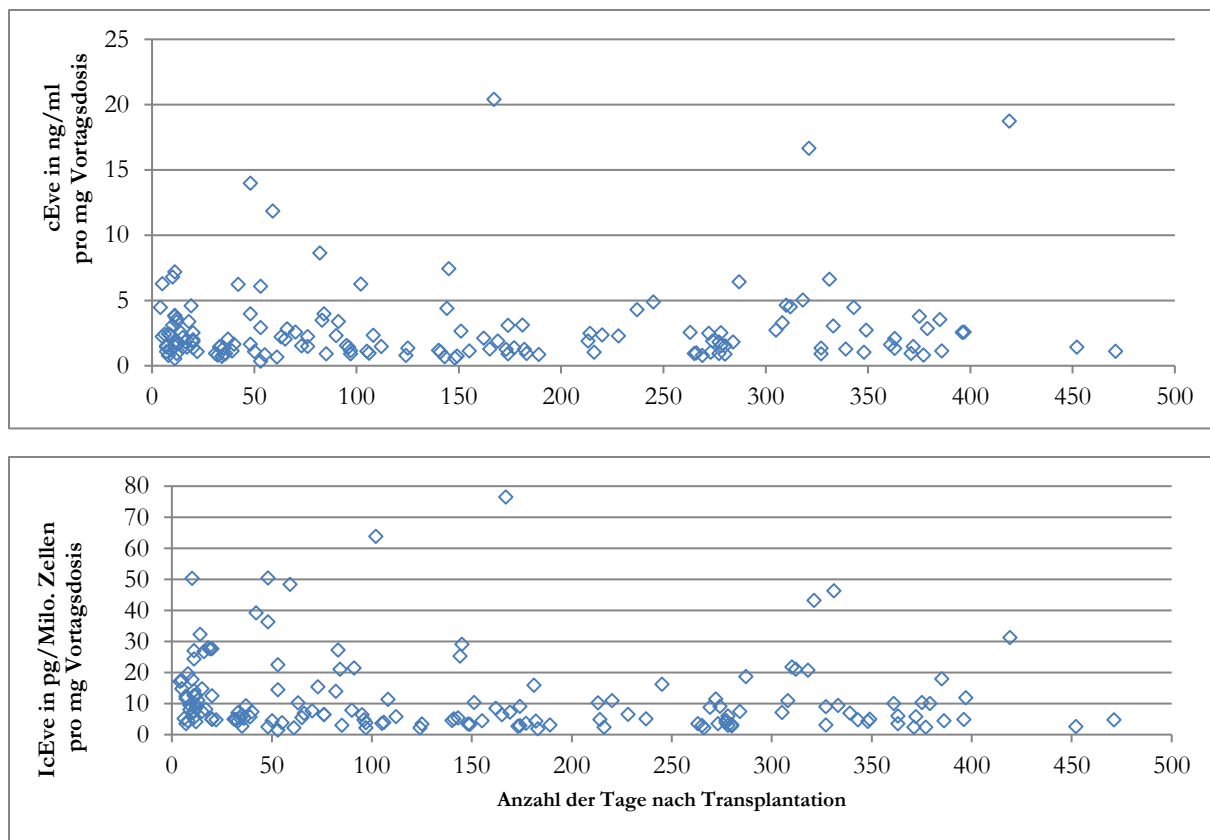


Abb. 38 und 39: Dosisnormierte Eve-Konzentrationen im Zeitverlauf.

Abschließend soll die folgende Tabelle eine Gesamtschau über die dosisnormierten Everolimus-Konzentrationen in Zeitspannen nach Transplantation geben. Auffällig ist hier, dass die Variabilität in der Zeitspanne 101 bis 200 Tage nach Transplantation am höchsten ist (s. Tab. 26).

Tab. 26: Darstellung der dosisnormierten Eve-Konzentrationen im Zeitverlauf.

Eve/Dosis in [ng/ml]		Zeitspanne	0-7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
	Min			0,56	1,10	0,36	0,67	0,60	0,80
	Median			2,41	1,87	1,40	2,23	1,28	1,87
	Mittelwert			2,75	2,16	2,53	2,92	2,61	2,17
	Max			7,20	4,60	14	11,87	20,42	6,45
icEye/Dosis [pg/1 Mio. Zellen]		Zeitspanne	0-7	8 - 14	15 - 28	29 - 56	57 - 100	101 - 200	201 - 300
	Min			4,14	4,75	1,41	2,20	1,82	2,12
	Median			11,79	12,44	5,44	6,77	4,76	4,95
	Mittelwert			15,48	15,20	11,89	11,60	11,66	6,66
	Max			50,29	27,96	50,44	48,32	76,53	18,65

Zuletzt soll Abb. 40 den Zusammenhang zwischen der Everolimus-Dosierung und seinen Konzentrationen anhand eines gewählten Beispiels demonstrieren: Zu sehen ist, dass die sehr hoch gewählte Dosis der Initialtherapie mit hohen intrazellulären Wirkspiegeln einhergeht. In der weiteren Behandlung korrelierten Dosis und Medikamentenspiegel sehr gut. Auffällig ist, dass die intrazellulären Spiegel wesentlich deutlichere Ergebnisse lieferten mit größeren Sprüngen zwischen höheren und niedrigeren Dosierungen.

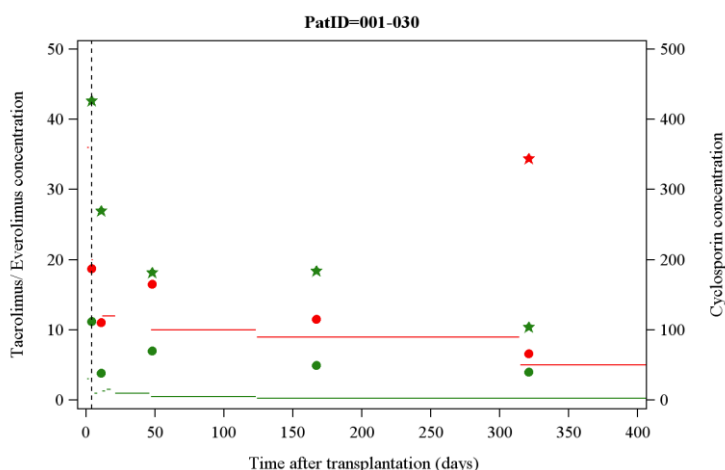


Abb. 40: Übersicht über die tägliche Eve-Dosis, cEve und icEve. Die grünen Markierungen beziehen sich auf Everolimus. Die Linien zeigen die Tagesdosis an, die Punkte die Eve-Konzentration in Vollblut und die Sterne die Eve-Konzentration intrazellulär. Die roten Markierungen beziehen sich entsprechend auf CSA.

3.4 Therapeutische Bereiche

Für das Therapeutische Drug Monitoring sind therapeutische Bereiche der jeweiligen Medikamente grundlegend. Mithilfe von Regressionsanalysen und den bekannten therapeutischen Bereichen in Vollblut wurden intrazelluläre therapeutische Bereiche ermittelt. Die Ergebnisse werde ich im Folgenden darstellen.

3.4.1 Ciclosporin

Für Ciclosporin liegt der therapeutische Bereich in Vollblut zwischen 100 und 300 ng/ml. Der niedrige Wert bezieht sich auf die Erhaltungstherapie, während der obere Wert in der Initialtherapie angewendet wird.

Aus der Studie ergab sich ein intrazellulärer Zielspiegel für Ciclosporin zwischen 670,5 und 1674,6 pg/1 Mio. Zellen, wie Tab. 27 und Abb. 41 übersichtlich zeigen

Tab. 27: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Ciclosporin-Spiegel.

	Vollblut	Intrazellulär	Konfidenzbereich
	[ng/ml]	[pg/1 Mio. Zellen]	95% [pg/1 Mio. Zellen]
Ciclosporin			
Untere Grenze	100	670,5	577,7 - 763,2
Obere Grenze	300	1674,6	1165,7 - 2183,4

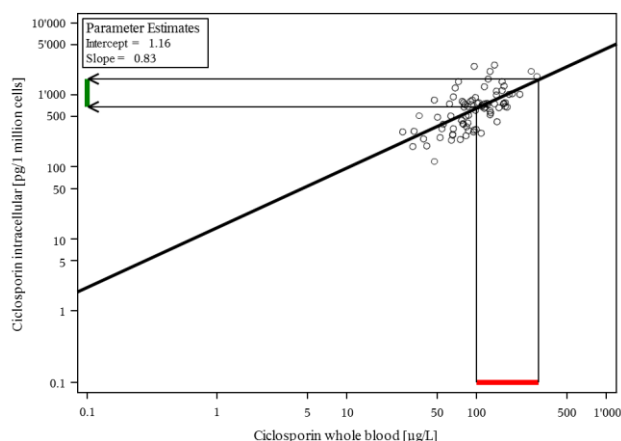


Abb. 41: Korrelation von cCSA und icCSA mit Markierung des therapeutischen Bereiches. Die rote Markierung gibt den in der Literatur gegenwärtig akzeptierten therapeutischen Bereich an. Die grüne Markierung gibt die aus unseren Analysen ermittelte therapeutische Breite für intrazelluläre CSA-Konzentrationen an.

3.4.2 Tacrolimus

Für Tacrolimus liegt der therapeutische Bereich in Vollblut zwischen 4 und 13 ng/ml. Der niedrige Wert bezieht sich auf die Erhaltungstherapie, während der obere Wert in der Initialtherapie angewendet wird. Aus der Studie ergab sich ein intrazellulärer Zielspiegel für Tacrolimus zwischen 14,8 und 45,9 pg/1 Mio. Zellen, wie Tab. 28 und Abb. 42 übersichtlich zeigt.

Tab. 28: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Tacrolimus-Spiegel.

Therapeutischer Bereich	Vollblut	Intrazellulär	Konfidenzbereich
	[ng/ml]	[pg/1 Mio. Zellen]	95% [pg/1 Mio. Zellen]
Tacrolimus			
Untere Grenze	4	14,8	13,6-15,9
Obere Grenze	13	45,9	42,0-49,8

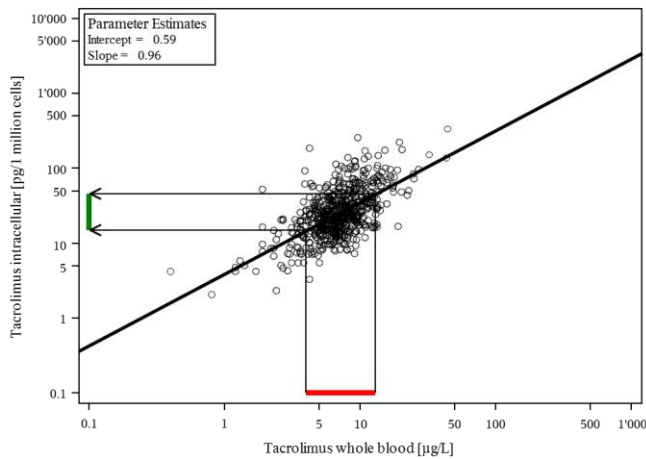


Abb. 42: Regressionsdiagramm der cTac zur icTac mit therapeutischer Breite. Die grüne Markierung gibt die therapeutische Breite für intrazelluläre Tac-Konzentrationen an. Die rote Markierung den therapeutischen Bereich in VB:

3.4.3 Everolimus

Für Everolimus liegt der therapeutische Bereich in Vollblut zwischen 3 und 8 ng/ml, wie in Tab. 29 und Abb. 43 dargestellt:

Tab. 29: Therapeutischer Bereich für intrazelluläre Everolimus-Spiegel.

