

**Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main**

Institut für Klinische Pharmakologie

**Plättchenfunktion als prädiktiver Marker kardiovaskulärer  
Ereignisse bei nierentransplantierten Patienten unter  
Berücksichtigung der Immunsuppression**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Philipp Weisser  
aus Göttingen

Frankfurt am Main, 2009

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. S. Harder
Korreferent:	Prof. Dr. H. Geiger
Tag der mündlichen Prüfung:	03.11.2009

für meine Frau und meine Kinder

<b>1</b>	<b><u>Einleitung.....</u></b>	<b>6</b>
1.1	Fragestellung:.....	9
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden.....</u></b>	<b>10</b>
2.1	Datenerhebung, Patientengut .....	10
2.2	Vergleich der Plättchenfunktionswerte .....	12
2.3	Definition der kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Endpunkte.....	12
2.4	Statistische Auswertung epidemiologischer und klinischer Daten in Zusammenschau mit Thrombozytenfunktion und Immunsuppression.....	13
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse.....</u></b>	<b>15</b>
3.1	<b>Demografie .....</b>	<b>15</b>
3.1.1	Alter.....	15
3.1.2	Geschlecht.....	15
3.1.3	Beobachtungsdauer.....	16
3.1.4	Grunderkrankung .....	16
3.1.5	Dialysedauer .....	18
3.1.6	Komorbidität .....	18
3.1.7	Nierenfunktion .....	21
3.1.8	Diabetes mellitus.....	22
3.2	<b>Kardiovaskuläre Ereignisse .....</b>	<b>22</b>
3.2.1	Häufigkeiten kardiovaskulärer Ereignisse .....	22
3.2.2	Zeitlicher Zusammenhang mit Plättchenfunktionsmessung .....	23
3.2.3	Verteilung der Ereignisse auf Untergruppen.....	24
3.3	<b>Thrombozytenfunktion .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Analyse der Funktionswerte.....	25
3.3.2	Findung von Cut-Off-Werten .....	30
3.3.3	Receiver-Operating-Characteristics-Analyse.....	37
3.4	<b>Unterschiede zwischen Ereignispatienten und Nicht-Ereignispatienten</b> <b>39</b>	
3.4.1	Epidemiologie von Ereignis- und Nicht-Ereignispatienten .....	39
3.4.2	Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf Ereigniseintritt.....	40
<b>4</b>	<b><u>Diskussion.....</u></b>	<b>42</b>
4.1	<b>Epidemiologische Daten und Besonderheiten .....</b>	<b>43</b>

<b>4.2</b>	<b>Weitere Komorbiditäten und bekannte Risikofaktoren .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Diabetes Mellitus.....	44
4.2.2	Calcineurin-Inhibitoren.....	45
4.2.3	Alter zum Zeitpunkt der Transplantation .....	45
<b>4.3</b>	<b>Plättchenfunktion und kardiovaskuläre Ereignisse .....</b>	<b>46</b>
4.3.1	CD62.....	46
4.3.2	PAC-1 .....	49
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung.....</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b>6</b>	<b><u>Abstract .....</u></b>	<b><u>53</u></b>
<b>7</b>	<b><u>Abbildungsverzeichnis.....</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b>8</b>	<b><u>Tabellenverzeichnis.....</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b>9</b>	<b><u>Anhang.....</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b>10</b>	<b><u>Literaturverzeichnis.....</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b>11</b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis.....</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b>12</b>	<b><u>Danksagung .....</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b>13</b>	<b><u>Ehrenwörtliche Erklärung .....</u></b>	<b><u>72</u></b>

# **1 Einleitung**

Immunsuppressiva sind in der Transplantationsmedizin eine essentielle Voraussetzung für allogene Organtransplantationen. In der Nierentransplantation sind hier vor allem Tacrolimus (FK506), Sirolimus (SLR, auch als Rapamycin (RAPA) bekannt), Azathioprin (AZA), Ciclosporin A (CsA) und Mycophenolatmofetil (MMF) in Gebrauch [1, 2]. Für die genannten Substanzen ist eine erhöhte Plättchenaktivierung beschrieben worden [1, 3]. Dies könnte zu erhöhten Raten kardiovaskulärer Ereignisse führen. Diese sind bei Nierentransplantierten Patienten ohnehin deutlich erhöht [4-7]. Dafür wird ein multifaktorielles Erklärungsmodell angenommen. Es liegt nahe die Aktivierung von Thrombozyten als einen Ko-Faktor zu postulieren.

Als Parameter der Aktivierung dient einerseits die Expression von P-Selektin (CD62), einem thrombozytären Adhäsionsrezeptor der  $\alpha$ -Granula Membran [8, 9]. Dort kommt es zu einer Verbindung mit Leukozyten über deren PSGL-1-Rezeptor. Er wird erst nach Aktivierung vermehrt exprimiert und an die Oberfläche transportiert, auf nicht aktivierten Plättchen findet sich kaum CD62. Es resultieren Plättchen-Leukozyten-Aggregate(PLA), die wiederum eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose sowie bei akuten thromboembolischen Ereignissen spielen sollen [10-12].

Andererseits ist die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf den Thrombozyten als Aktivierungsmarker angesehen [13]. Nach Aktivierung des Rezeptors und dadurch verursachter Änderung der Konformation kommt es zu einer Vernetzung mit Fibrinogen und weiteren Thrombozyten [14]. Diese Konformationsänderung kann mit dem monoklonalen Antikörpern PAC-1 nachgewiesen werden.

Am Institut für klinische Pharmakologie der Universität Frankfurt wurden mehrere Studien mit Nierentransplantierten Patienten durchgeführt, bei denen eine durchflusszytometrische Bestimmung der Plättchenaktivierung

gemessen wurde. Die Patienten waren alle mit einer Monotherapie plus Kortison immunsupprimiert. Dabei zeigte sich eine unterschiedlich starke, jedoch für alle Substanzen nachweisbare Thrombozytenaktivierung [1, 15]. Sämtliche Studien wurden von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität beraten. Alle Patienten werden klinisch im Kuratorium für Hemodialyse (KfH) in Frankfurt am Main betreut. Dieses steht in enger klinischer und wissenschaftlicher Kooperation mit der Universitätsklinik Frankfurt am Main.

Im Jahre 2000 wurde die NTX-Studie [1] durchgeführt. Dabei wurden je 13 – 17 Patienten, die mit Prednisolon und Monotherapie MMF, AZA, CSA oder FK506 behandelt wurden, mit 11 Hypertonie-Patienten ohne Immunsuppression sowie einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Gemessen wurden die Anzahl der CD62-positiven Plättchen, die Expression von PAC-1, sowie Plättchenaggregation und die Menge an Plättchen-Wachstumsfaktoren PDGF A/B. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression von CD62 für alle Immunsuppressiva gegenüber den Hypertonikern bzw. der gesunden Kontrollgruppe. PAC-1-Expression war bei AZA, CSA und MMF gegenüber Hypertonikern und gesunden Probanden erhöht. Für FK506 wurde jedoch keine erhöhte PAC-1-Expression gegenüber Hypertonikern gemessen.

Daraufhin fand 2002 die PLANT-Studie statt [15, 16]. PLANT steht für „**PL**ättchenfunktion unter **A**ggregationshemmern bei **N**ieren**T**ransplantierten Patienten“. Es wurden 4 Gruppen zu je 19-20 Patienten gebildet. Eine Gruppe war auf CSA und Prednisolon eingestellt, eine weitere auf FK506 und Prednisolon. Noch zwei weitere Gruppen nahmen zusätzlich ASS zu entweder FK506 und Prednisolon oder CSA und Prednisolon. Es wurden die Thrombozytenaktivitätsmarker CD62, PAC-1 und weitere wie Plättchen-Leukozyten-Aggregate gemessen. Danach nahmen alle Patienten 4 Wochen lang Clopidogrel ein, ASS wurde abgesetzt. Clopidogrel hemmt jede ADP -vermittelte Plättchenaggregation über eine irreversible Hemmung des P2Y-Rezeptors [17]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Plättchenaktivierung beeinflussbar ist und durch Einnahme von Clopidogrel deutlich gesenkt werden konnte. Dies traf sowohl für CD62, PAC-1 als auch PLAs zu. Der

Effekt war bei den Gruppen die CSA einnahmen deutlich stärker als bei den Gruppen unter FK506-Therapie, was mit einer allgemein stärkeren Plättchenaktivierung durch CSA erklärt wird.

Die dritte Studie, die so genannte RAPA-Studie, wurde dann 2004 durchgeführt. Dabei wurden wiederum nierentransplantierte Patienten unter Prednisolon plus Monotherapie AZA oder MMF auf RAPA umgestellt und mit 2 Gruppen verglichen, bei denen keine Umstellung erfolgte. Wiederum wurden unter anderen CD62 und PAC-1 gemessen. Dabei zeigen die noch nicht veröffentlichten Daten eine CD62-Aktivitätsminderung nach Umstellung auf RAPA für AZA, dies galt aber nicht für MMF.

Es liegen für insgesamt 176 Patienten Plättchenfunktionswerte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vor. Ferner liegen alle relevanten klinischen Daten zur Patientengeschichte seit Transplantation bis heute vor.

## **1.1 Fragestellung:**

In einem ersten Schritt soll in einem retrospektiven Ansatz untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen erhöhter Plättchenaktivität und thromboembolischen Ereignissen gibt, d.h. welchen prädiktiven Wert insbesondere Oberflächen-gebundenes CD62 und PAC-1 für kardiovaskuläre Ereignisse haben. Dazu wurden die klinischen Daten ab Einschluss in eine der durchgeführten Studien bis Anfang 2007 erfasst und mit den Plättchenaktivierungsparametern verglichen.

In einem weiteren Schritt soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der jeweiligen Immunsuppression und thromboembolischen Ereignissen gibt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Datenerhebung, Patientengut**

Es wurden klinische und laborchemische Verlaufsparemeter der Studienteilnehmer der Studien NTX, PLANT und RAPA aus den im KfH geführten Krankenakten erhoben. Diese umfassten folgenden Punkte:

Geburtsdatum, Geschlecht, Größe, nephrologische Grunderkrankung, Dialysebeginn, Dialysedauer, Transplantationsdatum, kardiovaskuläre Ereignisse vor der Transplantation, kardiovaskuläre Risikofaktoren vor der Transplantation, insbesondere Raucherstatus, Dyslipidämien, Hypertonie, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz.

Weiter wurde das Einschussdatum in die Studie, welches in der Regel das Datum der Plättchenfunktionsmessung war, als Indexdatum notiert. Davon ausgehend wurden folgende Daten von 6 Monaten davor bis zur Gegenwart (Tag der Datenerhebung) in 6-Monatsintervallen erhoben:

Kreatinin im Serum, Harnstoff im Serum, Albumin, Cholesterin, Triglyceride, Blutdruck (soweit vorhanden Durchschnittswerte aus 24-Stunden Blutdruckprofilen, ansonsten Einzelmesswerte aus der KfH-Ambulanz), HDL, LDL, Homocystein und Fibrinogen. Daraus wurden der Bodymaßindex (BMI) sowie die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) errechnet. In die statistische Auswertung ging die Berechnung nach der vereinfachten MDRD-Formel [18] ein, die inzwischen die Methode nach Cockroft und Gault als Standardmethode zur Abschätzung der GFR aus Serumkreatininwerten insbesondere bei verschlechterter Nierenfunktion ablöst [19].

Die Immunsuppression wurde in diesem Zeitraum Datumsgenau mit Dosierung und Blutspiegel für MMF, RAPA, CSA und FK506 erfasst. Für AZA können keine Blutspiegel direkt gemessen werden. Azathioprin ist ein Pro-Drug, welches im Blut sofort zu 6-Mercaptopurin (6-MP) als Wirkstoff und in weiteren Schritten zu 6-Thioguanin-Nukleotiden (6-TGN) umgewandelt wird, 6-TGN sind für die myelosuppressiven Nebeneffekte verantwortlich. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften wird meist ein Blutbild zur Kontrolle der Leukozyten angefertigt [20]. 6-MP kann von Thiopurin-Methyltransferase zu 6-Methylmercaptapurin inaktiviert werden, daraus können keine weiteren 6-

TGN entstehen. Die Messung von 6-TGN in Erythrozyten und TPMT-Aktivität wird zum Drug-Monitoring diskutiert, hat sich aber noch nicht etabliert [21, 22].

Des Weiteren wurden die Antihypertonika sowie deren Anzahl in 6-Monatsintervallen erfasst, Plättchenaggregationshemmer, andere Antikoagulanzen, ferner Lipidsenker. Die restliche Begleitmedikation wurde nicht im zeitlichen Verlauf erfasst.

Es wurden folgende klinischen Daten und Ereignisse mit Datum erfasst: Tod, AMI, Instabile AP, KHK, PTCA, Koronar-Bypass, Lungenembolie, DVT, Apoplex, TIA/PRIND, PAVK, DM, Hypertension (wenn neu aufgetreten nach Transplantation), Dyslipidämie, Demenz, Neoplasien, hier mit Unterscheidung von Hauttumoren und sonstigen Tumoren, Sepsis, Abstoßung, Transplantat-Versagen. Hauttumore sind die häufigsten Neoplasien nach einer Nierentransplantation [23], die Inzidenz in 20 Jahren post Transplantation liegt bei bis zu 61% in Großbritannien bzw. 82% in Australien.

Aus den Daten der Studien NTX, PLANT und RAPA wurden die jeweils gemessenen durchflusszytometrischen Funktionswerte erhoben. Dies waren für die NTX Studie der Prozentsatz der CD62-positiven Thrombozyten vor Aktivierung (CD62%-baseline) durch den Thrombozytenagonist „Thrombin receptor activating peptide“ (TRAP) und danach (CD62%-TRAP); die mittlere Fluoreszenzintensität der CD62 markierten Thrombozyten vor Aktivierung (CD62MFI-baseline) und danach (CD62MFI-TRAP), sowie die mittlere Fluoreszenzintensität der PAC-1 markierten Thrombozyten vor und nach Aktivierung durch TRAP (PAC-baseline und PAC-MFI).

In der PLANT-Studie sowie in der RAPA-Studie wurden neben diesen Werten noch jeweils eine Aktivierung mit Adenosindiphosphat (ADP) durchgeführt. Aus der PLANT-Studie wurden jeweils die Werte aus der ersten Visite, also vor Clopidogrel-Gabe, erfasst.

## 2.2 Vergleich der Plättchenfunktionswerte

Die Durchflusszytometer müssen regelmäßig neu kalibriert werden, die Fluoreszenzintensitätswerte sind relativ zu einer Referenzprobe. Die zugesetzten Test-Reagenzien können sich unterscheiden, insbesondere wenn sie von verschiedenen Herstellern kommen. Für die durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen gibt es daher noch keine internationalen Standards, welche also die Messergebnisse der drei Studien NTX, PLANT und RAPA direkt untereinander Vergleichbar machen würden [24, 25].

Bei jeder dieser Studien wurde eine gesunde Kontrollgruppe untersucht. Diese wiederum waren untereinander in Bezug auf Alter und Geschlechterverteilung vergleichbar. Daher wurden die Plättchenfunktionswerte der Patienten aus den Studien in Relation zu den Mittelwerten der jeweiligen gesunden Kontrolle gesetzt und daraus folgender Quotient gebildet, der also die Aktivierung im Vergleich zu dieser Norm darstellt:

$$\frac{\text{Messwert}_{\text{Patient}}}{\text{Mittelwert}_{\text{Gesunde\_Kontrolle}}}$$

Dadurch wird einerseits direkt sichtbar, welche Messwerte tatsächlich als erhöht anzusehen sind, nämlich alle Werte > 1, andererseits sind diese so normierten „relativen Plättchenfunktionswerte“ auch zwischen den Studien wieder vergleichbar.

## 2.3 Definition der kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Endpunkte

Die Kardiovaskulären Endpunkte wurden unter zwei Gesichtspunkten betrachtet: Einerseits die akuten thromboembolischen Ereignisse akuter Myokardinfarkt, Lungenarterienembolie, Schlaganfall, auch die tiefe Beinvenenthrombose. Ferner die instabile Angina Pectoris, transitorische ischämische Attacken.

Die nicht akuten kardiovaskulären Ereignisse umfassten eine neu aufgetretene periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK) oder deren Verschlimmerung, die erstmalige Diagnose einer koronaren Herzkrankheit

oder deren Verschlimmerung, elektive perkutane transarterielle Angioplastien (PTCA), elektive koronare Bypassoperationen.

