

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor:**

**Prof. Dr. Dr. h. c. Karl Walter Jauch**

**Makro- und mikrozirkulatorische Veränderungen  
nach Immunsuppressiva  
bei gesunden Probanden**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**

**an der Fakultät für Medizin**

**der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Kornelia Wirsching

München

2011

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. N. Hoffmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Messmer  
Prof. Dr. Peter Nelson, Ph. D.

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen  
Prüfung: 6.10.2011

Meinem Vater  
Prof. Dr. Rainer Paul Wirsching  
gewidmet



**Abkürzungverzeichnis:**

<b>akA:</b>	arteriokapsulärer Abstand
<b>CCD:</b>	Charge Coupled Device
<b>CyA:</b>	Ciclosporin A
<b>C2-Wert:</b>	Wert zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme
<b>CNI:</b>	Calcineurininhibitor
<b>FCD:</b>	funktionelle Gefäßdicke
<b>GFR:</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>HF:</b>	Herzfrequenz
<b>LDF:</b>	Laserdopplerflowmetrie
<b>MMF:</b>	Mycophenolatmofetil
<b>MAP:</b>	Mittlerer arterieller Blutdruck
<b>MZP:</b>	Messzeitpunkt
<b>NO:</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OPS:</b>	Orthogonal polarization spectral imaging
<b>O2C:</b>	Oxygen to see

**PDS:** Powerdopplersonographie

**RBC:** Erythrozyten

**RPF:** renaler Plasmafluss

**SpO<sub>2</sub>:** partielle Sauerstoffsättigung (pulsoximetrisch ermittelt)

**SO<sub>2</sub>:** Sauerstoffgewebssättigung

**TAC:** Tacrolimus

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	10
1. 1	Einführung in die Thematik	10
1. 1. 1	Die Geburt der Nierentransplantation	10
1. 1. 2	Die Anfänge der Transplantationsimmunologie	10
1. 2	Verwendete Immunsuppressiva	13
1. 2. 1	Ciclosporin A	13
1. 2. 2	Tacrolimus	16
1. 2. 3	Mycophenolatmofetil	18
1. 3	Transplantatabstoßung	20
1. 3. 1	Hyperakute Rejektion	20
1. 3. 2	Akute Rejektion	20
1. 3. 3	Chronische Rejektion und Transplantatnephropathie	20
1. 4	Ziel der Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2. 1	Probandenkollektiv	23
2. 2	Vorbefunde der Probanden	24
2. 3	Medikation und Dosierung	24
2. 4	Datenerhebung	25
2. 4. 1	Makrozirkulationsparameter	25
2. 4. 2	Mikrozirkulationsmessung der Mundbodenschleimhaut (Intravitalmikroskopie)	25
2. 4. 2. 1	Die Technik des OPS Imaging	26

2. 4. 2. 2	Ablauf der Messung und Analyse	28
2. 4. 3	Mikrozirkulationsparameter- Weißlicht- und Laserlichtgewebsspektroskopie	30
2. 4. 3. 1	Technik und Messparameter des Oxygen to see (O2C)	30
2. 4. 3. 2	Mikrozirkulationsmessung an der Mundschleimhaut	34
2. 4. 3. 3	Mikrozirkulationsmessung an der Fingerbeere	34
2. 4. 4	Sonographische Untersuchung an Nieren und Leber mittels Power-Dopplersonographie	36
2. 4. 4. 1	Grundlagen der Power-Dopplersonographie	36
2. 4. 4. 2	Messvorgang	37
2. 5	Statistische Methoden	38
3	AUSWERTUNG	39
3. 1	Laborparameter	39
3. 1. 1	Blutbild und Gerinnung	39
3. 1. 2	Immunsuppressivaspiegel im Vollblut	39
3. 2	Makrohämodynamik	41
3. 3	Mikrohämodynamik	44
3. 3. 1	Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung der Mundbodenschleimhaut (Intravitalmikroskopie)	44
3. 3. 2	Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung an der Mundschleimhaut (O2C)	51
3. 3. 3	Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung am Unterarm (Ischämie-Reperfusionstest)	55
3. 3. 3. 1	Baseline-Messung	55
3. 3. 3. 2	Minimalwerte	59
3. 3. 3. 3	Maximalwerte	60

3. 4	Sonographische Untersuchung der Mikrozirkulation von Niere und Leber	64
3. 4. 1	Arteriokapsulärer Abstand Niere	64
3. 4. 2	Arteriokapsulärer Abstand Leber	64
4	DISKUSSION	66
4. 1	Kritische Analyse der Messmethodik	66
4. 2	Veränderung der Makrohämodynamik	71
4. 3	Zentrale- und periphere mikrozirkulatorische Veränderungen	72
4. 4	Organspezifische mikrozirkulatorische Veränderungen am Beispiel Niere und Leber	76
4. 5	Konsequenz für die Klinik	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	DANKSAGUNG	89

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung in die Thematik

### 1.1.1 Die Geburt der Nierentransplantation

Es war im März 1902 als der Ungar *Emerich Ullmann* im Hörsaal des Billrothhauses der Gesellschaft der Ärzte in Wien, umzingelt von faszinierten Medizinern und Studenten einen lebenden Hund präsentierte dem Urin über einen am Hals des Tieres gelegenen Ureter tropfte. Der Chirurg hatte zuvor eine Niere des Tieres entnommen, sie in eine subkutane Tasche in dessen Nacken eingepflanzt, die Nierengefäße mit der Arteria Carotis und der Vena Jugularis anastomosiert und schließlich den Ureter in die Haut des Hundes eingenäht. Die Urinproduktion hielt 5 Tage an [115]. Die autologe Nierentransplantation war geboren. Beflügelt von diesem unerwarteten Erfolg stellte *Ullmann* nur einige Wochen später einen weiteren Transplantationserfolg vor: Eine Ziege, in deren Nacken die Niere eines Hundes transplantiert worden war [116]. Man muss es schon als einen sehr glücklichen Zufall für den Mediziner ansehen, der die Problematik der Abstoßungsreaktion noch nicht kannte, dass dieses xenogene Transplantat zumindest über einen sehr kurzen Zeitraum ohne jegliche Immunsuppression funktionierte.

### 1.1.2 Die Anfänge der Transplantationsimmunologie

Zur gleichen Zeit wie *Emerich Ullmann* arbeitete ein weiterer Chirurg mit dem Modell der Autotransplantation von Nieren an Hunden. Der Franzose *Alexis Carrel* (1873-1944), der erst in Lyon und später am Rockefeller Institute in New York arbeitete, hatte diese Operation mehrfach erfolgreich durchgeführt (1908, 1911, 1914). Bei von ihm an Labortieren erprobten Allotransplantationen fiel ihm immer wieder das unterschiedliche Schicksal zwischen autolog und homolog verpflanzten Organen auf. Und obgleich ihm der grundsätzliche Unterschied dieser beiden Transplantationstechniken noch nicht bewusst war, so hatte er dennoch schon erkannt, dass das Serum des Organempfängers für das Allotransplantat giftige Substanzen beinhalten musste. Zur selben Zeit als *Carrel* an Organtransplantationen

arbeitete, fand einer seiner Mitarbeiter am Rockefeller Institut, *N.N. Murphy*, heraus, dass in Hühnereier transplantierte Tumore nach dem Schlüpfen des Kükens mit dem Organismus mit wuchsen. Im Gegensatz dazu waren Tumorzellen, die in bereits geschlüpfte Küken transplantiert wurden, innerhalb weniger Tage abgebaut. *Carrel* folgerte daraus, dass ein Organismus an einem bestimmten Punkt seiner Entwicklung dazu befähigt wird Fremdgewebe abzustößen. Erst Jahre später sollte diese Idee von Vorreitern der Transplantationimmunologie wie Medawar und Billingham wiederaufgegriffen und weiterentwickelt werden, um daraus das Prinzip der „aktiv erworbenen Immuntoleranz“ gegenüber organismusfremden Zellen zu postulieren [10]. Die praktische Transplantationsmedizin befasste sich mittlerweile hauptsächlich mit der Übertragung menschlicher Nieren, der sogenannten humanen Allotransplantation. Die erste Leichen-Nierentransplantation erfolgte 1936 durch Voronoy in Kiew [21] ohne Kenntnisse um immunologische Zusammenhänge; das Transplantat wurde innerhalb von 2 Tagen abgestoßen. Jetzt musste die Ursache für den Abstoßungsprozess gefunden werden. Mitte der Vierziger Jahre gelang es Medawar, gemeinsam mit Billingham, zu zeigen, dass die Abstoßungsreaktion eine Immunantwort auf genetisch inkompatibles Gewebe war [11]. Darauf folgende Studien brachten zu Tage, dass transplantiertes Gewebe sowohl durch spezifische zelluläre und humorale Mechanismen als auch durch eine unspezifische Immunantwort zerstört werden kann [64]. Das galt allerdings nicht für Transplantate die dem Empfänger genetisch entsprachen, wie bei eineiigen Zwillingen.

Dank dieser Tatsache gelang am 23.12.1954 in Boston der große Durchbruch in Sachen Lebendtransplantation. Im Brigham Hospital der Harvard Medical School verpflanzten Joseph Murray und John Merrill dem jungen Amerikaner Richard Herrick eine Niere seines gesunden Zwillingenbruders Ronald. Der 25 Jährige konnte nach 14 Tagen das Krankenhaus verlassen, heirate bald darauf und gründete eine Familie [76]. Dieser bahnbrechende Erfolg schürte in Chirurgen wie auch experimentellen Forschern verstärkt das Verlangen die Technik der Allotransplantation auf die breite Masse niereninsuffizienter Patienten anwenden zu können. Wie also konnte das menschliche Immunsystem unterdrückt werden? Nach mehreren gescheiterten Versuchen den Immunprozess mittels Ganzkörperbestrahlung zu unterdrücken kam man 1959 auf die Idee einer medikamenteninduzierten Immuntoleranz [75]. Schwartz und Dameschek war es gelungen in Hasen, die mit 6-Mercaptopurin (6-MP) behandelt worden waren, eine

spezifische Immuntoleranz gegen Proteine auszulösen. Den Tieren war es jedoch gleichzeitig möglich eine Immunreaktion auf Proteine zu zeigen, die nicht simultan mit dem Medikament gegeben wurden, was für die erwünschte Spezifität der Immunsuppression sprach [95].

Den eigentlichen Startschuss für die klinische Ära der Transplantationsmedizin gab es schließlich im April 1962 als ein medikamentös behandelter Empfänger einer Nieren-Leichen-Spende mehr als ein Jahr überlebte [77]. Zahlreiche bahnbrechende Entwicklungen, wie die Einführung des heterologen Antilymphozyten Globulins (ALG), die Anwendung von Steroiden und Azathioprin sowie die von Terasaki entwickelte Histokompatibilitätstestung, brachten die Immuntherapie und damit das Transplantatüberleben über die nächsten 2 Jahrzehnte Schritt für Schritt nach vorne [81].

Nichts desto trotz stagnierte im Verlauf der 80er Jahre die Einjahresüberlebensrate von Transplantatnieren bei 60%. Diese Situation änderte sich, als das Medikament Ciclosporin auf den Markt kam. Die Entdeckung dieses ersten Immunsuppressivums der 2.Generation, also der spezifischen Immunsuppression, bedeutete einen Meilenstein für die Nierentransplantation. Die Entdeckung dieses Medikamentes durch Borel et al. 1976 und die baldige Einführung in den klinischen Alltag war der Beginn der „Ciclosporin-Ära“. In frühen Multicenterstudien konnte damit eine Steigerung des 1-Jahrestransplantatüberlebens auf 70-80% gezeigt werden [103]. Es folgte der steigende Einsatz biologischer Wirkstoffe, wie mono- und polyklonaler Antikörper, beispielsweise OKT3, aber auch spezifischer Antikörper gegen IL-2, welche vor allem in der Erstbehandlung nach Transplantation breite Anwendung fanden [85]. Parallel zu den monoklonalen Antikörpern kamen zwei weitere Präparate auf den Markt, die in der heutigen Transplantationsmedizin täglich Anwendung finden: Der Calcineurininhibitor Tacrolimus und das Mycophenolatmofetil. Zusammen mit Ciclosporin sind dies die drei Medikamente, die in unserer Studie untersucht wurden und auf die im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

## 1.2 Verwendete Immunsuppressiva

### 1.2.1 Ciclosporin A

Ciclosporin A (CyA) ist ein aus 10 bekannten aliphatischen Aminosäuren und einer neuartigen C9-Aminosäure bestehendes Peptid. Es wird aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams gewonnen. Erstmals wurde dieser Pilz 1971 von Mitarbeitern der Firma Sandoz aus Bodenproben in der Hardanger Vidde, einer weitgehend baumlosen Hochebene im südlichen Teil Norwegens isoliert [113]. Bei ersten Untersuchungen im Labor von *Jean Borel* 1972 in Basel wurde seine immunsuppressive Wirksamkeit entdeckt. Heute weiß man, dass dies durch eine relativ spezifische, nicht zytotoxische Suppression der T-Zellaktivität geschieht.

Wegen seiner wasserunlöslichen Struktur ist Ciclosporin pH-neutral und in vielen organischen Lösungsmitteln und Lipiden hochlöslich, in Wasser jedoch praktisch nicht [59]. Die Leber ist der Hauptmetabolisierungsort für Ciclosporin A. Hier erfolgt der Abbau über das Cytochrom p450-System. Die Eliminierung erfolgt zu 95% biliär und zu 5% renal. Die Halbwertszeit von Ciclosporin beträgt im Mittel 8,5 Stunden, bei Leberfunktionsstörungen kann sie jedoch deutlich verlängert sein. Man kennt heute 25 Metabolite von CyA, wobei einige davon immunsuppressive Eigenschaften aufweisen, jedoch weit weniger potent sind als die Muttersubstanz [79]. Ciclosporin hat eine geringe therapeutische Breite und ein enges therapeutisches Fenster [79].

Es bindet nach Eintritt in eukaryote Zellen an sogenannte Cyclophiline, zytosolische Proteine die zur Gruppe der Immunophiline gehören [32]. Die hauptsächliche zytoplasmatische Isoform Cyclophilin A (CyPA) wird in hoher Konzentration in allen Geweben von Säugetieren, so auch in T-Zellen exprimiert, und hat eine hohe Affinität zu Ciclosporin. Cyclophiline besitzen einerseits Isomerasefunktion, können also die cis-trans-Konformationsänderung von Peptiden katalysieren und außerdem Enzymfunktion, wodurch die Dreifachfaltung von Proteinen begünstigt wird. Die enzymatische Funktion wird durch die Bindung an Ciclosporin aufgehoben. Der intrazelluläre Komplex aus Cyclophilin A und Ciclosporin A interagiert wiederum mit einem weiteren zytosolischen Protein, dem Calcineurin. Calcineurin (auch PP2B genannt) ist eine Calcium-abhängige Phosphatase, die nach Aktivierung durch den T-Zell-Rezeptor Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (engl.: *Nuclear factor of activated T-cells*) dephosphoryliert. Die dadurch freiwerdende Energie bewirkt eine

Translokation von NFAT in den Zellkern, wo es sich mit einem anderen Protein zu einem aktiven Kernfaktor verbindet. Dieser Kernfaktor wirkt als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene, welche für Zytokine wie IL-2 und IL-4 sowie das costimulierende Molekül CD40L codieren [59]. Gebunden im biomolekularen CyPA/CsA-Komplex verliert das Calcineurin seine enzymatische Funktion. Das phosphorylierte NFAT kann nicht in den Zellkern übertreten wodurch konsekutiv T-Zellaktivierung verhindert wird [105]. Darüber hinaus wird auch die Dephosphorylierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie Elk1 und CREB (engl.: *cAMP-response element binding protein*), welche die Genexpression von Protoonkogenen, wie c-myc, c-fos und n-ras unterstützen, unterbunden [55]. Aktuelle Forschungsergebnisse haben ferner einen zweiten hochspezifischen Reaktionsweg zur Unterdrückung der Lymphozytenaktivierung aufgezeigt. So unterdrückt Ciclosporin nicht nur die Dephosphorylierung von NFAT, sondern auch die Aktivitäten von AP-1 und NF $\kappa$ B, zweier Transkriptionsfaktoren, welche zur Aktivierung des IL-2 Gens benötigt werden [67,86]. Dies geschieht unter anderem durch die Hemmung intrazellulärer MAP-Kinasen, wie JNK und p38 [66]. Durch diese multifaktorielle Unterdrückung transkriptioneller Vorgänge durch Ciclosporin stagniert die Zelle auf der Ebene der G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase ohne neue DNS oder RNS zu produzieren. Demzufolge bleibt auch die Produktion der für die Immunantwort essentiellen IL-2 Rezeptoren aus. Darüber hinaus beeinflusst Ciclosporin auch im Zytoplasma stromabwärts gerichtete molekulare Vorgänge. Im Falle eines proinflammatorischen Stimulus, z.B. durch allgemeine entzündliche Prozesse im Transplantat, ist Ciclosporin fähig, die durch Zytokine (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) ausgelöste Hochregulierung von Adhäsions- und MHC-Molekülen zu blockieren [98].

Generell existiert eine enge Korrelation zwischen der immunsuppressiven Wirksamkeit der Calcineurininhibitoren und deren Wirkstoffkonzentration im Blut. Bei oraler Medikamentenaufnahme ist die höchste Wirkstoffkonzentration ( $c_{max}$ ) nach circa 2 Stunden erreicht [41]. Bei einer oralen Medikamentendosis, aufgeteilt auf 2 Gaben pro Tag, entsteht so ein zweigipfelter Konzentrationsverlauf, wobei 8-12 Stunden nach Medikamenteneinnahme nur noch von einer partiellen Immunsuppression durch die Substanz ausgegangen werden kann [40].

Zu den wichtigsten Nebenwirkungen des Ciclosporins zählt die Nephrotoxizität. Man unterscheidet zwischen akuter Nephrotoxizität als Folge einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen auf dem Boden zu hoher Ciclosporin A Plasma Spiegel und

chronischer Nephrotoxizität, welche mit einer irreversiblen Nephrosklerose einhergeht und zum Organversagen führen kann. Ciclosporin erhöht die Produktion gefäßmodulatorischer Mediatoren, wie Thromboxan A<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub>, Leukotrien und Endothelin-1 [14,82]. Zur gleichen Zeit tragen Veränderungen im Stickstoffmonoxid (NO)-pathway zur CyA-induzierten renalen Vasokonstriktion bei [15]. Zusätzlich erhöht CyA die Aktivität der sympathischen afferenten und efferenten Schenkel der renalen Nerven, was zu einer kortikalen Vasokonstriktion und dem Anstieg des vaskulären Widerstandes führt [72]. Histologisch stellt sich die akute Nephrotoxizität durch isometrische Vakuolisierung im Bereich der proximalen Tubulusepithelien dar. Bei chronischer Nierenschädigung durch CyA kommt es zu einem Verlust der epithelialen Zellintegration im proximalen Tubulus bis hin zur Tubulusatrophie. Außerdem zu einem mehr oder weniger ausgeprägten interstitiellen mononukleären Zellinfiltrat, einer interstitiellen Schädigung mit sekundärer interstitieller Fibrose sowie einer vaskulären Wandsklerosierung mit Lumeneinengung, auch renale Atherosklerose genannt [37]. Ursachen dafür sind unter anderem die CyA-getriggerte Thromboxan- und Leukotrien-Produktion mit der Folge einer erhöhten Plättchenaggregation an der Gefäßwand und konsekutiver Freisetzung von PDGF (engl.: *platelet-derived growth factor*) sowie anderer fibrogener Faktoren, die zu einer Hypertrophie der arteriellen Gefäßwandmedia führen. Darüber hinaus konnte experimentell gezeigt werden, dass CyA die Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Interstitium induziert, welche sowohl vaskuläre Schädigungen als auch fibrotische Reaktionen verschlimmern können. Die Arbeitsgruppe um *Zhong* hat dazu die Hypothese aufgestellt, welche besagt, dass es bei der Verabreichung von CyA alle 12 Stunden durch erhöhte Aktivität renaler efferenter Nervenfasern zu einer erhöhten Ausschüttung freier Radikale kommt. Dies führt zu Vasokonstriktion und konsekutivem Stress durch Hypoxie und Reoxygenierung [122]. Als zusätzlicher Schädigungsmechanismus wird die CyA-induzierte Produktion von TGF- $\beta$ , vermutet, welches die extrazelluläre Matrix von Zellen so verändern kann, dass ein fibrotisches Milieu entsteht [65]. Neueste Studien sprechen außerdem Aldosteron eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der chronischen Nierenschädigung zu [16].

Auch neurologische und psychiatrische Nebenwirkungen sind unter der Ciclosporintherapie beobachtet worden. Dazu zählen Tremor, Kopfschmerzen, Krampfanfälle, unterschiedliche Parästhesien an den Gliedmaßen, sowie Manien und

Depressionen. Sie werden teilweise mit der Ciclosporin-induzierten Hypomagnesiämie in Verbindung gebracht und sind durch Dosisreduktion reversibel [36].

Eine weitere Komplikation stellt die CyA-assoziierte Hypertension dar. Bluthochdruck wird unter CyA-Therapie bei 68-92% aller transplantierten Patienten festgestellt [25]. Als Ursache dafür werden die CyA-getriggerte Endothelinfreisetzung sowie die Stimulation des sympathischen Nervensystems, die auch durch einen ausgeprägten Tremor in Erscheinung treten kann, diskutiert [70].

Weitere Nebenwirkungen von Ciclosporin sind das hämolytisch-urämische Syndrom, entsprechend einer Arteriopathie mit mikrothrombotischen Veränderungen [60]. Auch Hyperglykämie durch den betazelltoxischen Effekt von Ciclosporin und Hyperlipidämie, unter anderem durch Cholesterinwerterhöhung [13], kommen vor. Des Weiteren wird eine Hyperurikämie durch verminderte Harnsäureresorption im proximalen Tubulus beobachtet [62]. Hyperkaliämie und Hypomagnesiämie sind ebenso mehrfach beschrieben [46]. An unerwünschten Wirkungen werden Übelkeit, Erbrechen, Hypertrichiose und Gingivahyperplasie von vielen Patienten als besonders belastend empfunden. Die Inzidenz von Knochenerkrankungen und malignen Erkrankungen ist unter Ciclosporin-Dauertherapie erhöht [59].

### 1.2.2 Tacrolimus

Das zu den Makroliden zählende Tacrolimus, früher FK 506 genannt, wurde wie auch das Ciclosporin aus einem Pilz isoliert. Eine von Fujisawa Pharmaceutical Co.Ltd (Osaka, Japan) engagierte Forschergruppe um *Kino et al* hatte den Pilz 1984 am Fuße des Berges Tsukuba in der Nähe von Tokio gefunden und ihn daraufhin *Streptomyces Tsukubaensis* genannt [52]. In vielerlei Hinsicht um Tacrolimus besonders verdient gemacht hat sich die „Pittsburgh-Gruppe“ um *Thomas Starzl*. Sie stellte 1989 auf dem 4.Kongress der ESOT (Europäische Gesellschaft für Organtransplantation) in Barcelona die ersten klinischen Ergebnisse mit diesem Immunsuppressivum vor [102].

Die chemische Struktur des hydrophoben Tacrolimus ähnelt der von Ciclosporin nicht. Es besteht aus einem Hemiaktal-maskierten  $\alpha,\beta$ -Diketoamid, welches in einem 23-Gliederring inkorporiert ist [59]. Wie auch Ciclosporin wird Tacrolimus hepatisch über das Cytochrom P450-System abgebaut, was auch die ähnlichen

Medikamentenwechselwirkungen erklärt. Auch die geringe therapeutische Breite und die schlechte Bioverfügbarkeit hat es mit Ciclosporin gemein [79]. Tacrolimus verfügt über mehrere Metabolite, die teilweise eine Immunkreuzaktivität verbunden mit pharmakologischer Aktivität aufweisen [107]. Die biologische Halbwertszeit von Tacrolimus im gesunden Menschen beträgt im Durchschnitt rund 43 Stunden. Bei transplantierten Patienten verkürzt sie sich auf circa 12-16 Stunden.