Therapeutischer Bereich	Vollblut	Intrazellulär	Konfidenzbereich
	[ng/ml]	[pg/1 Mio. Zellen]	95% [pg/1 Mio. Zellen]
Everolimus			
Untere Grenze	3	13,8	12,3-15,3
Obere Grenze	8	26,0	22,8-29,1

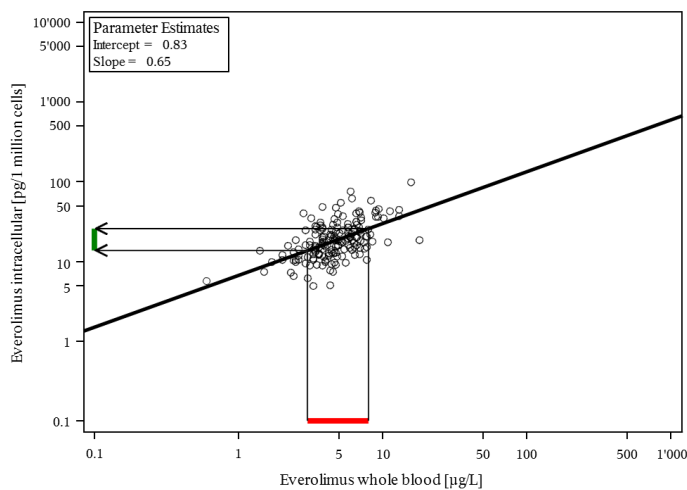


Abb. 43: Regressionsdiagramm der cEve zur icEve mit therapeutischer Breite. Die grüne Markierung gibt die therapeutische Breite für intrazelluläre Eve-Konzentrationen an. Die rote Markierung den therapeutischen Bereich in VB:

3.5 Beziehung zu Rejektionen und Infektionen

Das zentrale Ziel, dass mit der Messung der Blutkonzentrationen bzw. der intrazellulären Konzentrationen verfolgt wird, ist die Reduktion der typischen Komplikationen nach Transplantation, nämlich Rejektion und Infektion. Diese wird im Folgenden zunächst für die Rejektion dargestellt.

3.5.1 Zahl der Rejektionen

Bei 164 Patienten traten insgesamt 73 Rejektionen auf. Wie in Tab. 30 zu sehen, waren lediglich 60,3% der Rejektionen Biopsie-gesichert. Für die Übrigen lag lediglich der klinische Verdacht vor:

Tab. 30: Übersicht über beobachtete Rejektionen mit Fallzahlen.

	Zentrum								
	Gesamt		Hamburg		Göttingen		Berlin		
	N	%	N	%	N	(%)	N	(%)	
Rejektionen	73	100.0	30	100	19	100.0	24	100.0	
Biopsie									
Ja	44	60.3	20	66.7	3	15.8	21	87.5	
Klinischer Verdacht									
Ja	29	39.7	10	33.3	16	84.2	3	12.5	

Für die gesonderte Betrachtung der Immunsuppressiva-Konzentrationen vor Rejektion wurden nur diejenigen Daten einbezogen, welche folgenden Kriterien entsprachen: Maximal 0-8 Tage vor Feststellung einer Rejektion musste der Spiegel des jeweiligen Immunsuppressivums vorhanden sein, damit dieser konkret auf das Ereignis der Rejektion bezogen werden konnte. Unterschieden wurde jeweils nach den drei Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus und Everolimus nach extrazellulären und intrazellulären Messwerten, wobei insgesamt 20 Rejektionen diesen strengen Kriterien entsprachen:

Tab. 31: Zahl der Rejektionen mit aussagekräftigen Immunsuppressiva-Spiegeln.

Immunsuppressivum	N	%
Gesamt	20	100
Ciclosporin	8	40
Tacrolimus	9	45
Everolimus	3	15

Gezählt sind hier die Ereignisse, d. h. der gleiche Patient wird in einigen Fällen mehrfach gezählt.

3.5.1.1 Rejektion unter Ciclosporin

Unter Ciclosporin konnten insgesamt 8 Fälle einer Rejektion registriert werden, zu welchen es Konzentrations-Messungen gab, welche maximal 0-8 Tage zuvor registriert worden waren. In die Aufstellung wurden zum Vergleich die Werte aller Patienten aus Abschnitt 3.1.1 abgebildet. Somit findet hier ein Vergleich der Ciclosporin-Konzentrationen vor Rejektion zu allen Ciclosporin-Konzentrationen statt. Der Mittelwert war vor Rejektion in Vollblut um 11,7% niedriger, intrazellulär um 7,8%.

Tab. 32: CSA-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
CSA vor R	8	32,0	46,5	74,5	95,3	264,0	48,8	90,3	69,7	41,92 - 138,6
[ng/ml]										
icCSA vor R	8	195,1	291,8	507,7	1071,9	2520,6	780,1	727,5	858,3	132,7 - 1322,3
[pg/1 Mio. Zellen]										
	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
CSA (VB)	84	18,0	66,0	91,5	127,0	290,0	61,0	101,6	49,3	91,1 - 112,2
[ng/ml]										
icCSA	84	121,8	383,4	685,8	877,6	3748,8	494,3	788,8	605,0	659,6 - 918,2
[pg/1 Mio. Zellen]										

Die Zahl der Messungen vor Rejektion entsprach der Zahl der Rejektionen, die untere Zahl ist die Anzahl aller durchgeführten Messungen an 32 mit Ciclosporin behandelten Patienten.

In den folgenden Boxplots werden zunächst die Ciclosporin-Konzentrationen in den ersten drei Monaten jeweils ohne nachfolgende Rejektion („no“, blaue Balken) und mit aufgetretener Rejektion „yes“, rote Balken) dargestellt. Die Kriterien wurden hier anders gesetzt als in der obigen Tabelle: Für Patienten mit Rejektion wurden die Immunsuppressiva-Spiegel 40 bis 1 Tag vor registrierter Rejektion einbezogen. Im Boxplot in Abb. 44 zu Ciclosporin-Konzentrationen in

Vollblut in den ersten 3 Monaten nach Transplantation fällt auf, dass die Werte ohne Rejektion im Verlauf oftmals höher lagen als bei Patienten, die keine Rejektion erlitten.

Betrachtet man die intrazellulären Ciclosporin-Konzentrationen, ergibt sich ein überraschendes Bild: Hier zeigt sich im Boxplot, dass viele intrazelluläre Messwerte im Zeitraum von -40 Tage bis -1 Tag vor stattgefundenener Rejektion teilweise höher liegen als ohne Rejektion, insgesamt sind die intrazellulären Konzentrationen wesentlich weiter gestreut. Die Zeiträume beziehen sich insgesamt auf die ersten drei Monate nach Transplantations-Operation.

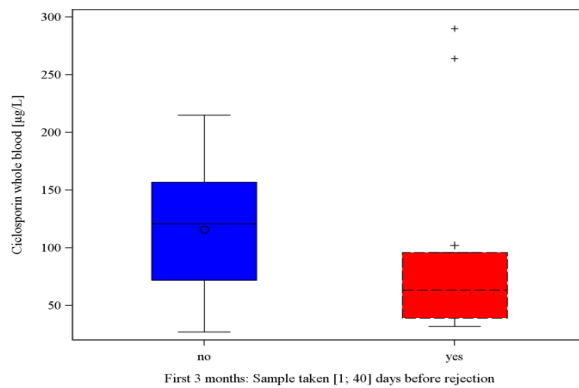


Abb. 44: CSA-Konzentration in VB vor Rejektion.

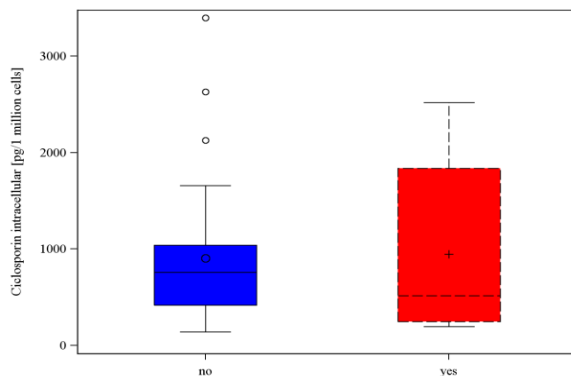


Abb. 45: Boxplot zur CSA-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.

Neben den ersten drei Monaten nach Transplantation war von Interesse, wie sich die Konzentrationsspiegel langfristig nach dieser Zeit vor Rejektion verhalten. Unter Everolimus fanden im Rahmen unserer Studie keine weiteren Rejektionen mehr statt. Dies deutet zum einen darauf hin, dass die Patienten medikamentös gut gegen Rejektionen eingestellt waren, zum anderen ist dies darauf zurückzuführen, dass die Patienten 3 Monate nach Transplantation allmählich stabiler werden.

3.5.1.2 Rejektion unter Tacrolimus

Unter Tacrolimus wurden 9 Rejektionen verzeichnet, welche unseren Kriterien entsprachen. Hierbei fällt auf, dass der Median in Vollblut vor Rejektion höher war. Der intrazelluläre Spiegel verhält sich entsprechend dazu, wie in Tab. 33 zu sehen ist. Der Mittelwert war hier in Vollblut vor Rejektion 7,3% höher, intrazellulär 5,2% höher:

Tab. 33: Tac-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
cTac vor R [ng/ml]	9	4,9	6,1	7,6	8,3	16,8	2,2	8,3	3,3	6,2 - 10,5
icTac vor R [pg/1 Mio. Zellen]	9	12,4	21,8	25,7	56,5	76,6	34,7	35,5	21,7	21,3 - 49,6
	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
cTac [ng/ml]	662	0,4	5,3	6,9	9,0	44,1	3,7	7,7	4,1	7,4 - 8,0
icTac [pg/1 Mio. Zellen]	662	2,1	15,8	24,3	38,5	338,7	22,7	33,4	31,4	31,0 - 35,8

Die Zahl der Messungen vor Rejektion entsprach der Zahl der Rejektionen, die untere Zahl ist die Anzahl aller durchgeführten Messungen an 151 mit Tacrolimus behandelten Patienten.

In den ersten drei Monaten nach Transplantation und im Falle einer nachgewiesenen Rejektion wird im folgenden Boxplot sichtbar, dass die meisten Konzentrationen für Tacrolimus in Vollblut ohne Rejektion meist auf ähnlichem Niveau lagen wie mit Rejektion. Dabei beziehen wir uns auf die Konzentrationen ab 40 Tage bis 1 Tag vor Hinweis auf eine Rejektion. Jedoch sind vereinzelte Werte bei Patienten ohne Rejektion deutlich höher. Für intrazelluläre Tacrolimus-Konzentrationen ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 46): auch hier zeigt sich, dass die meisten Konzentrationen auf ähnlichem Niveau liegen, mit oder ohne Rejektion. Jedoch zeigt sich auch hier, dass vermehrt höhere Konzentrationen auftreten, wenn keine Rejektion auftritt.

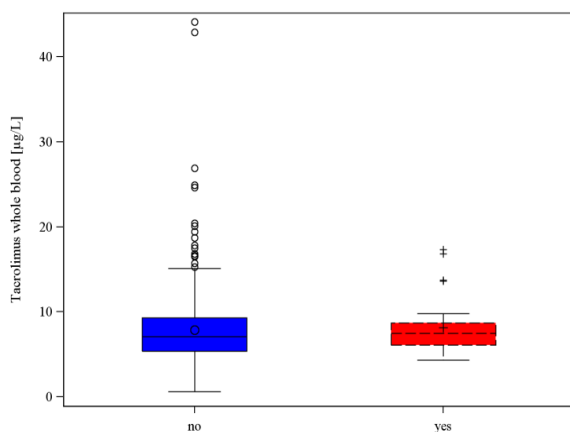


Abb. 46: Tac-Konzentration in VB vor Rejektion.

