

# MODULATION DENDRITISCHER ZELLEN ALS THERAPIE- ANSATZ ZUR BEEINFLUSSUNG DER AKUTEN UND CHRONISCHEN ABSTOSSUNG IN EINEM HETEROTOPEN RATTENHERZTRANSPLANTATIONSMODELL

ALIN EISELE

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



136+



*edition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof Dr. E. Burkhardt

und

dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I, Abteilung Kardiologie und  
Angiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Hölschermann

**Modulation dendritischer Zellen als Therapieansatz zur  
Beeinflussung der akuten und chronischen Abstoßung  
in einem heterotopen Rattenherztransplantationsmodell**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**ALIN EISELE**

Tierärztin aus Darmstadt (Hessen)

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Prof. Dr. H. Hölschermann

Tag der Disputation: 19.05.2009

Erklärung:

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Alin Eisele

Verstehen kann man das Leben nur rückwärts,  
aber leben muss man es vorwärts!

In Gedenken an meinen Bruder Daniel

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Organtransplantation</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Transplantationsimmunologie</b> .....	<b>2</b>
2.2.1	Formen der Abstoßung .....	2
2.2.2	Fremderkennung.....	7
<b>2.3</b>	<b>Bedeutung der Abstoßungsvorgänge nach Herztransplantation.</b> <b>11</b>	
2.3.1	Pathologie der Transplantatvaskulopathie: .....	
	Unterschied zur „gewöhnlichen“ koronaren Herzkrankheit .....	12
<b>2.4</b>	<b>Bisherige Therapieansätze zur Prävention der Abstoßung.</b> .....	<b>13</b>
2.4.1	Cyclosporin A.....	13
<b>2.5</b>	<b>Neue therapeutische Ansätze zur Prävention der Abstoßung</b> .....	<b>15</b>
2.5.1	Toleranzinduktion.....	15
2.5.2	„Modulation“ dendritischer Zellen als potentieller neuer Therapieansatz zur Prävention akuter..... und chronischer Abstoßung .....	17
2.5.2.1	Dendritische Zellen .....	17
2.5.3	Immunmodulation durch dendritische Zellen .....	17
2.5.4	Sanglifehrin A.....	21
<b>2.6</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>23</b>

<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>30</b>
3.1.1	Herkunft .....	30
3.1.2	Tierversuchsgenehmigung .....	30
3.1.3	Tierhaltung .....	30
<b>3.2</b>	<b>Tierexperimenteller Teil.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Operationstechnik der heterotopen Transplantation .....	31
3.2.2	Postoperative Nachsorge und Kontrolle..... der Transplantatfunktion .....	35
3.2.3	Immunsuppression.....	36
3.2.4	Organentnahme und Aufbewahrung .....	37
<b>3.3</b>	<b>Histologische Untersuchung .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin/Elastika-Färbung .....	38
3.3.2	Immunhistologische Färbung.....	40
<b>3.4</b>	<b>Zelltherapeutischer in vitro Teil.....</b>	<b>46</b>
3.4.1	Gewinnung von dendritischen Zellen .....	46
3.4.2	Gewinnung von Milzzellen .....	50
3.4.3	Pulsung der dendritischen Zellen.....	51
<b>3.5</b>	<b>Versuchsaufbau .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	In-vivo-Teil: Bestimmung des Transplantatüberlebens .....	52
3.5.2	In-vitro-Teil: Untersuchung der akuten und .....	
	chronischen Abstoßung .....	52



3.5.3	Vorbehandlung der Transplantatempfänger .....	53
<b>3.6</b>	<b>Zelltherapeutischer Ansatz .....</b>	<b>54</b>
3.6.1	In-vivo-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die .....	
	akute Abstoßung .....	54
3.6.2	In-vitro-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie .....	56
<b>3.7</b>	<b>Pharmakologische Modulation dendritischer Zellen durch Sanglifehrin A.....</b>	<b>59</b>
3.7.1	In-vivo-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die .....	
	akute Abstoßung .....	59
3.7.2	In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die .....	
	akute und chronische Abstoßung.....	61
3.7.3	In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die .....	
	akute Abstoßung .....	63
3.7.4	In- vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie.....	65
<b>3.8</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>66</b>
3.8.1	Funktion des Transplantates.....	66
3.8.2	Histologische Auswertung.....	66
<b>3.9</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>70</b>

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>71</b>
4.1	Transplantatüberleben ohne Immunmodulation.....	71
4.2	Evaluierung der minimalen CSA-Dosis zur Induktion von Langzeittransplantatüberleben.....	72
4.3	<b>Akute Abstoßung</b> .....	<b>74</b>
4.3.1	Kinetik der akuten Abstoßung.....	74
4.4	<b>In-vitro-Teil: Effekte der Immunmodulation auf histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie</b> .....	<b>76</b>
4.5	<b>Zelltherapeutischer Ansatz</b> .....	<b>78</b>
4.5.1	In-vivo-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die ..... akute Abstoßung.....	78
4.5.2	In-vitro-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die ..... histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie .....	86
4.6	<b>Pharmakologische Modulation dendritischer Zellen mit SFA</b> .....	<b>91</b>
4.6.1	In-vivo-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die ..... akute Abstoßung.....	91
4.6.2	In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die ..... akute Abstoßung (Immunhistologische Untersuchung).....	97
4.6.2.1	T-Zell Infiltration: .....	99
4.6.2.2	Monozyten/Makrophagen-Infiltration.....	105
4.6.3	In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie.....	109

<b>4.7</b>	<b>Zusammenfassung der Versuchsergebnisse der Zelltherapie ...</b>	<b>114</b>
4.7.1	Effekte der Zelltherapie auf die akute Abstoßung .....	114
4.7.2	Effekte der Zelltherapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie .....	114
<b>4.8</b>	<b>Zusammenfassung der Versuchsergebnisse der ..... pharmakologischen Modulation dendritischer Zellen ..... mit Sangliferin A .....</b>	<b>115</b>
4.8.1	Effekte der pharmakologischen Therapie auf die ..... akute Abstoßung.....	115
4.8.2	Effekte der pharmakologischen Therapie auf die ..... histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie .....	115
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>116</b>
<b>5.1</b>	<b>Hintergrund der Fragestellung .....</b>	<b>116</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Wahl des Transplantationsmodelles .....</b>	<b>117</b>
<b>5.3</b>	<b>Die Immunmodulation mit dendritischen und ..... apoptotischen Zellen .....</b>	<b>119</b>
<b>5.4</b>	<b>Die Immunmodulation mit SFA.....</b>	<b>127</b>
<b>5.5</b>	<b>Einordnung der vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse ..... in einen potentiellen klinischen Kontext.....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>139</b>



# 1 Einleitung

---

Die Transplantationsmedizin hat im Laufe des letzten Jahrhunderts enorme Fortschritte gemacht. Nach Etablierung der Operationstechnik konzentriert sich die derzeitige Forschung auf eine Verhinderung der nach einer allogenen Transplantation (d.h. Transplantation eines Organs zwischen genetisch verschiedenen Individuen) auftretenden Abstoßungsreaktionen. Neben der akuten Abstoßung ist die chronische Abstoßung, die sogenannte Transplantatvaskulopathie, ein die Transplantatfunktion und somit die Prognose herztransplantierte Patienten limitierender Faktor (Behrendt, D. et al., 2000).