Es wurden dabei alle akuten und nicht akuten kardiovaskulären Ereignisse des Patienten erfasst, auch diejenigen vor Studieneinschluss oder vor Transplantation. Es wurden die Immunsuppressiva zum Zeitpunkt des Ereignisses dokumentiert.

Die nicht kardiovaskulären Endpunkte umfassten Malignome, Abstoßungsreaktionen, Transplantatverluste, Sepsis, neu aufgetretener Diabetes mellitus, neu aufgetretene Dyslipidämien, neu aufgetretener Hypertonus.

Der Tod wurde im jeweiligen Zusammenhang erfasst.

## **2.4 Statistische Auswertung epidemiologischer und klinischer Daten in Zusammenschau mit Thrombozytenfunktion und Immunsuppression**

Demografische Daten wurden deskriptiv mit Mittelwerten beschrieben, mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und danach mit dem T-Test oder gegebenenfalls mit nicht-parametrischen Tests (Mann-Whitney-U) verglichen.

Es wurden die Mittelwerte der relativen Plättchenfunktionswerte für Patienten mit und ohne Ereignis berechnet. Zur weiteren Auswertung wurden diejenigen Funktionswerte besonders untersucht, die im Mittel am weitesten gegenüber den Kontrollgruppen erhöht waren.

Es wurden die Mittelwerte der Plättchenfunktionswerte für Patienten mit bzw. ohne Ereignisse mit Mann-Whitney-U-Test auf Gleichheit getestet und mit einer Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) nach Grenzwerten gesucht.

Es wurde eine Time-to-event-Analyse nach Kaplan-Meier für verschiedene Plättchenwerte angefertigt.

Kreuztabellen zur Beurteilung der Unabhängigkeit der Ereignisse von einem relativen Plättchenwert wurden erstellt und mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. dem exakten Test nach Fisher überprüft. Für die Prüfung der Unabhängigkeit des Eintritts eines Ereignisses von der Immunsuppression wurden ebenfalls Kreuztabellen mit denselben Tests erstellt.

Die Datenerfassung erfolgte mit Microsoft Excel, die Auswertungen im Wesentlichen mit SPSS, Version 17 für Macintosh.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Demografie**

#### **3.1.1 Alter**

Das Durchschnittsalter aller 176 Patienten lag bei Beobachtungsbeginn (Studieneintritt in NTX, PLANT oder RAPA) bei 52,25 Jahren (95%-Konfidenzintervall 50,4-54,1 Jahre). Bei den Patienten von NTX und PLANT war der Mittelwert 49,7 respektive 50,5 Jahre, bei den Teilnehmern von RAPA hingegen 59,2 (95%CI 56,4-61,9) Jahre. Der Unterschied zwischen NTX und PLANT war nicht signifikant, der Unterschied zu RAPA war jeweils signifikant auf einem Niveau von  $p < 0,00005$ .

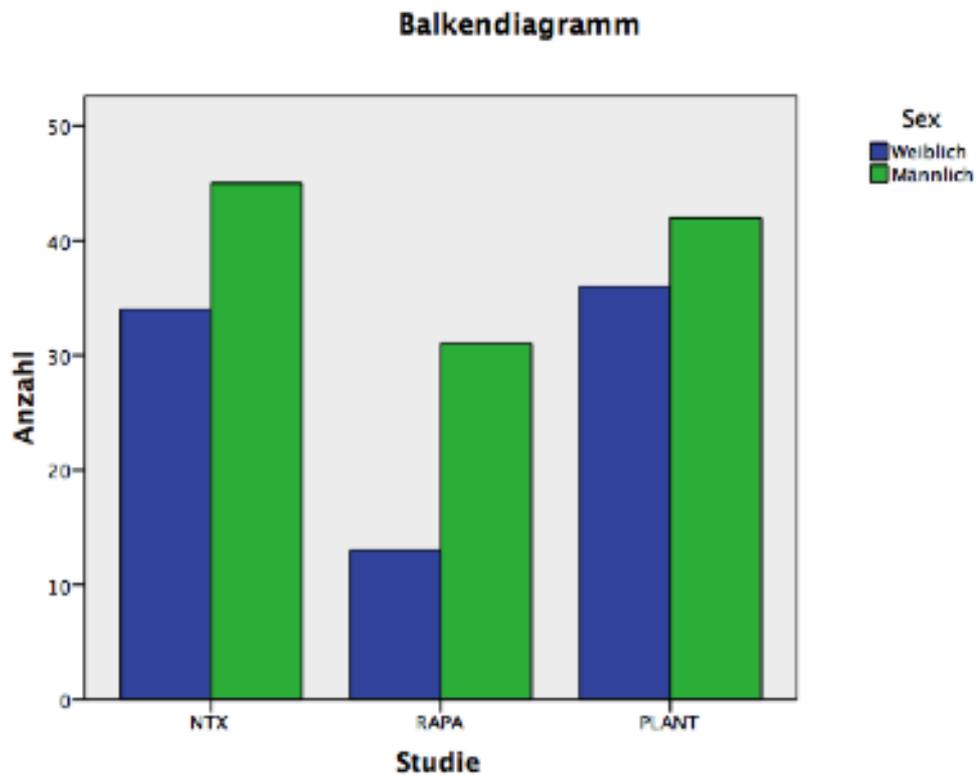
Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation war im Mittel 41,95 Jahre (95%CI 40,1-43,8). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studien.

Die Transplantate waren im Mittel seit 10,3 Jahren verpflanzt (95%CI 9,3-10,4). Analog zum Eintrittsalter waren lagen die Mittelwerte für NTX, PLANT und RAPA bei 8, 7,6 respektive 17,9 Jahren, die Unterschiede zwischen RAPA und NTX/PLANT waren ebenfalls hochsignifikant mit einem  $p < 0,00005$ .

#### **3.1.2 Geschlecht**

102 Patienten (58%) waren männlich, 74 (42%) weiblich. In NTX war das Verhältnis männlich : weiblich 45 : 34; bei RAPA 31:13 und bei PLANT 42:36.

Abb. 1 - Geschlecht



### 3.1.3 Beobachtungsdauer

Die mittlere Beobachtungszeit lag bei 3,7 Jahren. Für NTX waren dies 4,8 Jahre, für PLANT und RAPA 3,4 resp. 1,8 Jahre.

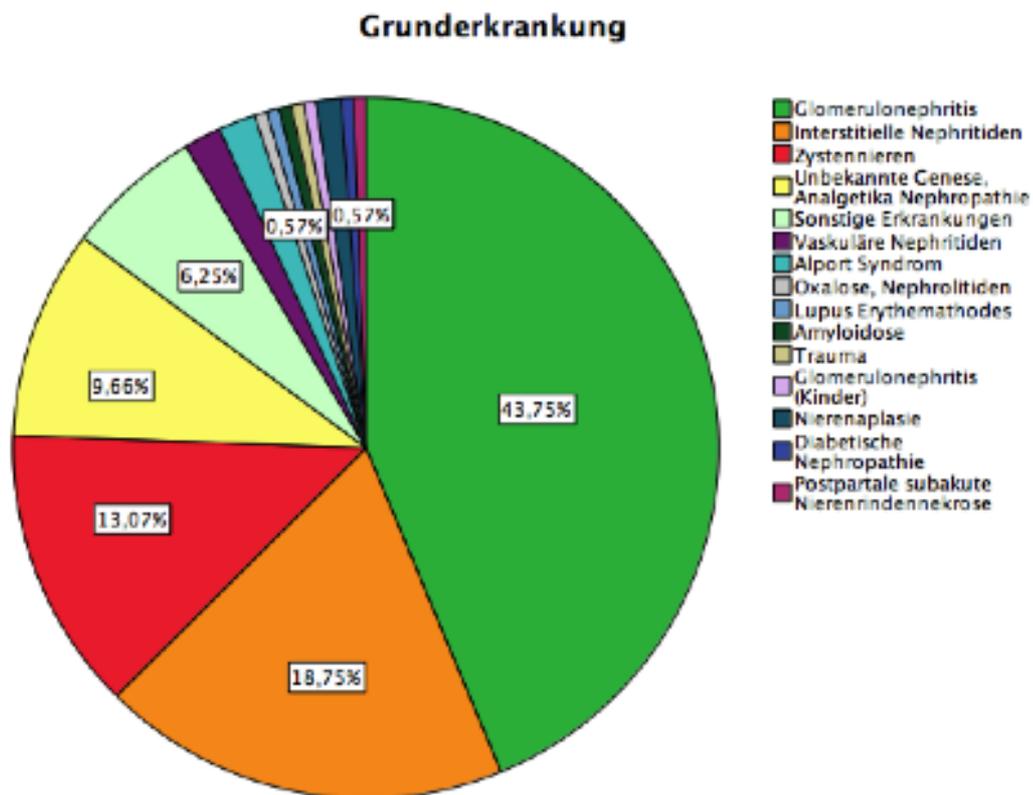
### 3.1.4 Grunderkrankung

Glomerulonephritiden und interstitielle Nephritiden waren bei 62,5% der untersuchten Patienten die nephrologische Grunderkrankung. Ferner waren Zystennieren und unbekannte Erkrankungen mit 13,1 resp. 9,7 % noch häufig, so dass diese vier Entitäten 85 % der Grunderkrankungen ausmachten. Kollagenosen, Amyloidosen, Diabetes oder Trauma waren seltene Ursachen.

Tab. 1 - Grunderkrankung

<b>Grunderkrankung</b>	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozent</b>
Glomerulonephritis	77	43,750
Interstitielle Nephritiden	33	18,750
Zystennieren	23	13,068
Unbekannte Genese, Analgetika Nephropathie	17	9,659
Sonstige Erkrankungen	11	6,250
Vaskuläre Nephritiden	3	1,705
Alport Syndrom	3	1,705
Nierenaplasie	2	1,136
Diabetische Nephropathie	1	0,568
Oxalose, Nephrolitiden	1	0,568
Lupus Erythemathodes	1	0,568
Amyloidose	1	0,568
Trauma	1	0,568
Glomerulonephritis (Kinder)	1	0,568
Postpartale subakute Nierenrindennekrose	1	0,568

Abb. 2 - Grunderkrankung



### 3.1.5 Dialysedauer

Die Patienten der PLANT-Studie wiesen eine deutlich längere Dialysezeit auf als die anderen Patientengruppen. Diese lag im Schnitt bei 5,08 Jahren vs. 3,71 bei RAPA bzw. 3,58 bei NTX. Diese Mittelwerte waren nicht normverteilt und wurden mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Die Mittelwerte waren signifikant unterschiedlich,  $p = 0,001$  (NTX vs. PLANT) bzw.  $p = 0,02$  (RAPA vs. PLANT).

### 3.1.6 Komorbidität

Arterielle Hypertonie ist die häufigste Komorbidität des beobachteten Kollektivs. Vor der Transplantation war dies bei 89,8% bzw. 158 Patienten der Fall. Zum Beobachtungsbeginn war der Blutdruck jedoch meist recht gut eingestellt. 9,8% waren nach den Kriterien der European Society of Cardiology [26] „optimal“ eingestellt, 64,4% normal oder hochnormal. Immerhin 24,7% waren hyperten Grad I, 1,1 % resp. 2 Patienten sogar Grad

II. 6 Patienten nahmen zu diesem Zeitpunkt keine Antihypertensiva ein, 15% ein Antihypertonikum jew. rund 30 % 2 bzw. 3 Medikamente. 21,5% waren auf mindestens 4 Antihypertensiva eingestellt.

Patienten mit Calcineurin-Inhibitoren (CNI) nahmen im Schnitt 2,7 verschiedene Substanzklassen ein, die Patienten die unter anderen Immunsuppressiva standen 2,33. Dieser unterschied war gering aber auf einem Niveau von  $p < 0,05$  signifikant. Der Blutdruck zum Beobachtungsbeginn lag bei den CNI-Patienten systolisch bei 133, diastolisch bei 80 mmHg, bei den anderen Patienten bei 131 resp. 79 mmHg. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Tab. 2 - Antihypertensiva

### Anzahl der Antihypertensiva bei Beobachtungsbeginn

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	6	3,4	3,4	3,4
	1	28	15,9	15,9	19,3
	2	53	30,1	30,1	49,4
	3	51	29,0	29,0	78,4
	4	28	15,9	15,9	94,3
	5	8	4,5	4,5	98,9
	6	2	1,1	1,1	100,0
	Gesamt	176	100,0	100,0	

Vor der Transplantation war bei 12 Patienten (6,8%) eine kardiovaskuläre Erkrankung aufgetreten. Bis zum Beobachtungsbeginn erlitten 37 Patienten (21,0%) mindestens ein kardiovaskuläres Ereignis. 25 Patienten (14,2%) hatten eine KHK, darunter waren 18 akute Myokardinfarkte (AMI) und 6 mal instabile Angina pectoris (AP). Es gab 18 Patienten mit Zustand nach perkutaner transluminaler Coronar-Angioplastie (PTCA), 6 hatten sich einer Bypass-Operation unterzogen. Ferner gab es im untersuchten Kollektiv bis zu

Beobachtungsbeginn 9 tiefe Beinvenenthrombosen (TVT), dabei eine Lungenembolie, fünf Schlaganfälle bzw. TIA/PRIND und bei fünf Patienten war bis dahin eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK) diagnostiziert worden.

Tab. 3 - Vorerkrankungen

<b>Vorerkrankungen der Patienten (n<sub>ges</sub> = 176)</b>		
	n	%
Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen vor Beobachtung	37	21,0
KHK	25	14,2
davon	12	6,8
- AMI		
- Instabile AP	6	3,4
- PTCA	18	10,2
-Bypass	6	3,4
TVT	9	5,1
dabei	1	0,6
- Lungenembolie		
Schlaganfall	2	1,1
TIA/PRIND	3	1,7
paVK	5	2,8
DM	12	6,8

Unterschiede gab es hier innerhalb der Gruppen. So waren die Patienten der RAPA-Studie signifikant häufiger durch eine KHK vorbelastet. Hierzu wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet, das Signifikanzniveau lag bei  $p = 0,006$ . Es gab dort 11 Patienten mit KHK, erwartet wurden jedoch nur 5,5. (Tab. 13)

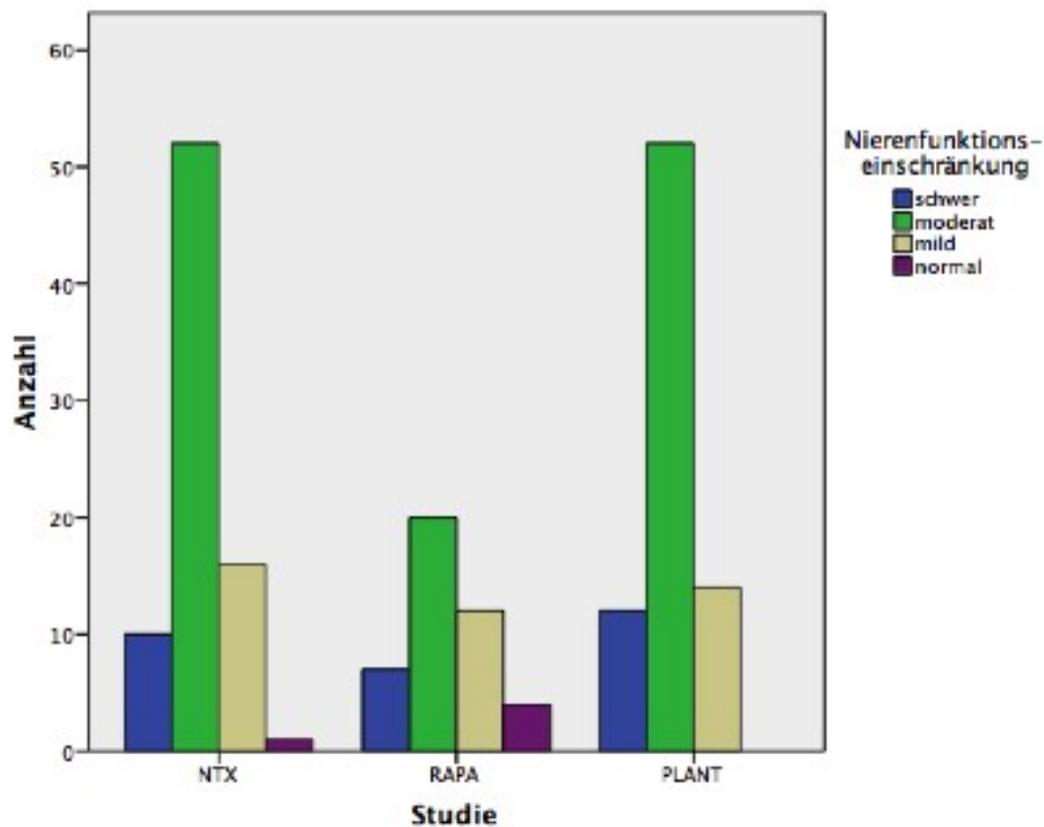
12 Patienten (6,8%) hatten zu Beobachtungsbeginn einen Diabetes mellitus (Typ I und II). 8 Patienten waren vor dem Indexdatum an einem (nicht-dermatologischem) Malignom erkrankt, davon je ein Urothel-, Schilddrüsen-, Kolon- und Nierenzellkarzinom, zwei Prostata-Karzinome, ein Seminom und ein Meningeom.