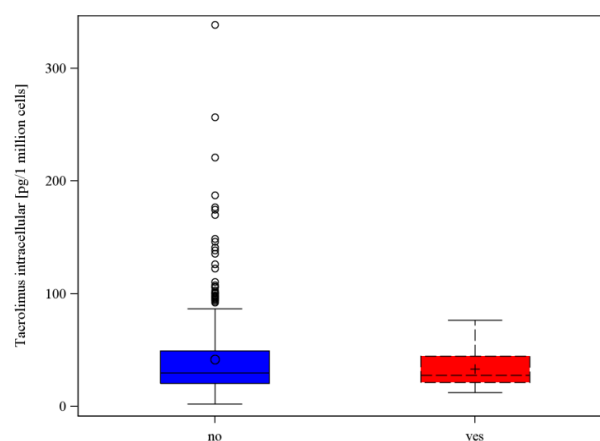


Abb. 47: Tac-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.

Für die Zeit 3 Monate nach Transplantation lag nur ein einzelner Wert für eine Rejektion unter Tacrolimus vor, wie Abb. 48 zeigt:

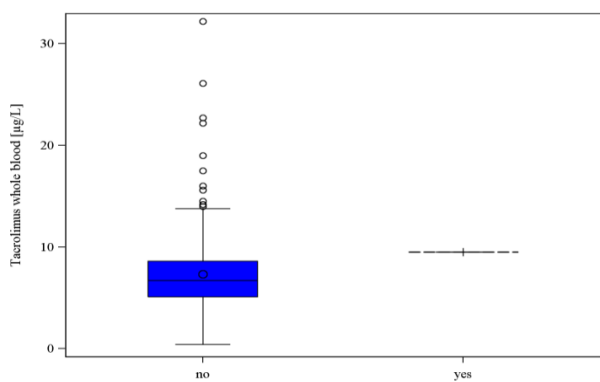


Abb. 48: Tac-Konzentration in VB vor Rejektion.

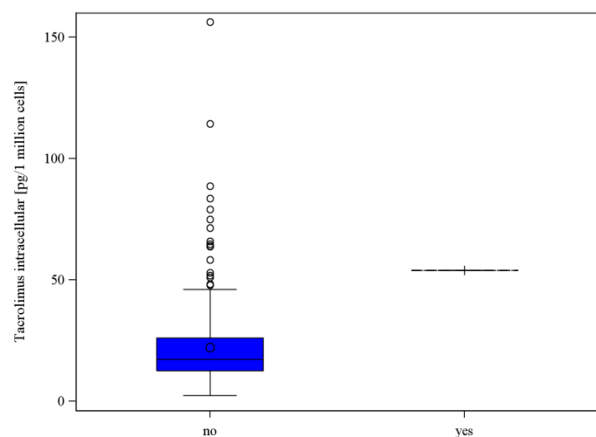


Abb. 49: Tac-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.

3.5.1.3 Rejektion unter Everolimus

Unter Everolimus traten lediglich 3 Rejektionen auf (s. Tab. 34). In Vollblut war der Mittelwert vor Rejektion allerdings um 8,8% erhöht, intrazellulär sogar um 33,6%.

Tab. 34: Eve-Konzentrationen vor Rejektion und in der Gesamtgruppe

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
Eve vor R [ng/ml]	3	3,8	4,8	5,8	6,6	7,4	1,8	5,7	1,5	4,0 - 3,1
icEve vor R [pg/1 Mio. Zellen]	3	17,6	18,6	19,5	34,0	48,5	15,4	28,5	14,1	12,7 - 44,5
	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
Eve [ng/ml]	171	0,6	3,6	4,6	25,6	17,9	22,0	5,2	2,4	4,8 - 5,5
icEve [pg/1 Mio. Zellen]	171	5,0	12,6	17,8	25,6	98,0	13,0	21,2	13,1	19,3 - 23,2

Die Zahl der Messungen vor Rejektion entsprach der Zahl der Rejektionen, die untere Zahl ist die Anzahl aller durchgeführten Messungen an 62 mit Everolimus behandelten Patienten.

In den nächsten beiden Boxplots (s. Abb. 50 f.) zeigt sich, dass die Everolimus-Konzentrationen in Vollblut trotz Rejektion höher lagen als bei Patienten ohne Rejektion. Für die intrazellulären Konzentrationen ergab sich ein ähnliches Bild:

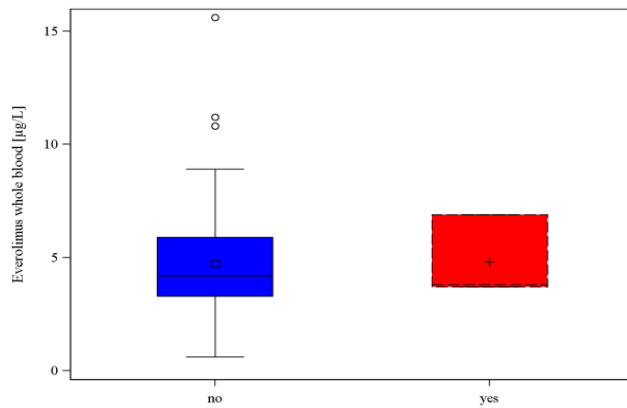


Abb. 50: Eve-Konzentration in VB vor Rejektion.

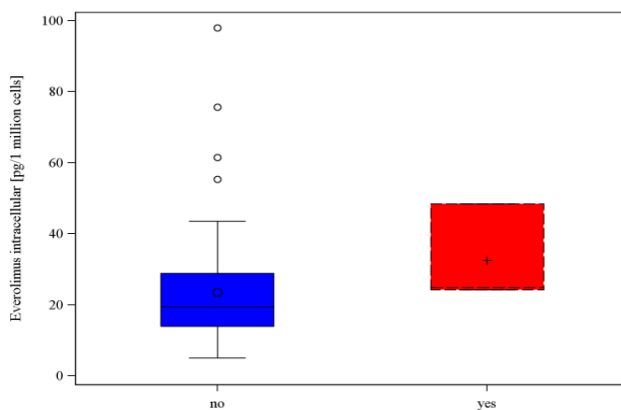


Abb. 51: Eve-Konzentration in PBMCs vor Rejektion.

Ab 3 Monaten nach Transplantation betrachtet konnte keine Rejektion unter Everolimus mehr festgestellt werden.

3.5.2 Zahl der Infektionen

Im Fokus unseres Interesses stand, ob die intrazellulären Konzentrationen der Immunsuppressiva frühzeitig einen Hinweis darauf geben können, dass die Dosierung herabgesetzt werden muss, da sonst mit einer Infektion sehr wahrscheinlich zu rechnen ist. Zur statistischen Auswertung wurde wiederum der Zeitraum 8 Tage bis 1 Tag vor Hinweis auf Infektion betrachtet. Erwartet wurde eine erhöhte Konzentration der Immunsuppressiva. Diese würde das Immunsystem so stark supprimieren, sodass opportunistische Infektionen zu einer Erkrankung des Patienten führen. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie 83 Infektionen nach Transplantation registriert, welche unter Immunsuppression mit Ciclosporin, Tacrolimus oder Everolimus stattfanden:

Tab. 35: Übersicht über beobachtete Infektionen mit Fallzahlen.

Immunsuppressivum	N	%
Gesamt	83	100
Ciclosporin	7	8,4
Tacrolimus	75	90,4
Everolimus	1	1,2

3.5.2.1 Infektionen unter Ciclosporin

Unter Ciclosporin traten insgesamt 7 Fälle von Infektion auf. Tabelle Tab. 36 gibt eine Gesamtschau über die Infektionen unter Ciclosporin. Der Mittelwert ist in Vollblut vor Infektion um 8,8% erhöht, intrazellulär um 4,4% erhöht.

Tab. 36: CSA-Konzentrationen vor Infektion und in der Gesamtgruppe.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
cCSA vor I [ng/ml]	7	33,0	73,5	77,0	140,5	264,0	67,0	102,4	75,6	46,4 - 158,5
icCSA vor I [pg/1 Mio.Zellen]	7	255,7	405,6	496,1	933,6	2179,8	528,0	805,9	633,0	336,9 - 1274,8
	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
cCSA [ng/ml]	84	18,0	66,0	91,5	127	290	61,0	101,6	49,3	91,1 - 112,2
icCSA [pg/1 Mio. Zellen]	84	121,8	383,4	685,8	877,6	3748,8	811,6	788,8	605,0	659,5 - 918,2

Die Zahl der Messungen vor Infektion entsprach der Zahl der Infektionen, die untere Zahl ist die Anzahl aller durchgeführten Messungen an 32 mit Ciclosporin behandelten Patienten.

In den folgenden Boxplots wurden die Kriterien wie in Kapitel 3.4.1 wieder anders gesetzt: Für Patienten mit Infektion wurden die Immunsuppressiva-Spiegel 40 bis 1 Tag vor registrierter Rejektion einbezogen. Die Ciclosporin-Spiegel werden in Abb. 47 und Abb. 48 in die beiden Balken ohne nachfolgende Rejektion („no“, blaue Balken) und mit aufgetretener Rejektion „yes“, grüne Balken) dargestellt. Für die Vollblut-Konzentrationen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Zeitraum vor Infektion oder nicht stattgefundenen Infektion. Die intrazellulären Werte zeigen eine Tendenz zu höheren Ciclosporin-Spiegeln vor Infektion als ohne Hinweis auf Infektion.

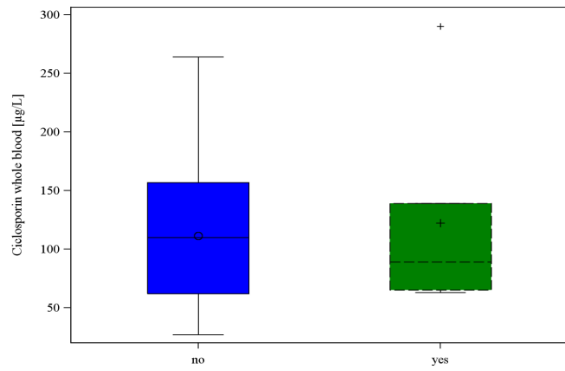


Abb. 52: CSA-Konzentration in VB vor Infektion.

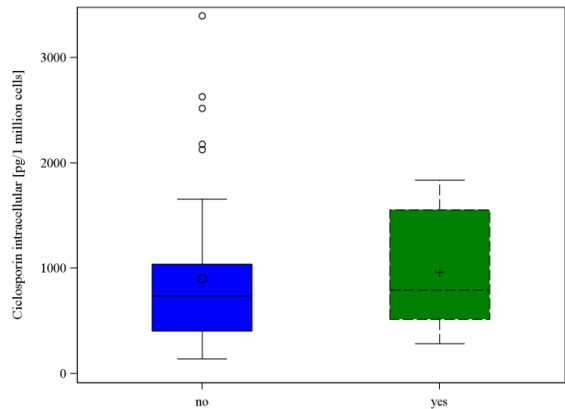


Abb. 53: CSA-Konzentration in PBMCs vor Infektion.

Ab 3 Monaten nach Transplantation fanden unter Ciclosporin keine Infektionen mehr statt.

3.5.2.2 Infektion unter Tacrolimus

Als Überblick über die Tacrolimus-Spiegel vor Infektion soll zunächst Tab. 37 gelten. Der Mittelwert war in Vollblut 23,1% geringer, intrazellulär blieb er unverändert.

Tab. 37: Tac-Konzentrationen vor Infektion und in der Gesamtgruppe.