Ziel der vorliegenden Studie war es, durch eine Modulation dendritischer Zellen, welche bei der Fremderkennung eine Schlüsselfunktion spielen, Einfluss auf diese Abstoßungsprozesse zu nehmen sowie deren Ausprägung zu reduzieren oder bestenfalls zu verhindern.

## **2 Literaturübersicht**

---

### **2.1 Organtransplantation**

Unter einer Organtransplantation versteht man die Übertragung von Organen von einem Spender auf ein anderes Individuum. Je nach Übereinstimmung von Spender und Empfänger spricht man von autogenen (Spender und Empfänger identisch), syngenen/isogenen (genetisch identische Individuen), xenogenen (Individuen verschiedener Spezies) und allogenen (genetisch differente Individuen, jedoch derselben Spezies angehörend) Transplantaten.

### **2.2 Transplantationsimmunologie**

Da es sich bei den meisten klinischen Organtransplantationen um allogene Transplantationen handelt, muss der Transplantatempfänger mit dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation rechnen.

#### **2.2.1 Formen der Abstoßung**

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt im Wesentlichen auf der Untersuchung von zwei Abstoßungsformen nach Herztransplantation, nämlich der akuten und der chronischen Abstoßung bzw. Transplantatdysfunktion, die aus diesem Grund auch ausführlicher beschrieben werden. Auf die hyperakute und akzelerierte Abstoßung wird hier nicht näher eingegangen.

Bei der akuten Abstoßung handelt es sich um eine komplexe Immunantwort (Tabelle 1). Ohne immunsuppressive Therapie tritt sie in ihrer vollen Ausprägung klassischerweise nach 5 - 7 Tagen auf. Histopathologische Untersuchungen zeigen einen vaskulären und parenchymalen Schaden, der in erster Linie T-Zell-vermittelt ist. Vor allem in der initialen Phase nach Transplantation kann man eine progrediente, zelluläre Infiltration aus T-Zellen und anderen immunkompetenten Zellen feststellen. Diese Zellen vermitteln die Schädigung des Parenchyms und der Endothelzellen, was zu einer verminderten Perfusion bis hin zu Infarkten des Transplantatgewebes führt (Tabelle 1).

Der Mechanismus der akuten Abstoßung ist von komplexer Natur und beinhaltet eine Reihe von Zell-Zell-Interaktionen, die durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Interleukine bewirkt werden. Das Gefäßendothel als primäre Barriere erleidet einen Schaden unterschiedlicher Genese (z.B. mechanische Verletzung durch die Transplantation, Ischämie-Reperfusionsschaden) was zu einer Aktivierung des Endothels führt und die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (Selektinen, Integrinen) induziert. Dies begünstigt letztendlich die Infiltration des Transplantates mit immunkompetenten Zellen und die daraus resultierende Gewebszerstörung (Dulkachainun, T.S. et al, 1998; Takada, M. et al., 1997).

Auf zellulärer Ebene geschieht dies im Wesentlichen durch Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten. Diese Zellen schädigen das Transplantat durch die direkte Lyse von Endothel- und Parenchymzellen. Neben der zellvermittelten Abstoßungsreaktion kommt es auch zur Induktion der humoralen Immunantwort. Hierbei spielt vor allem die über Antikörper und Komplement vermittelte Bildung des Membran-Attack-Komplexes eine Rolle, dessen Resultat die osmotische Lyse des allogenen Gewebes ist. Zu weiteren Schädigungen trägt schließlich noch die Antikörper-abhängige-Zytotoxizität bei.

Die chronische Transplantatdysfunktion wird bei Herztransplantation durch eine Transplantatvaskulopathie (TVP) ausgelöst und stellt das Hauptproblem für das Überleben und die Funktionstüchtigkeit transplantierte Organe dar. Die typische Ausprägung tritt erst im Langzeitverlauf nach Transplantation auf. Histomorphologisch zeigen sich organübergreifende Veränderungen im Sinne einer

progredienten Destruktion luminärer Strukturen, die organspezifisch im Bereich von Gefäßen, Glomeruli, Gallengängen oder Bronchiolen dominieren. Bei der Herztransplantation ist diese Veränderung histologisch in erster Linie durch eine progrediente, konzentrische, neointimale Proliferation gekennzeichnet, welche letztendlich zum Verschuß der betroffenen Gefäße führen kann. Vermutlich ist das pathologische Geschehen an der Gefäßintima komplexer multifaktorieller Natur und als „*Response to injury*“ zu verstehen, bei dem sowohl immunologische als auch nichtimmunologische Prozesse eine Rolle spielen (Mehra, M.R. et al., 2006; Tullius und Tilney, N.L., 1995; Weis, M. und Von Scheidt, W., 1997). Die Pathophysiologie der TVP, lässt sich in drei Phasen unterteilen:

Zunächst die teils durch Antikörper, teils durch unspezifische Schädigungen (wie z.B. durch den Ischämie-Reperfusionsschaden) vermittelte Phase des initialen Transplantatschadens. Dieser Phase folgen zellvermittelte inflammatorische Gewebereaktionen und als Endphase treten Reparationsmechanismen auf, die zur *Fibrose* und *Sklerose* des transplantierten Organes führen (Tilney, N.L. et al., 1991).

Die potentiellen Risikofaktoren der TVP lassen sich als ein multifaktorielles Geschehen mit einer engen Interaktion zwischen antigenunabhängigen und antigenabhängigen Faktoren verstehen (Abb. 1). Repetitive Episoden endothelialer Aktivierung sind verantwortlich für die progressiven vaskulären Veränderungen bei fortschreitender chronischer Transplantatdysfunktion. Diese ermöglichen die kontinuierliche Transmigration immunkompetenter Zellen in das Transplantat, wodurch schließlich der organschädigende Prozess durch die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, der sowohl proinflammatorische als auch profibrotische Prozesse in Gang setzt. Diese sind verantwortlich für Reparaturmechanismen, welche eine Proliferation der extrazellulären Matrix, von Fibroblasten und glatter Muskulatur zur Folge haben (Abb. 1).