### **3.1.7 Nierenfunktion**

Die glomeruläre Filtrationsrate, welche nach der vereinfachten MDRD-Formel berechnet wurde, lag im Mittel bei 47,93 ml/min/1,73m<sup>2</sup> Körperoberfläche. (95%-CI 45,35-50,5). Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen den Studien. Für NTX und PLANT liegt der Mittelwert bei 45,5 resp. 47,4 ml/min/KO, für RAPA bei 54,0 ml. Dabei sind die Unterschiede zwischen NTX und PLANT nicht signifikant, zwischen NTX und RAPA bzw PLANT und RAPA jedoch deutlich mit  $p < 0,0012$  resp.  $p < 0,00014$ .

Die chronische Niereninsuffizienz wird nach der Klassifikation der amerikanischen National Kidney Foundation [27] eingeteilt. Für Nierentransplantierte kann sie mit Einschränkungen auch angewandt werden. So zeigt sich für das Kollektiv zum Beobachtungsbeginn für 60,8% eine moderate Funktionseinschränkung, 15,3% hatten eine schwere Funktionseinschränkung. Kein Patient hatte eine GFR <15 ml/min/KO, welche nach den Kriterien der National Kidney Foundation als akutes Nierenversagen einzustufen wäre. Hier zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Studien. So sind bei RAPA relativ mehr Patienten mit normaler Nierenfunktion oder nur milder Funktionseinschränkung, nämlich 37,2 % vs. 18,6% resp. 17,9% bei NTX resp. PLANT. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ist hier zwar signifikant mit  $p < 0,028$ , jedoch haben dabei 3 Zellen eine erwartete Häufigkeit < 5. (Tab. 14)

Abb. 3 - Nierenfunktion



### 3.1.8 Diabetes mellitus

Bereits vor der Transplantation hatten 7 Patienten einen Diabetes mellitus. Bis zu Beobachtungsbeginn kamen weitere 12 Patienten hinzu, während dem Follow-up noch einmal 7. Somit gab es insgesamt 19 Patienten (10,8%) mit einem „Post-Transplantations-Diabetes-Mellitus“ (PTDM).

## 3.2 Kardiovaskuläre Ereignisse

### 3.2.1 Häufigkeiten kardiovaskulärer Ereignisse

Aus den in 2.3 definierten akuten und nicht akuten kardiovaskulären Ereignissen wurden 21 Ereignisse bei 21 Patienten (11,9%) beobachtet. Davon waren 9 akut und 12 nicht akut.

Tab. 4 - Ereignisse

	Ereignis	Anzahl
Akut	Instabile AP	3
	Apoplex/TIA/PRIND	2
	Lungenembolie	2
	TVT (ohne Lungenembolie)	2
Nicht akut	Erstdiagnose paVK	6
	Erstdiagnose KHK	6

In einem Fall einer instabilen AP wurde in einer Notfall-Koronarangiografie keine Stenose festgestellt und auch keine Lysetherapie eingeleitet. Ein Patient mit Apoplex hatte nach damaliger Definition ein PRIND und wurde nicht lysiert. Ein Patient mit Lungenembolie hatte zusätzlich eine tiefe Beinvenenthrombose, er wurde hier nicht doppelt aufgeführt.

Bei den Erstdiagnosen der KHK wurden in 4 Fällen sofort oder innerhalb von 2 Monaten Stents implantiert, ein Patient wurde einer Bypass-OP zugeführt.

### 3.2.2 Zeitlicher Zusammenhang mit Plättchenfunktionsmessung

Die Ereignisse traten im Mittel 637,8 Tage (ca. 1,7 Jahre) nach Messung der Plättchenfunktion ein, das kürzeste Intervall war bei 62 Tagen, das längste 1258 Tage (3,4 Jahre). Die Standardabweichung betrug 383,5.

Tab. 5 - Intervall Plättchenmessung bis Ereignis (d)

	Minimum	62
	Maximum	1258
Mittelwert		637,81
Median		700,00
Standardabweichung		383,478
Perzentile	25	263,50
	50	700,00
	75	946,00

### 3.2.3 Verteilung der Ereignisse auf Untergruppen

Die Ereignisse verteilten sich gleichmäßig auf alle Studien. Es wurden Kreuztabellen erstellt und mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede hin überprüft, die Unterschiede waren nicht signifikant. Der Anteil Patienten mit Ereignissen betrug bei NTX, RAPA und PLANT respektive 13,9%, 11,8% und 9,5%. (Tab. 15)

In dieser Untersuchung ergab sich keine Differenz bezüglich der Immunsuppression. Der Anteil lag für die verschiedenen Immunsuppressionsschemata (MMF, FK506, CSA, RAPA) bei 12,0%- 15,0%, lediglich für die Patienten unter AZA lag der Anteil bei 3,3%. Der Chi-Quadrat-Test war auch dann nicht signifikant, wenn nur zwischen AZA und nicht-AZA unterschieden wurde. Die erwartete Anzahl lag bei 3,6 Ereignissen, beobachtet wurde nur eines. (Tab. 16)

Auch die Unterscheidung zwischen Calcineurin-Inhibitoren und anderen Substanz-Klassen ergab keine weiteren Unterschiede. 13% der Patienten mit Calcineurin-Inhibitoren und 10,4% der übrigen Patienten hatten Ereignisse, diese Differenz war nicht signifikant. (Tab. 18)

Auch die Patienten mit einem PTDM hatten nicht mehr Ereignisse als die erwartete Häufigkeit, der Chi-Quadrat-Test war unauffällig. (Tab. 17). Einschränkend muss gesagt werden dass auch nur 2 Ereignisse bei der PTDM-Gruppe beobachtet wurden bei 2,3 erwarteten Ereignissen.

### 3.3 Thrombozytenfunktion

#### 3.3.1 Analyse der Funktionswerte

Die Thrombozytenfunktionswerte welche bei den Studien NTX, PLANT und RAPA gemessen wurden, wurden normiert auf den Mittelwert der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe. Diese Kontrollgruppen waren in Bezug auf Alter und Geschlecht vergleichbar. So ergab sich für jeden Funktionswert ein relativer Funktionswert. Dieser ist letztlich der Faktor um welchen die Plättchenfunktion gegenüber der Referenzgruppe erhöht ist:

$$\frac{\text{Messwert}_{\text{Patient}}}{\text{Mittelwert}_{\text{Gesunde\_Kontrolle}}}$$

Zuerst wurden aus denen mit dieser Formel bestimmten einzelnen Werten Mittelwerte für die jeweiligen Messgrößen (CD62 % pos., CD62 MFI, PAC MFI, jeweils Baseline und mit TRAP aktiviert) bestimmt, und zwar für sowohl für die Gesamtheit aller Patienten als auch für die Patienten mit und ohne kardiovaskulärem Ereignis nach Beobachtungsbeginn.

Tab. 6 - Plättchenfunktionswerte Übersicht

Relative Plättchenwerte (Mittelwerte)	Alle Patienten			Patienten ohne kardiovaskuläre Ereignisse			Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen		
	Mittelwert	Median	SD	Mittelwert	Median	SD	Mittelwert	Median	SD
CD62 % pos. Baseline	2,736	2,500	1,503	2,729	2,500	1,468	2,818	2,292	1,914
CD62 % pos. TRAP	1,747	1,621	0,830	1,763	1,654	0,825	1,572	1,414	0,887
CD62 MFI Baseline	1,741	1,248	1,279	1,761	1,254	1,277	1,531	1,091	1,335
CD62 MFI TRAP	1,799	1,348	1,414	1,769	1,357	1,360	2,084	1,117	1,892
PAC MFI Baseline	1,913	1,525	1,565	1,929	1,552	1,525	1,762	0,944	1,968
PAC MFI TRAP	1,449	1,197	1,102	1,436	1,197	1,038	1,575	1,163	1,647

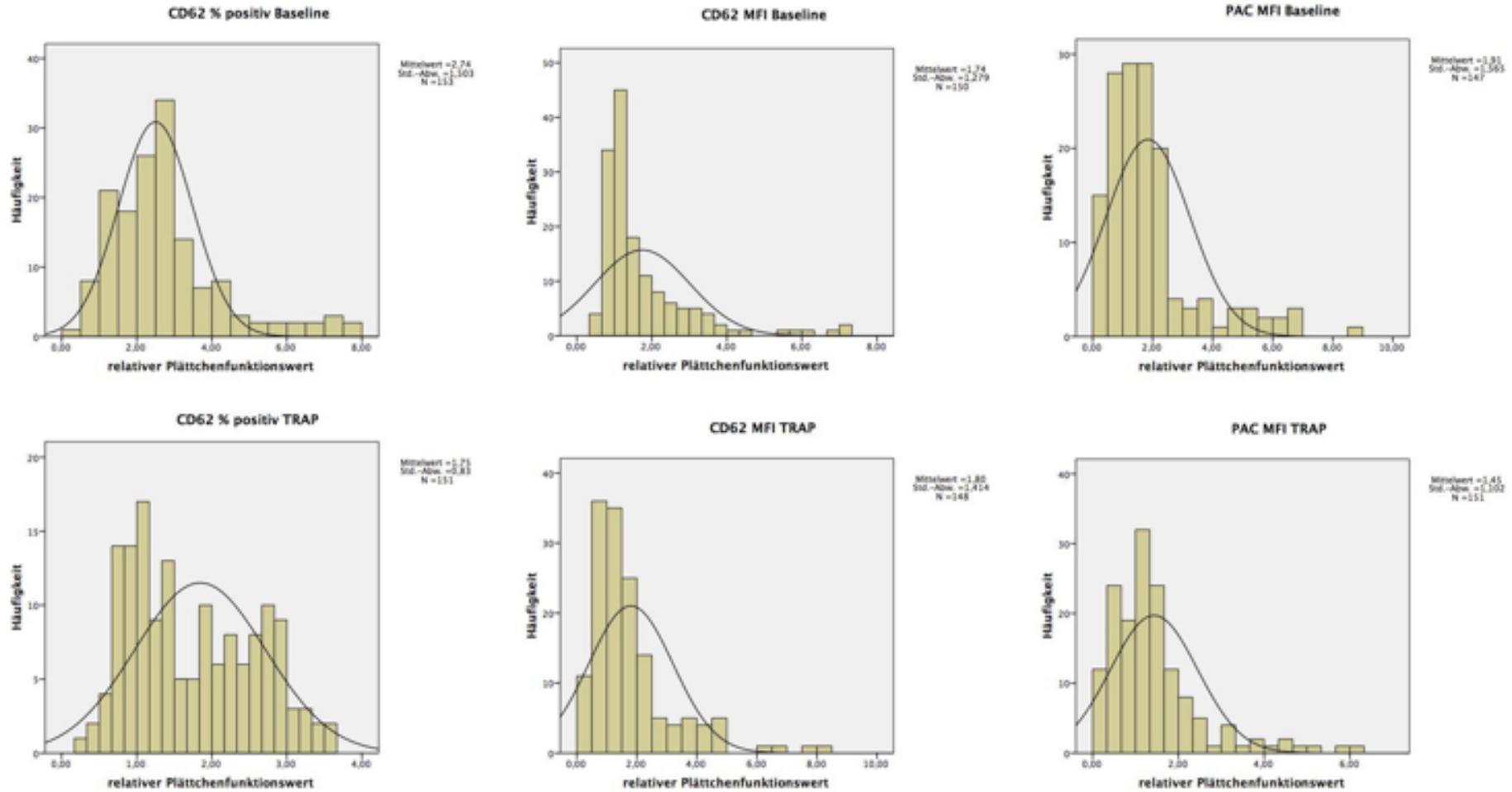
Wie zu erwarten waren die mittleren Funktionswerte gegenüber denen der gesunden Probanden erhöht, und zwar um den Faktor 1,5-2,7. Es zeigte sich hier allerdings nur bei 3 Messgrößen ein höherer Mittelwert bei den Ereignispatienten als bei den Nicht-Ereignispatienten. Dabei handelte es sich um CD62 % pos. sowie die TRAP-aktivierten Messungen für CD62 MFI und PAC MFI. Es wurden alle Messgrößen auf Normalverteilung überprüft, keine entsprach dieser. Die Mittelwerte wurden daraufhin mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen, die Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 7 - Plättchenfunktionswerte, Ereigniseintritt, Mann-Whitney-U Vergleich

	CD62%	CD62%	CD62	CD62	PAC	PAC
	BL	TRAP	MFI	MFI	MFI	MFI
	BL	TRAP	BL	TRAP	BL	TRAP
Mann-Whitney-U	847	743,5	722	937	717	885
Wilcoxon-W	938	834,5	813	9982	822	990
Z	-0,412	-1,018	-1,126	-0,007	-1,412	-0,475
p-Wert (2-seitig)	0,68	0,309	0,26	0,995	0,158	0,635

Zur Visualisierung sollen die folgenden Abbildungen dienen.

Abb. 4 - Histogramme der Plättchenfunktion



Boxplots der normierten Funktionswerte der Patienten mit bzw. ohne Ereignis.