	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
cTac vor I [ng/ml]	75	1,9	4,7	6,5	9,3	20,1	4,6	7,7	4,0	6,8 - 8,6
icTac vor I [pg/1 Mio. Zellen]	75	7,4	20,7	30,0	47,9	187,5	27,2	38,7	29,0	32,1 - 45,2
	N	Min	Q1	MD	Q3	Max	IQR	MW	SD	95% KI
Tac (VB) [ng/ml]	662	0,4	5,3	6,9	9,0	44,1	3,7	7,7	4,1	7,4 – 8,0
icTAC [pg/1 Mio. Zellen]	662	2,1	15,8	24,3	38,5	338,7	22,7	33,4	31,4	31,0 - 35,8

Die Zahl der Messungen vor Infektionen entsprach der Zahl der Infektionen, die untere Zahl ist die Anzahl aller durchgeführten Messungen an 151 mit Tacrolimus behandelten Patienten.

Für die Tacrolimus-Konzentrationen in Vollblut ergab sich eine Tendenz zu höheren Tacrolimus-Spiegeln vor einer stattgefundenen Infektion (s. Abb. 54). Ähnliche Ergebnisse sieht man für die intrazellulären Tacrolimus-Konzentrationen (s. Abb. 55).

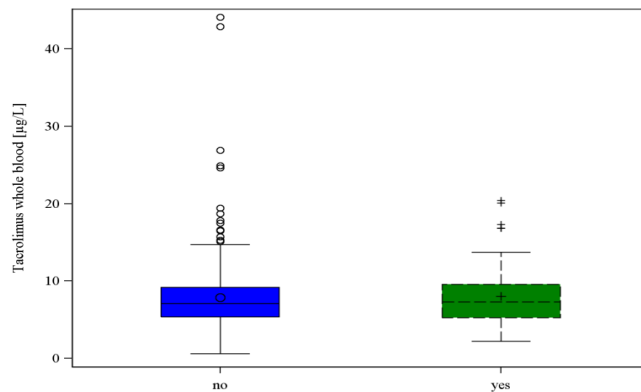


Abb. 54: Tac-Konzentration in VB vor Infektion.

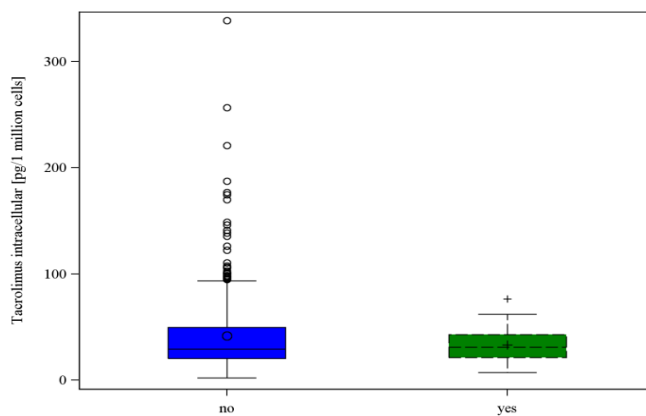


Abb. 55: Tac-Konzentration in PBMCs vor Infektion.

Für den Zeitraum ab 3 Monate nach Transplantation fand nur eine Rejektion unter Tacrolimus statt (s. Abb. 56f). Der extrazelluläre Wert liegt, wie erwartet, bei einer relativ geringen Konzentration, während der intrazelluläre Wert unerwartet hoch ist.

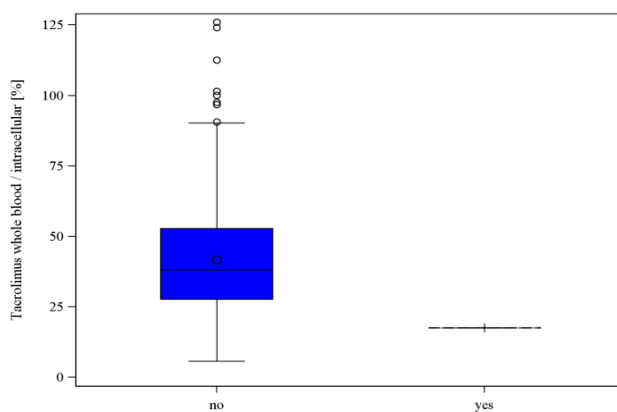


Abb. 56: Tac-Konzentration in VB vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.

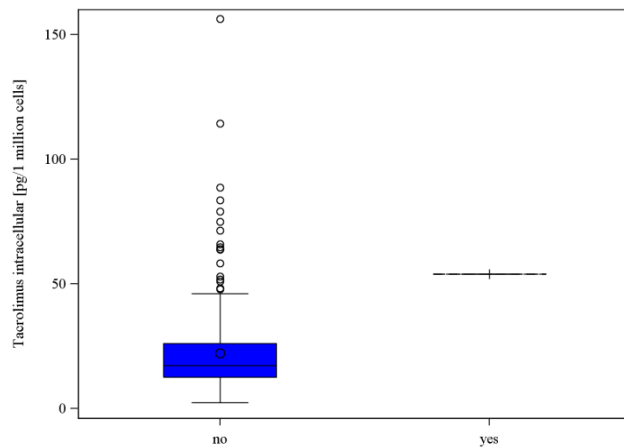


Abb. 57: Tac-Konzentration in PBMCs vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.

3.5.2.3 Infektion unter Everolimus

Unter Everolimus wurde lediglich eine Infektion verzeichnet. In diesem Einzelfall lag die Everolimus-Konzentration in Vollblut vor Infektion bei 3,8 ng/ml und somit 17,4% unter dem Median im Gesamtvergleich. Der intrazelluläre Wert lag mit 48,6 pg/1. Mio. Zellen 66,4% unter dem Median der Konzentrationen ohne Infektion. In den peripheren mononukleären Zellen wurde dagegen ein höherer Wert gemessen: Dieser lag 26,9% unter dem Gesamtdurchschnitt, allerdings 56,4 % höher intrazellulär.

In den Boxplots in den Abb. 58f. zeigt sich, dass in den ersten 3 Monaten nach Transplantation vor Infektion die Everolimus-Konzentrationen in Vollblut nicht wesentlich niedriger lagen als ohne Infektion. Für die intrazellulären Everolimus-Spiegel zeigt sich wesentlich deutlicher, dass ein höherer Spiegel eher mit einer Infektion einhergeht.

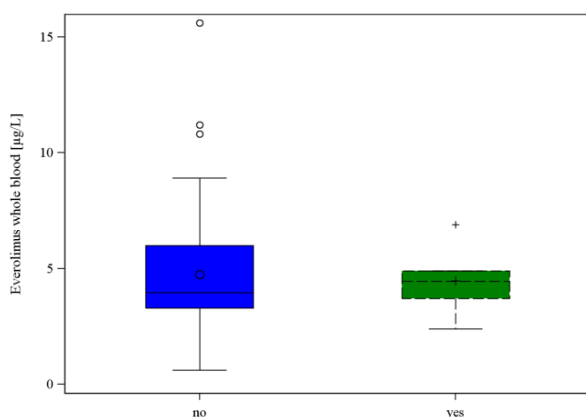


Abb. 58: Eve-Konzentration in VB vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.

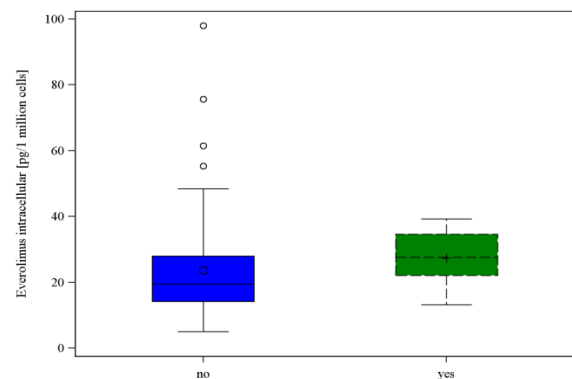


Abb. 59: Eve-Konzentration in PBMCs vor Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Infektion.

4 Diskussion

In unseren Analysen an insgesamt 164 Patienten nach Organtransplantationen haben wir zwischen den Vollblut-Konzentrationen und den intrazellulären Konzentrationen in grober Annäherung lineare Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,41$ für Ciclosporin, $r = 0,58$ für Tacrolimus und $r = 0,50$ für Everolimus ermittelt.

Nicht verwunderlich spiegeln beide Messungen, in Vollblut und intrazellulär, etwas Ähnliches wider, aber keineswegs das Gleiche (sonst wären die Korrelationskoeffizienten höher). Wir konnten zeigen, wie typische therapeutische Bereiche aus Vollblut mit intrazellulären Werten zusammenhängen (s. Tab. 38).

Tab. 38: Therapeutische Zielbereiche intrazellulär für CSA, Tac und Eve.

Medikament	Therapeutischer Bereich in Vollblut [ng/ml]	Therapeutischer Bereich intrazellulär [pg/1. Mio. Zellen]	Koeffizient für Korrelation Vollblut-intrazellulär
Ciclosporin	100 - 300	670,5 - 1674,6	$r = 0,41$
Tacrolimus	4 - 13	14,8 - 45,9	$r = 0,58$
Everolimus	3 - 8	13,8 - 26,0	$r = 0,50$

Aus den Korrelationsanalysen zwischen den Medikamenten-Konzentrationen und den Vortagsdosen ergaben sich insbesondere für die intrazellulären Werte sehr schwache Korrelationen, wie die Abb. 22f., Abb. 29f. und Abb. 36f. zeigen, aber auch die Konzentrationen in Vollblut korrelierten schlecht mit den Vortagsdosen:

Die Zusammenstellung der Medikamenten-Konzentrationen vor den kritischen Endpunkten Rejektion und Infektion soll einen Vergleich zulassen, ob tatsächlich anhand der Immunsuppressiva-Spiegel eine Rejektion bzw. Infektion erkannt werden kann. Vor einer Rejektion erwarteten wir daher, dass die Konzentrationen wesentlich geringer sind. Ein prozentualer Vergleich der Mittelwerte zeigt dies allerdings nicht bzw. nur im Trend für die Immunsuppressiva Ciclosporin und Tacrolimus (s. Tab. 32, Tab. 33 und Tab. 34). Der Vergleich vor Infektionen zeigt, dass die Mittelwerte der Konzentrationen vor Infektion nicht immer über den Mittelwerten der gesamten Patientengruppe lagen, allerdings bei intrazellulärer Messung eher in der erwarteten Richtung lagen, also höhere Konzentrationen vor Infektionen (Tab. 36 und Tab. 37) darstellen.

Tab. 39: Vergleich der Mittelwerte vor Rejektion bzw. Infektion und in der Gesamtgruppe.

Medikament	N	Mittelwertvergleich der intrazellulären Konzentrationen vor Rejektion	Mittelwertvergleich der Konzentrationen in Vollblut vor Rejektion
Ciclosporin	8	7,8% geringer	11,7% geringer
Tacrolimus	9	5,2% höher	7,3% höher
Everolimus	3	33,6% höher	8,8% höher
Medikament		Mittelwertvergleich der intrazellulären Konzentrationen vor Infektion	Mittelwertvergleich der Konzentrationen in Vollblut vor Infektion
Ciclosporin	7	4,4% höher	8,8% höher
Tacrolimus	75	gleichbleibend	23,1% höher
Everolimus	1	17,4% geringer	66,4% geringer

Im Folgenden soll diskutiert werden, was andere Autoren zum Vergleich von Vollblut-Messungen und intrazellulären Messungen herausgefunden haben. Dabei wird zunächst jeweils dargestellt, wie gut die Korrelationen waren und sodann, ob und nach welchen Kriterien sich aus der Studie ablesen ließ, ob das eine oder andere Verfahren besser ist.