## Mechanismen der chronischen Transplantatdysfunktion

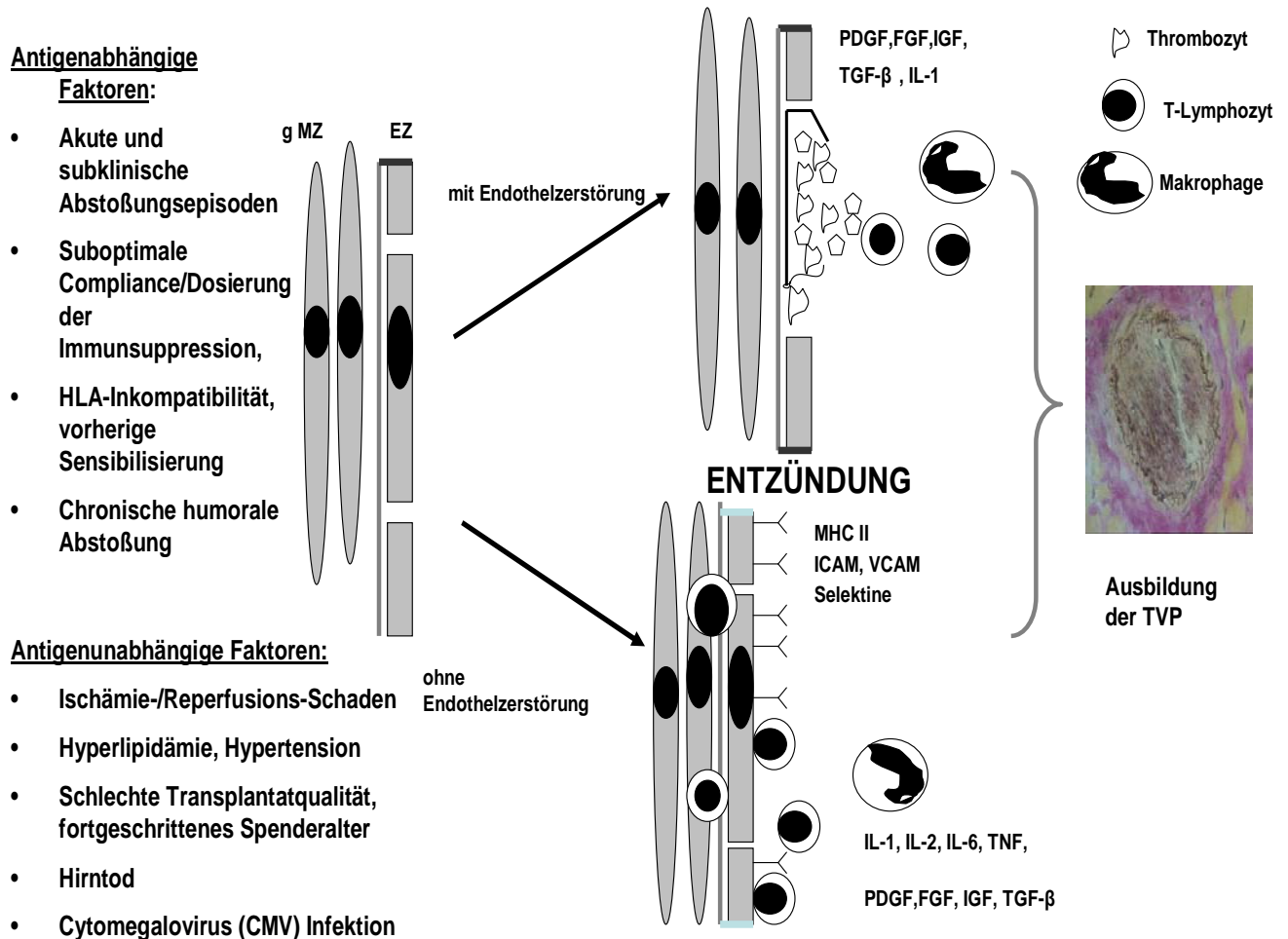


Abbildung 1: Mechanismen der Transplantatvaskulopathie modifiziert nach Mehra, M.R. et al., 2006.

EZ= Endothelzelle; FGF= Fibroblast growth factor; gMZ= glatte Muskelzelle; ICAM= Intracellular adhesion molecule; IGF= Insulin-like growth factor, IL= Interleukin; MHC II= Major histocompatibility complex; PDGF= Platelet derived growth factor; TGF-β= Transforming growth factor; TNF= Tumor necrosis factor; VCAM= Vascular adhesion molecule.

Tabelle 1: Formen der Abstoßung modifiziert nach Tan, C.D. et al., 2007.

Abstoßungs- Typ	Benötigte Zeit	Ursache	Pathologisches/ Histologisches Bild
Akut	Tage- Wochen	Primäre Aktivierung von T-Zellen.  Komplexe Immunantwort	Ausgeprägte zelluläre Infiltration, vor allem T- Zellen und Makrophagen.  Vaskulitis.  Ödeme und Nekrosen.
Chronisch	Monate- Jahre	Vermutet wird eine multifaktorielle Genese aus immunologischen und nicht immunologischen Prozessen.	Diffuse, konzentrische neointimale Proliferation des gesamten Gefäßbaumes.

Die *hyperakute Abstoßung* lässt sich als Folge bereits vorhandener präformierter Antikörper gegen das transplantierte Organ beschreiben, welche an Spenderantigene des Endothels binden und komplementvermittelt die Zerstörung des Transplantates einleiten.

Bei der *akzelerierten Abstoßung* handelt es sich im Wesentlichen um einen B- bzw. T-Zell-vermittelten Prozess, der aus einer bereits bestehenden Sensibilisierung der Empfänger resultiert. Wiederholte Exposition mit spenderspezifischem Antigen führt zur einer starken Aktivierung der humoralen und zellvermittelten Immunantwort, die sich zum einen in markanten endothelialen Läsionen und zum anderen in der Infiltration des Transplantates mit immunkompetenten Zellen äußert.

### 2.2.2 Fremderkennung

Die oben genannten Abstoßungsvorgänge werden durch das Immunsystem des Transplantatempfängers hervorgerufen, welches nach erfolgreicher Fremderkennung auf das körperfremde Organ mit einer Aktivierung des Immunsystems und daraus resultierender Abstoßungsreaktion reagiert.

Zellen verschiedener Individuen einer Art unterscheiden sich in erster Linie in der Ausstattung des Oberflächenmusters der Zellmembran, in den Allogenen. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die sich bei den einzelnen Individuen unterscheiden. Bei der Transplantation solider Organe erfolgt die Fremderkennung durch körpereigene T-Zellen über die Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle auf der Oberfläche des Spenderorganes (Barry, W.H., 1994; Pattison, J.M. und Krensky, A.M., 1997). Hierbei handelt es sich um hochpolymorphe Zelloberflächenproteine, die nur bei eineiigen Zwillingen und bei Inzuchttieren gleich sind.

Man unterscheidet MHC-Antigene der Klasse I und II, die jeweils auf verschiedenen Zellen lokalisiert sind und bei verschiedenen immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. MHC-I-Antigene befinden sich vor allem auf kernhaltigen Zellen. Neben der Eigenerkennung sind sie auch Zielstruktur bei der Fremderkennung.

Antigene der MHC-Klasse-II befinden sich auf vielen Zellen des Immunsystems (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen). Sie dienen der Zusammenarbeit und Regulation der Immunantwort und werden durch verschiedene Zytokine zur Expression stimuliert. Das Wissen über diese Moleküle und der Versuch, die MHC-Moleküle des Spenders und des Empfängers aufeinander abzustimmen, konnte die Erfolgsrate der Transplantation signifikant steigern.

Vorraussetzung einer Abstoßungsreaktion ist eine erfolgreiche Fremderkennung, die ihrerseits von einer erfolgreichen Interaktion von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit immunkompetenten T-Lymphozyten des Transplantatempfängers abhängt.

Grundsätzlich wird zwischen der direkten und der indirekten Form der Antigenerkennung bzw. -präsentation unterschieden (Abb. 2):

Bei der direkten Fremderkennung werden im Transplantat befindliche Spender-APC aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem körpereigenen MHC-Komplex direkt durch die T-Zelle des Empfängers erkannt (Caballero, A. et al., 2006). Die T-Zelle bindet direkt an das intakte allogene MHC-Molekül auf der Spender-APC (Abb. 2A).