Auf molekularer Ebene ähnelt die Wirkungsweise von Tacrolimus stark der von CyA, ist aber auf molarer Basis um das 10-100 fache potenter [47]. Analog zu Ciclosporin bildet Tacrolimus einen intrazellulären Komplex mit einem Bindungsmolekül, genannt „FK-binding protein 12“ (FKBP12). Die Enzyme der FKBP Familie (auch Romatasen genannt) kommen in allen Organismen vor und ähneln in vielen Bereichen der Cyclophilin-Familie [59]. Das im Zytoplasma von Säugetieren vorherrschende FKBP12 lagert sich als Komplex gemeinsam mit Tacrolimus an die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin, analog zum Ciclosporin [63]. Auch die darauf folgende Abschwächung der nukleären Transkriptionsfaktoren entspricht weitgehend den bereits im Zusammenhang mit dem molekularen Wirkungsmechanismus von Ciclosporin beschriebenen Vorgängen [48,49,89,97]. Ferner weisen neuere Untersuchungen daraufhin, dass auch Tacrolimus einen zweiten transskriptionellen Reaktionsweg über die JNK-p53-Kaskade blockiert [55]. Durch diese Mechanismen werden, wie auch bei Ciclosporin, vermindert Zytokine/Chemokine (z. B. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF sowie Protoonkogene wie c-myc und c-rel) in den T-Zellen synthetisiert und daraus freigesetzt, wodurch die Reaktion des Immunsystems auf transplantierte Organe unterbunden wird [61,112].

Das Nebenwirkungsspektrum von Tacrolimus entspricht im Wesentlichen dem von Ciclosporin, wobei die Nephrotoxizität ebenfalls die Bedeutsamste unter Ihnen ist [114]. Als Ursache dafür werden ein veränderter Prostaglandinspiegel, pathologische Lipidperoxidasen der Zellmembran sowie eine erhöhte Sekretion des vasokonstriktorisches Endothelins verantwortlich gemacht. Auch eine erhöhte Produktion des vasokonstriktorisches Thromboxan A2 in der Niere wird diskutiert [73,83,84].

Im Vergleich zu Ciclosporin wurden Komplikationen wie Tremor, Durchfall und Angina pectoris bei Tacrolimus-Patienten häufiger beobachtet, seltener hingegen Arrhythmien, Akne, Hirsutismus und Gingivahyperplasie [79].

Als eine ernsthafte Nebenwirkung unter Tacrolimus-Therapie muss der diabetogene Effekt angesehen werden. In Studien überstieg die Inzidenz von neu aufgetretenem insulinpflichtigem Diabetes die der Vergleichsgruppe mit Ciclosporinbehandlung um ein Vierfaches [45]. Es wird angenommen, dass Calcineurin und FKBP12 vermehrt in den Inselzellen vorhanden sind. Darüber hinaus scheint die Transkriptionshemmung durch Tacrolimus auch die Insulinproduktion und Freisetzung zu unterdrücken [59]. Die gleichzeitige Gabe von Tacrolimus und Ciclosporin ist kontraindiziert, da dies zu synergistisch- oder additiv-nephrotoxischen Effekten führen kann. Zur gegenseitigen Beeinträchtigung von Blutspiegel und Metabolisierung kommt es durch Gabe von Tacrolimus und Corticosteroiden [1].

### 1.2.3 Mycophenolatmofetil

Mycophenolatmofetil ist ein Morpholinoethylester, dessen Muttersubstanz Mycophenolsäure aus dem Pilz *Penicillium stoloniferum* gewonnen wird. Berichten zufolge wurde bereits 1896 Mycophenolsäure aus Maisbrühekulturen, die „*Penicillium brevicompactum* Diercks“ enthielten, isoliert und deren antibakterielle Wirkung beschrieben, jedoch nicht weiterverfolgt [59]. 1982 waren es *Allison* und *Eugui*, die innerhalb eines Forschungsprogrammes der Firma Synthex in Palo Alto, Kalifornien, das Vorstufenmedikament Mycophenolatmofetil entwickelten, um so dessen Bioverfügbarkeit um ein Vielfaches zu verbessern und darüber hinaus den Purinsynthese inhibierenden Charakter von MMF erforschten [4]. Die enorme immunsuppressive Wirkung von MMF wurde kurz darauf von Randall Morris und Mitarbeitern in Stanford entdeckt [71]. Unter der Leitung des Münchner Transplantationschirurgen und Immunologen *Hans Werner Sollinger* wurde MMF in einem Labor in Madison, Wisconsin bis zur klinischen Anwendung weiterentwickelt [100].

Die durchschnittliche orale Bioverfügbarkeit von MMF nach oraler Gabe beträgt 94%, die Halbwertszeit circa 18 Stunden [22]. Der Abbau erfolgt hauptsächlich in der Leber durch Glucuronisierung zum MPA-Glucoronid (MPAG). MPA wiederum wird größtenteils renal (93%) und zwar vorwiegend als MPAG (97%) eliminiert [79].

Die Wirkung von MMF beruht auf einer reversiblen Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), dem Schlüsselenzym der Purinbiosynthese. Da Lymphozyten keinen effizienten Wieder-

verwertungstoffwechsel (engl.: *salvage pathway*) besitzen müssen sie ihre Nucleotide, wie auch das Purin, über die De-Novo-Synthese herstellen. Die IMPDH liegt intrazellulär in zwei verschiedenen Isoformen vor. Die induzierbare Typ II IMPDH findet sich überwiegend in aktivierten Lymphozyten und ist gegenüber MPA etwa fünfmal empfindlicher als die konstitutive Isoform (IMPDH Typ I). Wenn IMPDH in der Zelle inhibiert wird, dann sinkt der Inosinmonophosphat-Spiegel. Neben einer verminderten Purinsynthese kommt es konsekutiv zur Blockierung der Guaninnucleotidsynthese, der DNA Polymerase-Aktivität, der T-Zell und B-Zell Proliferationsantwort sowie der antigenspezifischen Antikörperproduktion [31]. Darüber hinaus kommt es zur Hemmung der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und zugleich zur Hemmung der mitogenen Antwort von Fibroblasten und Endothelzellen [5].

Im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren konnte die nephroprotektive Wirkung von MMF in mehreren Studien nachgewiesen werden. Eine verminderte Häufigkeit eines Ischämie Reperfusionsschadens der Niere sowie ausbleibender Hypertonus zeichnen dieses neuere Immunsuppressiva aus [100] [117]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Mycophenolsäure gehören Beschwerden des Gastrointestinaltraktes mit Übelkeit, Diarrhoe und Erbrechen. In den meisten Fällen lässt sich durch eine Dosisreduktion ein Sistieren der Beschwerden erreichen, nur in seltenen Fällen muss das Medikament abgesetzt werden.

Zu den hämatologischen Nebenwirkungen zählen Leukopenie und Anämie. Im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren kommt es aber weder zu einer Hypertonie Induktion noch ist das Präparat nephrotoxisch.

Opportunistische Infektion wie Herpes simplex, Herpes zoster oder CMV werden gehäuft festgestellt [51].

## 1.3 Transplantatabstoßung

Eines der zentralen Probleme in der Praxis der Transplantationsmedizin ist die Transplantatabstoßung. Die größte Herausforderung stellt deren Vorbeugung, Diagnostik und Therapie dar. Im Folgenden werden die Formen der Abstoßungsreaktion (Rejektion) kurz skizziert.

### 1.3.1 Hyperakute Rejektion

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Herstellung der Blutzirkulation auf. Auslöser sind präformierte Antikörper gegen HLA oder ABO-Antigene. Es kommt zur konsekutiven Komplementaktivierung. Fibrinablagerung und Thrombenbildung in kleinen Gefäßen führen zu nachfolgenden Nekrosen [92]. Mit einem vor der Transplantation durchgeführten MLC-Test (engl.: *mixed lymphocyte culture*) müssen solche zytotoxischen Antikörper ausgeschlossen werden [46].

### 1.3.2 Akute Rejektion

Sie tritt meist innerhalb des ersten halben Jahres nach Transplantation auf. Es handelt sich meist um eine T-Zell vermittelte, selten eine humorale Immunantwort auf HLA-Antigene des Transplantats. Es kommt zu einem ausgeprägten lymphozytären Infiltrat des Interstitiums. Bei der humoralen Antwort dominieren zelluläre Infiltrate um Transplantatgefäße, zwiebelschalenförmige Endothelproliferationen und Entzündungszellen im Glomerulum. Die Therapie besteht zunächst in einer Kortikosteroidbolustherapie unter Fortführung der Basisimmunsuppression. Bei steroidresistenter Rejektion kommen auch ATG und OKT 3 zum Einsatz [92].

### 1.3.3 Chronische Rejektion und Transplantatnephropathie

Die chronische Transplantatnephropathie, gleichbedeutend mit der chronischen Abstoßungsreaktion, stellt eine nach 8 Wochen bis zu Jahren auftretende progrediente Funktionseinschränkung des Transplantats dar, deren Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Durch freie Sauerstoffradikale

ausgelöste Ischämie- und Reperfusionsschäden sowie Mikroangiopathien werden hierzu diskutiert. Sie führen zu interstitiellen und perivaskulären Infiltraten und fibrosierenden Veränderungen. Histologisch zeigen sich hierbei vier typische Pathologien, Tubulusatrophie, Fibrose und Intimafibrose und Glomerulopathie. Als Hauptursache gelten neben Hypertonie nephrotoxische Immunsuppressiva, zu denen auch die Calcineurininhibitoren gehören. Therapeutisch stehen überwiegend vorbeugende Maßnahmen im Vordergrund, wie eine kurze Ischämiezeit des transplantierten Organs, optimale Immunsuppression, gegebenenfalls Umstellen auf eine Calcineurininhibitorfreie Immunsuppression und Hypertensionskontrolle [33].

## 1.4 Ziel der Arbeit

Immunsuppressiva haben das Langzeitüberleben transplanteder Organe wesentlich verbessert. Jedoch werden gerade den klassischen Calcineurininhibitoren negative Effekte auf die Transplantatfunktion nachgesagt, die zu einer chronischen Transplantatnephropathie und konsekutiv zur Abstoßung des Organs beitragen können. Hierbei sollen insbesondere rezidivierende Mikrozirkulationsstörungen im Transplantat eine Rolle spielen (siehe Kapitel 1.2).

Das Ziel der nachfolgenden Pilotstudie besteht darin, die renale Mikrozirkulation, die Mundschleimhautmikrozirkulation sowie die periphere Vasoreaktivität nach Gabe verschiedener Immunsuppressiva zu untersuchen. Im Fokus stehen hierbei akute Veränderungen der Mikrozirkulation. Im Einzelnen sollen folgende Fragen berücksichtigt werden:

1. Eignet sich das gewählte Studiendesign um parallel periphere und zentrale Mikrozirkulation nicht-invasiv zu untersuchen?
2. Gibt es einen quantifizierbaren Einfluss nach Einmalgabe der untersuchten Immunsuppressiva auf die Mikrozirkulation und die Organperfusion?
3. In welchem Maße kommt es zu einer Veränderung der Vasoreaktivität nach einmaliger Medikamenteneinnahme?
4. Bestehen relevante Unterschiede zwischen den Calcineurininhibitoren und Mycophenolatmofetil?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Probandenkollektiv

In einer prospektiven randomisierten Studie wurden insgesamt 21 Probanden (9 Frauen und 12 Männer) auf der Transplantationsstation im Universitätsklinikum Großhadern untersucht. Sie wurden eingehend über den Inhalt der Studie aufgeklärt und gaben Ihre schriftliche Zustimmung zur Teilnahme.

Es erfolgte die alternierende Einteilung der Teilnehmer 3 Gruppen (n=7) mit jeweils unterschiedlicher immunsupprimierender Medikation (intent to treat n=21). Nach Durchsicht aller erhobenen Daten fiel auf, dass im Verlauf der Datenerhebung bei insgesamt 3 Probanden keine vollständigen bzw. verwertbaren Datensätze erhoben wurden (missing values n=3). Daraufhin wurden diese 3 Probanden nicht in die Auswertung miteingeschlossen. Insgesamt ergab sich daraus folgende Gruppeneinteilung und Durchschnittsalter der jeweiligen Gruppen: Ciclosporin A n=5 (28,8Jahre $\pm$ 3,8), Mycophenolatmofetil n=7 (25,1Jahre $\pm$ 4,7) und Tacrolimus n=6 (26,4Jahre $\pm$ 4,5). Die anthropometrischen Daten (Körpergröße/ Körpergewicht) wurden in Form des Body-Mass-Index für jeden Probanden ermittelt. Die berechneten Mittelwerte der drei Gruppen zeigten sich vergleichbar (CyA-Gruppe 22,8 $\pm$ 2,3/ MMF-Gruppe 23,3 $\pm$ 3,2/ TAC-Gruppe 23,1 $\pm$ 3,2).

Die Einschlusskriterien der Studie waren ein Probandenalter über 18 Jahre und ein Basislabor ohne pathologische Veränderungen, welches im Rahmen der Baseline Untersuchungen erfasst wurde. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von Tumoren oder Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, Nikotinabusus, sowie die Einnahme eines oder mehrerer gefäßmodulierender Medikamente. Generell war die Einnahme von Medikamenten in den letzten 7 Tagen vor dem Experiment, mit der Ausnahme oraler Kontrazeptiva, untersagt. Weiterhin war am Untersuchungstag das Trinken von Kaffee, schwarzteehaltigen Getränken sowie Alkohol verboten. Mit dem Ziel die Resorption und Metabolisierung des jeweiligen Medikamentes nicht zu beeinflussen, blieben die Probanden während des 5 stündigen Messzyklus nüchtern. Um Schleimhautaffektionen zu vermeiden, waren außerdem Kaugummis, Bonbons sowie Mundspüllösungen untersagt.

Die gesamte Studie, eingeschlossen der Aufwandsentschädigung der Probanden wurde von der Ethikkommission des Hauses genehmigt und es wurde eine Patientenversicherung abgeschlossen.

## **2.2 Vorbefunde der Probanden**

In einer dem Messzyklus vorausgehenden Blutuntersuchung wurden bei jedem Teilnehmer folgende Parameter bestimmt:

- kleines Blutbild (Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Leukozyten)
- Gerinnung (Quick , INR, aPTT, Antithrombin, D-Dimer)
- Harnstoff
- Kreatinin

## **2.3 Medikation und Dosierung**

Effekte auf die Mikrozirkulation wurden beobachtet nach einmaliger Gabe der unten genannten Medikamente in einer Dosierung, die einer in der klinischen Routine verabreichten durchschnittlichen Einzeldosis entspricht.

Folgende Dosierungen wurden verabreicht:

- Ciclosporin A (Sandimmun optoral)  
1×300mg per os
- Mycophenolatmofetil (Cell Cept, Roche, Grenzach-Whylen)  
1×1g per os
- Tacrolimus (Prograf, Fujisawa, München)  
1×3mg per os

## 2.4 Datenerhebung

In einem Beobachtungszeitraum von 30 Minuten vor bis 4 Stunden nach Medikamenteneinnahmen wurden 6 Messzeitpunkte (MZP) definiert:

Tabelle 1:

<b>Zeitachse in [min]</b>	-30	→Medikamenteneinnahme	30	60	120	180	240
<b>Messzeitpunkt</b>	1		2	3	4	5	6

Alle Messungen erfolgten am liegenden Patienten nach einer Ruhephase von 15 Minuten. Eine annähernd konstante Raumtemperatur von 21-23°C im vollklimatisierten Raum wurde mit einem handelsüblichen Innenraumthermometer regelmäßig überprüft und dokumentiert. Vor Messbeginn wurde ein Arm für die Blutentnahme und alle nicht-invasiven Messungen inklusive der Blutdruckmessung ausgewählt und über den gesamten Versuchszeitraum beibehalten.

Zu jedem der festgelegten Messzeitpunkte wurden folgende Messungen in konstanter Reihenfolge durchgeführt:

### 2.4.1 Makrozirkulationsparameter

Mittels eines vollautomatischen Überwachungsmonitors (Philips M3046A M3) mit Blutdruckmanschette (Oberarmdurchmesser 29-40cm) wurden der systolische Blutdruck (RR), der diastolische RR, der arterielle Mitteldruck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) am Oberarm, sowie die partielle Sauerstoffsättigung ( $S_pO_2$ ) per Pulsoximeter am Mittelfinger aufgezeichnet und protokolliert.

### 2.4.2 Mikrozirkulationsmessung der Mundbodenschleimhaut (Intravitalmikroskopie)

Das Netzwerk aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen der Schleimhaut am vorderen Zungengrund der Probanden wurde mit einem Intravitalmikroskop visualisiert. In

Anlehnung an *De Backer* [27] wurden die Videosequenzen, die auf S-VHS Videocassetten dokumentiert waren, offline semiquantitativ ausgewertet. Für die Messungen wurde das Gerät Cytoscan 1.1.3 (Cytometrics Philadelphia, PA 19106, USA) mit einer 5X Probe (PO5A001032) verwendet. Cytoscan arbeitet mit der orthogonal polarization spectral imaging Technik (OPS) und eignet sich besonders gut, um von einer dünnen Epithelschicht überzogenes Gewebe, beispielsweise Mucosa, zu untersuchen.

#### 2.4.2.1 Die Technik des OPS Imaging

Beim OPS handelt es sich um eine Technik, die es ermöglicht, nicht-invasiv Mikrozirkulation direkt sichtbar zu machen. Durch die von Cytometrics (Philadelphia, Pa) patentierte „virtual backlighting“-Technologie ist dies ohne den Gebrauch von fluoreszierendem Licht oder Durchleuchtungstechniken möglich [121].



**Abbildung 1: Cytoscan**

Beim OPS Imaging wird das zu untersuchende Gewebe durch polarisiertes Licht illuminiert und mit Hilfe eines Videocamera-Ladungstransportspeichers (CCD engl.: *charge coupled device*), der sich hinter einem Polarisationsfilter befindet und im Lot zur Lichtquelle steht, abgebildet [39]. Um ein Bild zu erzeugen wird das Licht aus der Lichtquelle zunächst gebündelt durch einen Spektralfilter und durch einen Polarisator gelenkt. Der Spektralfilter wandelt das Lichtstrahlenbündel in eine Wellenlänge von 550nm um, dem isosbestischen Punkt von Hämoglobin. An dieser Stelle im Lichtspektrum ändert sich die Lichtabsorption im Verlauf der Reaktion von Oxyhämoglobin zu Desoxyhämoglobin nicht. Hämoglobin wird so zum Hauptkontrastbildner, wodurch eine optimale homogene Darstellung der Mikrozirkulation gewährleistet wird. Der danach geschaltete Polarisator lässt nur Licht durch, welches in der Polarisationsebene des Filters liegt. Dem zufolge ist das Licht, welches den Polarisationsfilter verlässt, immer polarisiert, im Falle des OPS Imaging linear, das heißt die Photonen schwingen in einer Ebene. Das polarisierte Licht wird nun über einen Strahlteiler im 90° Winkel auf das Gewebe umgeleitet. Durch ein Linsenobjektiv wird der modifizierte Lichtstrahl auf einen circa 1,8mm<sup>2</sup> großen Gewebssausschnitt konzentriert. Der Lichtstrahl, welcher das Endbild produziert, wird durch dasselbe Objektiv vom Gewebssausschnitt auf eine CCD-Kamera, die hinter dem Strahlteiler angebracht ist, zurückreflektiert. Direkt vor die Kamera ist ein zweiter Polarisationsfilter geschaltet, der auch Analysator genannt wird. Er eliminiert das reflektierte polarisierte Licht. Generell bleiben 90% des vom Gewebe abgestrahlten Lichtes polarisiert. Nur 10% der Photonen oder weniger dringen tief in das Gewebe ein, werden währenddessen mehrfach gebrochen und dadurch depolarisiert (nach mindestens 10 Streuungsereignissen). Das depolarisierte Licht wiederum wird reflektiert, durchdringt nacheinander das Objektiv, den Strahlteiler und den 2. Polarisator um auf der CCD-Kamera ein Bild der beobachteten Gefäßregion in Echtzeit zu erzeugen, welches auf dem Bildschirm erscheint und aufgenommen werden kann. Das Bild wird also ausschließlich vom depolarisierten Teil des Lichtes erzeugt [39].

Kontrastreiche Bilder entstehen indem die tief im Gewebe reflektierten depolarisierten Photonen für die meist oberflächlicher liegenden lichtabsorbierenden Strukturen, wie beispielsweise Blutgefäße, als virtuelle Lichtquelle fungieren [28]. *Groner et al.* haben gezeigt, daß das OPS Imaging auf einen weiten Bereich

verschiedener optischer Dichtegrade anzuwenden ist und mit der standardisierten Transmissionsspektrometrie vergleichbar gute Ergebnisse erzielt [39].

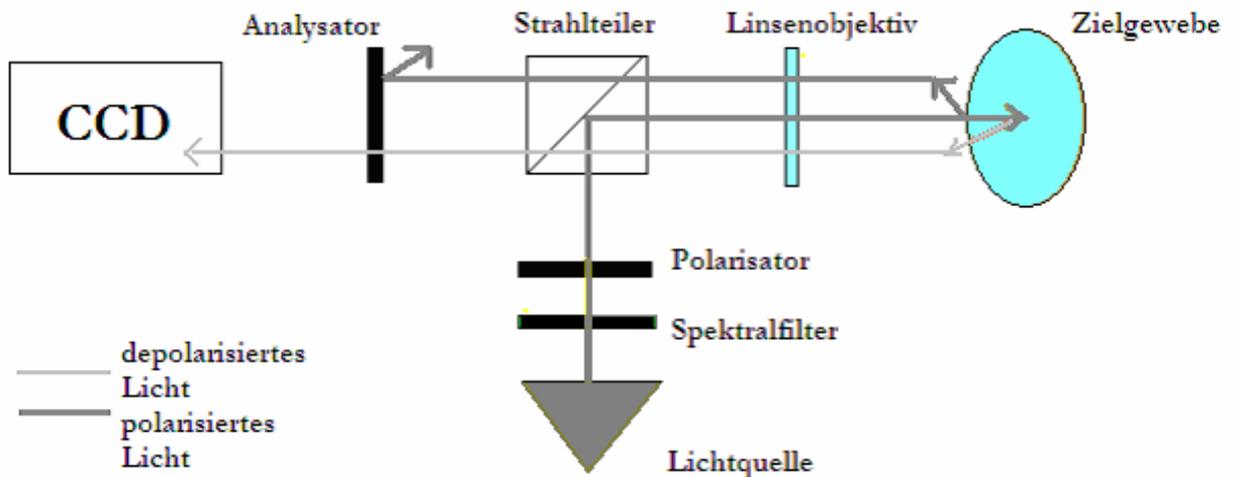


Abbildung 2: Funktionsprinzip des Intravitalmikroskops nach Groner et al. [39]

#### 2.4.2.2 Ablauf der Messung und Analyse

Die von uns verwandte Cytoscansonde mit einem 5fach-Objektiv lieferte eine 167fache Vergrößerung der gefilmten Schleimhautgefäße. Sie ist das Handstück des Cytoscangerätes. Ihre Form gleicht einer Pistole (siehe Abbildung 1). Die Sonde wurde vom Untersucher in eine Hand genommen und das Ende des Schaftes, auch als Sondenkopf bezeichnet, auf die zu untersuchende Stelle aufgesetzt. Zur Bildvergrößerung und sterilen Abdeckung wurde der Sondenkopf mit einem sterilen Einmalaufsatz (Cytolenskappe) versehen. Der Griff der Sonde wurde zusätzlich mit einer Plastikfolie umhüllt. Der Sondenkopf wurde ohne Anpressdruck im Bereich der Unterzungenfalte lateral des unteren Zungenbändchens aufgelegt. Der nach der Adjustierung gefilmte Schleimhautabschnitt wurde als ein Gesichtsfeld oder Sichtfenster bezeichnet. Mit einem Videokassettenrekorder (Video Cassette Recorder AG-MD835 von Panasonic) wurden pro Messzeitpunkt je 3 Videosequenzen eines Gesichtsfeldes à 5 Sekunden Dauer auf eine SVHS Kasette

aufgezeichnet. Die Zeit wurde mit einem Videotimer gestoppt (Video Timer, model VTG-10, FOR.A Video Timer limited). Nach intraoralem Einführen der Sonde und Einstellen des ersten repräsentativen Sichtfensters wurden die Probanden angewiesen ihre Zunge ganz locker auf den Schaft der Cytoscansonde zu legen, wodurch Bewegungsartefakte weitgehend verhindert werden konnten. Störender Speichel wurde zwischen den Aufnahmesequenzen durch ein weiches fuselfreies Tuch von der Cytolenskappe entfernt. Die Videosequenzen wurden später durch ein semiquantitatives Verfahren ausgewertet [27].