Die Analyse der Beziehung von intrazellulären und Vollblut-Messungen zu Rejektion und Infektion war nicht ganz einfach, da wir (der medizinischen Routine entsprechend) nur zu ausgewählten Zeitpunkten Blutproben entnommen hatten. Daher wurden die Konzentrationen in zwei Zeitfenstern vor dem jeweiligen Ereignis ausgewertet. Die Daten zu einem kürzeren Zeitfenster sind in obiger Tab. 39 in kombinierter Version zu Infektion und Rejektion zusammengefasst.

Die Alternative, auch Messwerte innerhalb von 40 Tagen vor den Ereignissen zu berücksichtigen, wurde von Herrn Markus Harden durchgeführt und ist hier nicht im Detail dargestellt. Die zum Vergleich herangezogenen Werte beziehen sich auf die ersten 90 Tage nach Transplantation. Da in dieser Zeit die meisten Infektionen und Rejektionen stattfanden, ließen sich hier signifikante Ergebnisse erzielen. Vor Rejektion gab es immer die gleiche Tendenz in Vollblut, intrazellulär dagegen wiesen die Tendenzen Diskrepanzen auf. Vor Infektionen trat dasselbe Phänomen auf.

Tab. 40: Mittelwertvergleiche der Konzentrationen vor Rejektion bzw. Infektion.

Medikament	N	Mittelwertvergleich der intrazellulären Konzentrationen vor Rejektion	Mittelwertvergleich der Konzentrationen in Vollblut vor Rejektion
Ciclosporin	10(8)	4,3% höher (7,8% geringer)	11,9% geringer (11,7% geringer)
Tacrolimus	28(9)	19,7% geringer (5,2% höher)	6,5% höher (7,3% höher)
Everolimus	3 (3)	7,7% höher (33,6% höher)	2,1% höher (8,8% höher)
Medikament		Mittelwertvergleich der intrazellulären Konzentrationen vor Infektion	Mittelwertvergleich der Konzentrationen in Vollblut vor Infektion
Ciclosporin	(7)	17% geringer (4,4% höher)	1,1% höher (8,8% höher)
Tacrolimus	(75)	6% höher (gleichbleibend)	8,9% höher (23,1% höher)
Everolimus	(1)	9,2% höher (17,4% geringer)	6,5% geringer (66,4% geringer)

Die Werte in Klammern beziehen sich auf meine in Kapitel 3.5 dargestellten Werte. Die Werte ohne Klammer beziehen sich auf Auswertungen von Markus Harden. Die rot hinterlegten Felder markieren die Werte, welche Diskrepanzen aufweisen zwischen den beiden Auswertungen und nicht den Erwartungen entsprachen. Ich bezog mich dabei auf den Zeitraum minus 8 bis 0 Tage vor Rejektion bzw. Infektion, Herr Harden auf minus 40 bis minus 1 Tag davor.

4.1 Ciclosporin

Tab. 41: Übersicht zu aktuellen Publikationen zum icTDM für CSA nach Organtransplantation.

Jahr	N	Tx	Untersuchte Parameter	Ergebnis
2005 (Barbari et al. 2005)	35	Niere	CSA in PBMCs CSA in VB Biopsie-gesicherte Rejektion	CSA-Spiegel in PBMCs waren deutlich höher bei Patienten ohne Rejektion ($P > 0,05$)
2007 (Lepage et al. 2007)	20	Niere	CSA in VB CSA in PBMCs Vortagsdosis	Korrelation icCSA/CSA: $r = 0,40$, ($P < 0,01$) Korrelation cCSA/Dosis: $r = 0,28$ Korrelation icCSA/Dosis: $r = 0,02$ Korrelation cCSA/Dosis: $r = 0,39$ Es fanden keinerlei Rejektionen statt.
2008 (Falck et al. 2008)	20	Niere	CSA in PBMCs	Intrazelluläre CSA-Konzentrationen fielen bei 7 Patienten mit Rejektion drei Tage vor der akuten Rejektion signifikant ab um 27%, ($P = 0,014$)
2008 (Crettol et al. 2008)	64	Niere, Leber, Lunge	ABCB1 Genotypen CSA in Vollblut CSA in PBMCs Vortagsdosis	icCSA/CSA: $r = 0,55$; ($P = 0,00005$) icCSA/Dosis: $r = 0,37$; ($P = 0,003$) cCSA/Dosis: $r = 0,77$; ($P = 0,2$) Die Studie bezog sich ausschließlich auf stabile Patienten ohne Hinweis auf Rejektion.
Eigene Daten	16 4	Leber, Niere	CSA in VB CSA in PBMCs Vortagsdosis CSA vor Rejektion und Infektion	icCSA/CSA: $r = 0,58$ icCSA/Dosis: $r = 0,02$ cCSA/Dosis: $r = 0,20$ MW icCSA vor Rejektion: 7,8% niedriger MW icCSA vor Infektion: 4,4% höher

Bereits 2005 wurde im Rahmen einer Studie an 35 Patienten nach Nierentransplantation die Beziehung zwischen Rejektionen und Ciclosporin-Konzentrationen intrazellulär und in Vollblut untersucht (Barbari et al. 2005). Es wurde unterschieden zwischen Patienten, welche eine Biopsie-gesicherte Rejektion erlitten hatten und Patienten mit regulärer

Transplantatfunktion. Die Rejektionen wurden sodann in Beziehung gesetzt zu den intrazellulären CSA-Konzentrationen und den CSA-Talspiegeln. 7 Rejektionen traten auf. Es stellte sich heraus, dass es bei den Vollblut-Konzentrationen schwache Zusammenhänge zu normaler Transplantatfunktion oder Rejektion bestanden, auch die Ergebnisse für die intrazellulären Messungen waren zwar im Schnitt höher, es gab jedoch weitestgehend Überschneidungen zwischen den Messwerten, wie Tab. 42 zusammenfasst. Im Vergleich mit unseren Ergebnissen zeigt sich eine Parallele: Sowohl in der Publikation nach Barbari et al. 2005 als auch in unserer Studie war eine leichte Tendenz zu niedrigeren Ciclosporin-Konzentrationen zu erkennen.

Tab. 42: Studienergebnisse: CSA-Werte bei Patienten mit und ohne Rejektion.

	N ges	N mit R	Patienten mit Rejektion	Patienten mit regulärer Transplantatfunktion
cCSA in VB [ng/ml]	35	7	108±56	147±94
IcCSA-Konzentration in [pg/Lc]			10±6	18±18
Eigene Daten			Patienten mit Rejektion	Patienten mit regulärer Transplantatfunktion
cCSA in VB [ng/ml]	32	8	74,5	91,5
ICSA-Konzentration in [pg/1 Mio. Zellen]			507,7	685,8

Daten nach Barbari et al. 2005. In den eigenen Daten wurden 32 Patienten mit Ciclosporin therapiert. Es traten insgesamt 8 Fälle von Rejektion auf.

2007 wurden in einer weiteren Studie 20 Patienten nach Nierentransplantation unter Ciclosporin-Therapie untersucht (Lepage et al. 2007). Der Zeitraum wurde auf 3 Wochen bis 18 Monate nach Transplantation festgelegt. Zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Ciclosporin-Konzentration konnte nur eine schwache Korrelation festgestellt werden ($r = 0,40$). Ebenso war die Korrelation der Vollblut-Konzentration zur Dosis schwach ($r = 0,28$). Eine Korrelation zwischen der Dosis und der intrazellulären Konzentration konnte nicht festgestellt werden ($r = 0,02$). Insgesamt ging aus der Studie hervor, dass die Messung der Ciclosporin-Konzentration in den PBMCs gut geeignet wäre für das TDM. Für die Festlegung von therapeutischen Zielspiegeln sollten allerdings Langzeitstudien durchgeführt werden. Im Vergleich zu unseren statistischen Ergebnissen, die ja nun über einen evidenten Zeitraum gesammelt worden waren, ergab sich ein ähnliches Bild, was die Korrelationen angeht. Die absoluten Werte der intrazellulären Ciclosporin-Konzentrationen können laborbedingt abweichen (Tab. 43).

Tab. 43: Korrelation zwischen CSA-Konzentration und Dosis.

	Lepage et al. 2007	Eigene Daten
N	20	32
icCSA [pg/1 Mio. Zellen]	0,6 - 16,3	121,8 – 3748,8
CSA [ng/ml]	18-366	18 – 290
icCSA/CSA	$r = 0,40, P < 0,01$	$r = 0,41$
cCSA/Dosis	$r = 0,28$	$r = 0,20$
icCSA/Dosis	$r = 0,02$	$r = 0,02$

Daten nach Lepage et al. 2007. N bezieht sich auf die Zahl der mit Ciclosporin therapierten Patienten im Rahmen der Studie.

Im Rahmen einer Studie aus dem Jahr 2008 wurden 20 Patienten nach Nierentransplantation unter Ciclosporin-Therapie beobachtet (Falck et al. 2008). Die Zeitspanne wurde auf ab 2 Wochen bis 3 Monate nach Transplantation festgelegt. 7 Patienten erlitten eine Rejektion. (s. Tab. 44). Beim Betrachten der Tabelle fällt auf, dass ein unregelmäßiger Zusammenhang zwischen abgefallenen und gestiegenen CSA-Konzentrationen vor Rejektion vorliegt.

Tab. 44: Ciclosporin-Konzentrationen bei Patienten mit und ohne Rejektion.

Monate nach NTx	Patienten mit Rejektion	Messungen mit Rejektion	Patienten ohne Rejektion	Pat. ges.	P
		[ng/ml]	[ng/1 Mio. Zellen]		
N	7	8	13	32	
CSA 1 Monat nach NTx in VB	1606±359		1482±370		0,48
CSA 2 Monate nach NTx in VB	1414±197	75	1404±297	92	0,94
CSA 3 Monate nach NTx in VB	1201±246		1192±193		0,93
icCSA 1 Monat nach NTx	102±88		149±83		0,10
icCSA 2 Monate nach NTx	107±60	195	121±158	122	0,63
icCSA 3 Monate nach NTx	148±200		125±37		0,38

Daten nach Falck et al. 2008

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2008 wurden intra- und extrazelluläre Ciclosporin-Spiegel nach Nieren- (n = 41), Leber- (n = 20) bzw. Lungentransplantation (n = 3) gemessen. Insgesamt waren 64 stabile Patienten ca. 8 Jahren nach stattgefundenener Transplantation für

die Studie rekrutiert worden (Crettol et al. 2008). Es wurde untersucht, inwieweit die Ciclosporin-Konzentrationen in den PBMCs und in Vollblut korrelieren ($r = 0,30$, $P = 0,00005$) (s. Tab. 45). Auffällig war, dass die Messwerte von Crettol et al. um den Faktor 1000 niedriger lagen als in unserer Studie. Die Diskrepanz konnte nicht abschließend geklärt werden. Die engere Korrelation der intrazellulären Konzentrationen mit der Dosis konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden.

Tab. 45: Korrelation zwischen intra- und extrazellulärer Ciclosporin-Konzentration.

	Crettol et al. 2008	Eigene Daten
N	64	32
Bereich der CSA-Konzentrationen [ng/ml]	33 - 205	18 – 290
Bereich der icCSA-Konzentrationen [ng/1 Mio. Zellen]	0,3 - 13,6	121,8 – 3748,8
icCSA/CSA	$r = 0,355$; ($P=0,00005$)	$r = 0,41$
icCSA/Dosis	$r = 0,37$; ($P=0,003$)	$r = 0,02$
cCSA/Dosis	$r = 0,39$ ($P = 0,001$)	$r = 0,20$

Daten nach Crettol et al. 2008.

4.2 Tacrolimus

Tab. 46: Übersicht über aktuelle Publikationen zum icTDM für Tac nach Organtransplantation.