Die indirekte Fremderkennung ist gekennzeichnet durch die Notwendigkeit einer der Antigenerkennung vorhergehenden Aufbereitung der Spender-MHC-Moleküle durch körpereigene APC des Transplantatempfängers. Die T-Zelle erkennt so das prozessierte Antigen in Form eines Peptidfragments in der Kuhle des körpereigenen MHC-Komplexes mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (Abb. 2 B).

## A Direkte Alloantigenerkennung

### Direkte Fremderkennung



## B Indirekte Alloantigenerkennung

### Indirekte Fremderkennung

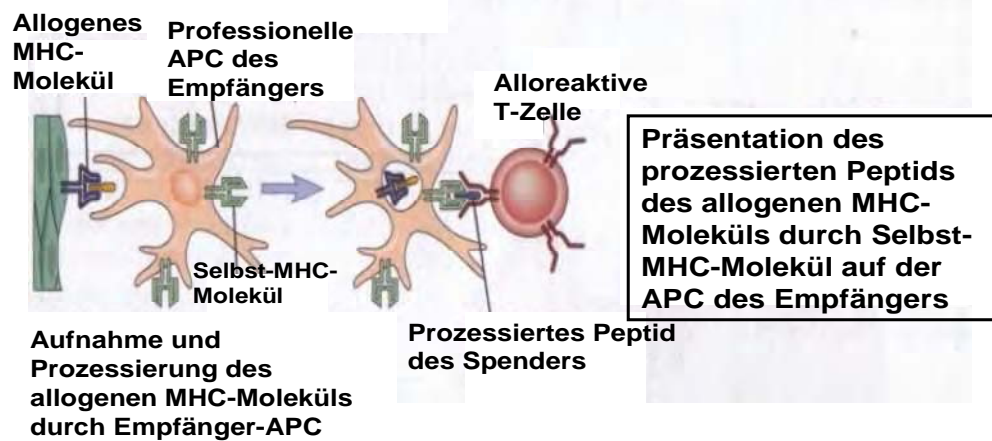


Abbildung 2: Direkte und indirekte Alloantigenerkennung modifiziert nach Abbas, A.K und Lichtmann, A.H., 2005.

Die vollständige Aktivierung der T-Zellen und somit auch die Auslösung einer effizienten Immunantwort hängt neben einer effektiven Antigenpräsentation noch von der Interaktion verschiedener Moleküle auf der Oberfläche der APC und der T-Zelle ab, der sog. Kostimulation (Abb. 3).

Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle durch die APC kommt es nur, wenn beide Signale auf der APC vorhanden sind. Nachdem das sog. „erste Signal“, das vom MHC-Komplex präsentiert wird, durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt wird, kommt es zur Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD 40 und CD 40 L, die das „zweite Signal“ vermitteln. Die erfolgreiche Antigenpräsentation bei gleichzeitiger Kostimulation hat die Produktion von IL-2 zur Folge, welche die T-Zellen zur Proliferation anregt und deren Differenzierung zu Effektorzellen in Gang setzt (Abb. 3, obere Zeile). Fehlt das kostimulatorische Signal, so verfällt die T-Zelle in den Zustand der Anergie, d.h. funktionelle Inaktivität (Schwartz, R.H., 1990) und die IL-2 induzierte Proliferation bleibt aus (Abb. 3, untere Zeile).

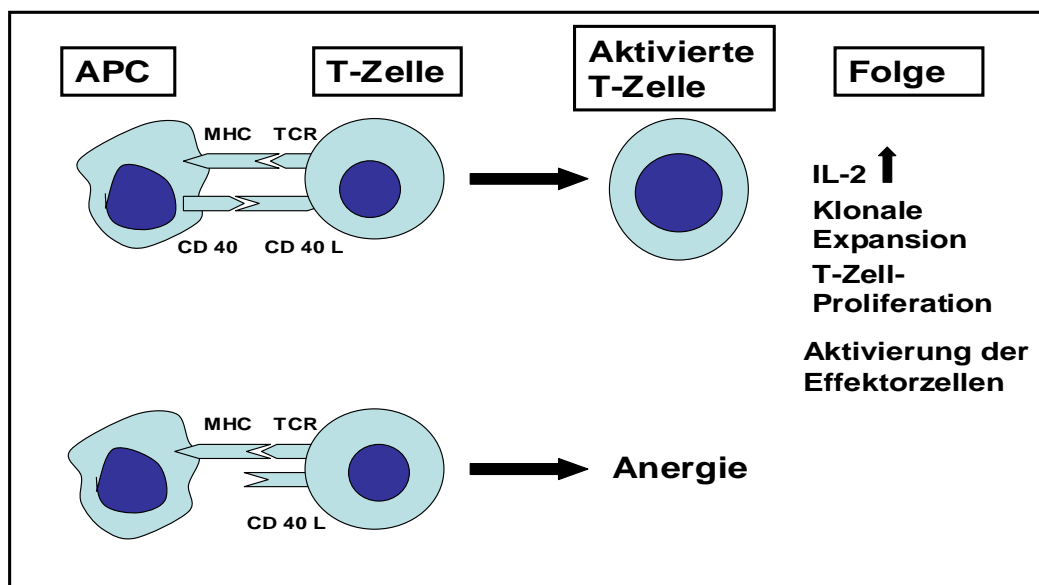


Abbildung 3: Prinzip der Kostimulation am Beispiel CD 40/ CD 40 L modifiziert nach Denton, M.D. et al, (1998).

### **2.3 Bedeutung der Abstoßungsvorgänge nach Herztransplantation**

Im Langzeitverlauf nach Herztransplantationen stellt die Transplantatvaskulopathie (TVP) die Hauptursache für Morbidität und Mortalität herztransplanteder Patienten dar. Trotz verbesserter Immunsuppression der letzten Jahre ist die Inzidenz der TVP unverändert hoch und stellt ein klinisch höchst relevantes, ernstzunehmendes Problem dar. Die Prävalenz angiographisch detektierbarer TVP ein, drei und fünf Jahre nach Transplantation bei mit Cyclosporin behandelten Patienten liegt bei 14%, 37% und 50% (Behrendt, D. et al., 2000). Bis heute fehlen effiziente Ansätze zur Prävention oder Therapie dieser Erkrankung, da die üblichen Behandlungsoptionen bei vorhandener TVP (perkutane koronare Ballonangioplastik, Stentimplantation, Aortocoronare Bypassoperation) aufgrund des diffusen Befalls der TVP und des Auftretens von Restenosen schwer umsetzbar sind. Somit stellt bei ausgeprägten Formen der TVP eine Retransplantation letztendlich die einzige Therapiemöglichkeit dar (Ardehali, A. et al., 1993; Behrendt, D. et al., 2000).

### 2.3.1 Pathologie der Transplantatvaskulopathie: Unterschied zur „gewöhnlichen“ koronaren Herzkrankheit

Bei der TVP handelt es sich um eine diffuse, häufig rasch auf den gesamten Gefäßbaum des Spenderorgans übergreifende Arteriosklerose, die sich als neointimale Proliferation äußert (Tabelle 2).

Differentialdiagnostisch muss man die TVP von der koronaren Herzkrankheit (KHK) abgrenzen (Tabelle 2). Hauptmerkmale der KHK sind neben ihrem schleichenden Charakter (oftmals Jahrzehnte) die für sie typischen exzentrischen, fokalen Atheromeinlagerungen, Kalziumablagerungen und eine Zerstörung der Lamina elastica interna (Ramzy, D. et al., 2005; Rahmani, M. et al., 2006).