Die Videosequenzen wurden auf einen Bildschirm (Triniton PVM-14N1E, Sony) mit den Maßen 27,8×20,6cm visualisiert und offline verblindet analysiert. Nach der Methode von de Backer [25] erfolgte die Auswertung der Gefäßdichte. Auf dem Bildschirm wurde dazu ein durchsichtiges Raster fixiert. Dieses Raster mit 3 vertikalen und 3 horizontalen Gitterlinien, unterteilte den Bildschirm in 16 gleich große Quadrante. Die Gefäßdichte (engl.: *vascular density*) wurde errechnet indem die Anzahl der Kreuzungspunkte aller Gefäße, mit den Gitterlinien der inneren 4 Quadranten durch die Gesamtlänge dieser Gitterlinien geteilt wurde (modifiziert nach de Backer [25]). Für die Gefäßdichte ergibt sich aus der obigen Beschreibung die Einheit Anzahl pro Millimeter [n/mm]. Gefäße in denen sich keine roten Blutkörperchen befanden oder deren Flusszustand nicht beurteilbar war, wurden in diese Berechnung generell nicht mit einbezogen, jedoch separat dokumentiert. Die Flusseigenschaften (*flow type*) der Erythrozyten (RBC) in den einzelnen Gefäßen pro Gesichtsfeld, wurden in die Kategorien kontinuierlich, intermittierend und stagnierend unterteilt. Zur korrekten Kalibrierung der Messung der Gefäßdurchmesser, wurde mit der Cytoscansonde eine Mikrometerstrichskala von insgesamt 1mm Länge gefilmt. Das auf dem Monitor erscheinende Abbild dieser Skala konnte dann auf ein translumineszentes Lineal übertragen werden. Dieser Vorgang wurde während der Auswertung mehrfach wiederholt, wobei die Skala jeweils gleich groß auf den Bildschirm übertragen wurde.

Wie bei Harris et al. [43,44] beschrieben war der Gefäßdurchmesser jeweils durch die äußerste Kante der im Gefäß befindlichen Erythrozytensäule definiert, da die innere Gefäßwand nicht zweifelsfrei identifizierbar war. In Anlehnung an de Backer wurden die Gefäße nach ihrem Lumendurchmesser (mit cut off 20µm) in große Gefäße und kleine Gefäße aufgeteilt. Die kleinen Gefäße entsprachen hierbei

hauptsächlich Kapillaren und Arteriolen, die großen Gefäße Sammelvenolen. In der folgenden Auswertung wurden große Gefäße demnach als Venolen und kleine Gefäße als Arteriolen bezeichnet, was eine gewisse Unschärfe beinhaltet. In die Gruppe der Arteriolen (kleiner  $20\mu\text{m}$ ) fielen auch die für die Gewebeversorgung entscheidenden Kapillaren, welche von Erythrozyten durchflossen und wie obig beschrieben dadurch visualisierbar waren. Die Messungen wurden mit dem oben beschriebenen Lineal durchgeführt.

Der Anteil der perfundierten Gefäße wurde sowohl für die 2 Größengruppen separat als auch generell zusammen für alle Gefäßlumina errechnet. Die Anzahl der kontinuierlich perfundierten Gefäße wurde hierfür durch die Gesamtanzahl der Gefäße ( $>20\mu\text{m}$ ,  $<20\mu\text{m}$ , alle) dividiert.

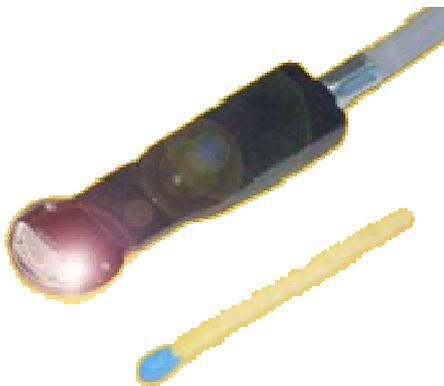
### 2.4.3 Mikrozirkulationsparameter - Weißlicht- und Laserlichtgewebsspektroskopie

Neben der orthogonalen Polarisationspektroskopie (OPS) bietet die Gewebe-Photospektrometrie (TPS; engl.: *Tissue Photo Spectrometry*) eine weitere Möglichkeit um die Mikrozirkulation zu evaluieren. Diese Technik ist derzeit in Form eines Geräts der Firma LEA Medizintechnik mit dem Namen O2C anwendbar, welches in unserer Studie ebenfalls verwendet wurde. Durch die indirekte Darstellung der Erythrozyten kann der Blutfluss mit dieser Methode nicht invasiv visualisiert und beurteilt werden.

#### 2.4.3.1 Technik und Messparameter des Oxygen to see (O2C)

Die Technologie des O2C basiert auf zwei physikalischen optischen Messprinzipien, der Weißlichtspektroskopie und dem Laser-Doppler-Verfahren [119]. Auf diese Weise ist es möglich 4 verschiedene Mikrozirkulationsparameter (Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobin-Konzentration, relativer Blutfluss, Blutflussgeschwindigkeit) in verschiedenen Körperoberflächen, wie Epidermis und Mucosa, nicht-invasiv zu bestimmen. Über eine flache Sonde (Modell SF-5-400-052 Lea Medizintechnik, Giessen, Deutschland), welche über fünf flexible Glasfaserkabel mit dem Computer verbunden ist, wird gleichzeitig Weißlicht (Wellenlängenspektrum von 500-800nm) und Laserlicht (Wellenlänge 830nm) in das Gewebe eingebracht [54]. Die auf der Unterseite der 14mm breiten und 2,4mm hohen Flachsonde sichtbaren Punkte repräsentieren jeweils eine Glasfaser. Von links nach rechts gesehen haben sie

folgende Funktionen: Faser 1: Illumination Laserlicht; Faser 2: Detektion Laserlicht; Faser 3: Illumination Weißlicht; Faser 4: Detektion Weißlicht; Faser 5: Detektion Laserlicht (diese wurde aber von unserem O2C Modell nicht unterstützt). Ein weiteres wichtiges Detail der O2C-Sonde ist der Abstand zwischen dem oben beschriebenen Illuminations- und dem Detektionspunkt. Diese als Separation bezeichnete Größe bestimmt die Detektionstiefe, sowohl für das Laser- als auch für das Weißlicht. Die Detektionstiefe in das Messgewebe von etwa 2mm in unseren Messungen ergibt sich aus einer Separation der Faserpunkte von 2mm. Sie ist definitionsgemäß die Tiefe, aus der circa 95% des, die Mikrozirkulationsparameter bestimmenden, Signalteils herrühren. Das erste Messprinzip, die Gewebespektrometrie oder Spektroskopie, arbeitet mit Weißlicht, welches, durch einen Weißabgleich im Gerät realisiert, simultan eine Vielzahl von Wellenlängen mit gleicher Intensität ins Zielgewebe emittiert [54]. Im O2C wird dieses von einer 20-W-Xenon-Glühbirne erzeugt, deren abgestrahlte Photonen im Wellenlängenbereich zwischen 450-1000nm liegen. Während einige der Weißlichtstrahlen aus der Sonde direkt reflektiert werden, wird der Großteil der Photonen von Gewebsbestandteilen absorbiert oder an den Mitochondrien gestreut [8].



**Abbildung 3: SF-1 Flachsonde (vergleichbar mit unserem Modell SF-5)**

Ein kleiner Teil des Lichts findet nach der Streuung einen Weg über einen sogenannten „Lichtbogen“ zurück an die Gewebsoberfläche, wo es von der O2C-Sonde aufgenommen und ausgewertet werden kann. Die Streuung im Gewebe bewirkt einen Intensitätsverlust des zum Detektionspunkt der Sonde zurückgestrahlten Lichts. Wenn das Weißlicht mit Erythrozyten wechselwirkt, wird ein

Teil des Lichtspektrums absorbiert. Das Licht nimmt die Farbe des Hämoglobins an. In Abhängigkeit der Menge der roten Blutkörperchen und deren Sauerstoffsättigung wird das Licht stärker „eingefärbt“, wird also „röter“. Mittels dieses Effektes werden die lokale Hämoglobinmenge (rHb) sowie die Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ) im Messvolumen spektral ermittelt. Da die Blutverteilung in den mikrovaskulären Gefäßen 85% venolär-kapillär und nur 15% arteriolär ist stellt der rHb ein sehr präzises Maß für die Füllung der Venolen mit Blut dar [23]. Für die Spektralanalyse bei einer Detektionstiefe von 2mm wird dazu in der Regel der sichtbare Wellenlängenbereich von 500-630nm herangezogen. Wie auch der Blutfluss werden die Werte für die Hämoglobinmenge in arbitrary units [AU], einer willkürlich gewählten Einheit, angegeben, da hierfür für sie keine SI-Einheiten existieren [54]. Erfasst werden mit diesem Verfahren aber ausschließlich mikrovaskuläre Gefäße, da das Licht von den mitochondrienlosen Erythrozyten in größeren Gefäßen ab einem Durchmesser von circa 100 $\mu$ m zu stark absorbiert wird, so dass sich die Lichtstrahlen verlieren und nicht mehr zum Detektorsystem zurückkehren [34]. Auch die vom O2C gemessene Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ), als Absolutwert in % angegeben, bezieht sich also auf das venöse Ende der Kapillaren, die sogenannte letzte Wiese. Prinzip dieser Messung ist die Tatsache, dass Blut seine Farbe und somit die Wellenlänge eindeutig mit dem Maß seiner Sauerstoffbeladung ändert. Vollständig oxygeniertes Blut ist hellrot während Blut mit einer Sauerstoffsättigung von 0% eine tief dunkelrote Farbe hat [57]. Die im Messgewebe gestreuten und von der Detektionsstelle wieder aufgenommenen Lichtstrahlen werden in Nanometerschritten [nm] analysiert und die postkapilläre Sauerstoffsättigung mittels Gewebemodellen und Spektralanalysen bestimmt [54]. In gleicher Weise wie das Weißlicht wird auch das Laserlicht von Mitochondrien gestreut. Beim O2C wird dieses nahinfrarote Licht bei 820nm von einem Diodenlaser im CW-Modus generiert. Trifft es im Messgewebe auf bewegte Erythrozyten, so erfährt dieses Licht eine Frequenzverschiebung (Dopplerverschiebung engl.: *doppler shift*) ähnlich wie bei Ultraschallwellen. Aus dieser in Hertz [Hz] gemessenen Doppler-Frequenzverschiebung lässt sich die Geschwindigkeit der Erythrozyten (engl.: *Velocity* [AU]) berechnen [54]. Die beiden Größen verhalten sich folglich direkt proportional zueinander. Um den Blutfluss in der Mikrozirkulation, den so genannten Flow, angegeben in arbitrary units [AU], zu errechnen, muss die Anzahl der Erythrozyten im Messgewebe ( $N_i$ ) bestimmt werden. Im Gegensatz zur

Ultraschallmessung ist es hierbei nicht notwendig, das Gefäß zu finden und dessen Querschnittfläche zu ermitteln, was den Messvorgang stark vereinfacht. Im folgenden Text soll der komplexe physikalische Vorgang, also die Messung des Blutflusses in der Mikrozirkulation [69], nur sehr vereinfacht in Grundzügen dargestellt werden. Es wird aus der Höhe der detektierten und normierten Laserlichtintensität ein entsprechender Wert generiert, der sich zur Anzahl der bewegten Erythrozyten proportional verhält. In der Normierung werden der Anteil des nicht Frequenz verschobenen mit dem Frequenz verschobenen Lichtanteil ins Verhältnis gesetzt. Während nur wenige Photonen einen Doppler Shift durch die bewegten Erythrozyten erfahren haben, ist der weitaus größere Anteil aus dem Gewebe zurückgestreut und nicht an bewegten roten Blutkörperchen gestreut worden. Dieser nicht Frequenz verschobene Laserlichtanteil repräsentiert somit die Gewebeparameter, auf die das Lichtsignal der bewegten Erythrozyten normiert wird. Aus dem Produkt von Geschwindigkeit ( $v_i$ ) multipliziert mit der Anzahl der Erythrozyten ( $N_i$ ) dieser Geschwindigkeit summiert über alle auftretenden Erythrozytengeschwindigkeiten ( $\sum_i$ ) lässt sich der Flow berechnen:  $\sum_i v_i \cdot N_i = \text{Blutfluss [AU]}$

Der Blutfluss wird in der Einheit arbitrary units [AU] angegeben [54].



Abbildung 4: Das O2C Gerät

#### 2.4.3.2 Mikrozirkulationsmessung an der Mundschleimhaut

Für die Messungen am liegenden Probanden wurde die O2C-Flachsonde (Modell SF-5) zwischen die untere Zahnreihe und Unterlippe eingebracht, wobei die Lichtquelle gegen die Unterlippe gerichtet war. Als Hülse für den Sondenkopf diente eine transparente Folie. Das Glasfaserkabel, welches den Sondenkopf mit dem O2C Computer verbindet, wurde an einem Infusionsständer hinter dem Bett der Probanden aufgehängt, um Bewegungsartefakten vorzubeugen und einen möglichst kleinen Winkel des Sondenkopfes zur Stellung der unteren Zahnreihe zu gewährleisten. Die Teilnehmer wurden außerdem dazu angehalten die Lippen entspannt, eventuell halbgeöffnet zu belassen, nicht zu sprechen oder den Kiefer zu bewegen, so dass die Sonde ohne Druck auf dem zu untersuchenden Schleimhautabschnitt aufliegen konnte. Die Mikrozirkulationsparameter ( $\text{SO}_2$ , rHb, Flow, Velocity) wurden in einem einminütigen Zeitintervall gemessen und alle 2 Sekunden per Computer dokumentiert. Während der Abspeicherung des Messverlaufs wurden am Computer insgesamt 10 Marker gesetzt, die bei der Auswertung der Wiedererkennung der einzelnen Zustandsintervalle dienten. Die Marker 1 und 2 dienten als Begrenzung des ersten 60sekündigen Messintervalls. Die Mittelwerte aller 4 Parameter zu den 6 Messzeitpunkten wurden in Form von Diagrammen dargestellt.

#### 2.4.3.3 Mikrozirkulationsmessung an der Fingerbeere

An der Fingerbeere wurde außerdem das Verhalten der mikrovaskulären Gefäße im Zustand der Normämie, Ischämie, Reperfusion sowie während einer reaktiven Hyperämie anhand des O2C (LEA Medizintechnik, Giessen, Deutschland) untersucht. Hierzu wurde die O2C-Flachsonde (Modell SF-5, Detektionstiefe 2mm) mit Hilfe eines Leukosilk Pflasters ohne Druck auf die Fingerbeere des Zeigefingers der zu untersuchenden Hand aufgeklebt mit Positionierung der Lichtpunkte circa einen Zentimeter proximal der Fingerkuppe. Neben den für die Messung relevanten Parametern war auf dem O2C-Bildschirm ein Graph für das Hämoglobinspektrum abgebildet (siehe Abbildung 4). Beim Abdrücken der Blutgefäße änderte sich das detektierte Hämoglobinspektrum und damit auch dessen graphische Darstellung. Er konnte somit genutzt werden, um die Sonde druckfrei aufzukleben. Auf die Fingerkuppe des Mittelfingers der gleichen Hand wurde zusätzlich ein Fingerclip zur

Kontrolle der peripheren arteriellen Sauerstoffsättigung mittels eines vollautomatischen Überwachungsmonitors (Philips M3046A M3) angebracht. Zusätzlich erfolgte am Oberarm des gleichen Armes die Anlage einer handelsüblichen manuellen Blutdruckmanschette (Oberarmdurchmesser 29-40cm, ERKA). Während des Messvorgangs lag der Oberarm der Probanden flach neben dem Körper auf der Liege. Der Unterarm war circa  $100^\circ$  angewinkelt, wobei die untersuchende Hand flach auf dem Unterbauch des jeweiligen Probanden positioniert war. Weiter wurde darauf geachtet, dass die Sonde selbst nicht auf dem Bauch aufliegt um die Werte nicht durch den Druck des Abdomens bei Atemexkursionen zu verfälschen. Die Messwerte des Spektrometers wurden während der gesamten Messung real-time in Form von Zahlen und Kurven auf dem O2C Bildschirm übertragen. Diese wurden alle zwei Sekunden auf dem O2C Computer abgespeichert. Die pulsoximetrisch bestimmte partielle Sauerstoffsättigung wurde alle 15-30 Sekunden schriftlich protokolliert. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Messung über 15 Sekunden von  $SO_2$ , rHb, Flow, Velocity und der partiellen Sauerstoffsättigung unter Normoxämie. Diese wurden am O2C-Computer durch die Marker 3 und 4 gekennzeichnet. Marker 4 stellte gleichzeitig den Beginn der Ischämiephase dar. Mit Hilfe des manuellen Blutdruckmessgerätes wurde eine 2minütige Unterarmischämie durch suprasystolische brachiale Kompression (p mindestens  $20\text{mmHg} > RR_{\text{sys}}$ ) hergestellt. Um eine suffiziente Ischämie zu gewährleisten wurde der Kompressionsdruck so gewählt, dass 30 Sekunden nach Kompressionsbeginn der Blutfluss auf unter 5 AU's und die kapilläre Sauerstoffsättigung auf unter 80% fiel. Wenn dies nicht der Fall war erfolgte eine Verstärkung der Kompression bis diese Schwelle unterschritten war. 15 Sekunden nach Start der Ischämie und am Ende der Ischämiephase wurden die Marker 5 und 6 gesetzt. Nach Beendigung der Ischämie durch Ablassen der Blutdruckmanschette wurde der Verlauf der Mikrozirkulationsparameter und der kapillären  $SO_2$  noch weitere 2 Minuten beobachtet und dokumentiert. Durch die Marker 7,8,9 und 10 wurden die Zeitpunkte 15 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden und 120 Sekunden nach Beginn der Reperfusion gekennzeichnet. Die Mittelwerte folgender Messintervalle wurden errechnet und als Excel Diagramme dargestellt. Der erste Mittelwert setzt sich aus 10 nacheinander gemessenen Einzelwerten inklusive Marker 3 zusammen und beschreibt die Grundperfusion an der Fingerbeere vor Ischämiebeginn. Ein zweiter Mittelwert aus den Werten bei Marker 6 und den 4

vorangegangenen Werten bezieht sich auf das Ende der Ischämie. Der letzte Mittelwert stellt das Ende der reaktiven Hyperämie dar und beinhaltet wiederum 10 aufeinanderfolgende Einzelwerte um den Marker 10.

#### 2.4.4 Sonographische Untersuchung an Nieren und Leber mittels Power-Doppler sonographie

Die nicht-invasive Untersuchung der Nieren- und Leberperfusion erfolgte mit einem Viking 2400 Sonographiegerät der Firma B-K-Medicals. Der Ultraschallkopf Typ 8803 (3-6MHz/MF1) arbeitete mit einer Frequenz von 5MHz und einer Pulsrepetitionsfrequenz von 800Hz. Der Gain variierte zwischen 50-75%. Für die Darstellung der Durchblutung des Organparenchyms wurde der Power-Doppler-Modus verwendet.

##### 2.4.4.1 Grundlagen der Power-Dopplersonographie

Während man bei der farbkodierten Dopplersonographie die Strömungsverhältnisse durch Bestimmung der Dopplerfrequenzverschiebung darstellt, zeigt der Powerdoppler, auch Angio-Mode oder Transparent Energy Mode (TEM) die nicht richtungskodierte Intensität der Strömungen an und ist proportional zu dem Quadrat der Amplitude des Dopplersignals [30]. Aus der Integration aller Flussanteile (engl.:*Power*) über ein Zeitintervall entsteht im Power-Doppler-Mode eine präzise Farbdarstellung der Durchblutungssituation des Messgewebes, in unserem Fall des Nierenparenchyms, in Superposition zum B-Bild in Echtzeit (engl.:*real time*) [20]. Die Information über die Flussrichtung geht dabei allerdings verloren. Im vom Ultraschall erfassten sample volume wird die Amplitude des reflektierten Dopplersignals durch die Menge und Dichte der Blutzellaggregate bestimmt, so dass sie weitgehend unabhängig vom Winkel zwischen Blutflussrichtung und eingeschalltem Signal ist [99]. Das Aliasing-Phänomen der farbkodierten Dopplersonographie gibt es beim Power-Doppler praktisch nicht mehr, da die Richtung der Geschwindigkeit bei der Berechnung unberücksichtigt bleibt. Darüber hinaus ist das Amplitudensignal des Power-Dopplers verglichen mit der Frequenzverschiebung in der FKDS unempfindlicher gegenüber störendem Hintergrundrauschen. Besonders ausgeprägt ist diese Eigenschaft bei breitbandigen Signalen, die als Summe vieler Frequenzen

vergleichbarer Intensität auftreten. Die Amplitude entsteht durch Addition dieser verschiedenen Frequenzanteile, die Frequenzverschiebung hingegen durch Mittelwertbildung. Durch dieses bessere Signal-Rausch-Verhältnis kann beim Power-Doppler mit höheren Verstärkungen gearbeitet werden [88]. Die Kombination von niedriger Pulswiederholungsfrequenz und hoher Verstärkung führt zu einer empfindlicheren Blutflussdetektion, auch bei langsamen Flussgeschwindigkeiten [99]. Der derzeitige Power-Doppler arbeitet mit einer hohen Persistenz, das heisst mit einer hohen Bildmittelungsrate. Dies ist möglich durch den weniger pulsatilen und geschwindigkeitsabhängigen Charakter des Amplitudensignals und führt dazu, dass die aufeinanderfolgenden Ultraschallbilder ähnlicher sind. Eine Differenzierung zwischen Venen und Arterien, schnell wechselnden Flussrichtungen oder Geschwindigkeiten gelingt mit dem Power-Doppler Bild nicht. Die hohe Bildmittelungsrate bedingt eine hohe Anfälligkeit gegenüber Bewegungs- und Pulsationsartefakten [78].

#### 2.4.4.2 Messvorgang

Das normal funktionierende Nierenparenchym zeigt im Power-Doppler-Modus eine Farbkodierung bis unmittelbar subkapsulär. Bei der Untersuchung wird je nach Schnittführung des Schallkopfes die individuelle Gefässarchitektur der Niere in Form eines rötlich gelben Gefässbaumes auf dem Bildschirm sichtbar. Der Abstand zwischen der Nierenkapsel und dem äussersten, durch diese Farbkodierung sichtbar gemachten Blutflusssignals wird als arteriokapsulärer Abstand (akA) bezeichnet. Er verläuft entlang einer Gerade, die im Lot zur Tangente der Nierenkapsel verläuft. Der akA kann mit Hilfe des Ultraschallgerätes im Standbild (engl.: *freeze mode*) eingezeichnet, berechnet und zur Dokumentation ausgedruckt werden. Dieser Wert dient in der Transplantationsmedizin zur Verlaufskontrolle nach Nierentransplantation, um eine eventuelle Verminderung der Perfusion der Transplantatniere frühzeitig zu erfassen. In unserer Studie wurden beide Nieren zu jedem Messzeitpunkt im Power-Mode sonographisch dargestellt. Bei der Baseline-Messung wurden im Standbild drei kapselnahe Gefäße gewählt, deren akA eingezeichnet, der Wert vom Ultraschallgerät berechnet und ausgedruckt. An den darauffolgenden Messzeitpunkten wurde anhand der ausgedruckten Vorbefunde versucht, die ausgewählten Gefäße wiederzufinden und deren akA im Verlauf zu

dokumentieren. Die drei ermittelten Abstandswerte pro Messzeitpunkt und Niere wurden jeweils gemittelt und in Exceltabellen eingetragen.