Jahr	N	Tx	Untersuchte Parameter	Ergebnis
2007 (Barbari et al. 2007)	35	Niere	Tac in VB Tac in PBMCs	icTac/Tac: $r = 0,17$
2012 (Capron et al. 2012)	90	Leber	Tac in VB Tac in PBMCs Biopsie-gesichert an Tag 7 pLTx	icTac/Tac: $r = 0,24$ Rejektionen korrelierten mit niedrigen Tacrolimus-Spiegeln in den PBMCs von den Tagen 5 und 7 bei 37 Patienten
2013 (Lemaitre et al. 2013)	24	Herz	Tac in VB Tac in PBMCs	icTac/Tac: $r = 0,26$ icTac/Dosis: $r = 0,36$ Rejektionen wurden nicht direkt untersucht
2015 (Lemaitre et al. 2015)	10	Leber	Tac in VB Tac in PBMCs	icTac/Tac: $r = 0,69$ an Tag 1 pLTx 1 Patient mit Rejektion: kein Hinweis in VB, vierfach niedrigere Konzentration in PBMCs
2016 (Han et al. 2016)	213	Niere	Tac in VB Tac in PBMCs	icTac/Tac: $r = 0,62$ 15% Rejektionen icTac/Tac vor Rejektion: 9,7 icTac/Tac ohne Rejektion: 9,2 keine Relation zwischen Rejektion und icTac
Eigene Daten			Tac in VB Tac in PBMCs Vortagsdosis icTac vor Rejektion und Infektion	icTac/Tac: $r = 0,58$ icTac/Dosis: $r = 0,16$ cTac/Dosis: $r = 0,07$ MW icTac vor Rejektion: 5,2% höher MW icTac vor Infektion gleichbleibend

Bereits vor 10 Jahren erschien eine Studie mit 35 Patienten nach Nierentransplantation, welche mit Tacrolimus therapiert wurden (Barbari et al. 2007). Zwischen der Tacrolimus-

Konzentration in Vollblut und intrazellulär konnte eine nur sehr schwache Korrelation ermittelt werden mit einem Bestimmtheitsmaß von $r = 0,57$.

In einer Studie zur Messung der Tacrolimus-Konzentration in den PBMCs wurden 2012 die Ergebnisse zu 90 Patienten nach Lebertransplantation veröffentlicht (Capron et al. 2012). An den Tagen drei, fünf und sieben nach erfolgter Transplantations-OP wurden intrazelluläre Tacrolimus-Konzentrations-Messungen durchgeführt und festgestellt, dass signifikant niedrigere Tacrolimus-Konzentrationen in den PBMCs bestehen. Zusätzlich wurden an Tag sieben Biopsien der Transplantat-Lebern durchgeführt und nach dem Banff-Schema eingestuft. Dieses Schema beschreibt nach Schweregraden mögliche auftretende Rejektionen und sichert diese. Nach statistischer Auswertung unserer Daten konnte diese Tendenz so nicht bestätigt werden. Die intrazellulären Konzentrationen lagen vor Rejektion über dem Wert der Patienten ohne Rejektion.

Tab. 47: Tacrolimus-Konzentrationen vor Rejektion und ohne Rejektion.

Tac in PBMCs [pg/1 Mio. Zellen]			
	Patienten ohne Rejektion	Patienten mit	P
	(n = 53)	Rejektion (n = 37)	
	MW (±SD)	MW (±SD)	
Tag 3	78.6 (±36.5)	21.6 (±13.3)	0,071
Tag 5	83.8 (±32.6)	27.6 (±12.2)	0,056
Tag 7	90.9 (±41.2)	33.8 (±16.7)	0,059
Eigene Daten			
N	Gesamtgruppe	Patienten mit	
	n = 151	Rejektion n = 9	
Mittelwert (±SD)	44,5±32,1	169,9±168,8	

Daten nach Capron et al. 2012. Zur Charakterisierung habe ich, genau wie bei Capron et al., im Hinblick auf die Vergleichbarkeit die Mittelwerte und Standardabweichung verwendet, auch wenn wegen fehlender Normalverteilung die in Tab. 33 genannten Mediane korrekter wären.

Eine weitere Studie zur Tacrolimus-Spiegelmessung in den PBMCs wurde 2013 an 24 Patienten nach Herztransplantation untersucht (Lemaitre et al. 2013). Zwischen den Tacrolimus-Konzentrationen in Vollblut und den intrazellulären war eine direkte Korrelation nur geringfügig zu erkennen ($r = 0,26$). Zwischen der Vortagsdosis und der intrazellulären Tacrolimus-Konzentration war ebenso eine geringfügige Korrelation zu sehen (icTac/Dosis:

$r = 0,36$). Diese Studie propagierte die Notwendigkeit weiterer Studien und die Einbeziehung der klinischen Endpunkte in weitere Studien. Im Vergleich zu Lemaitre ist in unserer, wesentlich größer angelegte Studie, die Korrelation zwischen Tacrolimus-Dosis und der intrazellulären Tac-Konzentrationen geringer (icTac/Dosis: $r = 0,16$). Eine Korrelation zwischen den Konzentrationen in Vollblut und in den PBMCs ist mit $r = 0,56$ gleichartig ausgeprägt (bei uns: $r = 0,58$).

2015 erschien eine Studie zu Tacrolimus mit 10 Patienten nach Lebertransplantation, an welchen wiederum der Zusammenhang zwischen intra- und extrazellulärem Tacrolimus-Spiegel untersucht wurde (Lemaitre et al. 2015). Für die Korrelation zwischen den beiden Konzentrationen ergab sich: $r = 0,69$. Dieser Wert scheint im Vergleich zu unseren Ergebnissen (icTac/cTac: $r = 0,58$) etwas hoch, was allerdings durch die relativ klein angelegte Studie bedingt sein kann.

Vergangenes Jahr erschien nochmals eine Studie zu intrazellulärer Tacrolimus-Konzentration nach Nierentransplantation. Insgesamt 213 asiatische Patienten waren beobachtet worden (Han et al. 2016). Die Korrelation zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Tacrolimus-Konzentration lag bei $r = 0,67$. Zwischen Patienten mit akuter Rejektion und normaler Transplantatfunktion waren keine signifikanten Relationen zu den Tacrolimus-Konzentrationen feststellbar.

Han et al. zeigten, dass die Tacrolimus-Konzentration im Zeitverlauf von zehn Jahren allmählich sinkt, wie Tab. 48 zeigt. Diese Tendenz ergab sich auch aus unserer Studie. Allerdings begleiteten wir die Patienten insgesamt nur ein Jahr, sodass ein direkter Vergleich an der Stelle nicht evident wäre. Daraus schließen lässt sich allerdings, dass die Konzentration auch über ein Jahr nach Transplantation noch etwas absinkt.

Tab. 48: Tacrolimus-Konzentrationen im Zeitverlauf nach Han et al. 2016.

	bis 1 Jahr	1-2 Jahre
Tac	6,8±2,06	5,5±1,13
icTac	75,2±33,32	61,2±25,28
Tac/icTa	11,0±3,67	10,7±3,15

Daten nach Han et al. 2016.

4.3 Everolimus

Tab. 49: Übersicht über aktuelle Publikationen zum icTDM für Everolimus nach Organtransplantation.

Jahr	N	Tx	Untersuchte Parameter	Ergebnis
2015	12	Niere	AUC ₀₋₁₂	AUC ₀₋₁₂ /ic: $r = 0,9$
(Robertsen et al. 2015)			AUC ₀₋₆ in PBMCs in VB	AUC ₀₋₁₂ : VB/ic: $r = 0,9$ AUC ₀₋₆ : VB/ic: $r = 0,87$ Talspiegel/AUC ₀₋₁₂ : $r = 0,85$
Eigene Daten			in PBMCs in VB	$r = 0,50$

Daten nach Robertsen et al. 2015

2015 wurden die Everolimus-Konzentrationen an 12 Patienten nach Nierentransplantation untersucht (Robertsen et al. 2015). Es wurden verschiedene Messungen intrazellulär und in Vollblut durchgeführt. Die Korrelation zwischen Everolimus AUC₀₋₁₂ in Vollblut und intrazellulärer Everolimus-AUC₀₋₁₂ ergab die größte Korrelation mit $r = 0,9$ (s. Tab. 50).

Tab. 50: Korrelation zwischen intra- und extrazellulären Everolimus-Konzentrationen.

Parameter	Korrelation	Irrtumswahrscheinlichkeit
Eve AUC ₀₋₁₂ /icEve	$r = 0,85$	$P < 0,01$
Eve AUC ₀₋₁₂ /icEve AUC ₀₋₁₂	$r = 0,9$	$P < 0,01$
Eve AUC ₀₋₆ / icEve AUC ₀₋₆	$r = 0,87$	$P < 0,01$.
Eve Talspiegel/ icEve AUC ₀₋₁₂	$r = 0,85$	$P = 0,76$.

Daten nach Robertsen et al. 2015.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte mit einer sehr großen Zahl an Studienteilnehmern an die bisherigen Ansätze angeknüpft werden. Das intrazelluläre Drug Monitoring erschien zu Beginn der Studie für eine stabile immunsuppressive Einstellung der Patienten nach Lebertransplantation unabdinglich. Vor allem in der ersten Phase nach Transplantation ist die Gefahr einer Rejektion am höchsten und eine angemessene Einstellung der Patienten am schwierigsten (Han et al. 2016). Ursprünglich war erhofft worden, mithilfe der Studie durch die intrazellulären Messungen der Immunsuppressiva in den weißen Blutzellen die Patienten nach Lebertransplantation künftig wesentlich besser medikamentös einstellen zu können.

Die Durchführung entsprechender Studien gestaltet sich allerdings sehr schwierig, da die Zahl der Organ-Spender in den vergangenen Jahren stark zurückging. Dabei ist es gerade im Hinblick der nach wie vor hohen Zahl an Rejektionen und Infektionen unabdingbar, die personalisierte Immunsuppression zu verbessern. Auch die immer noch höhere Anzahl an Wartenden im Vergleich zu vorhandenen Spenderorganen gestaltet die Situation schwierig. Umso wichtiger ist es, Re-Transplantationen zu vermeiden. Unser Ziel war es, das Transplantatüberleben und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

4.4 Variabilität

Die Variabilität zwischen den gemessenen Medikamentenspiegeln war extrem hoch. Es zählt zu einem der Ziele des Therapeutischen Drug Monitorings, die Variabilität zu reduzieren und die Spiegel möglichst konstant zu halten. Insbesondere extreme Maxima kamen fast ausschließlich in den ersten 1-2 Wochen nach Transplantation vor.

Interessanter Punkt an dieser Stelle ist, dass es für alle drei Medikamente möglich war, eine Korrelation zwischen intra- und extrazellulären Konzentrationen herzustellen. Zuvor gab es aus Studien Hinweise darauf, dass die Werte korrelierten, solange die Patienten stabil waren (Han et al. 2016).

Tab. 51: Korrelationen der intrazellulären Konzentrationen zu denen in Vollblut:

	Ciclosporin	Tacrolimus	Everolimus
Unsere Studie	r = 0,41	r = 0,58	r = 0,50
Lepage et al. 2007	r = 0,40		
Crettol et al. 2008	r = 0,55		
Capron et al. 2012		r = 0,38	
Lemaitre et al. 2013		r = 0,26	
Lemaitre et al. 2015		r = 0,69	
Han et al. 2016		r = 0,62	
Robertsen et al. 2015			r = 0,85

Daten nach Lepage et al. 2007, Crettol et al. 2008, Capron et al. 2012, Lemaitre et al. 2013, Lemaitre et al. 2015, Han et al. 2016, Robertsen et al. 2015.