Tabelle 2: Merkmale der TVP modifiziert nach Ramzy, D. et al., 2005.

Merkmale	TVP	KHK
Angiographische Lokalisation	<b>Diffus</b> , alle Blutgefäßtypen innerhalb des Transplantates, vor allem intramyokardiale Gefäße	<b>Fokal</b> , vor allem proximale Koronargefäße
Intimaproliferation	Konzentrisch	Exzentrisch
Kalziumablagerung	Keine	Teilweise vorhanden
Elastica interna	Intakt	Zerstört
Inflammation/Vaskulitis	Vorhanden	Nie
Dauer der Entwicklung	Monate	Jahre



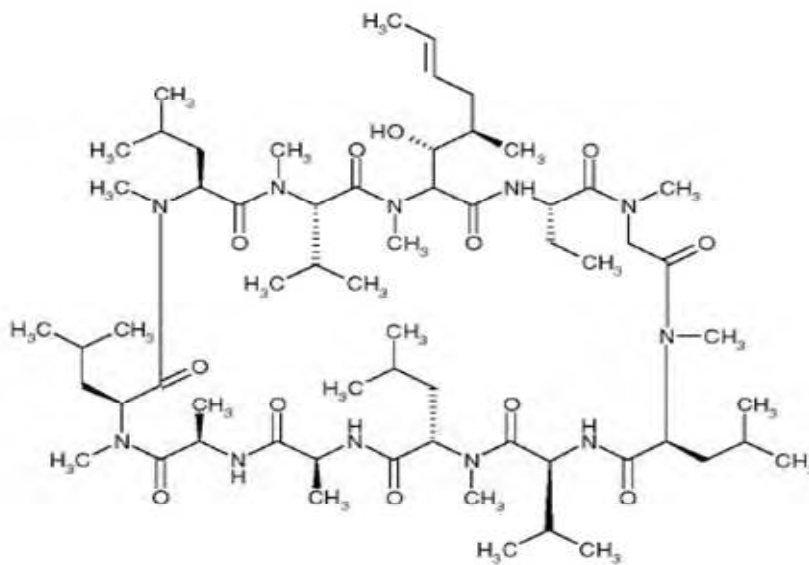
## **2.4 Bisherige Therapieansätze zur Prävention der Abstoßung.**

Bisherige Therapieansätze zur Verhinderung der Abstoßungsprozesse nach Herztransplantation sind in erster Linie pharmakologischer Natur. Zur Sicherung des Transplantat- und Patientenüberlebens ist der kontinuierliche Einsatz der gängigen Immunsuppressiva bei der allogenen Herztransplantation nach wie vor unumgänglich (Denton, M.D. et al, 1999). Diese Pharmaka greifen in den Abstoßungsprozess ein, in dem sie z.B. verschiedene Funktionen immunkompetenter Zellen bzw deren Interaktion modulieren oder verhindern. Ein wesentlicher Faktor für eine gute Langzeitprognose der Transplantation ist eine auf das individuelle immunologische Risikoprofil angepasste lebenslange Immunsuppression. Langfristiges Ziel ist hierbei neben der effektiven Prävention akuter Abstoßungen die Reduktion des langfristigen Transplantatversagens, der Toxizität, Infektionen, Malignomen, Komorbidität und metabolischer Probleme.

### **2.4.1 Cyclosporin A**

CSA (Abb. 4), der Prototyp der immunsuppressiven Therapie, wurde erstmals 1978 klinisch bei einer Nierentransplantation eingesetzt (Calne, R.Y. et al., 1978) und ermöglichte die effektive Unterdrückung der Vorgänge der akuten Transplantatabstoßung. Als Calcineurin-Inhibitor verhindert es in erster Linie die Produktion des Cytokins Interleukin (IL)-2, welches eine zentrale Rolle in der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation spielt (Perico, N. und Remuzzi, G., 1997). Dies geschieht über die Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion durch Inhibition eines Transkriptionsfaktors, dem „nukleären Faktor von aktivierten Zellen“ (NFAT), der die Transkription von verschiedenen Proteinen und Cytokinen reguliert. CSA wirkt somit direkt auf T-Lymphozyten im Vergleich zu den bisher eingesetzten weniger spezifischen Immunsuppressiva, wie z.B. Azathioprin (Schwartz, R. und Dameshek, W., 1959) und den antiinflammatorischen Steroiden.

Auch unter der auf Calcineurin-Inhibition basierenden immunsuppressiven Therapie kommt es innerhalb der ersten Tage und Wochen mit einer Frequenz von 1,3 Episoden zur akuten Abstoßung bei Herztransplantatempfängern im ersten Jahr *post transplantationem* (Hauptmann, P.J. et al., 1995), wobei es auch später noch zu akuten Abstoßungsperioden kommen kann. Trotz des immunsuppressiven Potentials, das die akute Abstoßung weitestgehend beherrscht, ist die Einnahme von CSA mit einer Reihe negativer Begleiterscheinungen behaftet. Neben der Nephrotoxizität und weiteren aus der Einnahme resultierender Nebenwirkungen kann CSA die Entstehung der TVP nicht verhindern.



**Strukturformel von Cyclosporin A**

Abbildung 4: Strukturformel von Cyclosporin A (Mix, E. und Zettel, K., 1999)

## **2.5 Neue therapeutische Ansätze zur Prävention der Abstoßung**

Die Transplantatprotektion durch unspezifische Immunsuppression geht mit einer Reihe von Nachteilen einher. Neben der zwingenden Notwendigkeit der lebenslangen Arzneimitteleinnahme und der erforderlichen guten Compliance der Patienten besitzen diese hochpotenten Medikamente eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen. Insofern stellt die Suche nach Alternativen zur medikamentösen Immunsuppression die größte Herausforderung in der experimentellen und klinischen Transplantationsforschung dar. Die nachfolgend beschriebene Spender-spezifische vaskuläre Toleranzinduktion durch den Einsatz modifizierter dendritischer Zellen könnte eine Alternative zu, bzw. eine Ergänzung der herkömmlichen rein pharmakologisch orientierten Therapieverfahren sein.

### **2.5.1 Toleranzinduktion**

Immunologische Toleranz ist definiert als ein Zustand spezifischer immunologischer Nichtreaktivität gegenüber einem Selbst- oder Fremd-Antigen unter Beibehaltung der immunologischen Reaktivität gegenüber anderen Antigenen (Chalasan, G. und Lakkis, F.G.; 2001; Salama, A.D. et al., 2001). Im Zusammenhang mit Transplantation bedeutet dies, dass der „tolerante“ Patient zu einer effektiven Immunantwort fähig ist, beispielsweise gegenüber Infektionserregern und Vakzinen, aber nicht in der Lage ist, das Transplantat abzustößen (Lakkis, F.G. und Sayegh, M.H., 2003).

Im Wesentlichen wird zwischen zwei Formen der Toleranz unterschieden, deren Induktion entweder im Thymus oder im peripheren lymphatischen Gewebe (wie Lymphknoten oder Milz) stattfindet. Die erste Form bezeichnet man als zentrale Toleranz, letztere als periphere Toleranz. Dem Organismus dient die Toleranzinduktion zum Auslösen selbstreaktiver T- und B-Zellen. Zu den prinzipiellen Mechanismen der Toleranzinduktion gehören die Deletion, d.h. Eliminierung aus dem Organismus nach erfolgter Apoptoseeinleitung, die Anergie, d.h. funktionelle Inaktivierung alloreaktiver Lymphozyten und die aktive Immunregulation durch Suppression mittels regulatorischer T-Zellen (Wekerle, T. und

Skyes, M., 1999).