Zusätzlich wurde die Leber der Probanden in gleicher Weise mittels Power-Dopplersonographie untersucht. Der Bildausschnitt wurde so gewählt, dass es sowohl die Gallenblase als auch das angrenzende Leberparenchym beinhaltet. Bei der baseline Messung wurde wiederum ein gallenblasennahes Gefäß im Lebergewebe gewählt, dessen Abstand zur Gallenblasenkapsel im Verlauf der 6 Messzeitpunkte dokumentiert wurde. Die 6 ermittelten Werte wurden in Exceltabellen übertragen.

## **2.5 Statistische Methoden**

Im Rahmen dieser prospektiven Pilotstudie sollten die makro- sowie mikrozirkulatorischen Veränderungen dreier Kollektive nach Gabe verschiedener Immunsuppressiva vergleichend untersucht werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Statistikprogramm SPSS Version 16.

Es wurden alle untersuchten Parameter als Mittelwerte mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten wurden mittels t-test für unverbundene Stichproben errechnet.

Innerhalb der Untersuchungsgruppen wurden signifikante Differenzen der Parameter über die Zeit in Relation zum Messzeitpunkt 1 mittels einer Oneway-ANOVA Analyse miteinbezogen.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 gewertet.

## 3 Auswertung

### 3.1 Laborparameter

#### 3.1.1 Blutbild und Gerinnung

In der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Ausgangslaborparameter der drei untersuchten Gruppen aufgeführt.

Tabelle 2:

	<b>CyA (n=5)</b>	<b>Tac (n=6)</b>	<b>MMF (n=7)</b>
<b>Krea [mg/dl]</b>	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<b>Harnstoff[mg/dl]</b>	28,8 ± 2,4	24,6 ± 2,6	30,2 ± 3,6
<b>Q [%]</b>	89,0 ± 3,3	89,0 ± 4,0	86,0 ± 2,4
<b>INR</b>	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0
<b>PTT [sec]</b>	32,8 ± 0,7	33,6 ± 0,7	31,8 ± 0,7
<b>AT [%]</b>	97,4 ± 2,1	93,4 ± 4,3	96,4 ± 5,6
<b>D-Dimer [µg/ml]</b>	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
<b>Hb [g/dl]</b>	14,3 ± 0,5	13,9 ± 0,5	14,9 ± 0,7
<b>Hkt [%]</b>	40	40	40
<b>Thromb. [G/l]</b>	239 ± 28	234 ± 20	210 ± 12
<b>L [G/l]</b>	6,1 ± 0,6	6,0 ± 0,7	5,3 ± 0,6

#### 3.1.2 Immunsuppressivspiegel im Vollblut

Im Zeitverlauf von vor der Medikamenteneinnahme bis zu 4 Stunden nach Medikamenteneinnahme zeigte sich in allen drei Patientenkollektiven ein signifikanter Anstieg der Medikamentenspiegel im Serum. Erwähnt werden muss, dass für Proband 7, 16 und 18 keine Medikamentenspiegel vorlagen, in der Tacrolimusgruppe folglich nur 4 Einzelwertverläufe in die Mittelwertberechnung mit eingegangen sind und in der MMF-Gruppe 6.

Für die CyA-Gruppe ergab sich ein C2-Wert (Medikamentenspiegel im Serum zwei Stunden nach Einnahme) von 1316 ng/ml welcher zugleich den Maximalwert im Verlauf der Zeitachse darstellte. So auch bei der Tacrolimus-Gruppe mit einem C2 Wert von 8,63 ng/ml. Im Gegensatz dazu war der Spitzenspiegel bei den Probanden der MMF-Gruppe mit 15,98 ng/ml bereits 30 Minuten nach Einnahme erreicht.

Die Resterhöhung des Medikamentenspiegels im Blut in den einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt C4 (vier Stunden nach Medikamenteneinnahme) betrug im Vergleich zum Maximum (=100%) für CyA noch 69,8%, für MMF 16,2% und für Tacrolimus 67,2%.

**Tabelle 3:**

<b>Messzeitpunkt</b>	<b>CyA</b>		<b>MMF</b>		<b>TAC</b>	
	<b>Mittelwert [ng/ml]</b>	<b>SEM</b>	<b>Mittelwert [ng/ml]</b>	<b>SEM</b>	<b>Mittelwert [ng/ml]</b>	<b>SEM</b>
<b>1 = baseline</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Medikamenten Einnahme</b>						
<b>2 = nach 30min</b>	270,6*	69,5	16*	6,0	2,5	0
<b>3 = 60min</b>	1104,2*	172,5	15,4*	3,0	4,2*	1,0
<b>4 = 120min</b>	1316*	111,5	9,8*	4,2	8,6*	2,4
<b>5 = 180min</b>	972,8*	92,2	3,8*	1,8	7,4*	2,0
<b>6 = 240min</b>	678,6*	83,7	2,5*	1,5	5,8*	1,6

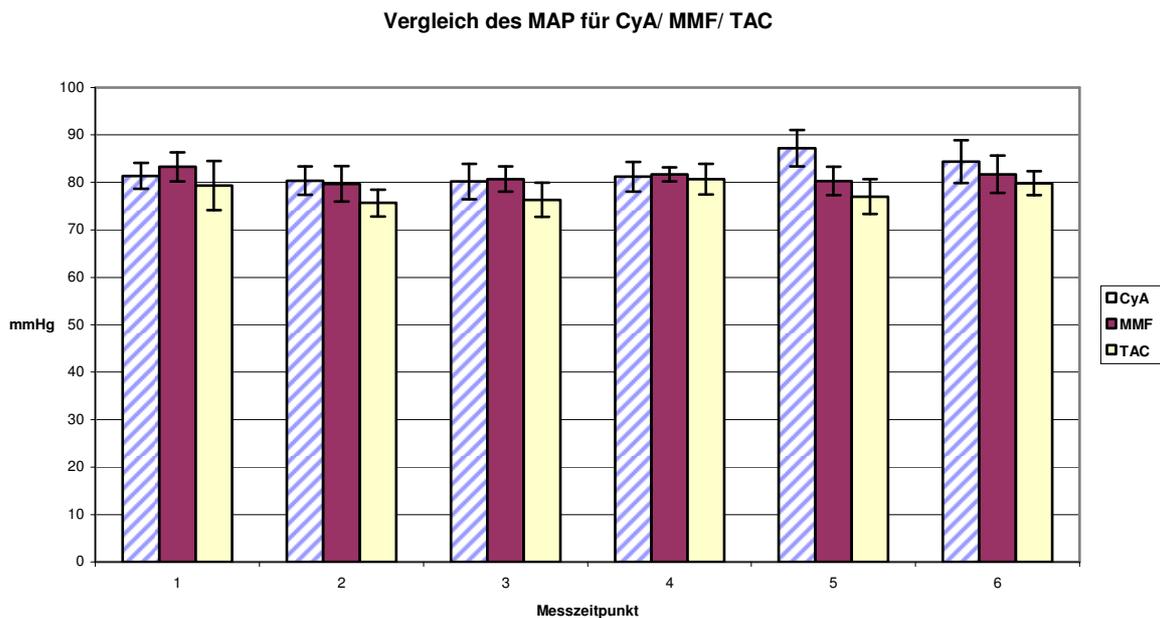
\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

## 3.2 Makrohämodynamik

### Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP):

Die drei zu vergleichenden Gruppen zeigten sich zum Zeitpunkt Baseline bezüglich des Blutdrucks vergleichbar (Oneway ANOVA  $p=0,529$ ). Es bestand auch keine signifikante Veränderung des mittleren arteriellen Drucks im Messverlauf.

Diagramm 1:



### Herzfrequenz (HF):

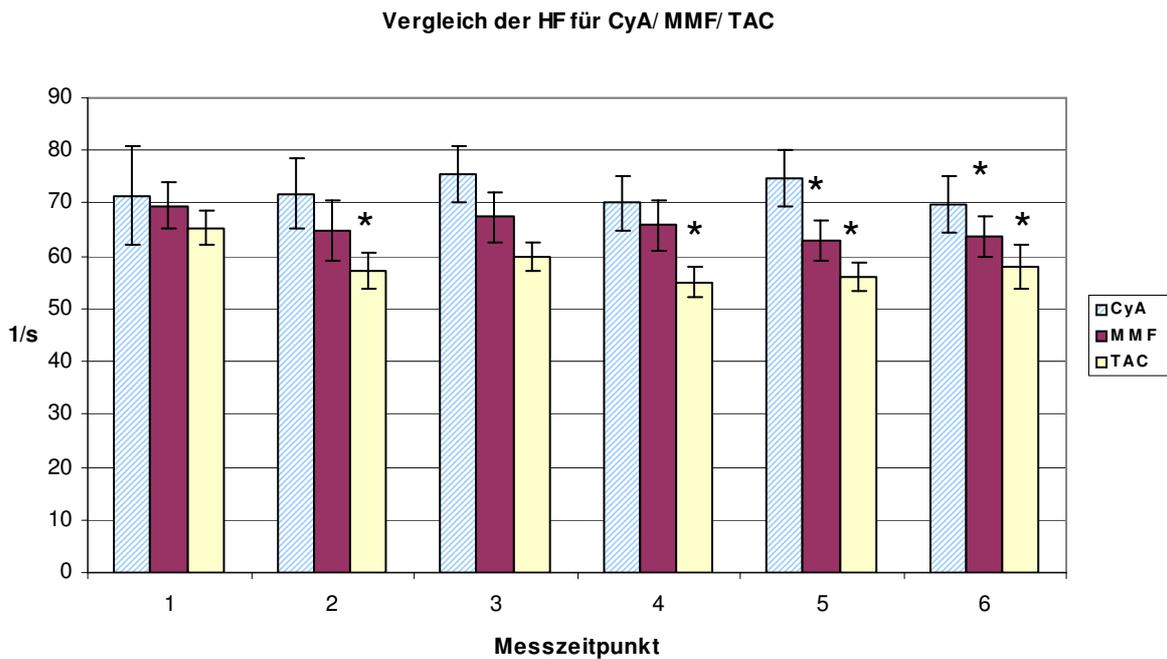
Zu Beginn der Messung zeigten sich zwischen allen drei Probandengruppen keine signifikanten Unterschiede (Oneway ANOVA  $p=0,75$ ). Im weiteren Messverlauf ergaben sich signifikante Absenkungen der Herzfrequenz in der Tacrolimusgruppe zu den Messzeitpunkten 2,4,5 und 6 im Vergleich zum Ausgangswert. Auch in der MMF-Gruppe kam es zum MZP 6 zu einer signifikanten Pulsabsenkung ( $p$  zum MZP 6= $0,009$ ).

Tabelle 4:

HF [1/s]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	71,4	9,3	69,6	4,3	65,3	3,2
2	71,8	6,7	64,7	5,7	57,2*	3,4
3	75,6	5,3	67,4	4,7	59,8	2,6
4	70,0	5,3	65,9	4,7	55,0*	2,8
5	74,6	5,4	62,9*	3,8	56,2*	2,8
6	69,8	5,2	63,6*	3,8	58,0*	4,2

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

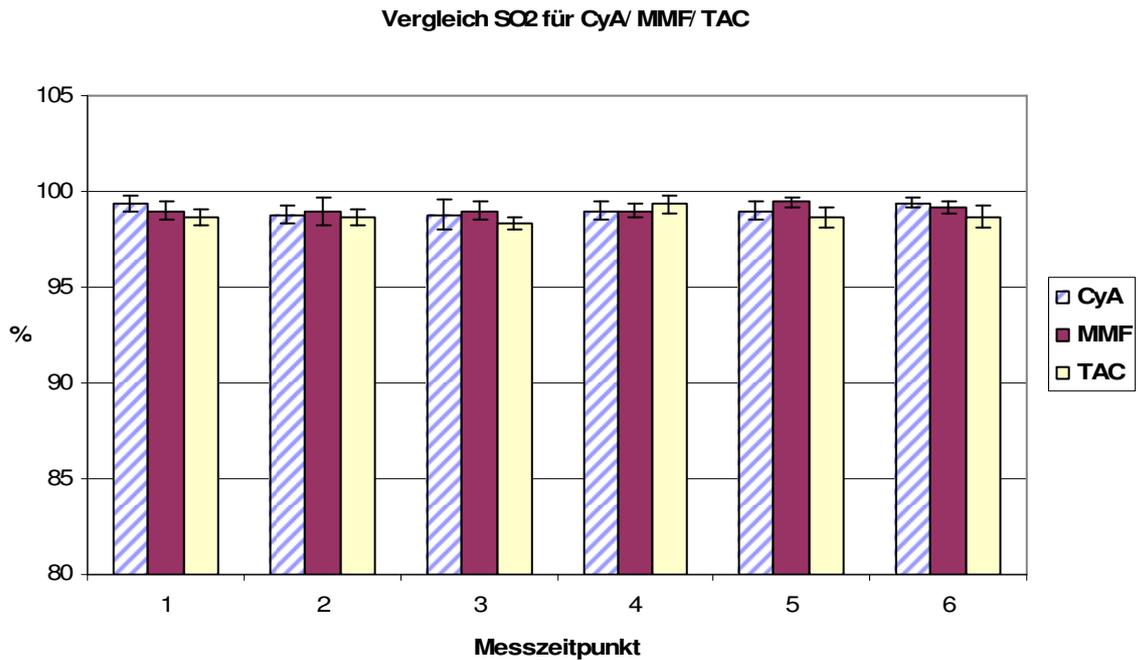
Diagramm 2:



\*)  $p < 0,05$  bezüglich des markierten Messzeitpunktes verglichen mit dem Wert zum MZP 1

**Partielle Sauerstoffsättigung ( $S_pO_2$ ):**

Zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Sauerstoffsättigung zum MZP 1 (Oneway ANOVA  $p= 0,529$ ). Auch über die Messzeitpunkte hinweg war in den drei Gruppen keine signifikante Veränderung der Sauerstoffsättigung feststellbar.

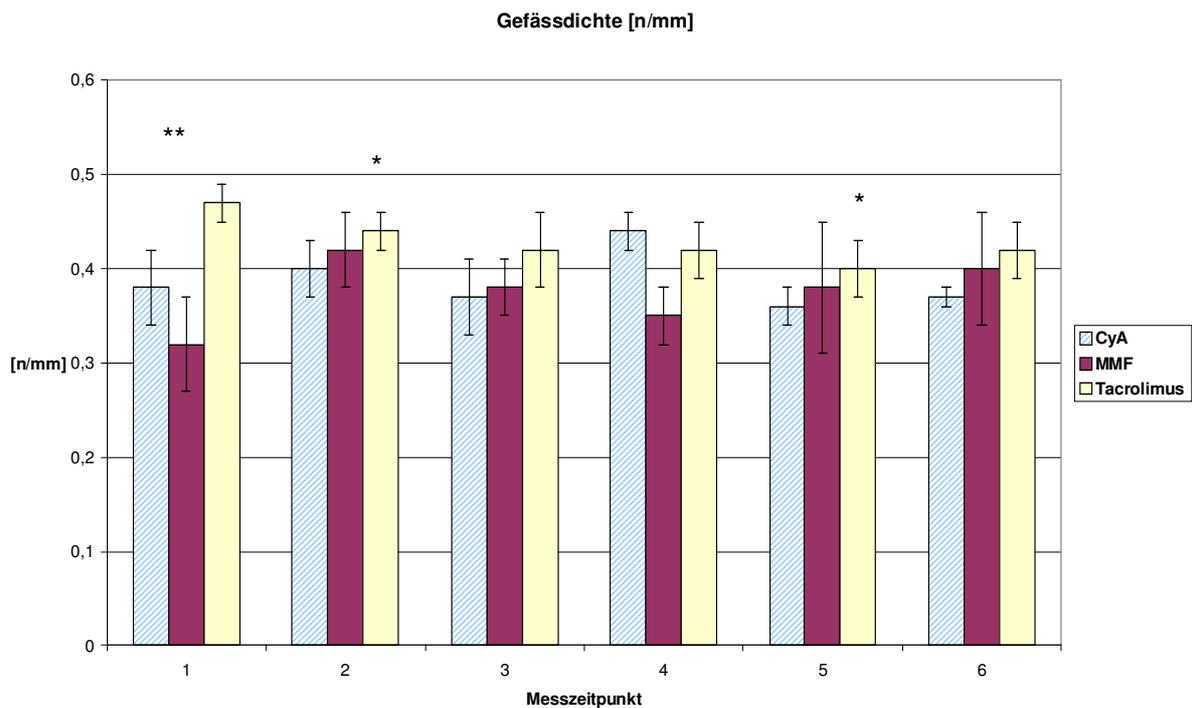
**Diagramm 3:**

### 3.3 Mikrohämodynamik

#### 3.3.1 Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung der Mundbodenschleimhaut (Intravitalmikroskopie)

Für die **Gefäßdichte**, angegeben in n/mm ergab sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 1 (=baseline) mit  $p=0,048$ . Des Weiteren ergab sich eine signifikante Verminderung der Gefäßdichte in der Tacrolimusgruppe zum zweiten und fünften Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert ( $p$  zum MZP 2=0,014/  $p$  zum MZP 5=0,013). Die CyA-Gruppe erwies sich bezüglich der Gefäßdichte weitestgehend konstant.

**Diagramm 4:**



\*)  $p < 0,05$  bezüglich des markierten Messzeitpunktes verglichen mit dem Wert zum MZP 1

\*\*\*)  $p < 0,05$  im Vergleich zu den übrigen Gruppen zum MZP 1

Tabelle 5:

Gefäßdichte [n/mm]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,38**	0,04	0,32**	0,05	0,47**	0,02
2	0,40	0,03	0,42	0,04	0,44*	0,02
3	0,37	0,04	0,38	0,03	0,42	0,04
4	0,42	0,02	0,35	0,03	0,42	0,03
5	0,36	0,02	0,38	0,07	0,40*	0,03
6	0,37	0,01	0,40	0,06	0,42	0,03

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

\*\*)  $p < 0,05$  im Vergleich zu den übrigen Gruppen zum MZP 1

Es zeigte sich ein deutlicher Trend zur Abnahme der **Arterioldichte** in der TAC-Gruppe, welcher mit jedoch kein Signifikanzniveau erreichte ( $p=0,066$  zum MZP 4). Hingegen war der Verlauf der MMF-Gruppe und CyA-Gruppe für Gefäß- und Arterioldichte weitestgehend konstant.

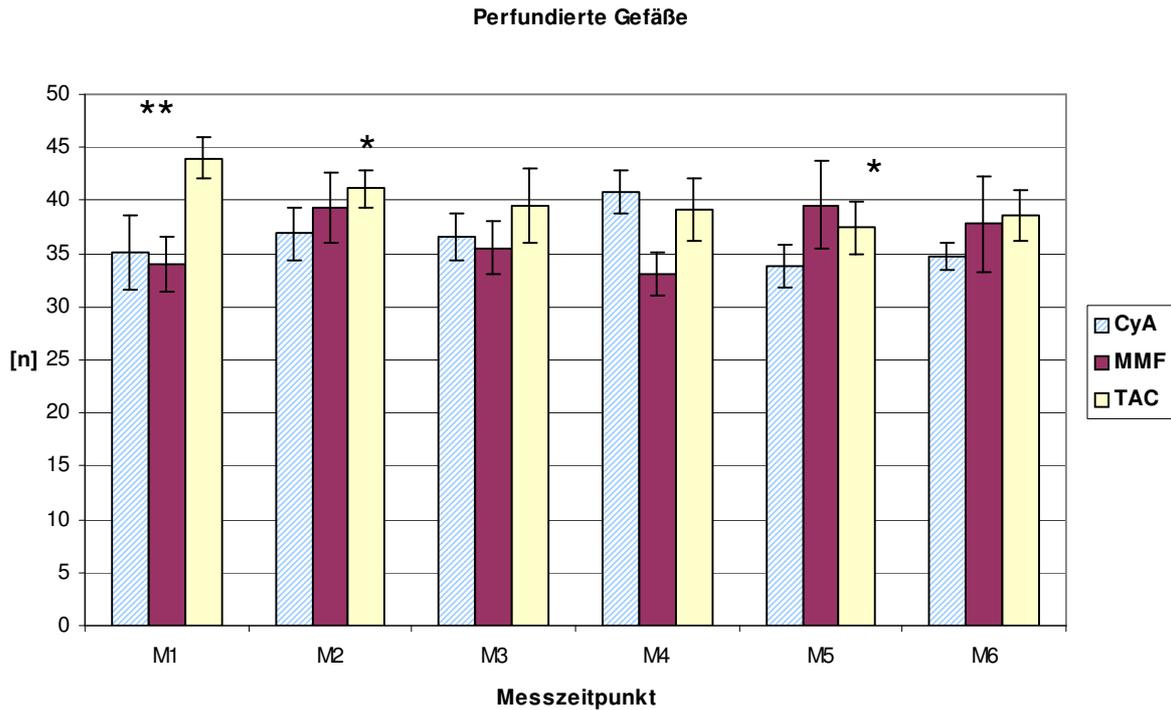
Tabelle 6:

Arterioldichte [n/mm]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	24,8	3,4	25,0	2,9	28,1	1,4
2	24,8	2,8	27,5	2,8	29,0	1,3
3	22,4	2,9	25,1	2,1	24,4	3,6
4	28,4	3,2	21,1	1,5	24,3	0,4
5	21,4	0,7	27,8	5,2	25,0	3,0
6	22,7	1,5	26,5	4,4	25,7	2,6

Bei der Betrachtung aller **perfundierten Gefäße** zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen den Probandengruppen bereits zu Beginn der Untersuchung ( $p=0,046$ ) wobei in der Tacrolimusgruppe die meisten Gefäße gezählt wurden. In der Tacrolimusgruppe war darüber hinaus eine Verminderung der Anzahl

perfundierter Gefäße zum zweiten sowie fünften Messzeitpunkt zu verzeichnen (p zum MZP 2=0,014/ p zum MZP 5=0,013), entsprechend nach 30min und 180min. In der Ciclosporin-Gruppe war diese Veränderung nicht zu erkennen. Bei relativ großer Streubreite waren in der MMF-Gruppe keine richtungsweisenden Veränderungen im Verlauf zu erkennen.

**Diagramm 5:**



\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Tabelle 7:

Perfundierte Gefäße [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	35,1**	3,5	34,0**	2,6	44,0**	2,0
2	36,9	2,5	39,4	3,3	41,1*	1,7
3	36,6	2,2	35,6	2,5	39,5	3,5
4	40,8	2,0	32,8	2,5	39,2	2,9
5	33,8	2,0	39,4	5,1	37,4*	2,5
6	34,7	1,3	37,3	5,4	38,6	2,4

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

\*\*)  $p < 0,05$  im Vergleich zu den übrigen Gruppen zum MZP 1

Bezüglich des **kontinuierlichen Flusses durch alle Gefäße** ergab sich ein Abfall in der Ciclosporingruppe, welcher zum Zeitpunkt 6 signifikant war ( $p$  zum MZP 6=0,037). Eine kontinuierliche Abnahme im Verlauf war vom 2.MZP an auch in der Tacrolimusgruppe zu sehen. Von der Baselinemessung zum 2.MZP kam es zunächst jedoch zu einem Anstieg der kontinuierlich durchflossenen Gefäße. Im direkten Vergleich der Gruppen im Sinne einer Testung der Zwischensubjekteffekte konnte keine Signifikanz herausgestellt werden. Im Einzelnen zeigte sich die eben beschriebene Verminderung des kontinuierlichen Gefäßflusses im Verlauf ausgeprägter für den arteriellen Schenkel.