Abb. 5 - Boxplot CD62% pos, Gruppiert n. Ereignis

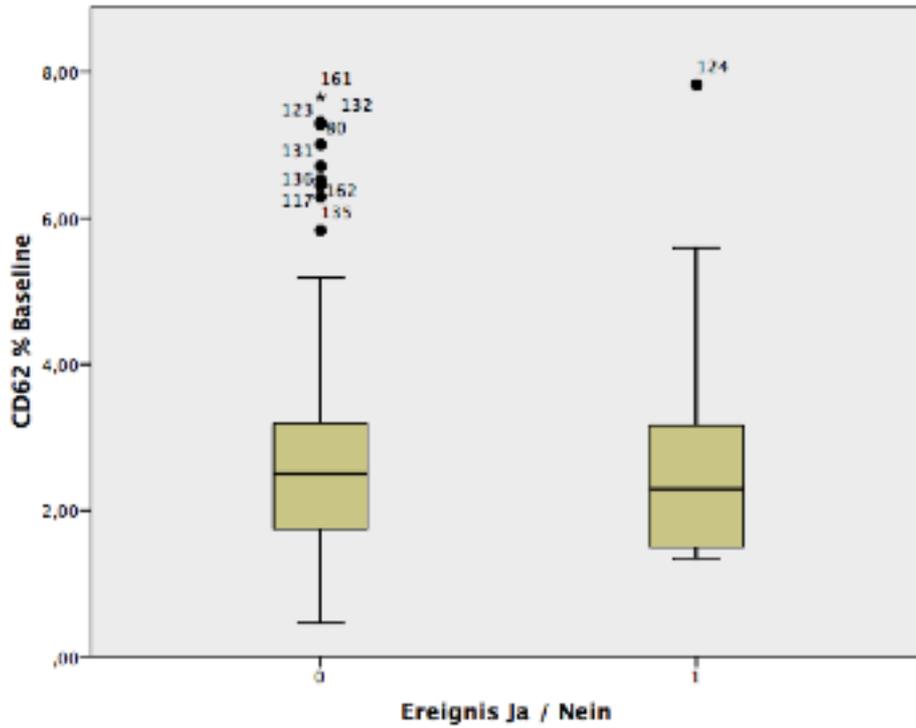


Abb. 6 - Boxplot PAC Baseline, Ereignis

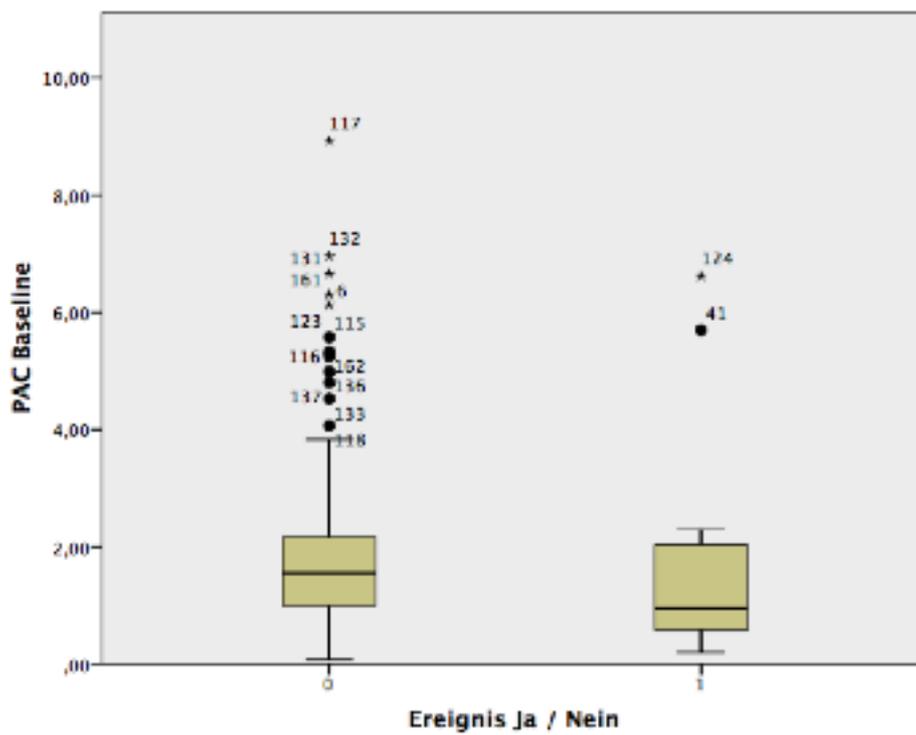
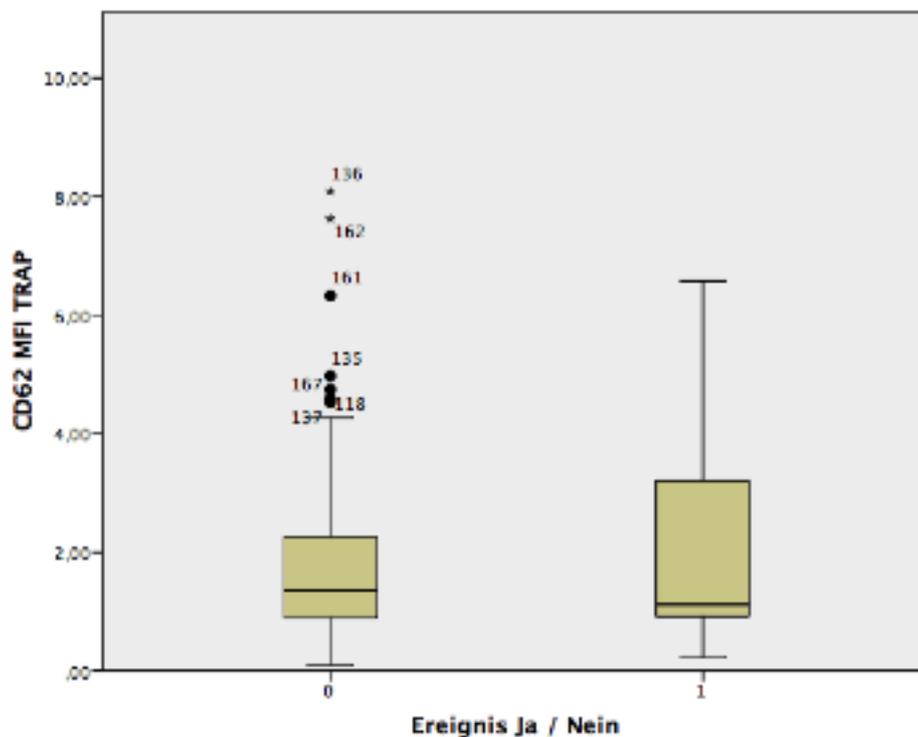


Abb. 7 - Boxplot CD62 MFI TRAP, Ereignis



### 3.3.2 Findung von Cut-Off-Werten

In einem weiteren Schritt wurden die Patienten anhand eines Cut-Off-Wertes der Plättchenfunktion in 2 Gruppen unterteilt. Es wurde untersucht ob unter den Patienten mit einem Funktionswert oberhalb des Cut-Offs mehr Ereignispatienten waren als unter denen unterhalb des Cut-Offs. Die primären Cut-Offs waren die jeweiligen Mittelwerte und Mediane der Plättchenfunktionsparameter. Ferner wurden als weitere Cut-Off-Werte 3 und 5 gewählt, da diese Werte deutlich über den Mittelwerten bzw. Medianen lagen und noch weiter vom gesunden Kollektiv entfernt, als noch pathologischer waren. Die Hypothese wurde jeweils mit einem Chi-Quadrat-Test geprüft. Hierbei gab es keine signifikanten Ergebnisse.

Tab. 8 - Chi-Quadrat-Test Cut-Off-Wert und Ereignis

	CUT OFF = Mittelwert		CUT OFF = Median		CUT OFF = 3		CUT OFF = 5	
	$\chi^2$	p-Wert	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
CD62% BL	0,256	0,613	0,171	0,679	0,013	0,911	0,867	0,352
CD62% TRAP	1,39	0,238	0,802	0,371	0,026	0,871	-	-
CD62 MFI BL	0,451	0,502	0,758	0,384	0,318	0,573	0,505	0,477
CD62 MFI TRAP	0,166	0,684	0,316	0,574	2,295	0,13	1,159	0,282
PAC BL	0,313	0,576	1,451	0,228	0,006	0,94	1,034	0,309
PAC TRAP	0,027	0,869	0,001	0,979	0,461	0,497	2,107	0,147

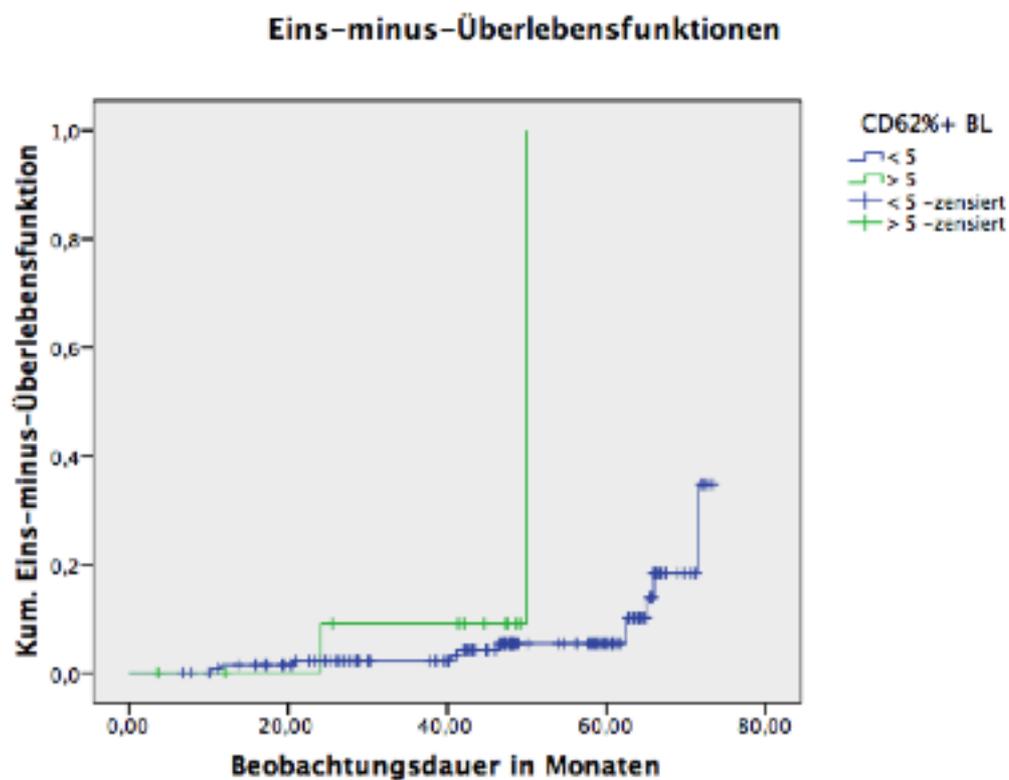
Schließlich wurden noch Time-to-Event-Analysen nach Kaplan-Meier angefertigt. Hier zeigten sich auf einem Signifikanzniveau von jeweils  $p = 0.05$  ein früheres Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen bei zwei Plättchenfunktionswerten.

Tab. 9 - Kaplan-Meier-Analyse

CUT OFF:	Mittelwert		Median		3		5	
	mittl. Time to event < Cut-Off	mittl. Time to event > Cut-Off	mittl. Time to event < Cut-Off	mittl. Time to event > Cut-Off	mittl. Time to event < Cut-Off	mittl. Time to event > Cut-Off	mittl. Time to event < Cut-Off	mittl. Time to event > Cut-Off
	$\chi^2$	p-Wert	$\chi^2$	p-Wert	$\chi^2$	p-Wert	$\chi^2$	p-Wert
CD62 % pos. BL	68,919	68,434	68,372	69,073	69,236	67,858	69,573	47,558
	0,004	0,949	0,036	0,848	0,191	0,662	3,792	0,052
CD62 % pos. TRAP	67,301	70,053	67,326	70,042	69,076	63,61	-	-
	2,251	0,134	2,17	0,141	0,09	0,764	-	-
CD62 MFI BL	68,657	68,062	68,375	68,528	68,812	63,014	69,149	62,324
	0,046	0,83	0,019	0,89	0,076	0,783	0,85	0,357
CD62 MFI TRAP	68,197	68,238	66,734	69,671	69,358	62,038	68,868	47,819
	0,098	0,754	0,647	0,421	3,999	0,046	2,219	0,136
PAC BL	67,91	69,323	62,911	70,822	68,725	63,801	69,05	58,185
	0,467	0,494	3,651	0,056	0,072	0,788	2,013	0,156
PAC TRAP	66,331	70,164	65,345	70,218	69,003	59,737	68,912	62,324
	0,865	0,352	1,16	0,281	1,087	0,297	2,133	0,144

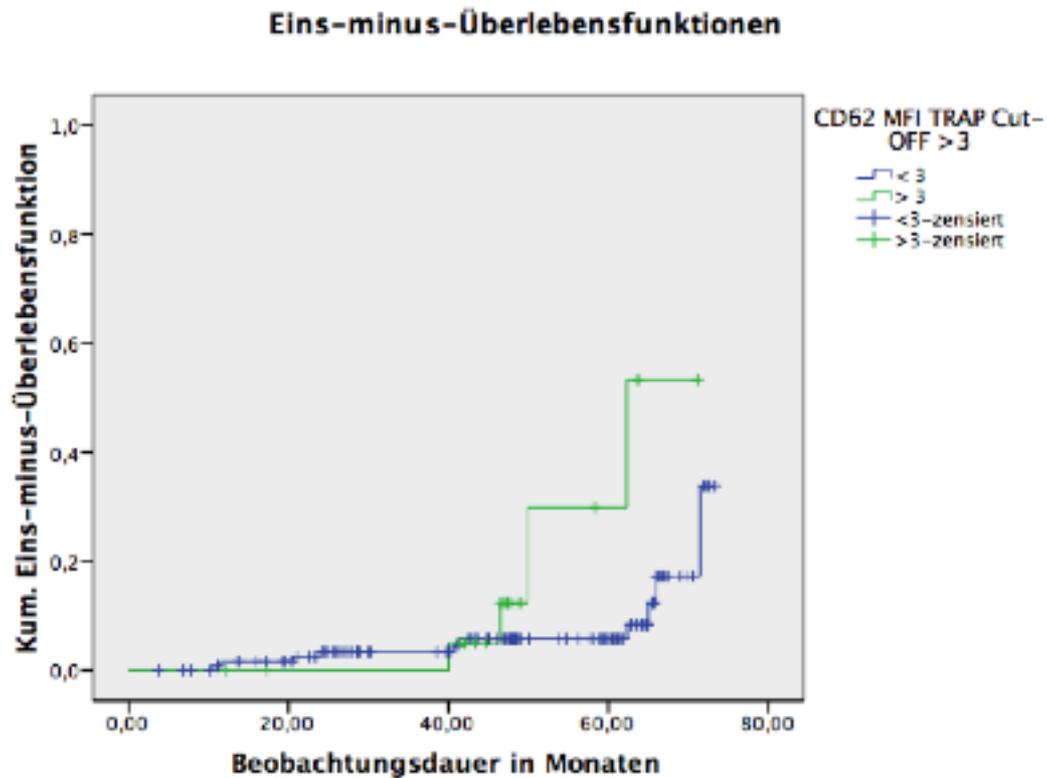
Dies betraf zum einen den relativen Funktionswert von CD62%-pos bei einem Cut-Off-Wert von 5. Bis zum Eintritt eines Ereignisses dauerte es im Mittel 47,6 vs. 69,6 Monate, bei einem  $p = 0,052$  gerade an der Signifikanzschwelle.

Abb. 8 - Kaplan-Meier bei CD62%+, Cut-Off >5



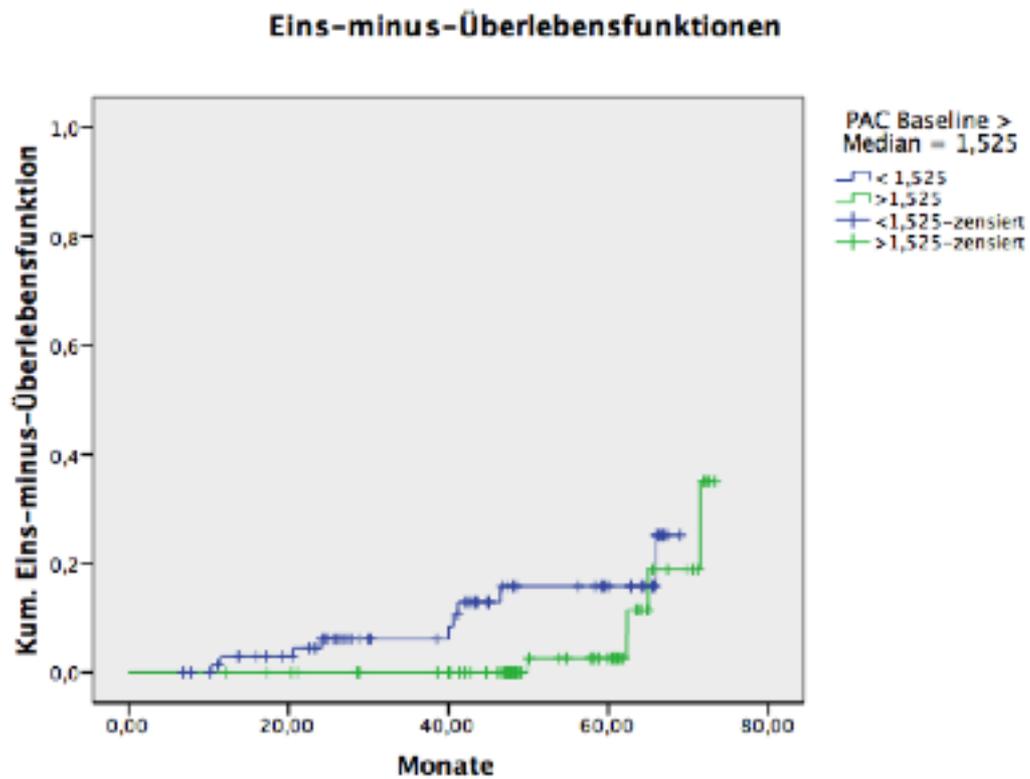
Bei einem Cut-Off von  $> 3$  war bei TRAP-aktivierten CD62-MFI-Werten ein Unterschied bei den Mittelwerten bis zum Eintritt eines Ereignisses von 62,0 vs. 69,4 Monaten zu beobachten. Dies war auf einem Niveau von  $p=0,046$  signifikant.

Abb. 9 - Kaplan-Meier CD62MFI Cut-Off > 3



Bei den relativierten Werten für PAC MFI Baseline gab es eine Auffälligkeit bei einem Cut-Off > dem Median von 1,525. Der Mittelwert bis zum Eintritt eines Ereignisses lag hier für Werte > 1,525 bei 70,8 vs. 62,9 Monaten. Somit schien hier eine Tendenz für einen negativen Zusammenhang zu bestehen.