Schwerpunkt der modernen Transplantationsforschung ist heutzutage die Induktion einer operationalen Toleranz, d.h. eines langfristigen Transplantatüberlebens unter Umgehung einer permanenten Immunsuppression. Rein „puristisch“ betrachtet, hätte eine solche Toleranz folgende drei Merkmale: Erstens die Akzeptanz des spezifischen Transplantates, zweitens eine Nichtakzeptanz bzw. Abstoßung eines Transplantates von einem genetisch anderen Individuum (Third-Party-Transplantat) und drittens das Ausbleiben der chronischen Transplantatdysfunktion im Langzeitverlauf.

## **2.5.2 „Modulation“ dendritischer Zellen als potentieller neuer Therapieansatz zur Prävention akuter und chronischer Abstoßung**

### **2.5.2.1 Dendritische Zellen**

Bei dendritischen Zellen (DC) handelt es sich um besonders potente Antigenpräsentierende Zellen (APC) des Immunsystems, denen insbesondere bei der adaptiven, d.h. erworbenen Immunität eine Schlüsselfunktion zugeschrieben wird. Gerade beim Abstoßungsprozess allogener Transplantate spielen sie somit aufgrund ihrer vermittelnden Funktion als APC bei der direkten und indirekten Fremderkennung eine wesentliche Rolle.

DC stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und befinden sich in situ vor allem in primären und sekundären lymphatischen Geweben, aber auch in Lymphe, Blut und Schleimhäuten. In den meisten Geweben und Organen liegen sie als unreife DC vor, welche nicht in der Lage sind T-Zellen zu stimulieren. Verschiedene Faktoren wie die Aufnahme nekrotischen Materials, das umliegende Zytokinmilieu des Gewebes oder Organes, die Anwesenheit pathogener Keime bewirken in situ schließlich die Mobilisierung und Ausreifung der DC (Steinman, R.M., 1991).

### **2.5.3 Immunmodulation durch dendritische Zellen**

Studien der letzten Jahre zeigten, dass DC eine Doppelfunktion bei der Regulation von Immunantworten haben: Eine immunstimulatorische zur Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und eine immuninhibitorische zur Hemmung entzündlicher Immunreaktionen. Darüber hinaus wurde den DC eine Beteiligung bei der Induktion und Erhaltung zentraler und peripherer T-Zell-Toleranz zugeschrieben (Morelli, A.E. und Thomson, A.W., 2003; Morelli, A.E., 2006; Penna, G. et al., 2005; Steinman, R.M. et al., 2003).

Im Hinblick auf die Regulation der Immunantwort ist der Reifegrad der DC von großer Bedeutung. Die Reifung dendritischer Zellen markiert einen wesentlichen Funktionswandel von einer professionellen antigenaufnehmenden Zelle zu einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998).

Gerade auf dieser „Reifung“ der DC basiert der entscheidende, die Immunantwort entfachende Mechanismus. Bei der Wanderung zu sekundären lymphatischen Organen wird aus der unreifen DC eine hochaktive und zudem potente APC mit veränderter Expression des MHC-II-Komplexes und der kostimulatorischen Moleküle (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998; Caux, C. et al., 2000). In dieser Form ist die DC in der Lage, T-Zellen zur Aktivierung und Proliferation anzuregen, wobei eine einzige DC hunderte von naiven oder ruhenden T-Zellen über die Präsentation von Antigenen auf MHC-I- und -II-Molekülen stimulieren kann (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). Der unreife Entwicklungszustand der DC ist dagegen durch eine niedrige Expression von T-Zell-kostimulatorischen und MHC-Klasse-II-Molekülen gekennzeichnet, wodurch diese DC nicht in der Lage sind, proinflammatorische Immunantworten effektiv zu induzieren (Lutz, M.B. und Schuler, G., 2002).

Diesen unreifen DC wurde im Hinblick auf die Regulation der Immunantwort eine entscheidende Rolle zugesprochen. Neben der Beobachtung, dass unreife DC *in vitro* und *in vivo* anerge und supprimierende T-Zellen induzieren, die eine Immunantwort wirksam unterdrücken können (Jonuleit, H. et al., 2000), wurde ein wesentlicher Einfluss auf den Schweregrad der Abstoßung allogener Transplantate gefunden. Verschiedene tierexperimentelle Studien zeigten, dass modifizierte DC die Entwicklung der parenchymatösen Abstoßung von Organtransplantaten (Abe, M. et al., 2005; Lutz, M.B. et al., 2000; Xu, D.L. et al., 2004) supprimieren können.

Die derzeitige Technologie des Einsatzes von DC im Tiermodell umfasst folgende Ansätze (Abb. 5):

- a.) die direkte i.v.-Verabreichung in-vitro mit Spenderantigen beladener tolerogener DC (Abb. 5, obere Zeile)
- b.) die i.v.-Verabreichung von apoptotischen (oder nekrotischen) Spenderzellen (Abb. 5, untere Zeile).

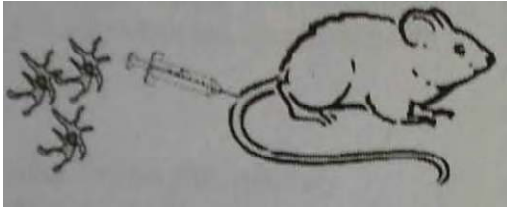
Apoptose und Nekrose, die beiden Hauptformen des Zelltodes, spielen im Zusammenhang mit der Immunregulation durch DC eine wichtige Rolle. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der ein aktiver, energieabhängiger Prozess mit typischen Veränderungen der Zellstruktur ist. Die Nekrose ist durch einen eher zufälligen pathologischen Zelltod mit irreversiblen Veränderungen im Nukleus und Zytoplasma gekennzeichnet. Im Gegensatz zur Apoptose läuft die Nekrose passiv und ohne Energieverbrauch ab und führt durch die Freisetzung toxischer Komponenten zur Entzündung des umliegenden Gewebes (Liu, G. et al., 2006).

Die klassische Technik zur Herabregulation der Immunantwort auf ein Fremdartigen erfordert den Einsatz in-vitro-generierter und modifizierter tolerogener DC (Abb. 5, obere Zeile). Die so manipulierten tolerogenen DC werden den Empfängern sieben Tage vor der Transplantation (i.v.) verabreicht.

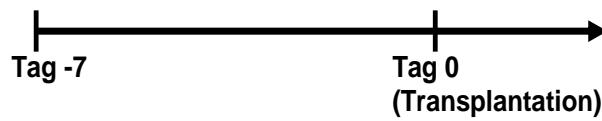
Alternativ kann auch eine indirekte Immunmodulation durch DC durch die direkte i.v.-Verabreichung von apoptotischen Spenderzellen erfolgen (Abb. 5, untere Zeile). Auf diese Weise wird den DC das Spenderantigen in situ geliefert. DC aus der Milz fangen diese im Blut befindlichen apoptotischen Zellen ein, ohne dass es in vivo zur Ausreifung der DC kommt. Die Präsentation der prozessierten Alloantigene in den sekundären lymphatischen Geweben durch die unreifen/semireifen DC hat eine spenderspezifische abgeschwächte T-Zellantwort zur Folge, die auf T-Zell-Deletion, Anergie und möglicherweise auf die Generierung regulatorischer T-Zellen zurückzuführen ist (Morelli, A.E., 2006).