Tabelle 8:

Kontinuierlicher Fluss durch alle Gefäße [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,51	0,06	0,53	0,1	0,38	0,04
2	0,43	0,05	0,50	0,03	0,48	0,03
3	0,46	0,04	0,44	0,07	0,43	0,04
4	0,39	0,08	0,58	0,09	0,42	0,05
5	0,40	0,07	0,39	0,11	0,40	0,05
6	0,39*	0,07	0,47	0,08	0,46	0,05

Ein signifikanter Abfall zum Zeitpunkt 6 und auch 5 in der Ciclosporingruppe zeigte sich bei der Beobachtung des **kontinuierlichen Flusses durch alle Arteriolen**. (p zum MZP 5=0,03/p zum MZP 6=0,046). Tendenziell konnte dieser Abwärtstrend auch für die TAC-Gruppe gezeigt werden, war jedoch wegen eines sehr niedrigen Baselinewertes, analog zur Messung des kontinuierlichen Flusses durch alle Gefäße, nicht signifikant. Auch in der MMF-Gruppe ergab sich eine signifikante Verminderung zum Messzeitpunkt 4 (p zum MZP 4=0,01).

Tabelle 9:

Kontinuierlicher Fluss durch alle Arteriolen [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,44	0,06	0,45	0,09	0,29	0,04
2	0,31	0,01	0,43	0,06	0,45	0,05
3	0,34	0,31	0,37*	0,05	0,34	0,05
4	0,25	0,08	0,51	0,09	0,32	0,05
5	0,25*	0,05	0,30	0,10	0,32	0,06
6	0,29*	0,08	0,36	0,08	0,29	0,03

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Im Gegensatz dazu kam es bei der Beobachtung des **kontinuierlichen venolären Flusses** im Messverlauf zu keinen gerichteten Veränderungen in den drei Messgruppen.

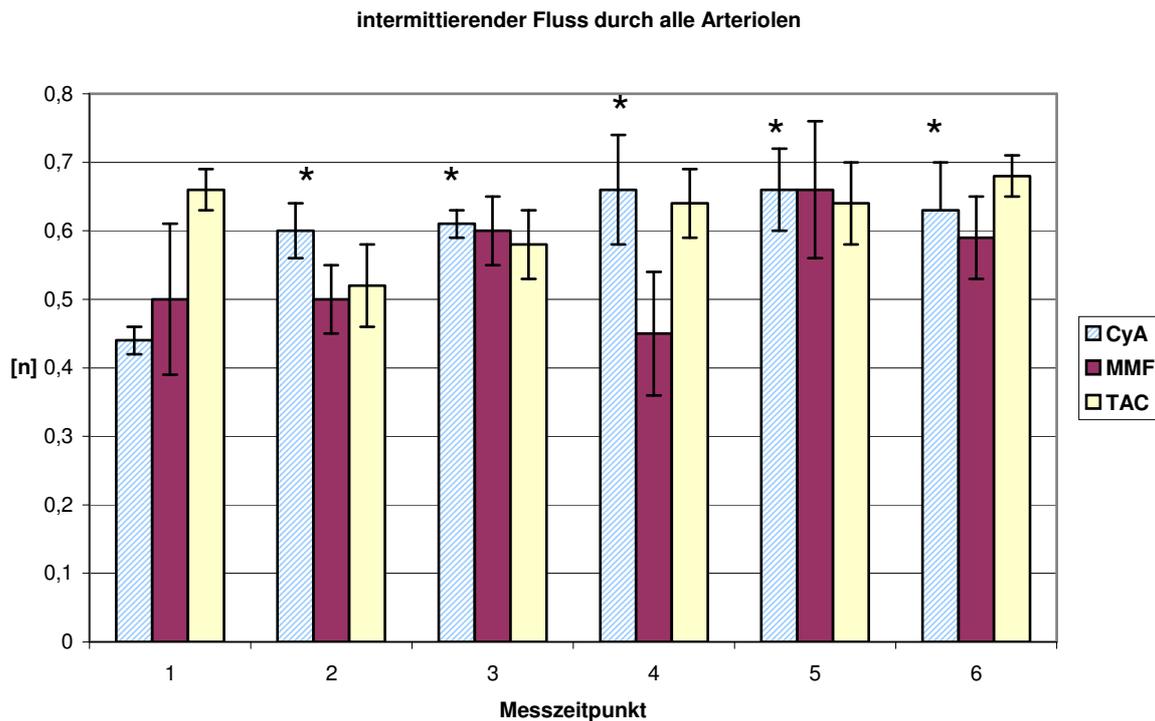
Tabelle 10:

Kontinuierlicher Fluss durch alle Venolen [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,67	0,10	0,66	0,09	0,53	0,05
2	0,63	0,09	0,65	0,05	0,58	0,09
3	0,66	0,09	0,62	0,10	0,58	0,10
4	0,71	0,11	0,74	0,08	0,62	0,09
5	0,64	0,14	0,61	0,12	0,53	0,07
6	0,59	0,12	0,70	0,10	0,78	0,09

Bei der Auswertung des **intermittierenden Flusses durch alle Arteriolen** im Verlauf ergab sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert in der Ciclosporin-Gruppe zu den Zeitpunkten 2 bis 6. ( $p$  zum MZP 2=0,015/  $p$  zum MZP 3=0,07/  $p$  zum MZP 4=0,028/  $p$  zum MZP 5=0,06/  $p$  zum MZP 6=0,02). Wegen eines hohen Ausgangswertes in der Tacrolimus-Gruppe konnte trotz eines im weiteren Verlauf stetigen Anstieges keine Signifikanz gezeigt werden. Zum besseren Verständnis dieser ungewöhnlichen Gefäßdynamik in der Tacrolimus-Gruppe wurden die Baselinewerte der sechs Probanden zusätzlich im Einzelnen betrachtet. Es stellte sich heraus, dass es einen Probanden gab der in der Kategorie „kontinuierlicher Fluss aller Gefäße“ das Minimum ( $n=0,22$  bei MW=0,29) und bezüglich des „intermittierenden Flusses der Arteriolen“ das Maximum ( $n=0,74$  bei MW 0,66) der Einzelwerte bildete.

Im Übrigen zeigten sich keine Signifikanzen im Verlauf oder beim Vergleich der Baselinewerte der unterschiedlichen Gruppen. Auch hier konnte bei der Testung der Zwischensubjekteffekte kein Unterschied bei der Gegenüberstellung von je zwei Gruppen im Verlauf aufgezeigt werden.

Diagramm 6:



\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Tabelle 11:

Intermittierender Fluss durch alle Arteriolen [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,44	0,02	0,50	0,11	0,66	0,03
2	0,60*	0,04	0,50	0,05	0,52	0,06
3	0,61*	0,02	0,60	0,05	0,58	0,05
4	0,66*	0,08	0,45	0,09	0,64	0,05
5	0,66*	0,06	0,66	0,10	0,64	0,06
6	0,63*	0,07	0,59	0,06	0,68	0,03

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Die Auswertung nach **Arteriolen, in denen kein Blutfluss** gesehen wurde, ergab für drei Überprüfungsmodi, Testung der Werte einer einzelnen Probandengruppe im Verlauf, Testung innerhalb der drei Gruppen im Vergleich zum Ausgangspunkt (=MZP 1) sowie Testung der Gruppen untereinander im Verlauf, jeweils keine relevant oder gar signifikant unterschiedlichen Werte.

Tabelle 12:

Kein Fluss durch alle Arteriolen [n]	CyA		MMF		TAC	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	0,10	0,57	0,04	0,02	0,04	0,01
2	0,08	0,03	0,07	0,03	0,03	0,02
3	0,04	0,02	0,03	0,01	0,08	0,03
4	0,07	0,03	0,04	0,01	0,05	0,01
5	0,06	0,02	0,04	0,01	0,04	0,01
6	0,08	0,03	0,05	0,02	0,03	0,01

### 3.3.2 Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung an der Mundschleimhaut (O2C)

#### Sauerstoffsättigung (SO<sub>2</sub>):

Insgesamt bestand zwischen den drei Gruppen bezüglich der SO<sub>2</sub>-Werte zum Ausgangszeitpunkt (=MZP 1) kein signifikanter Unterschied.

Die an der Mundschleimhaut detektierte Sauerstoffsättigung stieg in der Tacrolimusgruppe zum MZP 4 und 6 signifikant an (p zum MZP 4=0,049/ p zum MZP 6=0,008). Auch in der CyA-Gruppe stieg die Sättigung vom Baselinewert bis zum 4. Messzeitpunkt kontinuierlich an, erreichte aber keine Signifikanz und fiel dann bis zum letzten Messzeitpunkt wieder bis zum Ausgangswert. Eine derartige Veränderung konnte für die MMF-Gruppe nicht gezeigt werden.

Diagramm 7:

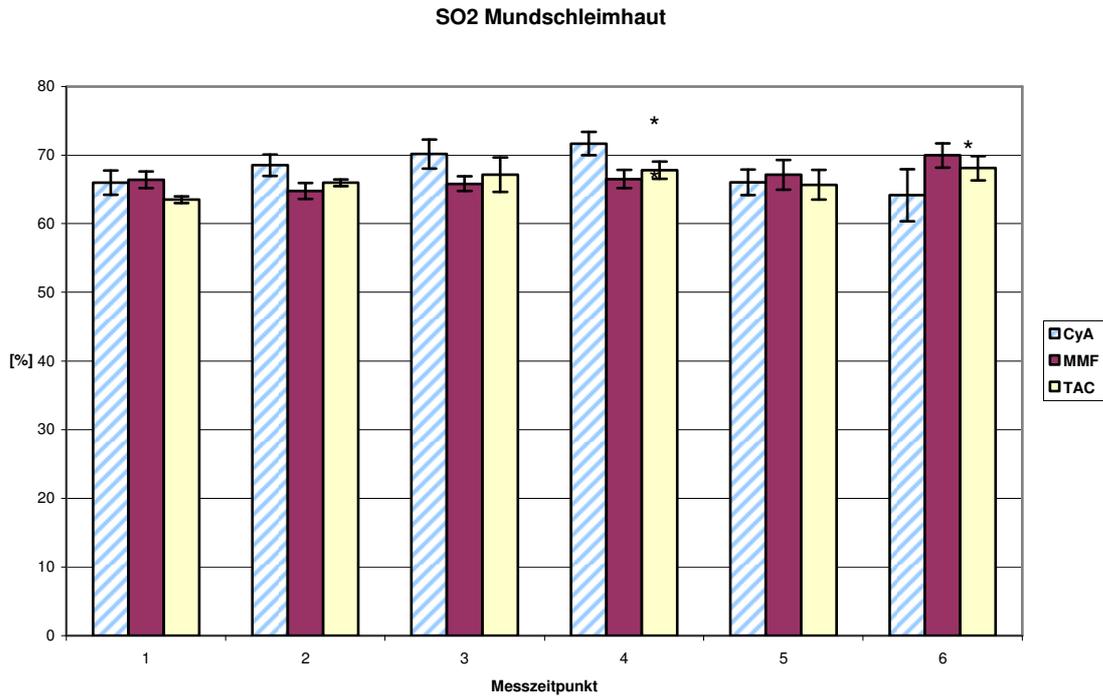


Tabelle 13:

SO <sub>2</sub> MSH [%]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	66,0	1,8	66,4	1,2	63,5	0,5
2	68,6	1,5	64,8	1,2	66,0	0,5
3	70,2	2,1	65,8	1,1	67,2	2,5
4	71,7	1,7	66,5	1,3	67,8*	1,3
5	66,0	1,9	67,1	2,2	65,7	2,2
6	64,2	3,8	70,0	1,7	68,1*	1,8

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

**Relativer Hämoglobinwert (rHb):**

Die drei Gruppen zum Ausgangspunkt der Messung erwiesen sich als vergleichbar (Oneway ANOVA  $p=0,624$ ).

Bei der Auswertung der peripheren Hämoglobinkonzentration konnte eine signifikante Veränderung im Sinne einer Hb-Zunahme ausschließlich für den 2.MZP in der Tacrolimusgruppe aufgezeigt werden ( $p$  zum MZP 2= $0,037$ ).

Tabelle 14:

rHb MSH [AU]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	78,7	2,2	77,8	2,5	75,7	1,4
2	80,7	1,5	74,6	2,1	79,7*	1,8
3	78,4	2,2	76,0	1,4	78,5	2,1
4	79,9	0,8	76,0	1,5	77,4	2,1
5	80,2	1,4	76,3	2,5	77,3	2,5
6	78,5	2,4	76,8	1,5	76,3	1,6

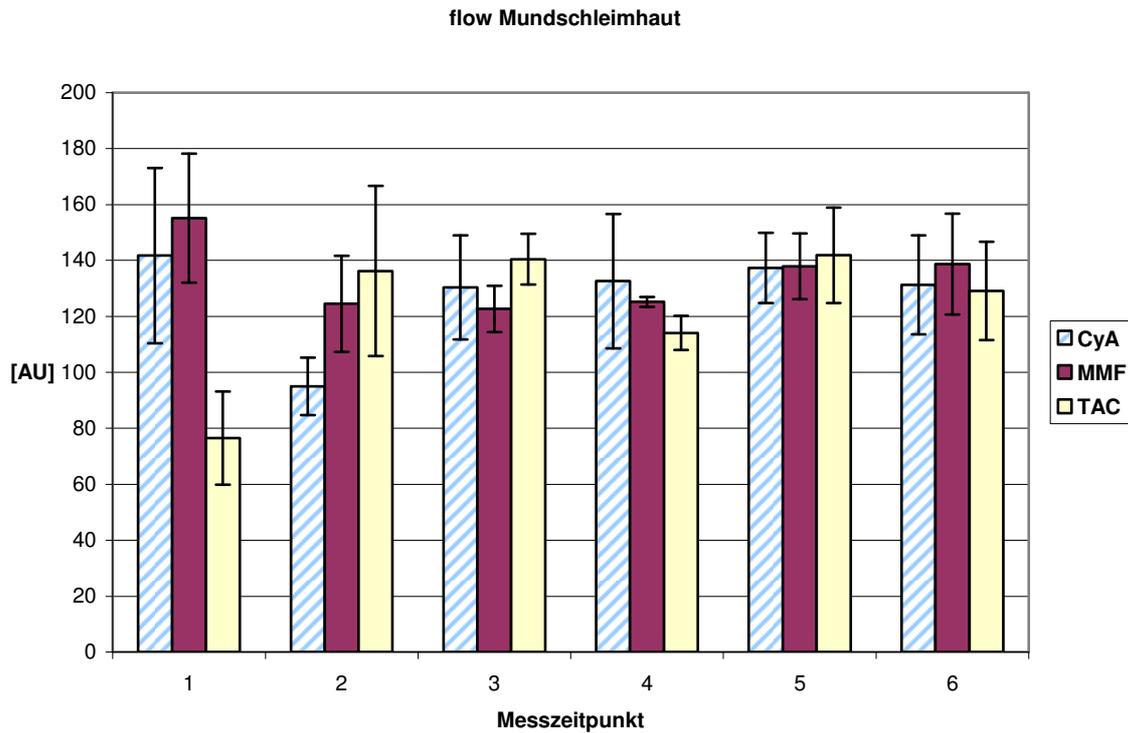
\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

**Durchflussvolumem (Flow):**

Insgesamt wies die Auswertung des Messparameters Flow die größte Streubreite auf. Beim Vergleich der Gruppen untereinander waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Bezogen auf den Ausgangszeitpunkt der Messungen des Durchflussvolumens in den einzelnen Probandengruppen ergaben sich statistisch signifikante Anstiege ausschliesslich in der Tacrolimusgruppe zu den Messzeitpunkten 3 und 5 ( $p$  zum MZP 3=  $0,006$ /  $p$  zum MZP 5= $0,021$ ).

Diagramm 8:



### Velocity (Durchflussgeschwindigkeit):

Bezüglich der Durchflussgeschwindigkeit zeigte die statistische Betrachtung signifikante Messwertsenkungen sowohl in der CyA-Gruppe zu den Messzeitpunkten 2 und 4 als auch in der MMF-Gruppe zum MZP 3 auf. Dagegen blieb die Velocity im Zeitverlauf bei der TAC-Gruppe ohne statistisch fassbare Veränderungen.

Tabelle 15:

Velocity MSH [AU]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	23,0	2,4	36,8	13,9	17,1	0,9
2	18,3*	3,2	30,2	9,2	19,5	3,0
3	18,1	1,8	32,7*	14,1	20,0	1,6
4	17,9	3,4	26,7	9,1	15,2	0,7
5	19,3*	1,9	30,5	9,7	19,8	2,2
6	17,9	1,7	27,5	6,4	18,8	1,6

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

### 3.3.3 Ergebnisse der Mikrozirkulationsmessung am Unterarm ( Ischämie-Reperfusionstest)

#### 3.3.3.1 Baseline-Messung

##### SO<sub>2</sub>:

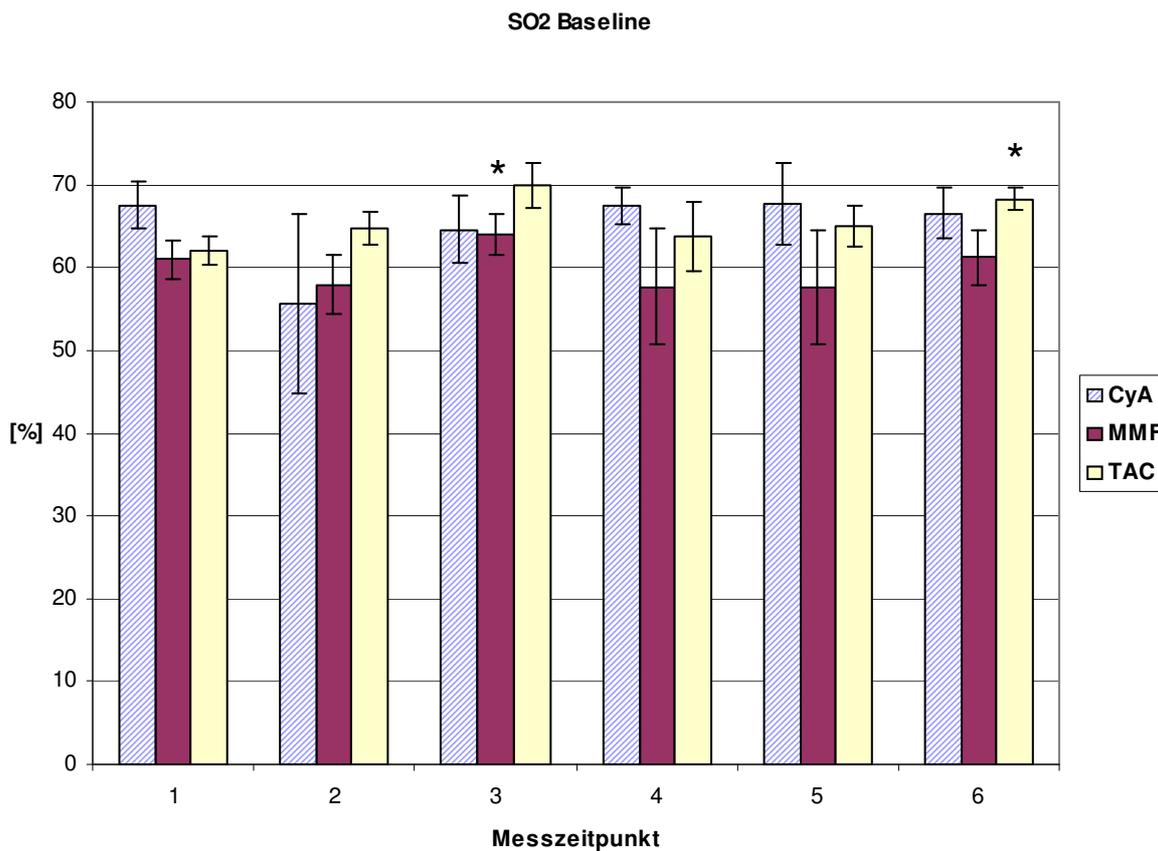
Hinsichtlich der Sauerstoffsättigung ergab sich für die MMF-Gruppe zum 3.MZP ein signifikanter Anstieg, in der Tacrolimusgruppe war dies zum 6.MZP der Fall. In der Ciclosporin-Gruppe ergaben sich keinerlei signifikante SO<sub>2</sub> Schwankungen im gesamten Verlauf der Messung. Dabei fällt jedoch zum Messzeitpunkt 2 ein Mittelwert auf der um rund 10% unter den restlichen Messwerten lag und zugleich eine sehr hohe Streubreite aufwies (SEM=10,77).

Tabelle 16:

SO <sub>2</sub> baseline [%]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	67,5	2,9	60,9	2,35	62,0	1,7
2	55,6	10,8	58,0	3,52	64,6	2,0
3	64,6	4,1	64,1*	2,45	70,0	2,7
4	67,4	2,1	57,7	6,99	63,7	4,2
5	67,7	4,9	57,6	6,83	65,0	2,5
6	66,6	3,0	61,2	3,27	68,3*	1,3

\*) p < 0,05 zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Diagramm 9:

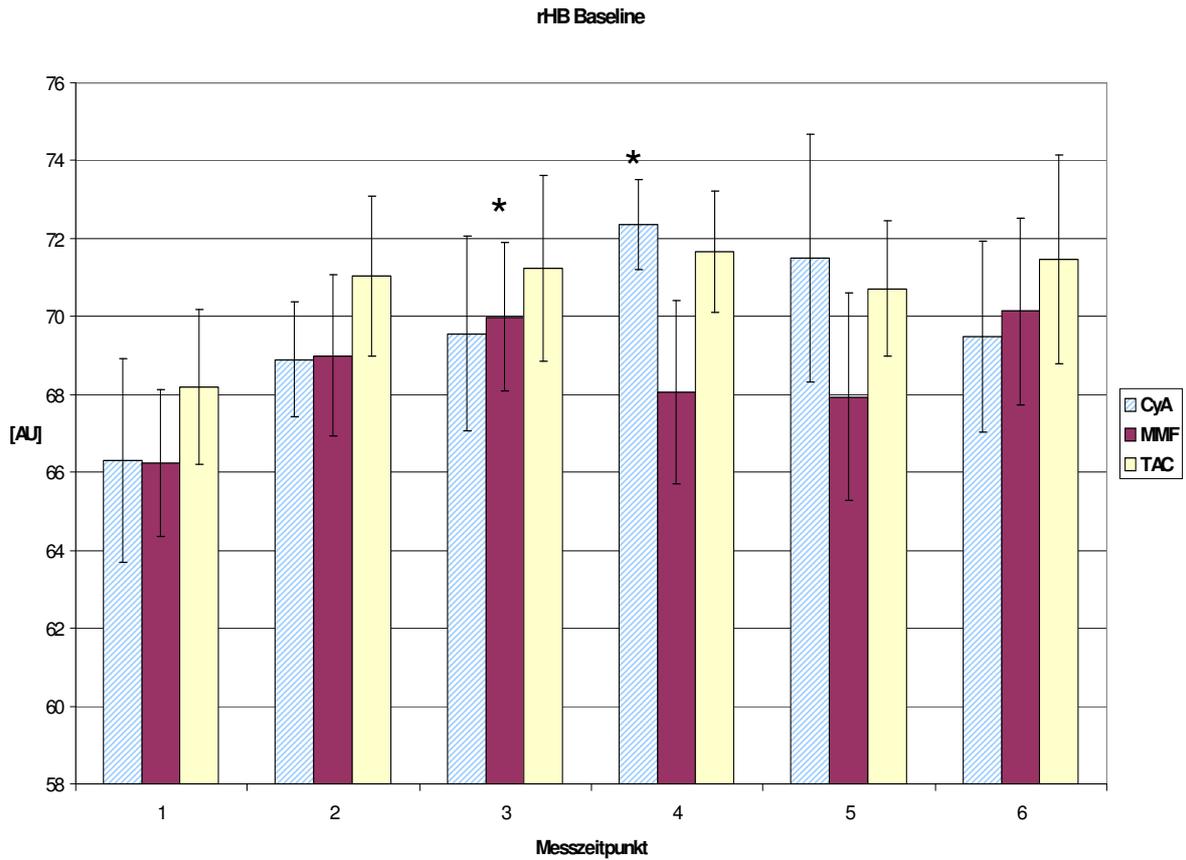


\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZZP1)

### rHb:

Die Werte der relativen Hämoglobinkonzentration in der Cicloporingruppe nahmen zum MZZP 4 signifikant zu ( $p$  zum MZZP 4 = 0,031). Gleiches konnte in der MMF-Gruppe zum MZZP 3 gezeigt werden ( $p$  zum MZZP 3 = 0,048). Die Tacrolimusgruppe zeigte ebenfalls rHb-Anstiege zu den MZZP 2,3 und 4. Diese erreichten jedoch keine Signifikanz.