Abb. 10 - Kaplan-Meier bei PAC Baseline > 1,5 (Median)



Zur Veranschaulichung wurden noch Box-Plots der auffälligen Funktionswerte erstellt:

Boxplots der normierten Plättchenfunktionswerte, Gruppierung nach Cut-Off-Wert und Ereigniseintritt

Abb. 11 – CD62% Baseline, Cut-Off >5

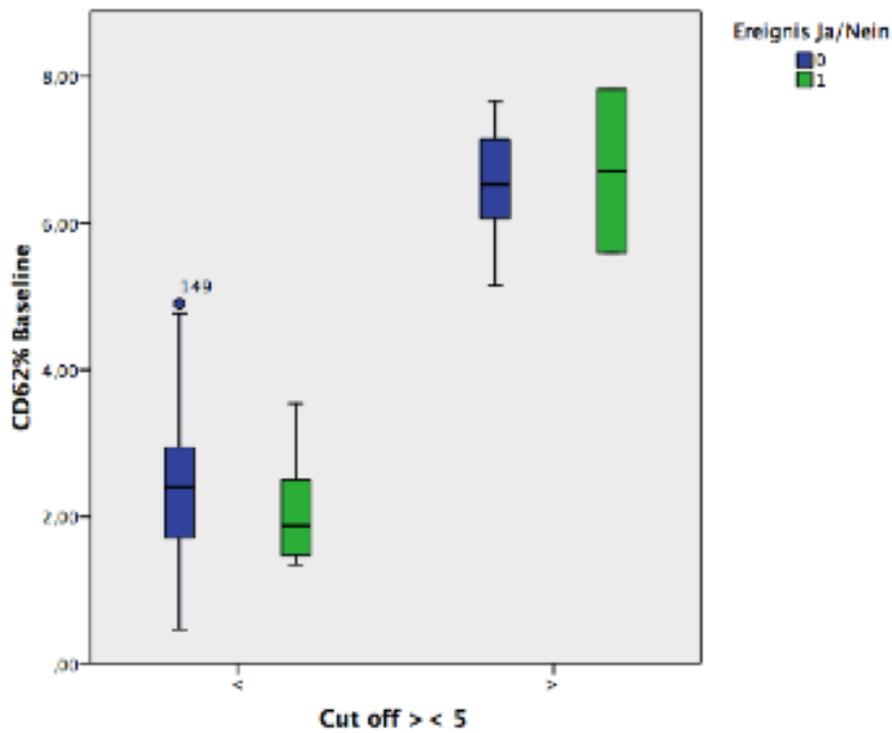


Abb. 12 – PAC MFI Baseline, Cut-Off >1,525

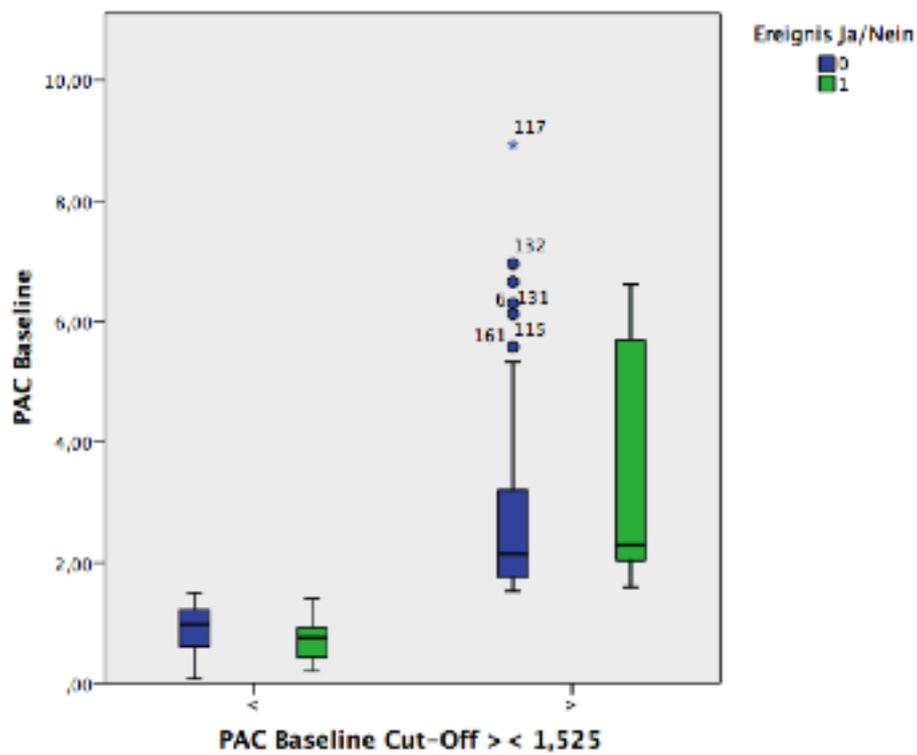
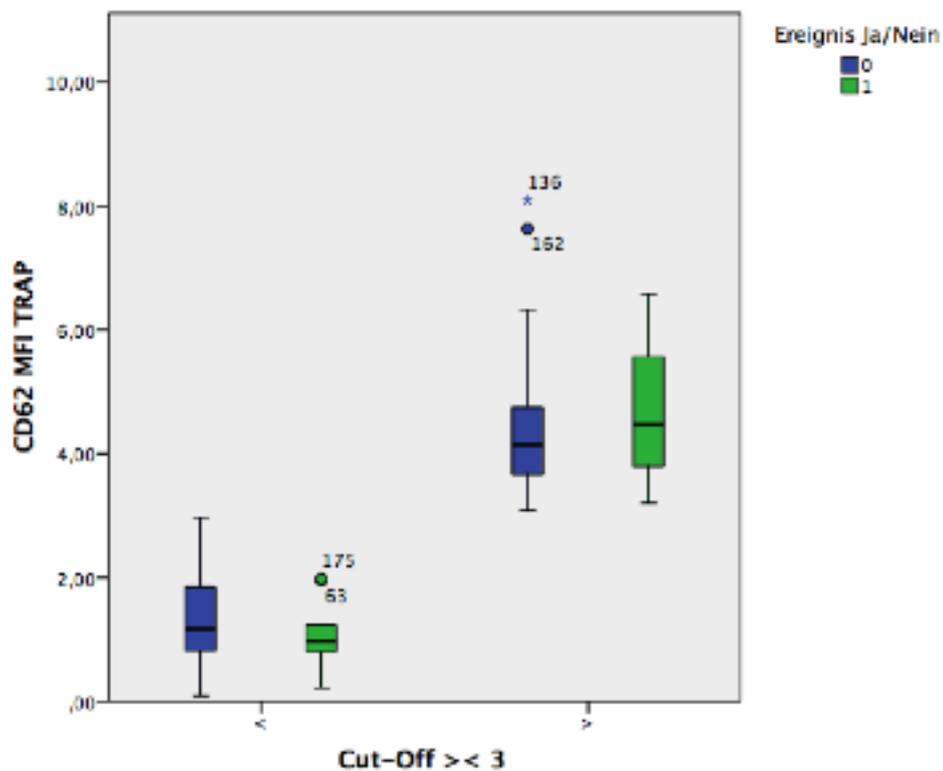


Abb. 13 – CD62 MFI TRAP, Cut-Off > 3



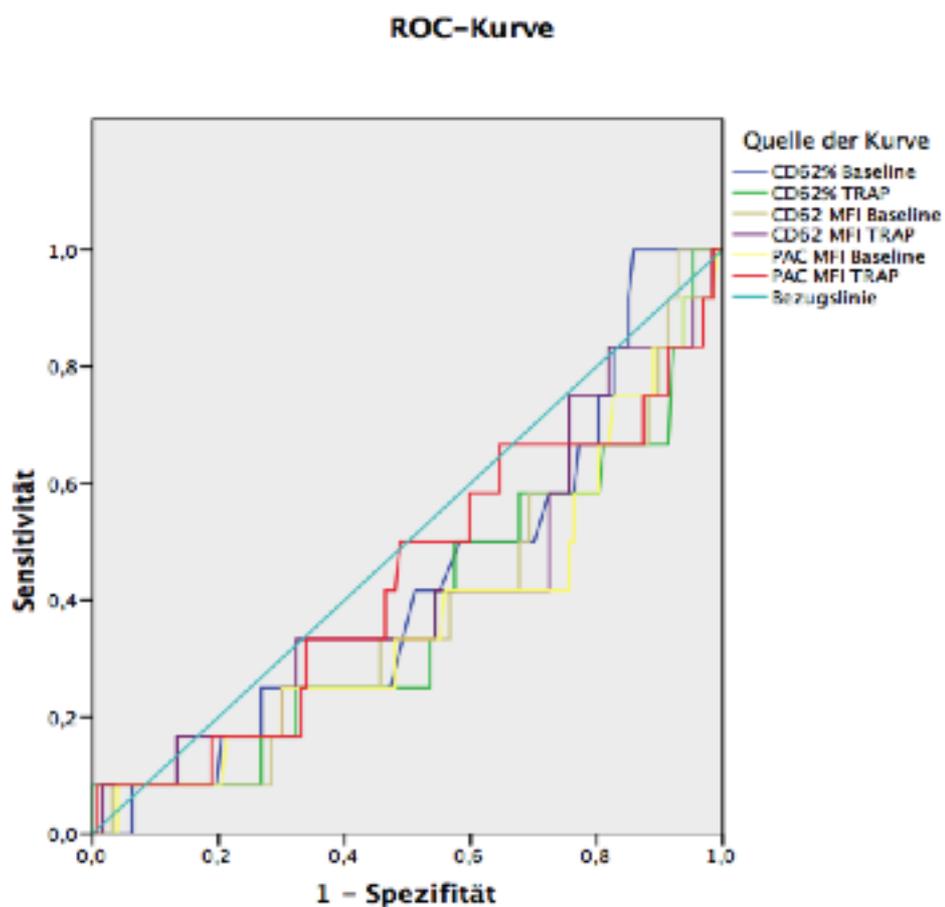
### 3.3.3 Receiver-Operating-Characteristics-Analyse

Zur genaueren Analyse wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Testvariablen waren die normierten Funktionswerte, die Zustandsvariable der erfolgte Eintritt eines Ereignisses. Es fanden sich hierbei jedoch keine Signifikanten Trennwerte, die AUCs waren alle kleiner 0,5.

Tab. 10 - ROC-Analyse für normierte Funktionswerte

Variable(n) für Testergebnis	Fläche unter der Kurve		
	Fläche	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz
CD62% BL	0,425	0,081	0,393
CD62% TRAP	0,379	0,088	0,166
CD62 MFI BL	0,385	0,085	0,187
CD62 MFI TRAP	0,414	0,092	0,326
PAC MFI BL	0,371	0,089	0,142
PAC MFI TRAP	0,433	0,092	0,447

Abb. 14 - ROC-Analyse



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

## **3.4 Unterschiede zwischen Ereignispatienten und Nicht-Ereignispatienten**

### **3.4.1 Epidemiologie von Ereignis- und Nicht-Ereignispatienten**

Im weiteren wurden die Gruppen der Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen und die ohne kardiovaskuläre Ereignisse verglichen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters bei Studieneinschluss, aber auch hinsichtlich des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation. Die Annahme der Mittelwertgleichheit konnte hier mit einem  $p$  von jew. 0,01 abgelehnt werden. Dabei wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, da das Alter nicht in beiden Gruppen normalverteilt war. Die Anzahl der Hospitalisierungen war nach Beobachtungsbeginn auch fast doppelt so hoch bei Ereignispatienten wie bei ereignislosen Patienten,  $p = 0.001$ .

Ein weiterer Zusammenhang konnte zwischen der Grunderkrankung und dem Eintreten eines Ereignisses gezeigt werden. Patienten mit Zystennieren hatten demnach ein etwa doppeltes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, 6 statt 2,7 erwarteter Fälle,  $p = 0.037$  nach Fisher's exaktem Test. Die Patienten mit Zystennieren waren älter als die mit anderen Grunderkrankungen. Das Alter dieser Untergruppe bei Studieneinschluss war 51,7 resp. 56,7 Jahre bei den Ereignispatienten, dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,11$ ). Das Alter bei Transplantation war 40,9 resp. 49,3 bei den Ereignispatienten, dieser Unterschied jedoch deutlich signifikant,  $p = 0,003$ .

Keinen Einfluss hatte die Dialysedauer, das Alter des Transplantates bei Beobachtungsbeginn (i.e. Zeit zw. Transplantation und Studieneinschluss), der Blutdruck, der BodyMassIndex oder die Nierenfunktion zum Beobachtungsbeginn. Auch keinen Unterschied gab es hinsichtlich des Geschlechtes oder vorangegangener Ereignisse.

Tab. 11 - Epidemiologie der Patienten mit und ohne Ereignisse

	Patienten ohne Ereignis		Ereignispatienten	
	MW	SD	MW	SD
DialyseDauer	<b>1547,6</b>	1236,9	<b>1478,0</b>	997,2
RR sys.	<b>132,2</b>	10,5	<b>134,7</b>	9,4
RR dia.	<b>79,7</b>	7,3	<b>79,1</b>	8,1
WHO Hypertonie-Grad	<b>2</b>		<b>2</b>	
	<b>(Median)</b>		<b>(Median)</b>	
Alter bei Index	<b>51,4</b>	12,1	<b>59,1</b>	12,8
Alter bei Transplantation	<b>41,0</b>	12,3	<b>49,5</b>	12,8
Transplantatalter bei Index	<b>10,1</b>	7,3	<b>9,6</b>	6,0
Anzahl Hospitalisierungen seit Index	<b>1,0</b>	1,4	<b>2,0</b>	1,4
BMI bei Index	<b>25,8</b>	4,0	<b>25,0</b>	3,7
GFR dMDRD bei Index	<b>48,6</b>	17,0	<b>43,3</b>	18,9
Nierenfunktionseinschränkung nach NKF	<b>2</b>		<b>2</b>	
	<b>(Median)</b>		<b>(Median)</b>	
Anzahl RR-Senker bei Index	<b>2,5</b>	1,2	<b>2,8</b>	1,3
Homocystein bei Index	<b>23,6</b>	7,0	<b>25,3</b>	8,8
Fibrinogen bei Index	<b>369,0</b>	89,7	<b>365,8</b>	78,3

### 3.4.2 Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf Ereignisseintritt

Die Faktoren, die ein Einfluss auf die Ereignishäufigkeit zu nehmen schienen, wurden mit einer Binär-logistischem Regressionsanalyse verglichen. Dies waren letztlich Alter bei Studieneinschluss, Alter bei Transplantation, Grunderkrankung, relativer Plättchenwert CD62% positiv > 5 und CD62 MFI TRAP > 3. Dabei zeigte sich sowohl bei der vorwärts wie rückwärts schrittweisen Regression jeweils das Alter bei Transplantation als wichtigste Einflussvariable.

Das Verfahren kam auch dann zum selben Ergebnis, wenn alle relativen Plättchenfunktionswerte eingeschlossen wurden.

Tab. 12 - Logistische Regression möglicher Einflussvariablen auf Ereigniseintritt

		RegressionskoeffizientB	Wald	Sig.	Exp(B)
Schritt	AlterIndex1	0,035	0,421	0,516	1,035
1a					
	Alterbei1teTx	0,057	1,367	0,242	1,058
	zystenniere_yn	0,974	1,982	0,159	2,648
	cd62mfitrap_co3	0,214	0,059	0,809	1,238
	cpblco5	0,345	0,119	0,73	1,412
	Konstante	-8,814	11,559	0,001	0
Schritt	Alterbei1teTx	0,084	7,687	0,006	1,087
5a					
	Konstante	-6,277	15,937	0	0,002

## 4 Diskussion

Die Hauptbefunde dieser Arbeit sind:

- Dies ist nach unserem Kenntnisstand die erste Studie, die einen prädiktiven Wert für kardiovaskuläre Ereignisse aktivierter Thrombozyten evaluiert, welche Oberflächengebundenes CD62 exprimieren bzw. eine erhöhte Dichte PAC-1-markierter GPIIb/IIIa-Rezeptoren aufweisen
- Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse bei nierentransplantierten Patienten in Abhängigkeit der Plättchenaktivierungsmarker P-Selektin (CD62) bzw. des GPIIb/IIIa-Rezeptors (PAC-1) gefunden werden.
- Die Thrombozyten von Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen wiesen auch keine erhöhte Aktivität gegenüber denen derjenigen Patienten ohne Ereignis auf.
- In der untersuchten Population war das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation der wichtigste Risikofaktor, nicht jedoch die Dauer der Dialyse.