## I. Klassische Immunmodulation durch DC

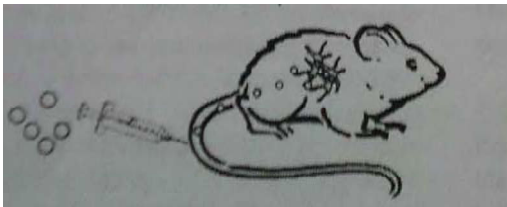
In-vitro generierte tolerogene DC  
(Empfänger-DC + Spenderantigen)



**Ziel:**  
Abgeschwächte T-Zellantwort in Folge von:  
-T-Zell-Deletion  
-Anergie  
-Induktion regulatorischer T-Zellen



Direkte Verabreichung von Spenderantigen an DC in situ  
(Apoptotische Spenderzellen)



## II. In-vivo-Modell: Indirekte Immunmodulation durch DC

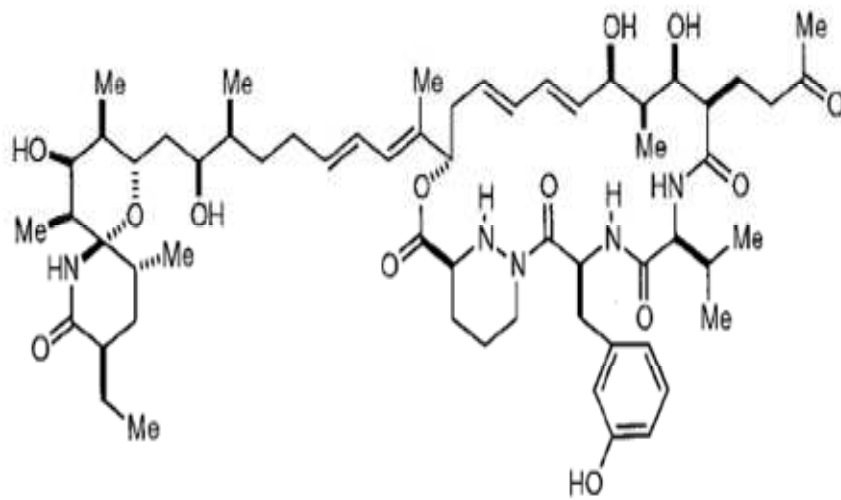
Abbildung 5: Immunmodulation durch DC modifiziert nach Morelli, A.E., 2006.



#### **2.5.4 Sanglifehrin A**

Das Makrolid Sanglifehrin A (SFA, Abb. 6) wurde als Abkömmling des Aktinomyceten *Streptomyces flaveolus* erstmals im Jahre 1999 durch Sanglier und Fehr als Substanz mit immunsuppressiver Kompetenz entdeckt (Fehr, T. et al., 1999; Sanglier, J.J. et al., 1999). Die Besonderheit dieser neuen Substanz im Hinblick auf das Thema der vorliegenden Arbeit besteht in der Wirkung auf wichtige Funktionen dendritischer Zellen.

SFA ist wie auch Cyclosporin A (CSA) Cyclophilin A bindend, jedoch mit einer zehnfach höheren Affinität. Im Gegensatz zu CSA ist seine Wirkung trotz Bindung an Cyclophilin A jedoch nicht der Calcineurin-Phosphatase-Inhibition zuzuschreiben (Fehr, T. et al., 1999; Sanglier, J.J. et al., 1999). In-vitro Experimente zeigten, dass SFA keine Effekte auf die Zielstrukturen der bekannten Immunsuppressiva hat (Zenke, G. et al., 2001), so dass es sich bei SFA um eine neue Substanz mit bisher ungeklärtem Wirkmechanismus handelt. Im Gegensatz zu CSA inhibiert SFA nur relativ schwach die T-Zellen und hat keinen Einfluss auf die Produktion von IL-2 (Zenke, G. et al., 2001). Strukturanalysen des humanen Cyclophilin-SFA Komplexes zeigten, dass die Effektor-domäne von SFA eine dreidimensionale Struktur aufweist, die stark von der des CSA abweicht und somit auf einen anderen immunsuppressiven Mechanismus hinweist (Kallen, J. et al., 2005). SFA blockiert zwei wichtige Funktionen dendritischer Zellen in vitro (Steinschulte, C. et al., 2003; Woltman, A.M. et al., 2004) und in vivo (Hackstein, H. et al., 2007): nämlich die Produktion des bioaktiven Interleukins IL-12 und die endozytotische Aktivität dendritischer Zellen.



Strukturformel von Sanglifehrin A

Abbildung 6: Strukturformel von Sanglifehrin A (Zhang, L.H. et al, 2001).

## 2.6 Fragestellung

Grundlegender Gedanke dieser Arbeit war es, durch den Einsatz bzw. durch eine Modulation dendritischer Zellen im Tiermodell (Abb. 7, Abb. 8 und Abb. 9), die Immunantwort des Empfängers auf das Transplantat so zu beeinflussen, dass die Abstoßungsvorgänge reduziert oder bestenfalls verhindert werden und insbesondere der TVP durch Induktion vaskulärer Toleranz entgegenzuwirken.

Hierzu diente das vollständig allogene Rattenherztransplantationsmodell, in dem sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung untersucht wurde.

Die Modulation dendritischer Zellen sollte direkt (mittels Zelltherapie mit autologen DC, Abb. 7) bzw. indirekt (mittels Zelltherapie mit Spendermilzzellen, Abb. 8 oder aber mittels pharmakologischer Immunmodulation durch SFA, Abb. 9) erfolgen.

In der vorliegenden Studie sollten die zwei Ansätze der DC-Technologie, also die direkte (Abb. 7) und die indirekte (Abb. 8) Immunmodulation durch DC, vor allem im Hinblick auf die chronische Abstoßung untersucht werden. Hierbei wurden die Transplantatempfänger 7 Tage vor Transplantation durch eine i.v. Vorbehandlung mit mit allogenen Spendermaterial konfrontiert.

Bei der direkten Immunmodulation durch DC sollte der Effekt einer i.v.-Vorbehandlung des Transplantatempfängers (Empfängerrattenstamm: Lewis) mit modifizierten autologen DC, die ihrerseits zuvor mit Spendermilzzellen beladen worden waren, untersucht werden (Abb. 7).

Bei der indirekten Immunmodulation durch DC sollte der Effekt einer i.v.-Vorbehandlung des Transplantatempfängers mit allogenen Spendermilzzellen (allogener Spenderrattenstamm: Wistar Furth) untersucht werden (Abb. 8), welche nach i.v.-Applikation von DC des Empfängers aufgenommen werden.

Durch die o.g. Möglichkeiten der i.v.-Vorbehandlung der Transplantatempfänger sollte das Immunsystem der Empfängertiere auf das Fremdantigen durch die indirekte Antigenpräsentation der DC vorbereitet werden. Angestrebtes Ziel war die Induktion einer adaptiven Immuntoleranz in Form einer vaskulären Toleranz.