Diagramm 10:



\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZZP1)

### Flow:

Im Hinblick auf den Flow konnten in keiner der drei Messgruppen im Verlauf signifikante Änderungen aufgezeigt werden. Von der Baseline bis zum MZZP 5 war jedoch bei großer Streubreite insgesamt ein deutlicher Aufwärtstrend in allen 3 Gruppen zu verzeichnen welcher zum letzten Messzeitpunkt jeweils rückläufig war.

Tabelle 17:

<b>Flow baseline [AU]</b>	<b>CyA</b>		<b>MMF</b>		<b>TAC</b>	
<b>Messzeitpunkt</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>
1	93,2	24,9	88,2	21,3	61,2	24,4
2	97,6	33,2	92,5	23,2	81,8	18,7
3	127,0	30,3	101,3	22,4	122,1	23,1
4	110,7	15,0	96,1	27,0	100,6	23,3
5	106,6	25,8	94,7	23,3	127,2	20,6
6	56,4	9,5	83,3	18,5	99,7	20,9

**Velocity:**

Bei der statistischen Betrachtung der Durchflussgeschwindigkeit (Velocity) kam es lediglich in der Ciclosporingruppe zu einer Abnahme welche zum MZP 6 signifikant war ( $p$  zum MZP 6=0,021). Dieser Trend zeichnete sich weder im MMF-Kollektiv noch der TAC-Gruppe ab.

Insgesamt kam waren alle drei beobachteten Gruppen hinsichtlich der vier oben genannten Parameter zum Ausgangspunkt vergleichbar.

Tabelle 18:

<b>Velocity baseline [AU]</b>	<b>CyA</b>		<b>MMF</b>		<b>TAC</b>	
<b>Messzeitpunkt</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>
1	18,0	2,2	17,8	3,0	15,0	3,2
2	18,7	4,0	17,5	4,0	16,9	3,1
3	20,7	4,6	17,6	3,8	22,7	3,5
4	17,0	2,1	19,1	4,8	16,4	3,0
5	16,9	3,4	18,6	4,2	21,1	3,6
6	10,5*	1,4	15,6	3,4	17,9	2,5

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

### 3.3.3.2 Minimalwerte

#### **SO<sub>2</sub>:**

Bei statistischer Betrachtung der Minimalwerte der Sauerstoffsättigung wies keine der drei Gruppen signifikante Schwankungen im Verlauf der 6 Einzelmessungen auf. Es waren für alle drei Probandengruppen die Messwerte am Beginn der Untersuchungen vergleichbar.

#### **rHb:**

Sowohl in der Ciclosporingruppe ( $p$  zum MZP 4=0,001) als auch der Tacrolimusgruppe ( $p$  zum MZP 4=0,013) kam es während der zweiminütigen Unterarmischämie zum MZP 4 zu signifikanten Verminderungen der relativen Hämoglobinkonzentration. Des Weiteren konnte zum MZP 2 in der MMF-Gruppe ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden ( $p$  zum MZP 2=0,022). Demgegenüber zeigte sich zum MZP 1 kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Probandengruppen.

#### **Flow:**

Weder zwischen den drei Gruppen zum Ausgangszeitpunkt noch im Zeitverlauf der 6 Einzelmessungen ließen sich in Bezug auf das Durchflussvolumen signifikante Veränderungen zeigen.

#### **Velocity:**

Bei der Auswertung der Velocity bei Ischämie an der Fingerbeere ergab sich ein signifikanter Anstieg in der Ciclosporingruppe zum Messzeitpunkt 5 ( $p=0,029$ ). Wiederum waren alle drei beobachteten Gruppen hinsichtlich der Messparameter zum Ausgangspunkt der Messungen vergleichbar.

## 3.3.3.3 Maximalwerte

**SO<sub>2</sub>:**

Bei Betrachtung der SO<sub>2</sub>-Maxima aller drei Gruppen zeigte sich ein statistisch relevanter Anstieg einerseits in der Ciclosporin-Gruppe zum MZP 2 ( $p=0,033$ ) und andererseits zum MZP 6 in der Tacrolimus-Gruppe ( $p=0,022$ ).

Tabelle 19:

<b>SO<sub>2</sub> Maximum [%]</b>	<b>CyA</b>		<b>MMF</b>		<b>TAC</b>	
<b>Messzeitpunkt</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>
<b>1</b>	72,2	2,5	71,6	2,0	69,3	2,2
<b>2</b>	79,3*	1,8	69,5	1,6	70,0	0,5
<b>3</b>	79,9	3,1	71,7	0,7	71,7	2,7
<b>4</b>	73,8	2,6	71,9	2,3	70,8	2,0
<b>5</b>	75,4	2,2	70,2	2,1	72,3	2,7
<b>6</b>	72,6	2,1	69,4	1,9	76,1*	2,2

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

**rHb:**

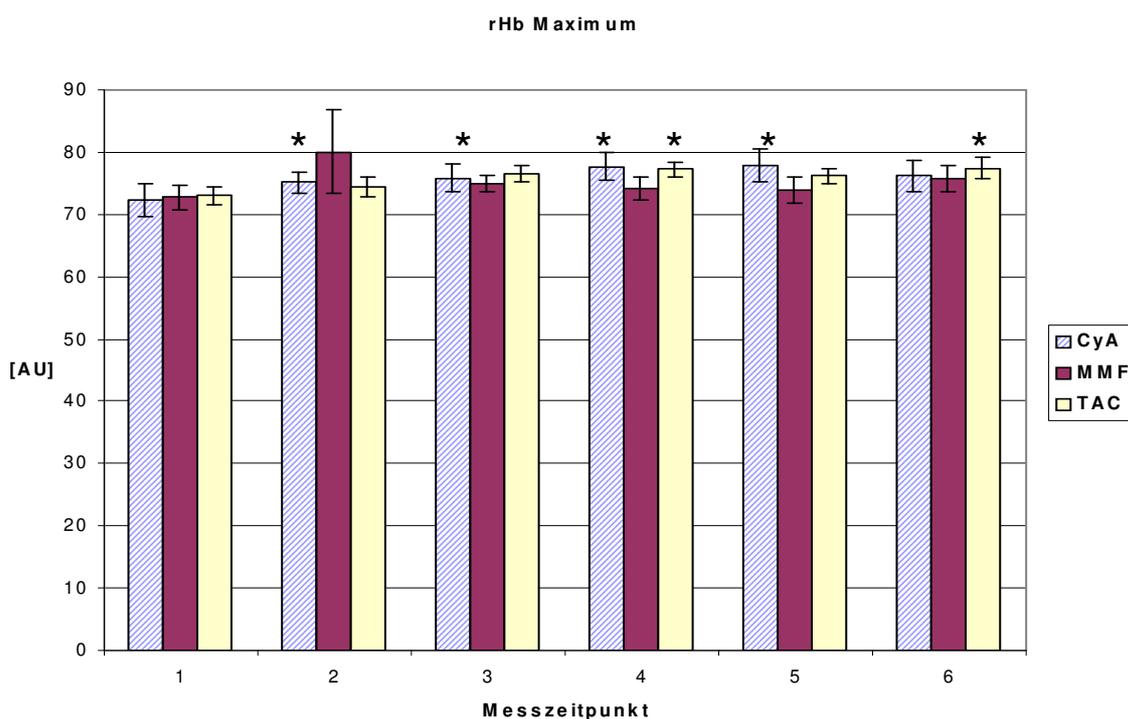
Zum 2. bis 5. Messzeitpunkt konnte in der Ciclosporin-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Maximalwerte der relativen Hb Konzentration detektiert werden ( $p_2=0,048/$   
 $p_3=0,04/p_4=0,022/p_5=0,025$ ). In der Tacrolimus-Gruppe war dies jeweils zu MZP 4 und 6 der Fall ( $p_4=0,05/p_6=0,021$ ). Die MMF-Gruppe wies keine wesentlichen Schwankungen im Messerverlauf auf.

Tabelle 20:

rHb Maximum [AU]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	72,3	2,6	72,8	1,9	73,1	1,4
2	75,2*	1,8	80,0	6,8	74,4	1,5
3	75,8*	2,3	75,0	1,3	76,5	1,4
4	77,7*	2,2	74,1	1,9	77,3*	1,2
5	77,8*	2,7	73,9	2,1	76,2	1,3
6	76,2	2,5	75,7	2,2	77,4*	1,8

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Diagramm 11:



\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

### Flow:

Weder in der Ciclosporingruppe noch in den beiden anderen Kollektiven kam es im Messverlauf zu signifikanten Schwankungen des Flows.

Tabelle 21:

Flow Maximum [AU]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	122,0	24,7	129,7	25,5	144,5	28,2
2	169,2	21,1	128,3	24,4	125,8	20,1
3	173,4	22,0	151,9	23,0	146,7	19,6
4	157,5	17,4	144,3	25,4	147,3	13,8
5	144,7	21,8	145,0	20,0	148,7	17,8
6	154,2	12,1	129,6	21,2	146,7	16,4

**Velocity:**

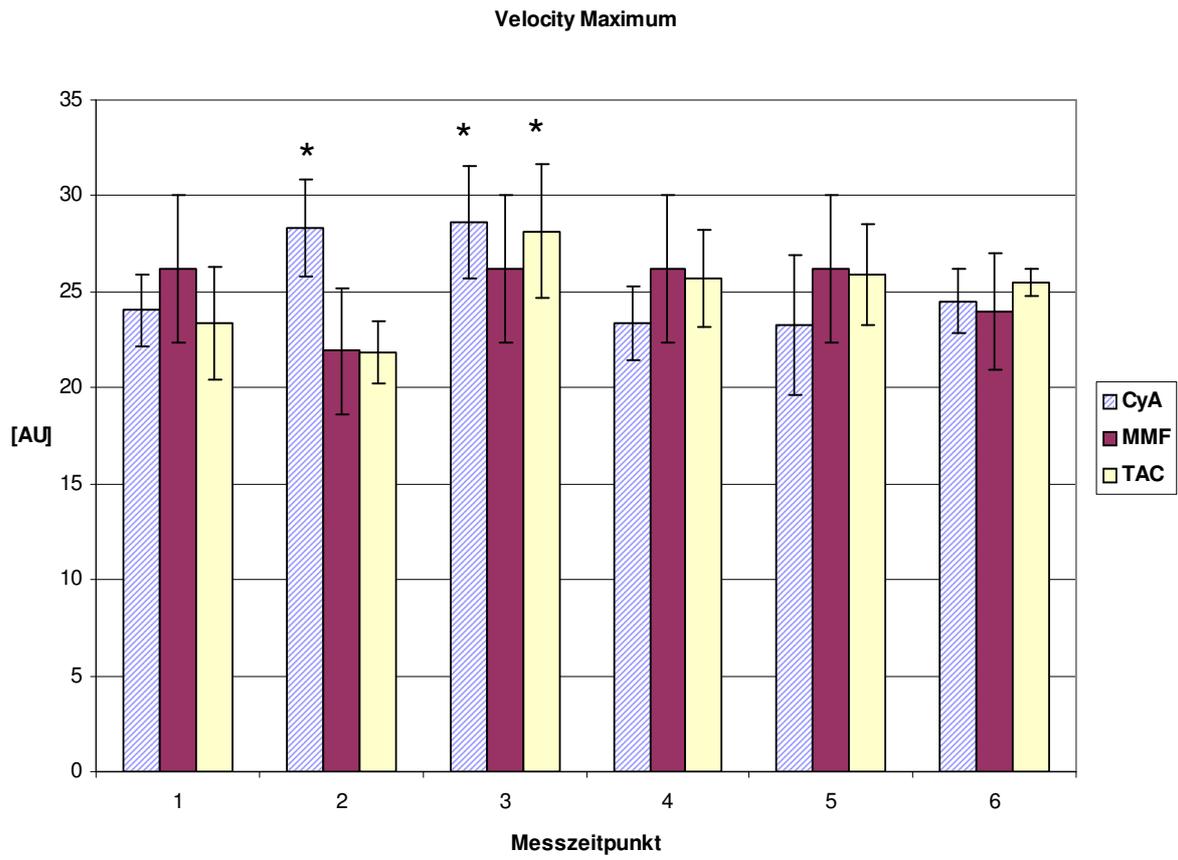
Die Analyse der Durchflussgeschwindigkeit ergab lediglich für die MMF-Gruppe einen annähernd konstanten Messverlauf. In der Ciclosporingruppe war hier ein signifikanter Anstieg zum zweiten und dritten Messzeitpunkt zu verzeichnen ( $p_2=0,044/p_3=0,026$ ). In der Tacrolimusgruppe kam es zum MZP 3 zu einer vergleichbaren Messwerterhöhung ( $p_3=0,02$ ). Wiederum waren alle drei beobachteten Gruppen hinsichtlich der Messparameter zum Ausgangspunkt der Messungen vergleichbar.

Tabelle 22:

Velocity Maximum [AU]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	24,0	1,9	26,2	3,8	23,4	2,9
2	28,3*	2,6	21,9	3,3	21,8	1,6
3	28,6*	2,9	26,2	3,8	28,1*	3,5
4	23,4	1,9	26,2	3,8	25,7	2,5
5	23,2	3,6	26,2	3,8	25,9	2,6
6	24,5	1,7	24,0	3,0	25,5	0,7

\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messzeitpunkt verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

Diagramm 12:



\*)  $p < 0,05$  zum jeweiligen Messezeitpunktes verglichen mit dem Ausgangswert (MZP1)

### 3.4 Sonographische Untersuchung der Mikrozirkulation von Niere und Leber

#### 3.4.1 Arteriokapsulärer Abstand Niere

Auch bei der statistischen Auswertung des akA beider Nieren wurden einerseits die einzelnen Messzeitpunkte der 3 Medikamentengruppen im Verlauf untersucht und - die drei Kollektive direkt vergleichend - die Messwerte vor Medikamenteneinnahme gegenübergestellt. In beiden Auswerteverfahren zeigten sich keine signifikanten Schwankungen. Ein tendenzieller Anstieg des akAs der Ciclosporin-Gruppe nach 3 und 4 Stunden nach Medikamenteneinnahme ging jeweils mit einer SEM Zunahme einher.

Tabelle 23:

<b>Nieren aKA [cm]</b>	<b>CyA</b>		<b>MMF</b>		<b>TAC</b>	
<b>Messzeitpunkt</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>MW</b>	<b>SEM</b>
<b>1</b>	3,5	0,2	3,9	0,5	3,2	0,6
<b>2</b>	3,9	0,4	3,8	0,4	3,5	0,7
<b>3</b>	3,5	0,3	4,1	0,4	3,1	0,5
<b>4</b>	3,5	0,3	4,0	0,4	3,7	1,0
<b>5</b>	4,2	0,7	4,2	0,5	3,1	0,6
<b>6</b>	4,0	0,6	4,4	0,5	3,1	0,5

#### 3.4.2 Arteriokapsulärer Abstand Leber

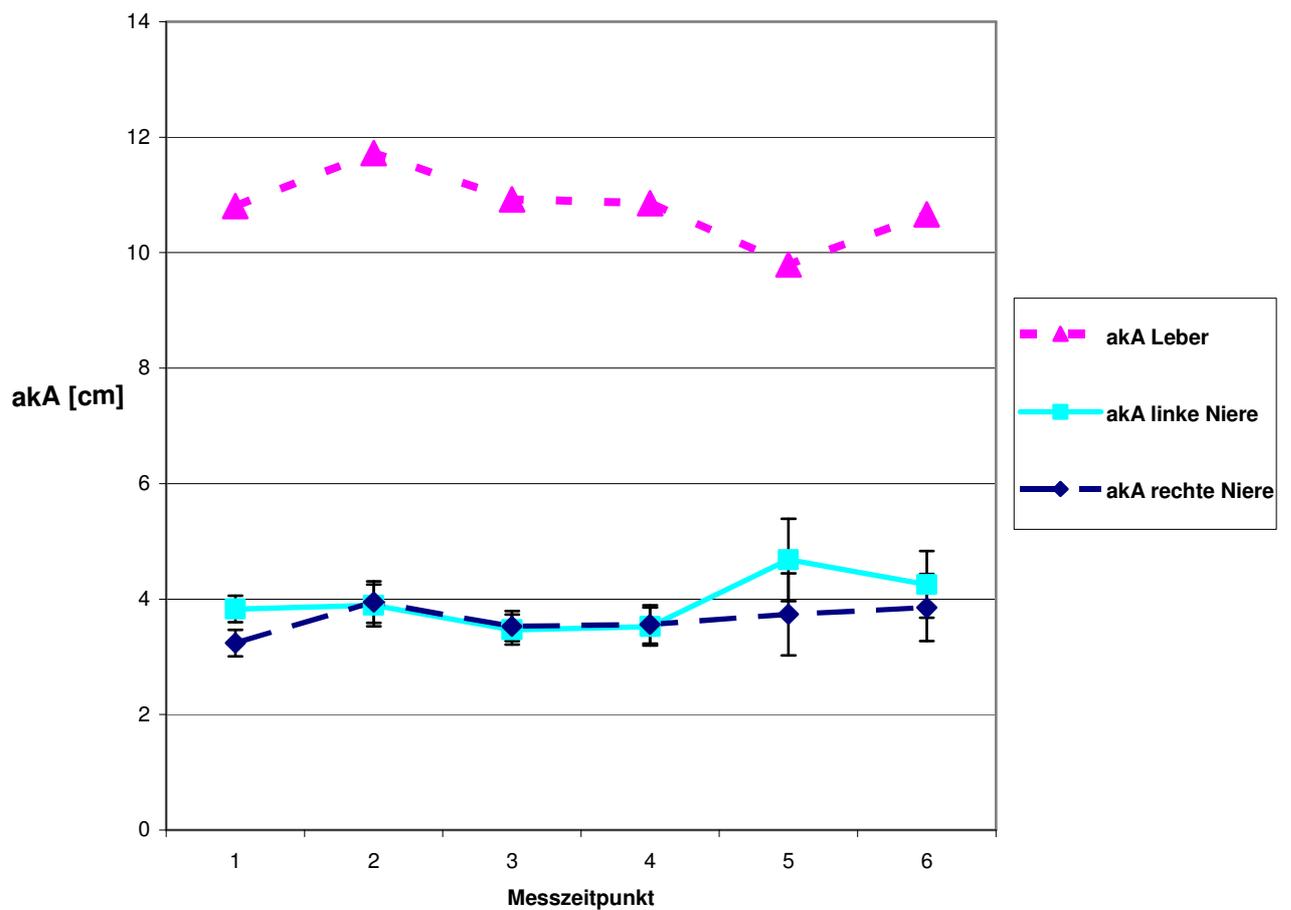
Ebenso wenig ließ sich bei der Beobachtung des Leber-akAs eine signifikante Messveränderung im Messverlauf der einzelnen Medikamentengruppen zeigen. Auch waren alle drei in die Studie miteinbezogenen Gruppen untereinander zum Ausgangspunkt der Messung vergleichbar.

Tabelle 24:

Leber aKA [cm]	CyA		MMF		TAC	
Messzeitpunkt	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
1	10,8	3,0	14,2	2,2	11,3	1,3
2	11,7	3,2	14,0	2,0	12,5	1,9
3	10,9	3,4	12,8	2,2	11,8	1,6
4	10,9	3,2	12,3	2,2	11,9	1,0
5	9,8	2,1	12,3	1,7	12,7	1,9
6	10,7	2,2	11,2	2,1	11,9	1,4

Diagramm 13:

akA am Beispiel Ciclosporin



## 4 Diskussion

Seit Einführung von Calcineurininhibitoren (CNIs) zur Immunsuppression nach allogener Nierentransplantation stellt die Nephrotoxizität ein ernstzunehmendes Problem dar [24]. Ursächlich für die Medikamentennebenwirkung wurde die renale Vasokonstriktion als wichtiger Faktor für die akute und chronische Nierenschädigung identifiziert. Im Zuge der Forschung konnte auch eine systemische Gefäßmodulation, also eine Vasokonstriktion arterieller Gefäße nach einmaliger und insbesondere nach dauerhafter Medikamentenapplikation vielfach nachgewiesen werden. Die genaue Quantifizierung der Effekte von CNIs auf die Mikrozirkulation gestaltet sich jedoch aus mehreren Gründen schwierig. Einerseits sind die traditionellen Messmethoden der Mikrozirkulation stets invasiv und mit Risiken für den Probanden bzw. Studienteilnehmer verbunden. Des Weiteren ist die Gefäßreaktivität nierentransplantierte Patienten meist durch Vormedikation und Erkrankung vielfach beeinträchtigt und lässt sich nur schwer objektiv messen. In unserer hier vorliegenden Studie untersuchten wir deshalb 18 gesunde Probanden deren Gefäßsystem ausschließlich nicht-invasiv untersucht wurde.

### 4.1 Kritische Analyse der Messmethodik

In unserer Studie wurden an Probanden Untersuchungen der Mikrozirkulation vor und im zeitlichen Verlauf nach Applikation dreier Immunsuppressiva durchgeführt. Die Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme wurden bewusst streng gewählt. So war die Einnahme von Koffein, Teein, Antihypertensiva und die Verwendung von Schleimhaut-durchblutungsfördernden Substanzen untersagt [21,93]. Die Unterteilung der Probanden in die drei Medikamentengruppen Ciclosporin, Mycophenolatmofetil und Tacrolimus erfolgte alternierend. Es wurde bei jedem der Probanden eine komplette Baselineuntersuchung aller Messparameter unmittelbar vor Einnahme des Medikamentes und zu den weiteren Messzeitpunkten durchgeführt.

Die anthropometrischen Daten zeigten eine Vergleichbarkeit der Gruppen.

Bei allen 18 an der Studie teilnehmenden Probanden zeigten sich Blutbild, Gerinnungsparameter und Nierenwerte im Normbereich. Die ebenfalls auf die renale

Blutzirkulation Einfluss nehmenden Laborwerte wie antinatriuretisches Peptid oder Angiotensin II [104] wurden nicht untersucht. Aufgrund der sehr niedrigen Inzidenz endokrinologischer Erkrankungen bei Personen mit normwertigen Nierenparametern, Blutbild und fehlender Anamnese von Nierenerkrankungen schien der Verzicht auf die Bestimmung dieser Laborwerte aber vertretbar, ohne die Aussagekraft der Studie zu gefährden.

Bei den Parametern mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF) und pulsoximetrisch detektierter Sauerstoffsättigung ( $S_pO_2$ ), gemessen an der Fingerbeere bestanden zwischen den drei Probandengruppen zum Ausgangszeitpunkt (Messzeitpunkt 1) vergleichbare Werte. Die zur Bestimmung dieser Parameter der Makrohämodynamik angewandten Messmethoden sind bereits lange klinisch etabliert und erfordern keine weitere Diskussion bezüglich der Analysetechnik und Wertigkeit.

Das Verfahren des OPS Imaging zur Darstellung der peripheren Mikrozirkulation ermöglicht die nicht-invasive Darstellung der Mikrozirkulation [121]. Grundlage der Messmethodik ist die Lichtabsorption von Hämoglobin. Dieses Prinzip ermöglicht, dass allein das Lumen der Gefäße ohne Wanddicke zur Darstellung kommt und dass die Gefäße, welche keine roten Blutkörperchen enthalten, nicht zur Darstellung kommen. Die Methode des OPS Imaging kommt im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie ohne Fluoreszenzfarbstoffe aus, welche potentiell Zellfunktionsstörungen, Zellzerstörung und phototoxische Effekte auslösen und beim Menschen schädlich sein können. Diese Effekte limitieren die Anwendbarkeit der Untersuchung am Menschen.