## 4.1 Epidemiologische Daten und Besonderheiten

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um Teilnehmer von drei voneinander unabhängigen Studien, die die Beeinflussung der Plättchenfunktion nierentransplantierte Patienten durch die Immunsuppression untersuchten [1, 15, 16]. Dabei waren für die Studien „NTX“ und „RAPA“ solche Patienten, die unter Dauermedikation eines Plättchenaggregationshemmers standen, ausgeschlossen. In der Studie „PLANT“ gab es 4 Untergruppen, davon waren bei 2 Untergruppen eine Dauermedikation durch Plättchenaggregationshemmer ebenfalls verboten. In den anderen 2 Untergruppen war eine ASS-Dauermedikation zu 100mg Voraussetzung. Dies betraf 37 Patienten. Eine ASS-Dauermedikation ist zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse bei Risikopatienten und zur Rezidivprophylaxe vorbelasteter Patienten indiziert [28, 29]. Dies war also bei 139 der 176 Patienten (79,0%) nicht indiziert.

Kardiovaskuläre Erkrankungen spielen eine wichtige Rolle in der Morbidität und Mortalität nierentransplantierte Patienten [30-32]. Dabei wird die Mortalität unterschiedlich angegeben. Während Aarhus eine jährliche Mortalitätsrate von 2,3 - 8,4% durch Herz- und Gefäßerkrankungen angibt [4], liegt diese im Jahresbericht des United States Renal Data System bei ca. 0,58 % [33, 34].

Die Inzidenz von koronaren Herzerkrankungen liegt bei Ducloux bei ca. 1,3% [35], dabei wurden prospektiv 340 nierentransplantierte Patienten ohne vorherige kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht.

Aalten et al [36] untersuchten 2187 Transplantatempfänger und fanden bei 32,6% kardiovaskuläre Ereignisse bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 8 Jahre ab Transplantation. Unser Kollektiv war zu Beobachtungsbeginn im Mittel seit 10 Jahren transplantiert und wurde ca. 3,7 Jahre weiterverfolgt. Wir beobachteten nur bei 11,9 % kardiovaskuläre Ereignisse.

Das untersuchte Kollektiv war mit 52,2 Jahren auch etwas älter als andere Kollektive, an denen kardiovaskuläre Komplikationen untersucht wurden. So lag bei Vanrenterghem das Durchschnittsalter bei 43 Jahren [37], dort wurden 2000 Patienten mit einem Transplantatüberleben von mehr als einem Jahr beobachtet. Eine Studie von Matas et al an Patienten mit einer Überlebenszeit nach Transplantation von mehr als 10 Jahren hatte ein mittleres Alter zum Zeitpunkt der Transplantation von 33 Jahren [38], in unserer Studie lag dies bei 42 Jahren; unsere Patienten waren im Mittel seit 10 Jahren transplantiert.

Zusammenfassen lässt sich sagen dass hier ein eher älteres aber überdurchschnittlich gesundes Kollektiv beobachtet wurde da es aufgrund der Einschlusskriterien der ursprünglichen Studien zu einem gewissen „Selection-Bias“ gekommen ist. Im Hinblick auf die Frage ob die Thrombozytenfunktion einen prädiktiven Wert für kardiovaskuläre Ereignisse hat, ist diese Situation eher hilfreich, da so die übrigen Risikofaktoren etwas in den Hintergrund treten.

## **4.2 Weitere Komorbiditäten und bekannte Risikofaktoren**

### **4.2.1 Diabetes Mellitus**

Diabetes Mellitus tritt bei bis zu 35% der Patienten nach der Transplantation auf [39, 40] und erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um einen Faktor 2-3. [41-43]. Das Risiko einen PTDM zu entwickeln ist in den ersten drei Monaten nach Transplantation am höchsten [39, 44], im weiteren Verlauf kommen nur noch wenige neue Fälle hinzu, dies wurde in zahlreichen Multizenter-Studien in Amerika [45, 46] und Europa gezeigt [47, 48].

Die Prävalenz in unserer Kohorte lag bei 10,8% und war somit deutlich niedriger als in den anderen Studien. Dies kann möglicherweise als Confounder des Selection-Bias erklärt werden, da durch die Reduzierung der Risikopatienten für kardiovaskuläre Ereignisse wohl auch Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse reduziert wurden. Andererseits könnte eine

zufällige Reduzierung von Diabetes-Patienten auch als zusätzliche Erklärung der geringeren Rate an kardiovaskulären Ereignissen dienen.

#### **4.2.2 Calcineurin-Inhibitoren**

Calcineurin-Inhibitoren (CNI) werden auch als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei nierentransplantierten Patienten gewertet [31, 32, 49, 50]. Einerseits bewirken diese eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [51, 52]. Andererseits wurde auch vermehrte Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie im Zusammenhang mit CNI beobachtet [53-56]. Im Tierversuch konnte darüber hinaus eine Beeinflussung von Vasodilatoren Prostaglandin und Stickstoffmonoxid (NO) sowie eine Steigerung der Vasokonstriktoren Adenosin, Thromboxan A2, Platelet-derived growth factor (PDGF) und Endothelin-1 gezeigt werden [57-59]. Eine blutdrucksteigernde Wirkung bzw. eine Blutdrucksenkung nach Umstellung auf andere Immunsuppressiva konnte auch in klinischen Studien nachgewiesen werden [60-62].

In unserem Beobachtungskollektiv fanden sich keine erhöhten Raten für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit Calcineurininhibitoren. Jedoch nahmen Patienten mit CNI etwas mehr Blutdrucksenker ein, im Schnitt 2,7 statt 2,3 verschiedenen Substanzklassen. Dieser Unterschied war auf einem Niveau von  $p < 0,05$  signifikant. Der Blutdruck selbst unterschied sich nicht. Eine Differenz im Blutdruck selbst war nicht unbedingt zu erwarten, schließlich war dieser im Allgemeinen bereits sehr gut eingestellt bei mittleren Werten von 130 resp. 80 mmHg. Der Blutdruck mag bei diesem Kollektiv mit geringeren kardiovaskulären Risiken auch leichter einzustellen gewesen sein. Der signifikant höhere Gebrauch von Antihypertensiva scheint aber dennoch die bisherigen Erkenntnisse zu den blutdrucksteigernden Effekten zu bestätigen.

#### **4.2.3 Alter zum Zeitpunkt der Transplantation**

Vanrenterghem [37] beobachtete 2071 Patienten mit einem Transplantatüberleben von mindestens einem Jahr bis zu 15 Jahre nach Transplantation. Dabei analysierte er verschiedene mögliche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse, zahlreiche Faktoren zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse. Die Liste umfasste unter anderem auch das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation. Dieses zeigte einen deutlichen Zusammenhang mit dem Eintritt des Todes ab einem Jahr post Transplantation.

In einer retrospektiven Analyse wertete Matas [38] die Ergebnisse von 2202 Patienten aus, die bis 1997 Transplantiert wurden und deren Transplantatüberleben mindestens 10 Jahre betrug. Hierbei zeigte sich dass das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation mit einem erhöhten Risiko für Transplantatverlust einhergeht.

Die Untersuchung von 2187 Patienten durch Aalten [36] zeigte einen signifikanten, aber geringen Risiko-Quotienten von 1,05 für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse in Abhängigkeit vom Alter zur Zeit der Transplantation.

Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang sowohl vom Alter des Patienten als auch von dessen Alter zur Zeit der Transplantation mit kardiovaskulären Ereignissen. Die Ereignisgruppe war jeweils deutlich älter, das Alter zum Beobachtungsbeginn war bei 59 vs. 51 Jahren, das Alter bei Transplantation 50 vs. 41 Jahre. Unsere Studie findet allerdings nicht die ebenfalls bei Aalten und Vanrenterghem [36, 37] beschriebenen Zusammenhänge mit der Dialysedauer.

## **4.3 Plättchenfunktion und kardiovaskuläre Ereignisse**

### **4.3.1 CD62**

P-Selektin (CD62) wird in Endothelzellen und Plättchen exprimiert und dient als Adhäsionsmolekül für die Entstehung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten (PLA), zur Adhäsion von Plättchen an Endothelzellen und wohl auch zur Unterstützung für Plättchen-Plättchen-Aggregate [63, 64]. P-Selektin

findet sich auf der Oberfläche Thrombozyten nur nach deren Aktivierung, es werden dann bis zu 10.000 Moleküle pro Plättchen dort nachgewiesen [65]. Aktivierte Thrombozyten wurden in verschiedenen pathologischen Situationen nachgewiesen, dies umfasst unter anderem Arteriosklerose [66-70], Vorhofflimmern [71-75], Diabetes [69, 76, 77], das akute Koronarsyndrom [78-82] und Schlaganfall [83, 84].

Eine vermehrte Plättchenaktivierung wurde initial in akuten Ereignissen wie akutem Koronarsyndrom oder Schlaganfall untersucht [85, 86]. Dass auch bei chronischen Zuständen wie Arteriosklerose die Thrombozytenaktivierung verstärkt ist, zeigte unter anderem Klinkhardt et al [67]. Dabei wurden Patienten mit generalisierter Arteriosklerose und peripheren Gefäßverschlüssen mit gesunden Probanden verglichen. Dabei konnten neben vermehrter CD62-Expression auch erstmalig vermehrte Plättchen-Leukozyten-Aggregate nachgewiesen werden.

Es fehlt bislang an einer Untersuchung die einen prädiktiven Wert erhöhter CD62-Expression auf Thrombozyten für kardiovaskuläre Ereignisse evaluiert hat. Lediglich Studien für gelöstes P-Selektin scheinen einen Zusammenhang mit erhöhten sCD62-Leveln und erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse aufzuzeigen [87, 88]. Blann untersuchte dabei in einer Fall-Kontroll-Studie von 116 Patienten nach Herzinfarkt und 116 Kontrollen die Spiegel von gelöstem P-Selektin im Plasma [87]. Dabei wurden die Spiegel der Patienten 6 Wochen nach dem Herzinfarkt gemessen, um die vermehrte Aktivierung in der akuten Phase nicht mit zu messen. Die Spiegel der Patienten lagen signifikant über denen der Kontrollen (272 vs. 190 ng/ml). In einem Follow-up 4 Jahre später wurde die Gruppe der Patienten erneut untersucht, insgesamt konnten davon noch 68 ausgewertet werden. 33 Patienten hatten einen Endpunkt erreicht, diese waren wie in der hier vorliegenden Untersuchung erneuter Herzinfarkt, Bypass, PTCA, Stroke. Diese Gruppe hatte mit 350 vs 270 ng/ml signifikant höhere sCD62-Spiegel. Darüber hinaus korrelierten die Messwerte für sCD62 nicht mit klassischen Risikofaktoren für Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen (Rauchen, Hyperlipidämie, Bluthochdruck), so dass Blann gelöstes P-Selektin als unabhängigen Risikofaktor interpretiert.

Varo konnte ähnliches für den ebenfalls gelösten Marker sCD40L zeigen [89]. Das Studiendesign war ähnlich zu dem von Blann. Varo untersuchte 195 Patienten und ebenso viele Kontrollen. Auch hier zeigten sowohl die Patienten höhere Spiegel als die Kontrollen, wie auch die Patienten mit erneutem Eintritt eines Endpunktes verglichen mit denen ohne erneutes Ereignis in einem Follow-up 10 Monate später. sCD40 wurde allerdings nicht bei unseren Patienten gemessen.

Malik fand hingegen keinen zusätzlichen Nutzen von sCD62 zur Risikostratifizierung in einer großen Studie mit 643 Patienten und 1278 Kontrollen [90]. Er untersuchte dabei Blutproben, die zwischen 1978-1980 in Großbritannien in der British Regional Heart Study entnommen wurden, bei -20°C gelagert und 16 Jahre später untersucht wurden. Dabei handelte es sich um Serum, im Gegensatz zur Studie von Blann, der Plasma untersuchte. Malik fand dabei eine Odds-Ratio von 1,18 für das Eintreten einer KHK für Patienten im oberen Drittel der sCD62-Spiegel verglichen mit denen im unteren Drittel.

Unsere Studie betrachtet nur die aktivierten Thrombozyten selbst. Die Hypothesen der erwähnten anderen Forschungsarbeiten lassen sich nicht ohne weiteres auf den Anteil aktivierter Thrombozyten übertragen, ob gleich die Thrombozyten wahrscheinlich die Hauptquelle von gelöstem CD62 sind [63].

Wir konnten keine erhöhten Level aktivierter Thrombozyten in der Gruppe der Ereignispatienten finden, weder in den Baseline-Messungen noch nach Aktivierung der Proben mit Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin receptor activating peptide (TRAP). Auch hatten die Patienten mit erhöhten CD62-Leveln nicht häufiger Ereignisse. Lediglich bei einer Aktivierung um den Faktor 5 oder größer gegenüber einem gesunden Normalkollektiv konnte gezeigt werden, dass kardiovaskuläre Ereignisse früher eintreten als bei Patienten mit geringeren Plättchenaktivierung, nämlich im Mittel nach 48 vs 70 Monaten. Diese Gruppe hatte aber nicht mehr Ereignisse als statistisch zu erwarten gewesen wären. Ähnliches fanden wir für Patienten, deren CD62-Expression nach TRAP-Aktivierung mehr als dreifach über dem Kontrollkollektiv lag. Hier betrug die Zeit-zum-Ereignis im Mittel 62 statt 69 Monate.

### 4.3.2 PAC-1

Der GP-IIb/IIIa-Rezeptor ist ein Glykoprotein und findet sich auf Thrombozyten in der Plasmamembran und in der  $\alpha$ -Granula. Er gehört zu den  $\beta$ 3-Integrinen und kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen. In aktiver Konformation kann der Rezeptor Fibrinogen binden und so weitere Thrombozyten miteinander verbinden. PAC-1 ist ein monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop, das nur bei aktivierten GP-IIb/IIIa-Rezeptoren frei liegt [91]. PAC-1 spielt als Marker für Thrombozytenaktivierung eine weniger große Rolle als P-Selektin [92], die Zahl der Studien die eine durchflusszytometrische Messung der PAC-1-Bindung in verschiedenen Situationen untersucht ist relativ gering. Gleichwohl gibt es viele Studien die die Wirkung von GP IIb/IIIa-Antagonisten untersuchen.

Die Arbeitsgruppe um McCabe [93] untersuchte PAC-1 bei Patienten mit Schlaganfall. Im akuten Stadium waren die Werte gegenüber denen der gesunden Kontrollen dort nicht erhöht, während in der Rekonvaleszenz PAC-1 sogar geringer war als bei den Kontrollen. McCabe postulierte als mögliche Erklärung dass die Zahl der freien Rezeptoren im Rahmen der fortschreitenden Plättchenbindungen sinken könnte.

Shimizu untersuchte 55 Patienten nach Schlaganfall und 41 Kontrollen [94]. Hier fanden sich signifikant erhöhte Werte für die PAC-1 bei den Patienten verglichen mit den Kontrollen, im Mittel waren es 37,3% vs. 19,6 % positive Plättchen. Darüber hinaus unterteilte der alle Studiensubjekte (Patienten und Kontrollen) in solche mit und ohne atherosklerotische Veränderungen, auch hier waren die Plättchen derer mit Atherosklerose öfter positiv, 33,4% vs. 22,1%.

Scharf [95] zeigte eine deutliche Aktivierung von Thrombozyten bei Patienten mit KHK durch perkutane transluminale *Angioplastie* im Gegensatz zur diagnostischen *Angiografie*. Dabei verwendete als Meßmethode die durchflusszytometrische Bestimmung sowohl von PAC-1 wie auch von an Plättchen gebundenem Fibrinogen (9F9). Dabei war die Messung von 9F9 deutlich unspezifischer als die von PAC-1.

Bihour [96] fand einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten sowohl für 9f9 als PAC-1 im Verlauf unter Fibrinolyse bei Patienten mit akutem Herzinfarkt.

Einen vermehrten Nachweis von GP IIb/IIIa-Rezeptoren auf Thrombozyten unabhängig von der Aktivitäts-Konformation mit dem CD41-Antikörper findet Giles bei Herzinfarktpatienten verglichen mit Kontrollen [97].

Die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Aktivierung wurde oft untersucht. Graff et al zeigte eine Reduktion der PAC-1-Bindung unter Clopidogrel bei nierentransplantierten Patienten [15], Peter zeigt mittels PAC-1-Messung eine Thrombozyten-Deaktivierung durch Abciximab bei Herzinfarktpatienten während Reteplase ohne Einfluss [98] bleibt. Eine deutlich unterschiedliche pharmakologische Beeinflussung der Plättchen-(De-)Aktivierung zeigt Braun [99] für Prasugrel und Clopidogrel.