Vor Rejektion ergaben sich sehr große Spannweiten. Sowohl in unserer Studie als auch in anderen war es nicht eindeutig festzustellen, ob eine Rejektion immer durch einen erhöhten Medikamenten-Spiegel vorherzusehen ist (vgl. Tab. 52). Erwartet wurde, dass die

intrazellulären Konzentrationen vor einer Rejektion signifikant abfallen, sodass das Immunsystem das Transplantatorgan abstößt. Vielmehr scheinen jedoch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen:

Tab. 52: Veränderung der intrazellulären Immunsuppressiva-Spiegel vor Rejektion.

	Ciclosporin intrazellulär	Tacrolimus intrazellulär	Everolimus intrazellulär
Unsere Studie	7,8 % niedriger	5,2 % niedriger	33,6 % höher
Falck et al. 2008	27,1 ± 14,6 % niedriger		
Capron et al. 2012		Bis zu - 72,5 % niedriger	

Daten nach Falck et al. 2008 und Capron et al. 2012.

Zu Immunsuppressiva-Konzentrationen vor Infektion gibt es wenig vergleichbares Material. Aus unserer Studie ergab sich jedoch, dass die Konzentrationen höher, gleichbleibend und niedriger auftraten als bei den Vergleichsgruppen. Entsprechend scheint es über die Messung der intrazellulären Immunsuppressiva-Konzentrationen nicht sicher möglich zu sein, auf eine drohende Infektion zwingend schließen zu müssen.

4.5 Limitationen: was hätte besser gemacht werden können?

Aus unserer Studie ergibt sich, dass die Messungen der Medikamentenspiegel intrazellulär gegenüber denen in Vollblut keinen entscheidenden Vorteil bringen. Da unsere Studie relativ groß aufgestellt war, erscheint es sehr zweifelhaft, ob eine noch größer angelegte Studie andere Ergebnisse geliefert hätte. Ein Aspekt, welcher in anderen kleinen Studien bereits angerissen wurde, war die Messung der Lymphozytenzahl. Diese Messungen mit in diese Arbeit einzubeziehen, würde an dieser Stelle den Rahmen sprengen, allerdings wäre es durch die Lage der Datenbank vor Ort in Göttingen theoretisch möglich, Vergleiche zwischen intrazellulären Konzentrationen und der Lymphozytenzahl zu machen. Evtl. kann ein falsch hoher intrazellulärer Spiegel mit einer zu niedrigen Lymphozytenzahl korrelieren.

4.6 Alternative Biomarker für die individuell optimierte Dosiseinstellung

Einen weiteren interessanten Ansatz zur Verbesserung des intrazellulären TDM stellt die Verwendung von sog. Biomarkern dar. Dabei geht es im Wesentlichen darum, das TDM ergänzend zu optimieren. Grundlegend kann der Aufbau der individuellen Therapie in

einzelne Stufen eingeteilt werden: Zunächst die Arzneimitteldosis, welche zunächst mittels Körpergewicht gewählt wird. Diesem folgt das pharmakokinetische Drug Monitoring in Vollblut. Dies entspricht dem aktuell angewendeten Stand des TDM. Darüber hinaus geht das in dieser Arbeit beschriebene intrazelluläre pharmakokinetische Drug Monitoring. Als nächster Schritt kann das Messen der Pharmakodynamik gesehen werden. Während sich die Pharmakokinetik (kurz: PK) noch mit der Verteilung der Arzneimittel im Körper auseinandersetzt, beschäftigt sich die Pharmakodynamik (kurz: PD) direkt mit der Wirkung des Arzneimittels auf den Organismus. Schließlich kann mit den klinischen Endpunkten Infektion und Rejektion die Dosis entsprechend reguliert werden (s. Abb. 60).



Abb. 60: Stufen des therapeutischen Drug Monitoring.

Zu den Biomarkern zählen Immunzell-Aktivitätsmarker, Immuntoleranzmarker sowie weitere Marker zur Früherkennung.

Tab. 53: Übersicht über Biomarker nach Organtransplantation.

Immunzell-Aktivitätsmarker	Immuntoleranzmarker	Weitere
IL-2/CD8+	B-Zell-Differenzierungsgene	GcfDNA (graft-derived cell-free DNA)
iATP	FoxP3	

Marker der Immunzellaktivität sollen dazu dienen, frühzeitig Infektionen und Rejektionsreaktionen vorherzusagen. Dies wurde 2010 bereits ex vivo durch die Messung von Interleukin 2 getestet (Millan et al. 2010). IL-2 wird von den CD8⁺-Zellen ausgeschüttet. Eine weitere Methode ist die Messung des intrazellulären ATP (iATP) in den CD4⁺-T-Zellen (Schulz-Juergensen et al. 2012). Somit wird deren Immunaktivität gemessen. Ein erhöhter Wert kann dabei möglicherweise eine Rejektion vorhersagen.

Zu den Immuntoleranzmarkern zählen die B-Zell-Differenzierungsgene. Dabei geht es darum, über quantitative PCR die Genexpression von IGKV1D-13, IGKV4-1 und IGLL zu messen. Somit kann zwischen Patienten verschiedener Toleranzniveaus differenziert werden.

Ein weiterer Immuntoleranzmarker ist FoxP3. Dieses wird von regulatorischen T-Zellen, sog. Tregs, exprimiert. Eine geringe Anzahl an Tregs geht mit einer postoperativen Toleranz einher (Pons et al.).

Zuletzt bleibt an dieser Stelle die donorspezifische zirkulierende DNA zu erwähnen, GcfDNA. Im Rahmen einer Abstoßungsreaktion wird das Spenderorgan beschädigt. DNA des Spenders wird aus den zerstörten Zellen frei und ist als zirkulierende DNA messbar.

4.7 Perspektiven für die Zukunft

Zunächst einmal kann es für instabile Patienten sehr sinnvoll sein, das intrazelluläre Therapeutische Drug Monitoring nach Transplantation anzuwenden, mindestens ergänzend zu den bisherigen Messungen in Vollblut. Zudem kann aus der Studie die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Patienten noch individueller therapiert werden müssen. Genotypisierungen nach dem ABCB1-Genpolymorphismus scheinen sinnvoll, außerdem eine Einhaltung des in dieser Arbeit schlussgefolgerten intrazellulären therapeutischen Bereichs.

In bereits veröffentlichten Publikationen wurden einige Ansätze getestet, das Therapeutische Drug Monitoring für eine personalisierte Immunsuppression nach Organtransplantation zu verbessern. Ein Ansatz bestand darin, die Konzentration von Tacrolimus nicht mehr in Vollblut zu messen, sondern in der Galle. Da Leberbiopsien sehr aufwändig, kostspielig und für den Patienten belastend sind, sollte über diese Studie ein einfacheres, kostengünstigeres TDM entworfen werden. Damit erhoffte man sich, Abstoßungsreaktionen besser erkennen zu können (Tron et al. 2016). Es wurde ein LC-MS/MS entwickelt, mit dem die Tacrolimus-Konzentration in der Galle gemessen werden konnte. Somit gelang es, die Tacrolimus-Exposition in der Galle zu messen und zugleich eine Korrelation zwischen Tacrolimus-Spiegeln in Vollblut und in der Galle zu erstellen.

Für Everolimus wurde 2014 im Rahmen eines Treffens des *LATDMCT (International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology)* der aktuelle Stand der Wissenschaft für das Therapeutische Drug Monitoring von Everolimus erörtert. Seit 10 Jahren wird für Everolimus ein TDM empfohlen (Shipkova et al. 2016). In dem Bericht wurden die bisher üblichen Messmethoden von Everolimus in Vollblut, unter anderem mithilfe des LC-MS/MS beschrieben. Schließlich fordert die Organisation dazu auf, die Erforschung weiterer, besserer Messmethoden zu fördern (Shipkova et al. 2016).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ging es um das Therapeutische Drug Monitoring bei Patienten nach Lebertransplantation. Nach erfolgter Transplantationsoperation muss der Patient in der Regel für sein restliches Leben immunsupprimiert werden. Gängige Medikamente sind dafür unter anderem Ciclosporin, Tacrolimus und Everolimus. Um die Optimierung des Drug Monitoring dieser drei Medikamente ging es in meiner Arbeit.

Die richtige Medikamentendosis stellt eine Gratwanderung zwischen den beiden klinischen Endpunkten Infektion und Rejektion dar. Werden die Medikamente überdosiert, ist das Immunsystem des Patienten zu sehr unterdrückt und opportunistische Infektionen können zu schweren Erkrankungen führen. Wird das Immunsystem hingegen zu wenig supprimiert, greift es das fremde Organ an und stößt es ab. Aus diesem Grund ist es von großem medizinischem Interesse, die optimale individuelle Dosis für den einzelnen Patienten zu ermitteln. Bisher werden die Immunsuppressiva-Konzentrationen in Vollblut gemessen. Jedoch stellte sich heraus, dass es dennoch zu Infektionen und Rejektionen kam. Die Immunsuppressiva wirken unter anderen in den peripheren mononukleären Zellen (PBMC) des Blutes. Daher schien es sinnvoll, die Konzentrationen der Immunsuppressiva dort zu messen.

Als Grundlage für die Messung hatten wir insgesamt 164 Patienten nach erfolgreicher Transplantation aus Hamburg, Göttingen und Berlin über ein Jahr beobachtet. Zu sieben Visiterterminen wurden neben den routinemäßigen Vollblutmessungen die intrazellulären Konzentrationen der Immunsuppressiva ermittelt. Zur Messung mussten die PBMCs zunächst aus der Blutprobe isoliert werden, bevor in diesen Zellen die Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC und massenspektrometrischer Detektion gemessen wurden.

Im Folgenden habe ich statistische Auswertungen vorgenommen. Insgesamt 32, 151, und 62 Patienten wurden mit Ciclosporin, Tacrolimus und Everolimus behandelt. Für Ciclosporin konnten 84 Messungen intrazellulär und in Vollblut durchgeführt werden. Die Korrelation zwischen beiden Werten war nur moderat ($r = 0,41$). In der Untergruppe der Patienten, die eine Rejektion erlitten, waren die Blutspiegel intrazellulär und in Vollblut vor Rejektion geringer als in der Gesamtgruppe (intrazellulär: 727,5 versus 788,8 pg/1 Mio. Zellen in Gesamtgruppen). Für Tacrolimus konnten 662 Messungen intrazellulär und in Vollblut registriert werden. Die Korrelation zwischen den beiden Konzentrationen war schwach, aber signifikant ($r = 0,58$). In der Untergruppe der Patienten, die eine Rejektion erlitten, waren die Blutspiegel intrazellulär und in Vollblut vor Rejektion allerdings höher als in der Gesamtgruppe (intrazellulär: 35,5 versus 33,4 pg/1 Mio). Für Everolimus konnten schließlich 171 Messung intrazellulär und in Vollblut durchgeführt werden. Die Korrelation zwischen beiden Werten war mit $r = 0,50$ wieder nicht sehr stark. Bei Patienten, welche eine

Rejektion erlitten, verhielten sich die Messwerte konträr zu den Erwartungen und waren höher im Vergleich zur Gesamtgruppe (intrazellulär: 5,7 versus 5,2 pg/1 Mio. Zellen).

Insgesamt ist die Frage bisher nur in wenigen von den Fragestellungen und vom Studiendesign her unterschiedlichen Studien analysiert worden. Viele der Studien sind in der Datenauswertung gar nicht auf die Frage eingegangen, ob für die Voraussage von Rejektion oder Infektion das intrazelluläre Verfahren besser als das Vollblut-Verfahren ist.