Die Messung von mikrozirkulatorischen Parametern beim Menschen ist von großer medizinischer Wichtigkeit, weshalb der nicht-invasiven Messung große Bedeutung zukommt. Diese ist durch die nicht-invasive, schmerzfreie Technik des OPS Imaging realisiert. Selbst bei Cytoscanmessungen am Oberarm von Neugeborenen zeigten sich nach Angaben der Autoren keinerlei lokale Hautschädigungen [35]. Weiterhin ist das Cytoscan gut transportabel, was es tauglich für die klinische Anwendung macht. Studien haben gezeigt, dass sowohl bei gesunden Menschen als auch bei Probanden mit sehr niedrigen Hämatokritwerten das OPS Imaging eine qualitativ hochwertige und validierte Methode ist, funktionelle Kapillardichte (FCD), Flussgeschwindigkeiten und deren Alterationen darzustellen [43,44].

*Verdant et al* [118] führten parallele Messungen an der Mundschleimhaut und intestinalen Schleimhaut mit dem OPS imaging durch. Demnach sind mikrozirkulatorische Veränderungen der beiden Messregionen qualitativ in Bezug auf das Ausmaß und den zeitlichen Verlauf vergleichbar. In der Literatur wird die enorale Schleimhaut deshalb vielfach repräsentativ für Veränderungen des mikrovaskulären Blutflusses des Gastrointestinaltraktes gesehen [29,91,101]. In neueren Untersuchungen zeigte sich die Cytoscanmessung zur Überwachung der viszeralen Mikrozirkulation beispielsweise beim septischen Patienten neueren Methoden, wie der Pulskonturanalyse (PiCCO) überlegen [120].

Die Messung mit dem OPS Imaging ist jedoch auch einigen Limitationen unterworfen. Hierbei sind Artefakte durch Speichelsekretion, Bewegung und Druck zu erwähnen. Bei der Durchführung unserer OPS-Messungen am Mundboden war es notwendig den Anpressdruck der Sonde gleichbleibend so gering als möglich zu halten, um die Geschwindigkeit der Blutsäule nicht zu beeinflussen. Der Arm des Untersuchers wurde deswegen immer in gleicher Weise auf der Liege des Probanden abgestützt um die Messung möglichst stabil halten zu können. Es wurde zudem vor Beginn der Videoaufzeichnung ein eventuell zu hoher lokaler Anpressdruck nach Visualisierung des Gefäßflusses auf dem Bildschirm vorsichtig moduliert.

Das zu untersuchende Schleimhautareal wurde vor jeder Messung vorsichtig ohne reibende Bewegungen mit einem fuselfreien Tuch von übermäßigem Speichel befreit. Die aufwendige semiquantitative offline Analyse der Mundschleimhautmessungen, welche die manuelle Auszählung von Blutgefäßen beinhaltet, stellt einen Nachteil der Methode dar. Diese verwendete Form der offline Analyse wurde erstmals 2002 von *de Backer* publiziert [27].

In der Literatur zeigte sich ein relativ hoher inter- und intraindividueller Variationskoeffizient für Messungen mit dem Cytoscan [18]. Dies ist neben den eben beschriebenen Unterschieden bei der Messdurchführung auch durch die Heterogenität der Mikrozirkulation bedingt. So kann bei der Cytoscan Untersuchung anders als bei der Fluoreszenzmikroskopie die identische Schleimhautregion regelhaft nicht wieder dargestellt werden.

Die Messungen und Auswertungen fanden in unserer Studie alle verblindet und durch dieselbe Person, die Autorin, statt. Durch eine vergleichbare Arm- und Kopfhaltung des Untersuchers und der untersuchten Probanden sowie die Erfassung

eines Messwertes gemittelt aus jeweils 3 Einzelmessungen sollten Messschwankungen und Ungenauigkeiten weitgehend minimiert werden. Darüberhinaus wurde durch die Dokumentation und spätere Mittelung mehrerer Gesichtsfelder versucht der Heterogenität des Blutflusses allgemein Rechnung zu tragen. Intraindividuelle Schwankungen in der Beurteilung konnten bei im Vorfeld der Studie durchgeführten Pilotmessungen kleiner 5% gehalten werden, was sich gut mit den Ergebnissen *de Backers* und weiteren Angaben der Literatur deckt [19].

Die Qualität der Gefäßdarstellung ist im Vergleich zu anderen Methoden, die beispielsweise mit fluoreszierenden Farbstoffen arbeiten, eingeschränkt. Fluoreszenzmarker stellen den Innendurchmesser des Gefäßes dar, welcher den durch die Cytoscanmethode gemessenen Durchmesser in einer vergleichenden Studie von *Harris et al* um circa  $5\mu\text{m}$  unterschreitet [43,44]. Dies zollen die Autoren einerseits der Tatsache, dass sich zwischen den der Gefäßwand am nächsten liegenden Erythrozyten und der Oberfläche der Endothelzellen der Gefäßwand eine bis zu  $2\mu\text{m}$  dicke Plasmaschicht befindet [68], von der man heute weiß, dass sie der Glykokalix entspricht. Desweiteren kommt es bei der Fluoreszenzmethode zu einer Grenzflächenstreuung.

Die O2C Laserdopplerflowmetrie ist eine etablierte Methode um nicht invasiv transkutan die Mikrozirkulation anhand der vier Messgrößen, relativer Hämoglobingehalt (rHB), Sauerstoffsättigung ( $\text{SO}_2$ ), Flussvolumen (Flow) und Flussgeschwindigkeit (Velocity) zu quantifizieren [80,119]. O2C wurde bereits in einigen klinischen und experimentellen Studien eingesetzt und zeigte sich als valide [9,53,54]. Ein limitierender Faktor dieser Messung scheint dabei aber die interindividuelle Reproduzierbarkeit der Positionierung des Sondenkopfes [38]. In unserer Studie wurden alle Versuche an den Probanden durch eine einzige Person durchgeführt. Des Weiteren arbeiteten wir mit einer flachen Sonde (Modell SF-5-400-052 Lea Medizintechnik, Giessen, Deutschland) welche sich ohne zusätzliche Schiene problemlos in die Tasche zwischen unterem Alveolarkamm und Unterlippe platzieren lies. Das dabei als Verbindung zwischen Gerät und Sonde dienende Glasfaserkabel wurde zudem locker auf einem Infusionsständer aufgehängt um so Zug, Druck oder zu starke Biegung zu vermeiden. In gleicher Weise wurde auch bei den Messungen an der Fingerbeere verfahren. Die erreichbare akzeptable Reproduzierbarkeit des O2C für Längsschnittstudien, gerade wenn es sich dabei um vergleichende Verlaufsstudien an einer Person handelt, wird in aktuellen

Untersuchungen aus Skandinavien bestätigt [106]. Wie in unserer Studie wurde hier zur Messung an der Haut, im Falle der besagten Studie an der Wange, die Sonde locker mit einem einfachen Klebeband fixiert. Eine weitere Einschränkung der Methodik liegt wiederum in der Heterogenität des Gefäßflusses, was bei der Evaluation der einzelnen Messungen berücksichtigt werden muß. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, gingen in unsere Auswertung ausschliesslich Mittelwerte aus bis zu 10 Einzelmessungen ein.

Mit Hilfe der LDF wurden bereits vielfach Untersuchungen zur Vasoreaktivität und ihrer Beeinflussung durch Immunmodulatoren gemacht, in denen Iontophoresetechniken angewandt wurden [3,6]. Aus der Kardiologie stammt die erste Beschreibung eines Ischämie-Reperfusionversuches an der Fingerbeere, der mittels Blutdruckmanschette durchgeführt und mit Oxygen to see (O2C) Gerät dokumentiert wurde. Dabei zeigte sich, dass der Ischämie-Reperfusionstest eine sensible Methode ist um den Einfluss von Medikamenten, welche in den Prostaglandin und Stickstoffmonooxid (NO) Haushalt eingreifen, zu untersuchen [12]. Darüber hinaus konnte die Reproduzierbarkeit in einer Studie um *Kubli et al.* nachgewiesen werden [56]. Ähnliche Studien mit dem O2C liegen nach Durchsicht der zur Verfügung stehenden Literatur bis dato nicht vor. In neueren placebokontrollierten Studien wurden neben Statinen auch COX-Hemmer als signifikante Störfaktoren, also die Messergebnisse beeinflussende Stoffe, postuliert, weshalb in unserer Studie die Einnahme dieser Substanzen bei den Probanden ausgeschlossen wurde. Durch eine entspannte Messsituation in Ruhe (horizontale Körperlage mindestens 10min vor Beginn der Messung) und konstanter Raumtemperatur, wie von *Krug et al.* empfohlen, sollten sympathikogen bedingte Schwankungen der Messergebnisse möglichst minimiert werden [54]. Kritisch zu bewerten ist die Dauer der Ischämie von nur 2 Minuten, welche aus Gründen der Schmerzbelastung für die Probanden bewusst so gewählt wurde. Laut Studienlage hat diese jedoch Einfluss auf die entstehende reaktive Hyperämie. Danach steigt die Qualität der Messergebnisse bei einer Ischämiezeit von 3 Minuten signifikant [109]. Die Hauptfragestellung unserer Studie ob Immunsuppressiva die Mikrozirkulation der Niere verschlechtern und somit die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung erhöhen kann letztendlich nur durch die direkte Messung der Perfusion des Nierenparenchyms beantwortet werden. Die dafür angewandte Methode der Powerdopplersonographie (PDS) ermöglicht eine nicht-invasive Darstellung der

Perfusion im renalen Kortex in Echtzeit. Diese korreliert gut mit invasiven Messungen der Nierenrindenperfusion [58]. Im Vergleich zur Farbdopplersonographie ist die PDS unempfindlicher gegenüber störendem Hintergrundrauschen, es kann somit mit höheren Verstärkungen zur besseren Darstellung des subkapsulären Gefäßflusses gearbeitet werden [20,88]. Vor Allem die in unserer Studie untersuchten Änderungen der kortikalen Mikrozirkulation können so reproduzierbar zur Darstellung gebracht werden. Die Messung des Abstands zwischen Nierenkapsel und äußerster darstellbarer Gefäßperfusion im Cortex (akA) ist dazu eine im klinischen Alltag häufig angewandte Methode zur Verlaufskontrolle der Nierenperfusion nach Transplantation, welche jedoch in der Literatur nur vereinzelt beschrieben ist [108]. Mittels PDS konnten wir sowohl die Nierenperfusion der Probanden im Zeitverlauf als auch vergleichend zwischen rechter und linker Niere detektieren. Ein wesentlicher Vorteil dabei ist die Einfachheit der Messmethode. Um interindividuelle Schwankungen zu umgehen wurden die Sonographien eines Messtages stets vom selben Untersucher durchgeführt. Limitationen bestehen jedoch in der semiquantitativen Auswertung dieser Perfusionsmessung. Dies gilt in analoger Weise für die Messung des arteriokapsulären Abstands (akA) der Leber. Hilfreich für ein reproduzierbares Auffinden des einmal ausgewählten kapselnahen Gefäßes bei Folgemessungen war für uns die Gallenblase als konstante anatomische Struktur welche allerdings im Laufe der Messungen aufgrund der Nüchternheit der Patienten an Größe zunahm. Eine Messung des akAs bei der Leber-sonographie ist nach unserer Kenntnis in der Literatur nicht vorbeschrieben. Im Gegensatz zur Messung des akAs an der Niere wurde zu einem Messzeitpunkt jeweils nur ein Abstandswert gemessen. Dies ist für die Güte der Ergebnisse sicher als Einschränkung zu werten, da Ausreißer einzelner Werte mehr ins Gewicht fallen und bei der niedrigen Fallzahl von 18 nur schwer von tatsächlichen Schwankungen der Perfusion zu unterscheiden sind.

## **4.2 Veränderung der Makrohämodynamik**

Ein Calcineurininhibitor-assoziiertes Hypertonus ist in der Literatur vielfach beschrieben. Als Ursachen hierfür werden neben endothelialen Faktoren eine vermehrte renale Natriumretention sowie ein erhöhter Sympathikotonus genannt

[26,90]. Das Ausmaß des Blutdruckanstiegs ist für Ciclosporin ausgeprägter als für Tacrolimus und dosisabhängig [87,111]. *Abraham et al.* berichten über einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) von 34% 5 Minuten nach intravenöser Applikation von 20mg/kg Ciclosporin im Tiermodell [2]. Zum Vergleich wurde bei unserer Studie mit einer maximalen Medikamentenkonzentration von 5mg/kg Ciclosporin gearbeitet. Bei unseren Untersuchungen der Makrohämodynamik zeigten sich die ausgewerteten Parameter MAP,  $SO_2$  in allen drei Kollektiven stabil. Dies könnte sowohl in der einmaligen Gabe, sowie der Medikamentendosierung begründet liegen, des Weiteren mit der nicht vorhandenen renalen Vorbelastung der Patienten.

Die in der Tacrolimus- und Mycophenolatmofetilgruppe messbare, signifikante Absenkung der Herzfrequenz während der letzten Messungen lässt sich am ehesten durch die Messsituation im Liegen und in Ruhe begründen. Zu allen früheren Messzeitpunkten in allen drei Gruppen zeigte sich auch die Herzfrequenz stabil. Es liegt nicht fern, dass das Ausbleiben der Pulssenkung in der Cyclosporin-Gruppe mit der bereits zitierten Sympathikusaktivierung in Verbindung steht. Die Parasympathikusaktivierung durch die ruhige Messsituation und konsekutive Senkung der Herzfrequenz im Verlauf in der TAC- und MMF-Gruppe ist dadurch möglicherweise nivelliert worden.

### **4.3 Zentrale- und periphere mikrozirkulatorische Veränderungen**

Mittels Intravitalmikroskopie (Cytoscan) und Laserdopplerflowmetrie (Oxygen to see) an der Mundschleimhaut und Fingerbeere wurden Veränderungen in der Mikrozirkulation nach Einnahme dreier verschiedener Immunsuppressiva analysiert. Zur Ausgangssituation der Cytoscanuntersuchung an der Mundschleimhaut ist folgendes zu erwähnen. Betrachtet man die statistische Auswertung fällt zunächst ein signifikanter Unterschied in der Gefäßdichte am Ausgangspunkt auf (TAC Gruppe=0,47n/mm, CyA-Gruppe=0,38n/mm, MMF-Gruppe=0,32n/mm), welche durch die Heterogenität des Gefäßnetzes zu begründen ist. Folglich war auch der Ausgangswert für die Anzahl aller perfundierten Gefäße in der Tacrolimusgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Kollektiven signifikant höher ( $p=0,046$ ). Da das Intravitalmikroskop Gefäße nur erkennen kann, wenn diese durch Erythrozyten

perfundiert sind, sinkt der Messwert für die Gefäßdichte mit der Verminderung der Anzahl perfundierter Gefäße.

Insgesamt bestätigte sich bei der Untersuchung an der Mundschleimhaut die Aussage aus der Literatur, dass die Einnahme von Calcineurininhibitoren (Ciclosporin und Tacrolimus) im Gegenteil zu Mycophenolatmofetil unmittelbar auf die zentrale Mikrozirkulation Einfluss nimmt.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass dosisabhängig 30 Minuten nach intravenöser Applikation von Calcineurininhibitoren die Renin-Plasmaaktivität signifikant ansteigt [74]. Aktuelle Studien unterscheiden an dieser Stelle zwischen systemischen RAS (circulating RAS) und nierengebundenem RAS-System (tissue RAS). So kommt es nur initial zu einer Aktivierung des systemischen RAS-Systems (circulating RAS), was sich in einer Veränderung des zirkulierenden Blutvolumens und Blutdrucks niederschlägt. Dies führt zu einer renalen Ischämie, welche nun das nierengebundene RAS-System (tissue RAS) aktiviert. Dessen wiederholte Aktivierung bei wiederholter Calcineurinapplikation scheint hauptsächlich für die chronische Nierenschädigung verantwortlich zu sein [96].

Auch in unserer Studie kam es im Zeitverlauf korrelierend mit dem Anstieg der Medikamentenspiegel im Serum bereits nach 30 Minuten zu signifikanten Veränderungen der mikrovaskulären Perfusion der Mundschleimhaut. Unter dem Einfluss beider beobachteter Calcineurininhibitoren zeigte sich eine Abnahme der kontinuierlich durchflossenen Gefäße und konsekutiv ein Anstieg der nur intermittierend durchflossenen Gefäße. Dass diese Veränderung in der TAC-Gruppe keine Signifikanz erreichte, lässt sich anhand der Messwerte am ehesten durch einzelne deutliche Ausreißer in der sonst im Verlauf homogenen TAC-Gruppe begründen.

Betrachtet man die Zirkulationsveränderungen genauer, zeigen sich für die Abnahme der kontinuierlich durchflossenen Gefäße in beiden CNI-Gruppen ausschließlich Gefäßverengungen der Gefäße kleiner 20µm ursächlich, die neben der kapillären Strombahn hauptsächlich dem arteriolären Gefäßsystem angehören. Dies korrespondiert mit der Beobachtung, dass direkt an der Arterienwand wirkende vasoaktive Substanzen von CNIs beeinflusst werden. Zu nennen sind hierbei Leukotrien C4 und D4, Prostaglandin I2, Thromboxan A2 sowie Endothelin-1. In tierexperimentellen Studien, in denen Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels

gezielt inhibiert wurden, zeigte sich der Einfluss dieser Substanzen auf den renalen Plasmafluss (RPF) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) [82].

Die in diesem Zusammenhang auch postulierte Suppression der Cyclooxygenase (COX-1) muss jedoch für die verschiedenen CNIs differenziert betrachtet werden. In einer 2009 veröffentlichte Studie beschrieben *Jespersen und Kollegen*, dass Tacrolimus in vivo sogar zu einer verminderten Thromboxanausscheidung und gleichzeitig einer Unterstützung der systemischen PGI<sub>2</sub> Produktion führt [50], was die Autoren mit der antiinflammatorischen Eigenschaft der Makrolide, zu denen Tacrolimus gehört, in Verbindung bringen.

Auch in unserer Untersuchung der blutzirkulatorischen Auswirkungen an der Mundschleimhaut differierten die beiden CNI-Gruppen. Blutfluß und Sauerstoffsättigung in der Ciclosporingruppe verbesserten sich im Verlauf nur unwesentlich. Während es jedoch in der Ciclosporingruppe zu einer signifikanten Verlangsamung des Blutflusses im Verlauf kam, wies die TAC-Gruppe signifikante Verbesserung der SO<sub>2</sub>, rHb und des Blutvolumens im Zeitverlauf auf. Dass diese Entwicklung nicht allein auf eine Parasympathikusaktivierung und verminderten Sauerstoffbedarf in Ruhe zurückzuführen sein kann, bestätigen die im Zeitverlauf im Wesentlichen unveränderten Zirkulationsparameter aller MMF-Probanden. Insgesamt machen unsere Messergebnisse an der Mundschleimhaut deutlich, dass sowohl Tacrolimus als auch Ciclosporin die zentrale Mikrozirkulation durch Vasokonstriktion negativ beeinflussen. Die positiven rheologischen Eigenschaften von Tacrolimus scheinen jedoch das Ausmaß der Stoffwechselkompromittierung der Niere zu vermindern.

Betrachtet man dagegen die periphere Mikrozirkulation, gemessen an der Fingerbeere entlang der Zeitachse, sind dynamische Veränderungen dieser Parameter für alle drei Medikamentenkollektive kaum erkennbar. In Übereinstimmung dazu beschreibt die Literatur vasoaktive Substanzen, welche ciclosporininduziert zu einer renalen Vasokonstriktion führen, analoge Untersuchungen peripherer Gefäßveränderungen jedoch Limitationen aufzeigen. Der Endothelin- und Stickstoffmonoxidmetabolismus des Nierengefäßendothels, so zeigen viele etablierte Studien, wird sowohl in vitro, als auch in vivo durch die Applikation von Ciclosporin und Tacrolimus beeinflusst [14,110]. Zwar wurde hierbei auch bestätigt, dass die Reaktivität der Gefäße auf Endothelin und NO sich minimal verändert. Dies sei jedoch laut der Autoren eher auf den erhöhten Blutdruck als auf

die Medikamentenwirkung selber zurückzuführen. Außerdem ist nicht davon auszugehen, dass die Vasoreaktivität induziert durch genannte Metabolite in verschiedenen Gefäßbetten stets identisch ist [17]. Bezogen auf die untersuchten Parameter kam es in der Tacrolimusgruppe lediglich bezüglich der Sauerstoffsättigung zum Messzeitpunkt 6 zu einem signifikanten Anstieg. Sichtbare Tendenzen einer Verbesserung des Flussverhaltens betrafen Fließgeschwindigkeit und Hämoglobinkonzentration vor allem zum Zeitpunkt der höchsten Blutkonzentration. Im CyA-Kollektiv konnte keine einheitliche Verlaufsrichtung ausgemacht werden. Signifikant waren die Anstiege der rHB zum MZP 4 und die verminderte Velocity zum MZP 6. Interessanterweise wies auch die MMF-Gruppe signifikante rHB Anstiege zum MZP 3 sowie der Sauerstoffsättigung eine Stunde nach Medikamenteneinnahme auf. Wir konstatieren, dass die Absolutwerte der peripheren Mikrozirkulation zu sehr individuellen Schwankungen unterworfen sind um beim Versuchsaufbau und Fallzahl unserer Studie aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. Hautdicke, Muskulatur, Temperaturregulation sind Faktoren, die hier eine wichtige Rolle spielen.

Anders verhält es sich beim Ischämie-Reperfusionstest an der Fingerbeere.

Hier waren in beiden CNI-Gruppen signifikante Anstiege der Fließgeschwindigkeit, sowie teils signifikante, teils nur gerichtete Anstiege von  $SO_2$  und rHb zu verzeichnen. Ihren Gipfel erreichten die Messwerte zwischen ein bis zwei Stunden nach Medikamentenapplikation. *Asberg et al.* konnten bei einem Ischämie-Reperfusionstest mit einer Ischämiedauer von 3 Minuten und Detektionszeitpunkt 3 Stunden nach Ciclosporineinnahme ähnliche Ergebnisse verzeichnen. Ursächlich wird hierbei eine mitunter neurogene Stimulation des endothelinabhängigen gefäßerweiternden Systems in Widerstandsgefäßen gesehen. Dieser Regulationsmechanismus als Antwort auf die Ciclosporin induzierte Vasokonstriktion scheint sich im Laufe der Zeit jedoch zu erschöpfen. Eine konsekutive Veränderung des Plasmaspiegels vasoaktiver Substanzen Endothelin-1 und NO konnte dabei nicht gezeigt werden. [7]. Eine Messung von Endothelin-1 scheint somit nicht sinnvoll und wurde in unserer Studie nicht durchgeführt.

#### **4.4 Organspezifische mikrozykulatorische Veränderungen am Beispiel Niere und Leber**

Bei der Messung des arteriokapsulären Abstands an beiden Nieren der Probanden zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der rechten und linken Niere unabhängig von der eingeteilten Medikamentengruppe. Ein derartiges Ergebnis war bei durchweg normalwertigen Nierenparametern und der fehlenden Anamnese einer Nierenschädigung bei allen unseren Probanden durchaus zu erwarten. Entscheidender für die Beantwortung unserer Frage nach Veränderungen der Mikrozykulation im Zeitverlauf war jedoch die Erfassung der Intensität der kapselnahen Nierenperfusion. Tendenziell kam es in allen drei Medikamentengruppen zu einer leichten Verschlechterung der kapselnahen Parenchyndurchblutung. Diese war jedoch nicht signifikant. Am ehesten scheint es sich hier um ein nicht medikamentös induziertes Phänomen zu handeln. Als Auslöser wären sowohl Änderungen im Flüssigkeitshaushalt als auch vom Sympathikotonus abhängige physiologische Durchblutungsschwankungen denkbar. Aber auch die von der Dauer der Seitenlage während der jeweiligen sonographischen Untersuchungen abhängigen Durchblutungsunregelmäßigkeiten müssen als Ursache in Betracht gezogen werden [94].