Keine Studie untersuchte ob eine verstärkte Thrombozytenaktivierung im Sinne einer vermehrten PAC-1-Bindung als Risikofaktor für später eintretende kardiovaskuläre Ereignisse eine Rolle spielt. Wir haben dies in der vorliegenden Arbeit getan und dabei keinen Zusammenhang finden können. Weder hatten die Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen höhere Werte für PAC-1, noch hatten die Patienten mit hohen PAC-1-Werten öfters Ereignisse. Allerdings war die mittlere Zeit-zum-Ereignis bei Patienten mit niedrigen PAC-Werten ohne Aktivierung durch ADP kürzer (63 vs. 71 Monate). Die war mit  $p=0,05$  gerade signifikant. Da die meisten Autoren jedoch sowohl in akuten wie chronischen Krankheitsstadien erhöhte PAC-1-Werte gemessen hatten, sehen wir dies dennoch eher als Zufallsbefund.

## 5 Zusammenfassung

Immunsuppressiva sind essentiell für die allogene Organtransplantation. Graff et al konnten in drei vorangegangenen Studien zeigen, dass Immunsuppressiva zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung führen. Diese ist für die verschiedenen Substanzen unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine verstärkte Thrombozytenaktivierung könnte zu vermehrten kardiovaskulären Ereignissen führen. Insbesondere bei nierentransplantierten Patienten ist das kardiovaskuläre Risiko ohnehin deutlich erhöht. Es stellt sich die Frage ob diese medikamentös induzierte Plättchenaktivierung als Ko-Faktor kardiovaskulärer Ereignisse bei nierentransplantierten anzusehen ist.

Im Vorfeld dieser Studie wurden in den Studien NTX, RAPA und PLANT bei insgesamt 176 nierentransplantierten Patienten mit einer Mono-Immunsuppression flowzytometrische Plättchenfunktionsmessungen durchgeführt, dabei wurden insbesondere der Degranulationsmarker CD62 und der aktivierte GP IIb/IIIa-Rezeptor PAC-1 gemessen. Diese Ergebnisse wurden in Relation zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppen gesetzt:

$$\frac{\text{Messwert}_{\text{Patient}}}{\text{Mittelwert}_{\text{Gesunde\_Kontrolle}}}$$

Diese relativen Plättchenfunktionswerte waren zwischen den Studien vergleichbar. Des Weiteren wurden epidemiologische Eckdaten und klinische Endpunkte bis zu 5 Jahre nach der Thrombozytenmessung erfasst, im Mittel 3,7 Jahre.

Aufgrund des Studiendesigns der vorangegangenen Studien wurde hier ein Kollektiv mit relativ niedrigem kardiovaskulärem Risiko untersucht, jedoch sollte durch diese Reduktion klassischer Risikofaktoren der Einfluss der Plättchenaktivität besser sichtbar sein.

Die retrospektive Analyse untersuchte ob die Plättchenfunktionsparameter CD62 und PAC-1 als prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Ereignisse

geeignet sind. Insgesamt traten seit den Messungen 21 kardiovaskuläre Ereignisse auf, davon 9 akute.

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten bei Patienten mit Ereignissen und denen ohne Ereignis: Bei CD62 (baseline) lag der Mittelwert bei  $2,82 \pm 1,9$  mit Ereignis vs.  $2,73 \pm 1,47$  ohne, für PAC-1 bei  $1,76 \pm 1,97$  vs.  $1,93 \pm 1,53$ . Nach Aktivierung mit TRAP lag der Mittelwert für CD62 bei Ereignispatienten bei  $1,57 \pm 0,88$  vs.  $1,76 \pm 0,83$ , für PAC-1 bei  $1,56 \pm 1,65$  vs.  $1,44 \pm 1,04$ .

In einem weiteren Schritt wurden die Patienten nach dem Ausmaß der Plättchenaktivierung klassifiziert, als Cut-Off-Werte wurden die Mittelwerte und Mediane der jeweiligen Plättchenfunktion aller Patienten gewählt, ferner noch willkürlich eine 3- bzw 5-fache Aktivierung gegenüber den gesunden Kontrollen. Hierbei wurden in den Gruppen mit hohen Funktionswerten nicht signifikant mehr Ereignisse beobachtet als in den Gruppen mit niedrigen Werten. In einer daraufhin durchgeführten Time-to-event-Analyse nach Kaplan-Meyer zeigte sich allerdings für CD62 (baseline)  $> 5$  ein früheres Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse, im Mittel 47,6 vs. 69,9 Monate,  $p = 0,05$ .

Als Risikofaktoren in dieser Studie erwiesen sich insbesondere das Alter und das Alter bei Transplantation, letzteres erwies sich in einer logistischen Regressionsanalyse als der wichtigster Faktor.

Dies ist nach unserem Wissen die erste Untersuchung, die den prädiktiven Wert von Thrombozyten-gebundenem CD62 sowie von PAC-1 für kardiovaskuläre Ereignisse evaluiert. Es ergibt sich kein Hinweis, dass diese Marker einen prädiktiven Wert haben. Somit erscheint auch eine direkte pharmakologische Beeinflussung der Thrombozytenfunktion oder eine Veränderung der Immunsuppression nicht wegweisend, um die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei nierentransplantierten Patienten zu senken.

## 6 Abstract

Immunosuppression is essential for allogenic organ transplantation. Graff et al showed in 3 precursory studies that immunosuppression leads to an increased activation of thrombocytes, which is different for the individual drugs. An increased platelet activation could lead to an increased rate of cardiovascular events. Especially in renal transplant recipients the cardiovascular risk is clearly elevated. The questions arises if this drug-induced platelet activation is a co-factor for cardiovascular events in renal transplant patients.

Previously, within the three studies NTX, RAPA and PLANT at a total of 176 renal transplant recipients under a mono-immunosuppression a flowcytometric platelet function was assessed, particularly with regard to the degranulation marker CD62 and the activated GP IIb/IIIa-receptor PAC-1. These values were now put into relation to the average of the appropriate healthy control group:

$$\frac{value_{patient}}{average_{healthy\_control}}$$

These relative values are comparable between the three studies.

Further epidemiologic data and clinical endpoints up to 5 years after platelet assessment (average 3.7 years) were recorded.

Due to the study designs of the previous studies, were observed a quite healthy collective, however this reduction of traditional risk factors would make the influence of platelet activity more clearly.

The retrospective analysis evaluated whether CD62 und PAC-1 are suitable as predictive markers for cardiovascular events. Since the assessments, a total of 21 events were recorded, 9 of them acute.

There was no significant difference in the average values of patients with and without cardiovascular events: For CD62 (baseline) the average was

2,82±1,9 with event vs. 2,73±1,47 without, for PAC-1 1,76 ±1,97 with event vs. 1,93±1,53. After sample activation with TRAP the average for CD62 was 1,57±0,88 with event vs. 1,76±0,83, for PAC-1 1,56±1,65 vs. 1,44±1,04.

In another step the patients were classified into each two groups according to the degree of platelet activation, as cut-off-values served the averages and medians of the appropriate markers of all patients, and further a 3- and 5-time activation compared to healthy controls. We could not observe higher rates of cardiovascular events within the groups of higher platelet activation. An additional time-to-event analysis according to Kaplan-Meyer however showed for CD62 (baseline) > 5 an earlier occurrence of cardiovascular events, in average 47,6 vs. 69,9 months, p = 0,05.

As risk factors in our study, the age and the age at transplantation were significant risk factors, the latter proved to be the most important factor in a logistic regression analysis.

To our knowledge, this is the first study trying to evaluate the predictive value of platelet-bound CD62 and PAC-1 for cardiovascular events. It results no evidence for any predictive value. Therefore, a direct pharmacologic manipulation of thrombocyte function or changes in immunosuppression regimen do not seem to be promising to reduce cardiovascular events in renal transplant recipients.

## **7 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1 - Geschlecht.....	16
Abb. 2 - Grunderkrankung .....	18
Abb. 3 - Nierenfunktion.....	22
Abb. 4 - Histogramme der Plättchenfunktion .....	28
Abb. 5 - Boxplot CD62% pos, Gruppier n. Ereignis .....	29
Abb. 6 - Boxplot PAC Baseline, Ereignis .....	29
Abb. 7 - Boxplot CD62 MFI TRAP, Ereignis .....	30
Abb. 8 - Kaplan-Meier bei CD62%+, Cut-Off >5 .....	33
Abb. 9 - Kaplan-Meier CD62MFI Cut-Off > 3.....	34
Abb. 10 - Kaplan-Meier bei PAC Baseline > 1,5 (Median).....	35
Abb. 11 – CD62% Baseline, Cut-Off >5.....	36
Abb. 12 – PAC MFI Baseline, Cut-Off >1,525.....	36
Abb. 13 – CD62 MFI TRAP, Cut-Off > 3.....	37
Abb. 14 - ROC-Analyse .....	38

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 - Grunderkrankung .....	17
Tab. 2 - Antihypertensiva.....	19
Tab. 3 - Vorerkrankungen.....	20
Tab. 4 - Ereignisse .....	23
Tab. 5 - Intervall Plättchenmessung bis Ereignis (d) .....	24
Tab. 6 - Plättchenfunktionswerte Übersicht .....	26
Tab. 7 - Plättchenfunktionswerte, Ereigniseintritt, Mann-Whitney-U Vergleich .....	27
Tab. 8 - Chi-Quadrat-Test Cut-Off-Wert und Ereignis.....	31
Tab. 9 - Kaplan-Meier-Analyse .....	32
Tab. 10 - ROC-Analyse für normierte Funktionswerte .....	38
Tab. 11 - Epidemiologie der Patienten mit und ohne Ereignisse .....	40
Tab. 12 - Logistische Regression möglicher Einflussvariablen auf Ereigniseintritt.....	41

Tab. 13 - Koronare Herzkrankheit vor Studienbeginn.....	57
Tab. 14 - Nierenfunktion .....	58
Tab. 15 - Kreuztabelle Studie-Ereignis .....	59
Tab. 16 - Kreuztabelle IS-Ereignis .....	60
Tab. 17 - PTDM und Ereignisse .....	61
Tab. 18 - Ereignisse und Calcineurininhibitoren .....	62

## 9 Anhang

Tab. 13 - Koronare Herzkrankheit vor Studienbeginn

<b>Kreuztabelle</b>					
			KHKPräIndex		Gesamt
			Nein	Ja	
Studie	NTX	Anzahl	75	4	79
		Erwartete Anzahl	69,2	9,8	79
	RAPA	Anzahl	33	<b>11</b>	44
		Erwartete Anzahl	38,5	<b>5,5</b>	44
	PLANT	Anzahl	68	10	78
		Erwartete Anzahl	68,3	9,7	78,0
Gesamt		Anzahl	176	25	201
		Erwartete Anzahl	176	25	201
		% der Gesamtzahl	87,6%	12,4%	100%
<b>Chi-Quadrat-Tests</b>					
		Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	
Chi-Quadrat nach Pearson		10,331 <sup>a</sup>	2	,006	
Anzahl der gültigen Fälle		201 <sup>b</sup>			
<p>a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,47.</p> <p>b. Manche Patienten nahmen an mehreren Studien teil, daher ist die Gesamtzahl hier 201 und nicht 176</p>					

Tab. 14 - Nierenfunktion

**Kreuztabelle**

		Nierenfunktionseinschränkung				Gesamt
		schwer	moderat	mild	normal	
NTX	Anzahl	10	52	16	1	79
	Erwartete Anzahl	11,5	49,0	16,6	2,0	79,0
	% innerhalb von NTX	12,7%	<b>65,8%</b>	<b>20,3%</b>	<b>1,3%</b>	100,0%
RAPA	Anzahl	7	20	12	4	43
	Erwartete Anzahl	6,2	26,7	9,0	1,1	43,0
	% innerhalb von RAPA	16,3%	<b>46,5%</b>	<b>27,9%</b>	<b>9,3%</b>	100,0%
PLANT	Anzahl	12	52	14	0	78
	Erwartete Anzahl	11,3	48,4	16,4	2,0	78,0
	% innerhalb von PLANT	15,4%	<b>66,7%</b>	<b>17,9%</b>	<b>,0%</b>	100,0%
Gesamt	Anzahl	29	124	42	5	200
	Erwartete Anzahl	29,0	124,0	42,0	5,0	200,0
	% der Gesamtzahl	14,5%	62,0%	21,0%	2,5%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	14,178 <sup>a</sup>	6	,028
Likelihood-Quotient	13,018	6	,043
Anzahl der gültigen Fälle	200		

a. 3 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,08.

Tab. 15 - Kreuztabelle Studie-Ereignis

**Kreuztabelle**

		Studie			Gesamt
		00 'NTX'	00 'RAPA'	00 'PLANT'	
Ereignis 0	Anzahl	68	30	57	155
	Erwartete Anzahl	69,6	29,9	55,5	155,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	43,9%	19,4%	36,8%	100,0%
	% innerhalb von Studie	86,1%	88,2%	90,5%	88,1%
	% der Gesamtzahl	38,6%	17,0%	32,4%	88,1%
1	Anzahl	11	4	6	21
	Erwartete Anzahl	9,4	4,1	7,5	21,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	52,4%	19,0%	28,6%	100,0%
	% innerhalb von Studie	13,9%	11,8%	9,5%	11,9%
	% der Gesamtzahl	6,3%	2,3%	3,4%	11,9%
Gesamt	Anzahl	79	34	63	176
	Erwartete Anzahl	79,0	34,0	63,0	176,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	44,9%	19,3%	35,8%	100,0%
	% innerhalb von Studie	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% der Gesamtzahl	44,9%	19,3%	35,8%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,647 <sup>a</sup>	2	,724
Likelihood-Quotient	,656	2	,720
Zusammenhang linear-mit- linear	,643	1	,423
Anzahl der gültigen Fälle	176		

a. 1 Zellen (16,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,06.

Tab. 16 - Kreuztabelle IS-Ereignis

**Kreuztabelle**

		Immunsuppression					Gesamt
		MMF	AZA	FK506	CSA	RAPA	
Ereignis	0 Anzahl	17	29	44	50	14	154
	Erwartete Anzahl	17,6	26,4	44,0	51,0	15,0	154,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	11,0%	18,8%	28,6%	32,5%	9,1%	100,0%
	% innerhalb von Immunsuppression	85,0%	96,7%	88,0%	86,2%	82,4%	88,0%
	% der Gesamtzahl	9,7%	16,6%	25,1%	28,6%	8,0%	88,0%
	1 Anzahl	3	1	6	8	3	21
	Erwartete Anzahl	2,4	3,6	6,0	7,0	2,0	21,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	14,3%	4,8%	28,6%	38,1%	14,3%	100,0%
	% innerhalb von Immunsuppression	15,0%	3,3%	12,0%	13,8%	17,6%	12,0%
	% der Gesamtzahl	1,7%	,6%	3,4%	4,6%	1,7%	12,0%
Gesamt	Anzahl	20	30	50	58	17	175
	Erwartete Anzahl	20,0	30,0	50,0	58,0	17,0	175,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN	11,4%	17,1%	28,6%	33,1%	9,7%	100,0%
	% innerhalb von Immunsuppression	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% der Gesamtzahl	11,4%	17,1%	28,6%	33,1%	9,7%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,994 <sup>a</sup>	4	,559
Likelihood-Quotient	3,672	4	,452
Anzahl der gültigen Fälle	175		

a. 3 Zellen (30,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,04.