Abschließende Aussagen sind auch aus unserer Studie nicht möglich, da sich in den relevanten Zeiträumen nur relativ wenig Rejektionen oder Infektionen ereignet hatten. Es ist nach den vorliegenden Messungen möglich, dass intrazelluläre Messungen etwas besser als Vollblut-Messungen sind, aber eine erhebliche Verbesserung ist nach den vorliegenden Zahlenwerten nicht wahrscheinlich. Auch bleibt zu berücksichtigen, dass mit den gegenwärtigen Verfahren die Messung der intrazellulären Konzentrationen sehr aufwändig ist und nicht einfach zu standardisieren ist.

6 Literaturverzeichnis

Aktories K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10., überarb. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2009

Astellas (2015a): Fachinformation Advagraf® 1 mg Hartkapseln, retardiert

Astellas (2015b): Fachinformation Prograf® 1mg Hartkapseln

Barbari A, Masri M, Stephan A, Mourad N, El-Ghoul B, Kamel G, Kilani H, Karam A (2005): Cyclosporine lymphocyte maximum level: a new alternative for cyclosporine monitoring in kidney transplantation. *Exp Clin Transplant* 3, 293-300

Barbari A, Masri M, Stephan A, Rizk S, Younan F (2007): A novel approach in clinical immunosuppression monitoring: drug lymphocyte level. *Exp Clin Transplant* 5, 643-648

Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB (2013): PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 23, 563-585

Beimler J, Morath C, Zeier M (2014): Modern immunosuppression after solid organ transplantation. *Internist* 55, 212-222

Binder (2015): Bestimmung der Immunsuppressiva in PBMC's an der LC-MS/MS 4 SOP

Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE: Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2006

Capron A, Lerut J, Latinne D, Rahier J, Haufroid V, Wallemacq P (2012): Correlation of tacrolimus levels in peripheral blood mononuclear cells with histological staging of rejection after liver transplantation: preliminary results of a prospective study. *Transpl Int* 25, 41-47

Citterio F (2004): Evolution of the therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc* 36, 420 - 425

Cornberg M, Schlevogt B, Rademacher J, Schwarz A, Sandherr M, Maschmeyer G (2016): Spezifische Infektionen bei Organtransplantationen. *Internist* 57, 38-48

Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Ansermot N, Fathi M, Pascual M, Eap CB (2008): Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients *Pharmacogenet Genomics* 18, 307-315

Dasari BV, Hodson J, Nassir A, Widmer J, Isaac J, Mergentel H, Muiesan P, Mirza DF, Perera MT (2016): Variations in Practice to Therapeutic Monitoring of Tacrolimus following Primary Adult Liver Transplantation *Int J Organ Transplant Med* 7, 1-8

Dempke W: *Lehrbuch Hämato-Onkologie: Hämatologie - Onkologie - Hämostaseologie*. Huber, Bern 2006

EB (2003): Organtransplantation: Immunsuppression erhöht das Krebsrisiko *Dtsch Arztebl International* 100, A-1890

Falck P, Asberg A, Guldseth H, Bremer S, Akhlaghi F, Reubsæet JL, Pfeffer P, Hartmann A, Midtvedt K (2008): Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients *Transplantation* 85, 179-184

Gross JH: *Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch*. Springer, Berlin 2013

Han SS, Yang SH, Kim MC, Cho JY, Min SI, Lee JP, Kim DK, Ha J, Kim YS (2016): Monitoring the Intracellular Tacrolimus Concentration in Kidney Transplant Recipients with Stable Graft Function *PLoS One* 11, e0153491

Hibbeler B (2007): Christiaan Barnard: Star im OP und in den Klatschblättern *Dtsch Arztebl International* 104, A-3563

Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM (2002): International Federation of Clinical Chemistry/International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology working group on immunosuppressive drug monitoring *Ther Drug Monit* 24, 59-67

Klinkhammer G, Richter-Kuhlmann E (2015): Organspenden in Deutschland und Europa: Das Vertrauen zurückgewinnen *Dtsch Arztebl International* 112, A-234

Koster RA, Dijkers EC, Uges DR (2009): Robust, high-throughput LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus in whole blood *Ther Drug Monit* 31, 116-125

Leeson S, Desai SP (2015): Medical and ethical challenges during the first successful human kidney transplantation in 1954 at Peter Bent Brigham Hospital, Boston *Anesth Analg* 120, 239-245

Lemaitre F, Antignac M, Fernandez C (2013): Monitoring of tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells: application to cardiac transplant recipients. *Clin Biochem* 46, 1538-1541

Lemaitre F, Blanchet B, Latournerie M, Antignac M, Houssel-Debry P, Verdier MC, Dermu M, Camus C, Le Priol J, Roussel M, et al. (2015): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in liver transplant recipients: inside the white blood cells. *Clin Biochem* 48, 406-411

Lemmer B, Brune K, Palm D, Fülgraff G: *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie*. 14., überarb. Auflage; Springer, Heidelberg 2010, 427-428

Lepage JM, Lelong-Boulouard V, Lecouf A, Debruyne D, Hurault de Ligny B, Coquerel A (2007): Cyclosporine monitoring in peripheral blood mononuclear cells: feasibility and interest. A prospective study on 20 renal transplant recipients. *Transplant Proc* 39, 3109-3110

Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie : Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 17., vollst. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010

Meißner J, Wendler T: *Statistik-Praktikum mit Excel: Grundlegende quantitative Analysen realistischer Wirtschaftsdaten mit Excel 2013*. Springer Fachmedien, Wiesbaden 2015

Meißner JD, Freidank CC: *Statistik: verstehen und sinnvoll nutzen ; anwendungsorientierte Einführung für Wirtschaftler*. Oldenbourg, München 2004

Merck (2013): Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Solu-Decortin®

Millán O, Benitez C, Guillén D, López A, Rimola A, Sánchez-Fueyo A, Brunet M. (2010): Biomarkers of immunoregulatory status in stable liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive therapy. *Clin Immunol* 137, 337-346

Novartis (2014): Fachinformation Simulect®

Novartis (2015): Fachinformation Sandimmun® Weichkapseln

Novartis (2016a): Fachinfo Certican® Tabletten

Novartis (2016b): Fachinformation Myofortic®

Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martinez-Alarcon L, Sanchez-Bueno F, Robles R, Rios A, Aparicio P, Parrilla P: FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplant* 86, 1370-1378

Robertsen I, Vethe NT, Midtvedt K, Falck P, Christensen H, Asberg A (2015): Closer to the Site of Action: Everolimus Concentrations in Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlate Well With Whole Blood Concentrations *Ther Drug Monit* 37, 675-680

Schulz-Juergensen S, Burdelski MM, Oellerich M, Brandhorst G (2012): Intracellular ATP production in CD4+ T cells as a predictor for infection and allograft rejection in trough-level guided pediatric liver transplant recipients under calcineurin-inhibitor therapy. *Ther Drug Monit* 34, 4-10

Shipkova M, Vogeser M, Ramos PA, Verstraete AG, Orth M, Schneider C, Wallemacq P (2014): Multi-center analytical evaluation of a novel automated tacrolimus immunoassay. *Clin Biochem* 47, 1069-1077

Shipkova M, Hesselink DA, Holt DW, Billaud EM, van Gelder T, Kunicki PK, Brunet M, Budde K, Barten MJ, De Simone P, et al. (2016): Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus: A Consensus Report. *Ther Drug Monit* 38, 143-169

Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963): Homotransplantation of the Liver in Humans *Surg Gynecol Obstet* 117, 659-676

Stienstra NA, Sikma MA, van Dapperen AL, de Lange DW, van Maarseveen EM (2016): Development of a Simple and Rapid Method to Measure the Free Fraction of Tacrolimus in Plasma Using Ultrafiltration and LC-MS/MS. *Ther Drug Monit* 38, 722-727

Stingl JC, Brockmüller J (2013): Personalisierte Pharmakotherapie: Evidenzbasierte Leitlinien und klinische Anwendung pharmakogenetischer Diagnostik. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56, 1509-1521

Tonsho M, Michel S, Ahmed Z, Alessandrini A, Madsen JC (2014): Heart transplantation: challenges facing the field. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a015636

Tron C, Rayar M, Petitcollin A, Beaurepaire JM, Cusumano C, Verdier MC, Houssel-Debry P, Camus C, Boudjema K, Bellissant E, et al. (2016): A high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of tacrolimus in human bile in liver transplant recipients *J Chromatogr A* 1475, 55-63

Vogeser M, Shipkova M, Rigo-Bonnin R, Wallemacq P, Orth M, Widmann M, Verstraete AG (2014): Multicenter analytical evaluation of the automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. *Ther Drug Monit* 36, 640–650

Wehling M, Busch E, Diener HC, Dippel E: *Klinische Pharmakologie*. 2. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011

Wiegand J, Berg T (2013): Ätiologie, Diagnose und Prävention einer Leberzirrhose *Dtsch Arztebl International* 110, 85-91

Wieland E, Shipkova M: Biomarker im Blut zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie nach der Transplantation solider Organe. Zugriff am 2016-04-04[11:23:51.168+02:00] 2014

Wolff D, Bertz H, Greinix H, Lawitschka A, Halter J, Holler E (2011): Klinische Versorgung der chronischen Graft-versus-Host-Krankheit. *Dtsch Arztebl* 108, 732-740

Wong SH, Johnson-Davis KL, Garrison K, Rankin JD, Muhammad CS (2016): Everolimus TDM using Thermo Fisher QMS immunoassay on Indiko, Beckman DxC, AU680, and AU5800 analyzers. *Clin Biochem* 50, 425-430

Internetquellen:

<http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation.html#aboveline>;
Zugriff am 05.03.2017

<https://www.mh-hannover.de/lebertransplantation.html#c1653>; Zugriff am 03.03.2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen Dank aussprechen. Mein Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Brockmöller, für die stets exzellente Betreuung, die großzügige Leihgabe von Fachliteratur und das immer offene Ohr für Fragen. Für die Anleitung zur Einfindung in das Thema unserer Studie, die Unterstützung in der Sammlung der klinikeigenen Daten sowie der Kommunikation mit den externen Studienzentren und die Einarbeitung in die Datenbank danke ich insbesondere Dr. Johannes Matthaei. Ebenso danke ich Herrn Markus Harden für die freundliche zur Verfügungstellung der Datenbankeexporte. Schließlich danke ich der Abteilung der klinischen Pharmakologie für das großzügige Angebot eines eigenen Arbeitsplatzes im Büro und das über zwei Jahre angenehme Arbeitsklima.

Lebenslauf

Ich, Marie-Luise Bräuer, wurde am 21. August 1991 in Oberviechtach in geboren. Als eine von zwei Töchtern wuchs ich zusammen mit meinen Eltern, RA Maria Bräuer und stv. OStD Manfred Bräuer, in Teunz auf. Dort besuchte ich von 1996 bis 2000 die Grundschule Teunz, begann die gymnasiale Laufbahn im Jahr 2000 am Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach und setzte diese von 2002 bis zu meinem Abitur im Juni 2010 am Kepler-Gymnasium in Weiden in der Oberpfalz fort. Im November 2010 begann ich eine Ausbildung zur Zahntechnikerin bei „Thymian Dental“ in Weiden i. d. OPf. und bewarb mich daneben mit Erfolg für einen Studienplatz der Zahnmedizin an der Georg-August Universität Göttingen, wo ich mein Studium zum Sommersemester 2011 begann. Meine Anmeldung zur Dissertation erfolgte im Februar 2015. Für die zeitintensive Datensammlung investierte ich das Sommersemester 2015. Im November 2016 schloss ich mein zahnmedizinisches Staatsexamen ab und widmete mich bis März 2017 dem Abschluss meiner Dissertation.