Im Gegensatz zur Niere konnten bei der statistischen Analyse des akAs an der Leber weder signifikante noch einheitliche Veränderungen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Messung des akAs mittels Powerdopplersonographie verglichen mit der Intravitalmikroskopie oder Laserdopplerflowmetrie keine genügend sensible Methode zur Darstellung geringer mikrozykulatorischer Schwankungen ist. Eine andere vergleichbare Untersuchung über die Wertigkeit der Powerdopplersonographie bzw aKA Bestimmung an der Leber zur Messung mikrozykulatorische Veränderungen ist uns aus der Literatur auch nicht bekannt.

#### **4.5 Konsequenz für die Klinik**

Der Calcineurininhibitor Ciclosporin ist fester Bestandteil der klassischen Therapieprotokolle nach Nierentransplantation [42]. In den ersten zwei Wochen nach Transplantation soll bei Anwendung dieses Immunsuppressivums eine

Aufsättigung erreicht werden. Danach folgt in der Regel die Gabe einer Erhaltungsdosis von 2-6mg Ciclosporin pro kg Körpergewicht (Talspiegel 100-200ng/ml) täglich. Diese Tagesdosis wird vorzugsweise auf zwei Einzelgaben verteilt [51]. Beim Immunsuppressivum Tacrolimus beträgt die Tagesdosis 0,2mg pro kg/ KG (Talspiegel 5-15ng/ml) und wird aufgrund seiner Pharmakokinetik in zwei Einzeldosen aufgeteilt. Die Ergebnisse der uns hier vorliegenden Studie zeigen, dass sich zum Zeitpunkt der Anflutung dieser beiden Medikamente CyA und TAC im Blut eine Veränderung der zentralen Mikrozirkulation mit signifikanter Vasokonstriktion einstellt. Vergleichend dazu konnte kein signifikanter Effekt auf die Gefäße durch Mycophenolatmofetil gezeigt werden. Auch deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass das Ausmaß der arteriellen Gefäßmodulation proportional zum Medikamentenspiegel ansteigt. Uns ist bewusst, dass unsere Untersuchung aufgrund der geringen Fallzahl von 18 Probanden nur Pilotstudiencharakter aufweist. Ihre Ergebnisse stellen die Frage in den Raum, ob es notwendig ist die Galenik beider CNIs zu verändern. Eventuell könnten makro- und mikrozirkulatorische Veränderungen nach Einnahme von Calcineurininhibitoren minimiert werden wenn bei gleich bleibender AUC der maximal erreichte Serumspiegel gesenkt wird. Dies könnte beispielsweise durch eine Aufteilung der Tagesdosis auf mehr als zwei Einzelgaben oder durch retardierte Medikamentenformen erreicht werden. Die Klärung dieser wichtigen Fragen sollte Inhalt künftiger Untersuchungen und Studien in der Transplantationsmedizin sein. Aus unserer Sicht hat die vorliegende Arbeit bewiesen, dass die Kombination aus Intravitalmikroskopie, O<sub>2</sub>C-Laserdopplerflowmetrie und Ischämie-Reperfusionstests an der oberen Extremität ein sinnvolles Armamentarium darstellt, um Mikrozirkulationsveränderungen nach Einnahme von Immunsuppressiva an Probanden und Patienten untersuchen und quantifizieren zu können.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Immunsuppressiva auf die periphere und zentrale Mikrozirkulation nierengesunder Probanden untersucht werden. Es wurden einmalig Ciclosporin (CyA), Tacrolimus (TAC) und Mycophenolatmofetil (MMF) verabreicht. Im Einzelnen wurden Mundschleimhautmikrozirkulation, renale Mikrozirkulation sowie periphere Vasoreaktivität an der Fingerbeere analysiert.

Dazu wurden insgesamt 18 gesunde Probanden im Zeitverlauf 30 Minuten vor und jeweils 60, 120, 180 und 240 Minuten nach Einnahme eines der drei Immunsuppressiva untersucht (Ciclosporin-Gruppe n=5/ Mycophenolatmofetil-Gruppe n=7/ Tacrolimus-Gruppe n=6). Zu diesen Zeitpunkten erfolgte eine venöse Blutentnahme (Blutbild, Gerinnung, Nierenwerte, Medikamentenspiegel) sowie eine Messung der Makrohämodynamik mit Hilfe einer automatischen Blutdruck- und Herzfrequenzmessung. Die Quantifizierung der Mundschleimhautperfusion erfolgte mittels intravitraler Mikroskopie (OPS=engl.:*Orthogonal Polarization Spectral*) Imaging. Gleichzeitig wurden durch Gewebsspektroskopie (O2C=engl.:*Oxygen too see*) die Hämoglobinkonzentration, Sauerstoffsättigung, Durchflussvolumen (Flow) und Durchflussgeschwindigkeit (Velocity) in den Gefäßen der Mundschleimhaut sowie die periphere Vasoreaktivität der Gefäße der Fingerbeere nach zweiminütiger Ischämie am Oberarm quantitativ erfasst. Zusätzlich wurden per Duplexsonographie in beiden Nieren arterio-kapsuläre Abstände (akA) am oberen und unteren Nierenpol und an der Leberkapsel als Maß für die Organperfusion bestimmt.

Bei der Analyse der Medikamentenspiegel war das Konzentrationsmaximum in der TAC- und CyA-Gruppe nach 120 Minuten erreicht, in der MMF-Gruppe bereits nach 60 Minuten.

Die Zusammenschau der Ergebnisse der Cytoscanmessungen zeigte eine signifikante Verminderung der Gefäßdichte in der TAC-Gruppe (MZP 1=0,47n/mm; MZP 5=0,40n/mm; p=0,013). In der Ciclosporin-Gruppe zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Gefäßdichte ohne Erreichen eines Signifikanzniveaus. Gleiches war für die Arterioldichte der Fall. Korrespondierend ergab sich eine signifikante Verminderung der kontinuierlich durchflossenen Gefäße in der CyA-Gruppe. Eine tendenzielle Verminderung dieser Parameter war auch in der Tacrolimusgruppe zu

verzeichnen. Die MMF-Gruppe zeigte demgegenüber keine vergleichbaren Veränderungen.

Bei der O<sub>2</sub>C Untersuchung an der Mundschleimhaut ergab die Auswertung insgesamt uneinheitliche Werte. Die Ergebnisse der SO<sub>2</sub> zeigten signifikante Anstiege im Verlauf bei der TAC- und CyA-Gruppe. Gleiches galt für die TAC-Gruppe bei der Beobachtung des rHb und Flows. Die Velocity sank hingegen in der CyA-Gruppe signifikant.

Die Untersuchung der Vasoreaktivitätsveränderung im Ischämie-Reperfusionstest ergab in der Ciclosporin- und der Tacrolimusgruppe jeweils signifikante Anstiege der Parameter SO<sub>2</sub> (TAC: MZP 1=69,3%; MZP 6=76,1%; p=0,022) rHb (CyA: MZP 1=72,3AU; MZP 5=77,8AU; p=0,025) und Velocity (TAC: MZP 1=23,4AU; MZP 3=28,1AU; p=0,02). Im Vergleich dazu verhielten sich die Messergebnisse in der MMF-Gruppe annähernd konstant.

Die sonographische Untersuchung des arteriokapsulären Abstands der drei Probandengruppen, gemessen an der Niere und Leber, ergab keine relevanten Veränderungen im Zeitverlauf.

Mit der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Einmalgabe von Ciclosporin und auch Tacrolimus an nierengesunden Probanden die zentrale und periphere Mikrozirkulation unmittelbar beeinflusst wird. Insbesondere die Messung der zentralen Mikrozirkulation an der Mundschleimhaut mittels Cytoscan und der Ischämie-Reperfusionstest an der Fingerbeere mit dem O<sub>2</sub>C erwiesen sich als geeignete Analyseverfahren zur Quantifizierung der Gefäßmodulation. Für die Vasokonstriktion an den Gefäßen der Mundschleimhaut und die verlangsamte Reaktivität der Gefäße bei der peripheren Reperfusion werden sowohl eine Calcineurininhibitor induzierte Aktivierung des Sympathikus und Renin-Angiotensinsystems als auch Metabolite des Archidonsäurestoffwechsel, welche direkt an der arteriellen Gefäßwand wirken, verantwortlich gemacht. Dass derartige Gefäßmodulationen speziell durch die Gruppe der den Calcineurininhibitoren zugehörigen Immunsuppressiva ausgelöst werden, bewies die Untersuchungsreihe mit Mycophenolatmofetil, welches in keiner der durchgeführten Untersuchungen richtungsweisende Veränderungen der Mikrozirkulation bei Anflutung des Medikamentes bewirkte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die Kombination aus Intravitalmikroskopie, Oxygen too see und Ischämie-Reperfusionstests Mikrozirkulationsveränderungen

nach Einnahme von Immunsuppressiva quantifizierbar sind, die durch konventionelle Untersuchungen (z.B. Powerdoppler-Sonographie) nicht erfassbar sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Rote Liste Service GmbH (Herausgeber und Verlag) 2010, 2336 Seiten, ISBN 978-3-939192-40-4.
- [2] Abraham JS, Bentley FR, Garrison RN. In vivo assessment by videomicroscopy of acute renal microvascular responses to cyclosporin. *Br J Surg* 1992;79:1187-91.
- [3] Algotsson A, Nordberg A, Winblad B. Influence of age and gender on skin vessel reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators tested with iontophoresis and a laser Doppler perfusion imager. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50:M121-M127.
- [4] Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;47:85-118.
- [5] Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, et al. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 1993;25:67-70.
- [6] Asberg A, Berg KJ, Hartmann A. Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients. *Microvasc Res* 2000;60:81-90.
- [7] Asberg A, Berg KJ, Hartmann A. Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients. *Microvasc Res* 2000;60:81-90.
- [8] Beauvoit B, Evans SM, Jenkins TW, et al. Correlation between the light scattering and the mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumors. *Anal Biochem* 1995;226:167-74.
- [9] Beckert S, Witte MB, Konigsrainer A, et al. The impact of the Micro-Lightguide O2C for the quantification of tissue ischemia in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2004;27:2863-7.
- [10] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* 1953;76:1409-12.
- [11] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity.III Actively acquired tolerance. *Philos Trans Soc* 1956;239:357-414.
- [12] Binggeli C, Spieker LE, Corti R, et al. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:71-7.
- [13] Bittar AE, Ratcliffe PJ, Richardson AJ, et al. The prevalence of hyperlipidemia in renal transplant recipients. Associations with immunosuppressive and antihypertensive therapy. *Transplantation* 1990;50:987-92.
- [14] Bloom IT, Bentley FR, Garrison RN. Acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction is mediated by endothelin-1. *Surgery* 1993;114:480-8.

- [15] Bloom IT, Bentley FR, Spain DA, et al. An experimental study of altered nitric oxide metabolism as a mechanism of cyclosporin-induced renal vasoconstriction. *Br J Surg* 1995;82:195-8.
- [16] Bobadilla NA, Gamba G. New insights into Pathophysiology of Cyclosporine Nephrotoxicity: A role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:2-9.
- [17] Bracht C, Yan XW, LaRocca HP, et al. Cyclosporine A and control of vascular tone in the human forearm: influence of post-transplant hypertension. *J Hypertens* 1999;17:357-63.
- [18] Bracht C, Yan XW, LaRocca HP, et al. Cyclosporine A and control of vascular tone in the human forearm: influence of post-transplant hypertension. *J Hypertens* 1999;17:357-63.
- [19] Buchele GL, Silva E, Ospina-Tascon GA, et al. Effects of hydrocortisone on microcirculatory alterations in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2009;37:1341-7.
- [20] Bude RO, Rubin JM, Adler RD. Power versus Conventional Color Doppler Sonography: Comparison in the Depiction of Normal Intrarenal Vasculature. *Radiology* 1994;192:777-80.
- [21] Buhr G. On the effect of caffeine on the peripheral circulation and its neural regulation. *Arztl Forsch* 1966;20:89-94.
- [22] Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996;36:315-24.
- [23] Burton AC. Resistance to flow in vascular beds. *Nature* 1958;182:1456-7.
- [24] Calne RY, Thiru S, McMaster P, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. 1978. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1751-6.
- [25] Chapman JR, Marcen R, Arias M, et al. Hypertension after renal transplantation. A comparison of cyclosporine and conventional immunosuppression. *Transplantation* 1987;43:860-4.
- [26] Curtis JJ, Luke RG, Jones P, et al. Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *Am J Med* 1988;85:134-8.
- [27] De Backer D, Creteur J, Preiser JC, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:98-104.
- [28] De Backer D, MD, PhD, et al. Assessment of the microcirculatory flow in patients in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:200-3.
- [29] De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, et al. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 2010;36:1813-25.

- [30] Dietrich CF. Ultraschall-Kurs: Organbezogene Darstellung von Grund-, Aufbau- und Abschlusskurs. 5 ed.: Deutscher Ärzte-Verlag, 2006;25-26.
- [31] Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, et al. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991;33:161-73.
- [32] Fruhmans DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB* 1994;8:391.
- [33] Gabriel M. Danovitch, Gabriel M. Handbook of kidney transplantation Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2010;311-329.
- [34] Gandjbakhche AH, Bonner RF, Arai AE, et al. Visible-light photon migration through myocardium in vivo. *Circ Physiol* 1999;46:698-704.
- [35] Genzel-Boroviczeny O, Strotgen J, Harris AG, et al. Orthogonal polarization spectral imaging (OPS): a novel method to measure the microcirculation in term and preterm infants transcutaneously. *Pediatr Res* 2002;51:386-91.
- [36] Gijtenbeek JM, van den Bent MJ, Vecht CJ. Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J Neurol* 1999;246:339-46.
- [37] Gillum DM, Truong L, Tasby J, et al. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: a rodent model. *Transplantation* 1988;46:285-92.
- [38] Gleissner C, Kempfski O, Peylo S, et al. Local gingival blood flow at healthy and inflamed sites measured by laser Doppler flowmetry. *J Periodontol* 2006;77:1762-71.
- [39] Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, et al. Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999;5:1209-12.
- [40] Halloran PF. Mechanism of action of the calcineurin inhibitors. *Transplant Proc* 2001;33:3067-9.
- [41] Halloran PF. Calcineurin Inhibition- relationship to cyclosporin blood concentration. *Focus on Medicine* 1998;13:15.
- [42] Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
- [43] Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Validation of OPS imaging for microvascular measurements during isovolumic hemodilution and low hematocrits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1502-H1509.
- [44] Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res* 2000;37:469-76.
- [45] Hauser IA, Neumayer HN. Tacrolimus and cyclosporine efficacy in high-risk kidney transplantation. *Transpl Int* 1998;11:73-7.

- [46] Herold G. Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln: Herold Gerd, 2006.
- [47] Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 1995;23:28-34.
- [48] Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993;365:352-5.
- [49] Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, et al. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 1992;356:801-4.
- [50] Jespersen B, Thiesson HC, Henriksen C, et al. Differential effects of immunosuppressive drugs on COX-2 activity in vitro and in kidney transplant patients in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1644-55.
- [51] Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 14 ed.: Karow/Lang, 2006.
- [52] Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 1987;40:1249-55.
- [53] Knobloch K, Lichtenberg A, Pichlmaier M, et al. Palmar microcirculation after harvesting of the radial artery in coronary revascularization. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1026-30.
- [54] Krug A. Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung des Gewebes: Methode des sogenannten O<sub>2</sub>C (oxygen to see). *Phlebologie* 2006;6:300-12.
- [55] Kruger M, Schwaninger M, Blume R, et al. Inhibition of CREB- and cAMP response element-mediated gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506 in T cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;356:433-40.
- [56] Kubli S, Waeber B, le-Ave A, et al. Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:640-8.
- [57] Kuchenreuther S, Adler J, Schultz W, et al. The Erlanger Microlightguide Photometer: a new concept for monitoring intracapillary oxygen supply of tissue - first results and a review of the physiological basis. *J Clin Monit* 1996;12:211-24.
- [58] Kuwa T, Cancio LC, Sondeen JL, et al. Evaluation of renal cortical perfusion by noninvasive power Doppler ultrasound during vascular occlusion and reperfusion. *J Trauma* 2004;56:618-24.
- [59] Land WG. Immunsuppressive Therapie. 1 ed. Stuttgart: Thieme Verlag, 2006.
- [60] Land WG, Samtleben W, Hillebrand G, et al. unveröffentlichte Beobachtungen. 2006.

- [61] Lang P, Baron C. Molecular mechanisms of immunosuppressive chemical agents recently introduced in clinical transplantation protocols. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2050-4.
- [62] Lin HY, Rocher LL, McQuillan MA, et al. Cyclosporine-induced hyperuricemia and gout. *N Engl J Med* 1989;321:287-92.
- [63] Liu J, Farmer JD, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807.
- [64] Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol* 1986;4:119-45.
- [65] Massague J. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597.
- [66] Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacol* 2000;47:119.
- [67] Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, et al. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 1990;9:4425-33.
- [68] Michoud E, Carpentier P, Franco A, et al. Two light attenuation models for automatic diameter measurement of the blood vessels. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993;12:157-71.
- [69] Möller KO, Nilsson G, Fagrell B. Laser-Doppler Flowmetry for microcirculation monitoring. Introduction. *Technol Health Care* 1999;7.
- [70] Morales JM. Influence of the new immunosuppressive combinations on arterial hypertension after renal transplantation. *Kidney Int* 2002;62:81-7.
- [71] Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, et al. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990;22:1659-62.
- [72] Moss NG, Powell SL, Falk RJ. Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8222.
- [73] Moutabarrik A, Ishabashi M, Fukunaga M, et al. FK-506 induced kidney tubular cell injury. *Transplantation* 1992;54:1041.
- [74] Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 1985;28:767-74.
- [75] Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, et al. Kidney transplantation in modified recipients. *Ann Surg* 1962;156:337-55.
- [76] Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:201-4.

- [77] Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, et al. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963;268:1315-23.
- [78] Mutze S, Overhoff M, Filimonow S, et al. Ultrasonography diagnosis in kidney transplantation. *Radiologe* 1996;36:31-7.
- [79] Neumayer HH. *Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin*. 1 ed. Bremen: Uni-Med Science, 2001.
- [80] Oberg PA. Laser-Doppler flowmetry. *Crit Rev Biomed Eng* 1990;18:125-63.
- [81] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.
- [82] Perico N, Pasini M, Gaspari F, et al. Co-participation of thromboxane A2 and leukotriene C4 and D4 in mediating cyclosporine-induced acute renal failure. *Transplantation* 1991;52:873-8.
- [83] Peters DH, Fitton A, Plosker GL, et al. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993;46:746-94.
- [84] Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus. A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59:323-89.
- [85] Rainiene T. Immunosuppression in the past and today. *Acta Medica Lituanica* 2005;12:10-7.
- [86] Rincon M, Flavell RA. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J* 1994;13:4370-81.
- [87] Rodrigo E, Ruiz JC, Angeles de CM, et al. Correlation of C0 and C2 levels with cyclosporine side effects in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:2328-31.
- [88] Rubin JM, Bude RO, Carson PL, et al. Power Doppler US: A Potentially Useful Alternative to mean Frequency-based Color Doppler US. *Radiology* 1994;190:853-6.
- [89] Ruff VA, Leach KL. Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. *J Biol Chem* 1995;270:22602-7.
- [90] Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, et al. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med* 1990;323:693-9.
- [91] Schiessler C, Schaudig S, Harris AG, et al. [Orthogonal polarization spectral imaging-a new clinical method for monitoring of microcirculation]. *Anaesthesist* 2002;51:576-9.
- [92] Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U. *Kurzlehrbuch Chirurgie*. 6 ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 2004; 198-99.

- [93] Schwalb H, Hensel H. Effect of caffeine on renal circulation, glomerular filtrate and on diuresis in man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1954;221:198-208.
- [94] Schwartz BF, Dykes TE, Rubenstein JN, et al. Effect of body position on renal parenchyma perfusion as measured by nuclear scintigraphy. *Urology* 2007;70:227-9.
- [95] Schwartz R, Damashek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959;183:1682-3.
- [96] Shang MH, Yuan WJ, Zhang SJ, et al. Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity. *Chin Med J (Engl )* 2008;121:983-8.
- [97] Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, et al. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11205-9.
- [98] Sims TN, Dustin ML. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* 2002;186:100-17.
- [99] Sohn C, Krünes U, Becker D, et al. Possibilities and limits of a new color technique: ultrasound angiography- results of the heidelberg Round Table Discussion". *Bildgebung* 1995;62:53-63.
- [100] Sollinger HW. From mice to man: the preclinical history of mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 1996;10:85-92.
- [101] Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, et al. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 2002;360:1395-6.
- [102] Starzl TE, Todo S, Groth C. Second International Workshop on FK506 - a potential breakthrough in immunosuppression. clinical implications. *Transplant Proc* 1990;22:113-20.
- [103] Starzl TE, Weil R, Iwatsuki S. The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1980;151:17-26.
- [104] Steinhausen M. [Physiology and pathophysiology of renal circulation]. *Z Kardiol* 1987;76 Suppl 4:71-9.
- [105] Sugimoto T, Stewart S, Guan KL. The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* 1997;272:29415-8.
- [106] Svalestad J, Hellem S, Vaagbo G, et al. Reproducibility of transcutaneous oximetry and laser Doppler flowmetry in facial skin and gingival tissue. *Microvasc Res* 2010;79:29-32.
- [107] Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, et al. Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* 1987;19:11-6.

- [108] Taylor GA, Barnewolt CE, Adler BH, et al. Renal cortical ischemia in rabbits revealed by contrast-enhanced power Doppler sonography. *AJR Am J Roentgenol* 1998;170:417-22.
- [109] Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Dependence of human forearm skin postocclusive reactive hyperemia on occlusion time. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004;50:73-8.
- [110] Textor SC, Burnett JC, Jr., Romero JC, et al. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int* 1995;47:1426-33.
- [111] Textor SC, Taler SJ, Canzanello VJ, et al. Posttransplantation hypertension related to calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2000;6:521-30.
- [112] Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995;17:584-91.
- [113] Tilney NL. *Transplant From Myth to Reality*. New Haven and London: Yale University Press, 2003.
- [114] Trimarchi HM, Truong LD, Brennan S, et al. FK-506-associated thrombotic microangiopathy. *Transplantation* 1999;67:539-44.
- [115] Ullmann E. Experimentelle Nierentransplantation. *Wien klin Wochenschr* 1902;15:281-2.
- [116] Ullmann E. Officielles Protokoll der k.k. Gesellschaft der Ärzte in Wien. *Wien klin Wochenschr* 1902;15:707.
- [117] Ventura CG, Coimbra TM, de Campos SB, et al. Mycophenolate Mofetil Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2524-33.
- [118] Verdant CL, De BD, Bruhn A, et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit Care Med* 2009;37:2875-81.
- [119] Walter B, Bauer R, Krug A, et al. Simultaneous measurement of local cortical blood flow and tissue oxygen saturation by near infrared Laser Doppler flowmetry and remission spectroscopy in the pig brain. *Acta Neurochir* 2002;81:197-9.
- [120] Wiessner R, Gierer P, Schaser K, et al. [Microcirculatory failure of sublingual perfusion in septic-shock patients. Examination by OPS imaging and PiCCO monitoring]. *Zentralbl Chir* 2009;134:231-6.
- [121] Winkelmann JW. Apparatus and method for in vivo analysis of red and white blood cell indices. 1991. US Patent 4998553.
- [122] Zhong Z, Connor HD, Yin M, et al. Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporine A-induced hydroxyl radical production in rat kidneys. *Mol Pharmacol* 1999;56:455.

## 7 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johannes N. Hoffmann für die Überlassung des Themas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, die Einarbeitung in die experimentellen Untersuchungen, die umfassende Betreuung sowie die effizienten Korrekturen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. med. Jan Fertmann für die menschliche und fachliche Betreuung in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Weidenhagen möchte ich mich für die leihweise Überlassung des Cytoscan bedanken, durch das die Messungen an den Patienten möglich wurden.

Frau Prof Dr. Vollmar bin ich dankbar für die Ratschläge hinsichtlich der statistischen Aufarbeitung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester und meinem Schwager, die mich jederzeit und uneingeschränkt motiviert und unterstützt haben und somit wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