Tab. 17 - PTDM und Ereignisse

**ENDPKT\_CVALL\_YN\_postindex \* ptdm Kreuztabelle**

		ptdm		Gesamt
		,00	1,00	
ENDPKT_CVALL_ 0 YN_postindex	Anzahl	138	17	155
	Erwartete Anzahl	138,3	16,7	155,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_ YN_postindex	89,0%	11,0%	100,0%
	% innerhalb von ptdm	87,9%	89,5%	88,1%
	% der Gesamtzahl	78,4%	9,7%	88,1%
1	Anzahl	19	2	21
	Erwartete Anzahl	18,7	2,3	21,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_ YN_postindex	90,5%	9,5%	100,0%
	% innerhalb von ptdm	12,1%	10,5%	11,9%
	% der Gesamtzahl	10,8%	1,1%	11,9%
Gesamt	Anzahl	157	19	176
	Erwartete Anzahl	157,0	19,0	176,0
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_ YN_postindex	89,2%	10,8%	100,0%
	% innerhalb von ptdm	100,0%	100,0%	100,0%
	% der Gesamtzahl	89,2%	10,8%	100,0%

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,040 <sup>a</sup>	1	,841
Anzahl der gültigen Fälle	176		

Tab. 18 - Ereignisse und Calcineurininhibitoren

**cni\_yn \* ENDPKT\_CVALL\_YN\_postindex Kreuztabelle**

		ENDPKT_CVALL_YN_postindex		Gesamt
		0	1	
cni_yn ,00	Anzahl	60	7	67
	Erwartete Anzahl	59,0	8,0	67,0
	% innerhalb von cni_yn	89,6%	10,4%	100,0%
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN_postindex	39,0%	33,3%	38,3%
	% der Gesamtzahl	34,3%	4,0%	38,3%
1,00	Anzahl	94	14	108
	Erwartete Anzahl	95,0	13,0	108,0
	% innerhalb von cni_yn	87,0%	13,0%	100,0%
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN_postindex	61,0%	66,7%	61,7%
	% der Gesamtzahl	53,7%	8,0%	61,7%
Gesamt	Anzahl	154	21	175
	Erwartete Anzahl	154,0	21,0	175,0
	% innerhalb von cni_yn	88,0%	12,0%	100,0%
	% innerhalb von ENDPKT_CVALL_YN_postindex	100,0%	100,0%	100,0%
	% der Gesamtzahl	88,0%	12,0%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,248 <sup>a</sup>	1	,619
Anzahl der gültigen Fälle	175		

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 8,04.

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Graff J, Klinkhardt U, Harder S, Wegert W, Lenz T, Scheuermann EH, et al. Immunosuppressive therapy regimen and platelet activation in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2002 Oct;72(4):411-8.
- [2] Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jun;10(6):1366-80.
- [3] Babinska A, Markell MS, Salifu MO, Akoad M, Ehrlich YH, Kornecki E. Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant.* 1998 Dec;13(12):3153-9.
- [4] Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Cardiovascular disease in stable renal transplant patients in Norway: morbidity and mortality during a 5-yr follow-up. *Clinical Transplantation.* 2004;18(5):596-604.
- [5] Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C-y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England Journal of Medicine.* 2004;351(13):1296-305.
- [6] Aker S, Ivens K, Grabensee B, Heering P. Cardiovascular risk factors and diseases after renal transplantation. *Int Urol Nephrol.* 1998;30(6):777-88.
- [7] Aker S, Ivens K, Guo Z, Grabensee B, Heering P. Cardiovascular complications after renal transplantation. *Transplant Proc.* 1998 Aug;30(5):2039-42.
- [8] Polasek J. Procoagulant potential of platelet alpha granules. *Platelets.* 2004 Nov;15(7):403-7.
- [9] Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, Harder S, Franz N, Bassus S, et al. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Mar;300(3):952-7.
- [10] Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 1997 May 20;95(10):2387-94.
- [11] Marx N, Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Koch W, Pinkau T, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Jul;30(1):165-70.
- [12] Ashman N, Macey MG, Fan SL, Azam U, Yaqoob MM. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2003;18(10):2088-96.
- [13] Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005 Mar;19(2):111-23.
- [14] Fullard JF. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des.* 2004;10(14):1567-76.
- [15] Graff J, Harder S, Wahl O, Scheuermann EH, Gossmann J. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Nov;78(5):468-76.

- [16] Wahl OW. Plättchenfunktion unter Aggregationshemmern bei nierentransplantierten Patienten / vorgelegt von Oliver Wolfgang Wahl. 2007.
- [17] Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Urban & Fischer Verlag 2001.
- [18] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine*. 1999;130(6):461-70.
- [19] Coresh J, Stevens LA. Kidney function estimating equations: where do we stand? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2006;15(3):276-84.
- [20] Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL. Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem*. 1998;44(2):428-32.
- [21] Thervet E, Anglicheau D, Toledano N, Houllier AM, Noel LH, Kreis H, et al. Long-term results of TMPT activity monitoring in azathioprine-treated renal allograft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2001;12(1):170-6.
- [22] Armstrong VW, Oellerich M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clinical Biochemistry*. 2001;34(1):9-16.
- [23] Vasudev B, Hariharan S. Cancer after renal transplantation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2007;16(6):523-8.
- [24] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif)*. 2000;21(3):259-70.
- [25] Gratama JW, D'Hautcourt JL, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, et al. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. *European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry*. 1998;33(2):166-78
- [26] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*. 2007;25(6):1105-87.
- [27] K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266-S1-.
- [28] Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G, Brown DL. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2006;295(3):306-13.
- [29] Wolff T, Miller T, Ko S. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*. 2009;150(6):405-10.
- [30] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 1998;9(12 Suppl):S16-23-S16-23.
- [31] Marcén R. Cardiovascular risk factors in renal transplantation--current controversies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of*

the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2006;21 Suppl 3:iii3-8-iii3-8.

[32] Ojo AO. Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention. *Transplantation*. 2006;82(5):603-11.

[33] U.S. Renal Data System, USRDS 2008 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2008.

[34] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 1998;32(5, Supplement 3):S112-S9-S-S9.

[35] Ducloux D, Kazory A, Chalopin J-M. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney International*. 2004;66(1):441-7.

[36] Aalten J, Hoogeveen EK, Roodnat JI, Weimar W, Borm GF, de Fijter JW, et al. Associations between pre-kidney-transplant risk factors and post-transplant cardiovascular events and death. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008;21(10):985-91.

[37] Vanrenterghem YFC, Claes K, Montagnino G, Fieuws S, Maes B, Villa M, et al. Risk factors for cardiovascular events after successful renal transplantation. *Transplantation*. 2008;85(2):209-16.

[38] Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Kandaswamy R, Sutherland DER, Payne WD, et al. 2202 kidney transplant recipients with 10 years of graft function: what happens next? *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(11):2410-9.

[39] Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003 Feb;3(2):178-85.

[40] Hjelmsaeth J, Hartmann A, Midtvedt K, Aakhus S, Stenstrom J, Morkrid L, et al. Metabolic cardiovascular syndrome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 May;16(5):1047-52.

[41] Fernandez-Fresnedo G, Escallada R, de Francisco AL, Rodrigo E, Zubimendi JA, Ruiz JC, et al. Posttransplant diabetes is a cardiovascular risk factor in renal transplant patients. *Transplant Proc*. 2003 Mar;35(2):700.

[42] Chuang P, Gibney EM, Chan L, Ho PM, Parikh CR. Predictors of cardiovascular events and associated mortality within two years of kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2004 Jun;36(5):1387-91.

[43] Faenza A, Fuga G, Nardo B, Donati G, Cianciolo G, Scolari MP, et al. Metabolic syndrome after kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2007;39(6):1843-6.

[44] Sumrani NB, Delaney V, Ding ZK, Davis R, Daskalakis P, Friedman EA, et al. Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine era--an analysis of risk factors. *Transplantation*. 1991 Feb;51(2):343-7.

[45] Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*. 1997 Apr 15;63(7):977-83.

- [46] Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation*. 2002 Mar 15;73(5):775-82.
- [47] Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):741-6.
- [48] Montagnino G, Kramer BK, Arias M. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporine microemulsion in kidney transplantation: twelve-month follow-up. *Transplant Proc*. 2002 Aug;34(5):1635-7.
- [49] Campistol JM, Grinyó JM. Exploring treatment options in renal transplantation: the problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity. *Transplantation*. 2001;71(11 Suppl):SS42-51-SS42-51.
- [50] Morales JM. Cardiovascular risk profile in patients treated with sirolimus after renal transplantation. *Kidney International Supplement*. 2005(93):S69-73-S69-73.
- [51] Bantle JP, Nath KA, Sutherland DE, Najarian JS, Ferris TF. Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. *Arch Intern Med*. 1985 Mar;145(3):505-8.
- [52] Bennett WM. Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1996 Nov;34(11):515-9.
- [53] Keogh A. Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2004 May;23(5 Suppl):S202-6.
- [54] Andany MA, Kasiske BL. Dyslipidemia and its management after renal transplantation. *J Nephrol*. 2001 Nov-Dec;14 Suppl 4:S81-8.
- [55] McLagan J. *Fat: An Appreciation of a Misunderstood Ingredient with Recipes*: Aurum Press 2009.
- [56] Marchetti P, Navalesi R. The metabolic effects of cyclosporin and tacrolimus. *J Endocrinol Invest*. 2000 Jul-Aug;23(7):482-90.
- [57] Endoh M, Odamaki M, Ikegaya N, Kumagai H. Factors involved in the development of hypertension induced by a low-protein diet in rats with renal injury. *Kidney Blood Press Res*. 2004;27(1):1-9.
- [58] Lanese DM, Conger JD. Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(5):2144-9.
- [59] Zhang R, Leslie B, Boudreaux JP, Frey D, Reisin E. Hypertension after kidney transplantation: impact, pathogenesis and therapy. *Am J Med Sci*. 2003 Apr;325(4):202-8.
- [60] Marcén R, Chahin J, Alarcón A, Bravo J. Conversion from cyclosporine microemulsion to tacrolimus in stable kidney transplant patients with hypercholesterolemia is related to an improvement in cardiovascular risk profile: a prospective study. *Transplantation Proceedings*. 2006;38(8):2427-30.
- [61] Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JI, Christiaans MH, Vos PF, et al. Improved cardiovascular risk profile and renal function in renal transplant patients after randomized conversion from cyclosporine to tacrolimus. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul;14(7):1880-8.
- [62] Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JI, Christiaans MH, Vos PF, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life

- indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):937-45.
- [63] Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 2003;24(24):2166-79.
- [64] Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000 Oct 17;102(16):1931-6.
- [65] Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. 1985 Sep;101(3):880-6.
- [66] Dotsenko O, Chaturvedi N, Thom SAM, Wright AR, Mayet J, Shore A, et al. Platelet and leukocyte activation, atherosclerosis and inflammation in European and South Asian men. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2007;5(10):2036-42.
- [67] Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Mar;73(3):232-41.
- [68] Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2045-50.
- [69] Koyama H, Nishizawa Y. Platelet in progression of atherosclerosis: a potential target in diabetic patients. *Current Diabetes Reviews*. 2005;1(2):159-65.
- [70] Tschoepe D. Adhesion molecules influencing atherosclerosis. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1996;30 Suppl:19-24.
- [71] Akar JG, Jeske W, Wilber DJ. Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(18):1790-3.
- [72] Blann AD, Li-Saw-Hee F, Lip GY, Minamino T, Kitakaze M, Sanada S, et al. Increased membrane and soluble P-selectin in atrial fibrillation. *Circulation*. 1999;100(17):e86-7-e-7.
- [73] Choudhury A, Chung I, Blann AD, Lip GYH. Platelet surface CD62P and CD63, mean platelet volume, and soluble/platelet P-selectin as indexes of platelet function in atrial fibrillation: a comparison of "healthy control subjects" and "disease control subjects" in sinus rhythm. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(19):1957-64.
- [74] Minamino T, Kitakaze M, Sanada S, Asanuma H, Kurotobi T, Koretsune Y, et al. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation*. 1998;98(17):1721-7.
- [75] Pongratz G, Brandt-Pohlmann M, Henneke KH, Pohle C, Zink D, Gehling G, et al. Platelet activation in embolic and preembolic status of patients with nonrheumatic atrial fibrillation. *Chest*. 1997;111(4):929-33.
- [76] Tschoepe D, Rauch U, Schwippert B. Platelet-leukocyte-cross-talk in diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*. 1997;29(12):631-5.
- [77] Wagner OF, Jilka B. Putative role of adhesion molecules in metabolic disorders. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*. 1997;29(12):627-30.

- [78] Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, et al. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. Journal of the American College of Cardiology*. 1999;33(3):634-9.
- [79] Baeza V R, Corbalán H R, Castro G P, Acevedo B M, Quiroga G T, Viviani G P. [Coronary biomarkers and long-term clinical outcome in acute coronary syndrome without ST segment elevation]. *Revista Médica De Chile*. 2005;133(11):1285-93.
- [80] Frazier L. Novel predictors of acute coronary syndrome outcomes. *Biological Research for Nursing*. 2003;5(1):30-6.
- [81] Wang J, Zhang S, Jin Y, Qin G, Yu L, Zhang J. Elevated levels of platelet-monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. *International Journal of Cardiology*. 2007;115(3):361-5.
- [82] Yazici M, Demircan S, Durna K, Yasar E, Sahin M. Relationship between myocardial injury and soluble P-selectin in non-ST elevation acute coronary syndromes. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2005;69(5):530-5.
- [83] Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, et al. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*. 2006;37(9):2283-7.
- [84] Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*. 2006;66(3):232-45.
- [85] Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1997 Nov;28(11):2214-8.
- [86] Wu G, Li F, Li P, Ruan C. Detection of plasma alpha-granule membrane protein GMP-140 using radiolabeled monoclonal antibodies in thrombotic diseases. *Haemostasis*. 1993 Mar-Apr;23(2):121-8.
- [87] Blann AD, Faragher EB, McCollum CN. Increased soluble P-selectin following myocardial infarction: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1997 Oct;8(7):383-90.
- [88] Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001 Jan 30;103(4):491-5.
- [89] Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003 Sep 2;108(9):1049-52.
- [90] Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):971-6.
- [91] Gawaz M. *Das Blutplättchen*: Thieme, Stuttgart 1999.
- [92] Kappelmayer J, Nagy B, Jr., Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med*. 2004 May;42(5):475-86.
- [93] McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(6):777-87.

- [94] Shimizu M, Kohara S, Yamamoto M, Ando Y, Haida M, Shinohara Y. Significant relationship between platelet activation and intra-media thickness of the carotid artery in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res.* 2006;117(6):647-52.
- [95] Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb.* 1992 Dec;12(12):1475-87.
- [96] Bihour C, Durrieu-Jais C, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Flow cytometry reveals activated GP IIb-IIIa complexes on platelets from patients undergoing thrombolytic therapy after acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995 Jul;6(5):395-410.
- [97] Giles H, Smith RE, Martin JF. Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 1994 Jan;24(1):69-72.
- [98] Peter K, Kohler B, Straub A, Ruef J, Moser M, Nordt T, et al. Flow cytometric monitoring of glycoprotein IIb/IIIa blockade and platelet function in patients with acute myocardial infarction receiving reteplase, abciximab, and ticlopidine: continuous platelet inhibition by the combination of abciximab and ticlopidine. *Circulation.* 2000 Sep 26;102(13):1490-6.
- [99] Braun OO, Johnell M, Varenhorst C, James S, Brandt JT, Jakubowski JA, et al. Greater reduction of platelet activation markers and platelet-monocyte aggregates by prasugrel compared to clopidogrel in stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2008 Oct;100(4):626-33.

## **11 Abkürzungsverzeichnis**

6-MP	6-Mercaptopurin
6-TGN	6-Thioguanin-Nukleotiden
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	akuter Myokardinfarkt
AP	Angina pectoris
AUC	area under curve
AZA	Azathioprin
BMI	Body Mass Index
CNI	Calcineurin-Inhibitoren
CsA	Cyclosporin A
DM	Diabetes mellitus
DVT	tiefe Venenthrombose
FK506	Takrolimus
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
KfH	Kuratorium für Heimdialyse
KHK	koronare Herzkrankheit
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MMF	Mycophenolat-Mofetil
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PLA	Plättchen-Leukozyten-Aggregat
PRIND	prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
PSGL	P-selectin glycoprotein ligand
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie /-grafie
PTDM	Post-Transplantations-Diabetes mellitus
RAPA	Rapamycin
ROC	Receiver operating characteristic
sCD62	soluble (gelöstes) CD62
SLR	Sirolimus
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
TVT	tiefe Venenthrombose

## **12 Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Graff aus dem Institut für klinische Pharmakologie für die stete und prompte Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jan Goßmann aus dem Kuratorium für Hemodialyse, Frankfurt für die freundliche und kompetente Unterstützung in wissenschaftlichen wie nephrologischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sebastian Harder aus dem Institut für klinische Pharmakologie für Bereitstellung des Themas und die ausführliche und kritische Diskussion meiner Ergebnisse.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die persönliche Unterstützung und das Verständnis bedanken, ebenso bei Dr. Wilma Flaig für die Leihgabe des Laptop.

### **13 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

*Plättchenfunktion als prädiktiver Marker kardiovaskulärer Ereignisse bei nierentransplantierten Patienten unter Berücksichtigung der Immunsuppression*

am

Institut für Klinische Pharmakologie

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Sebastian Harder  
mit Unterstützung durch Dr. Jochen Graff

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 14. Juli 2009