Im besten Fall sollte dieses Ziel durch eine mögliche Induktion aneurer und supprimierender T-Zellen erreicht werden; nämlich einerseits durch die Verabreichung semireifer autologer DC, die zuvor mit apoptotischen Spendermilzzellen beladen worden waren (Abb. 7), oder andererseits direkt durch die Verabreichung apoptotischer Spendermilzzellen (Abb. 8).

### Direkte Immunmodulation durch DC

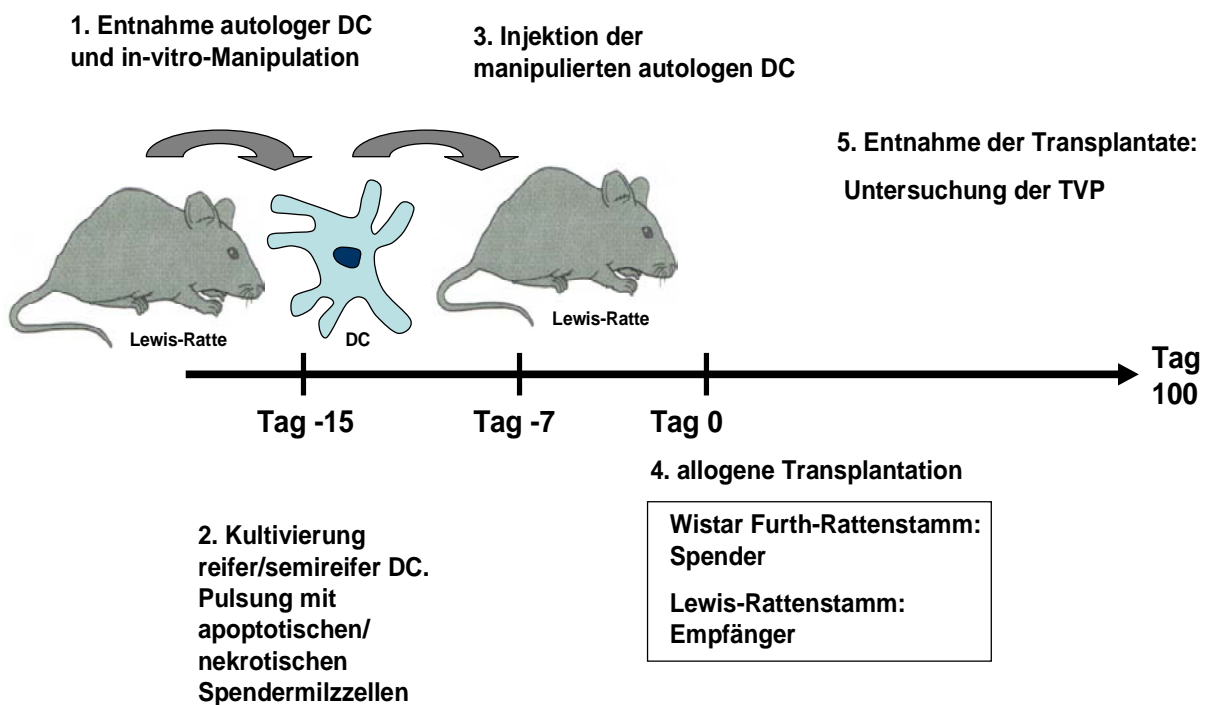


Abbildung 7: Direkte Immunmodulation durch Verabreichung von Spenderantigen präsenternden Empfänger-DC.

## Indirekte Immunmodulation durch DC

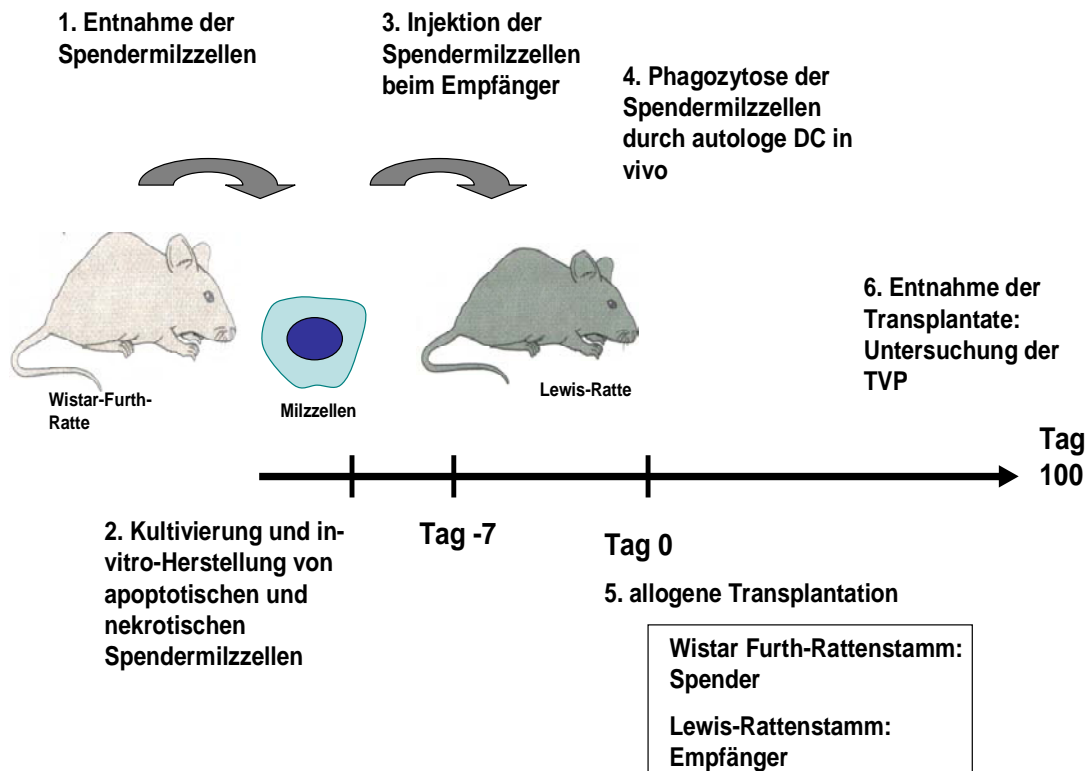


Abbildung 8: Indirekte Immunmodulation durch DC durch direkte Verabreichung von Spenderantigen (Spendermilzzellen, apoptotisch, nekrotisch).

Die Untersuchung der neuen pharmakologischen Substanz SFA (Abb. 6) stützt sich auf die Hypothese, dass DC bei der Abstoßungsreaktion als APC eine entscheidende Rolle spielen. Die derzeitig eingesetzten Immunsuppressiva wirken vor allem über eine Hemmung der T- und B-Lymphozyten als Effektorzellen des antigenspezifischen Immunsystems. SFA hat aufgrund eines anderen Wirkmechanismus nur einen geringen Einfluss auf die T-Lymphozyten. Eine wichtige Funktion besteht in der Blockade der Schlüsselfunktionen dendritischer Zellen (Antigenaufnahme, proinflammatorische Zytokinproduktion). Durch eine Modulation des Fremderkennungsprozesses durch SFA sollte eine bessere Transplantatprotektion erreicht werden, was sich auch langfristig möglicherweise positiv auf das Ausmaß der TVP auswirken könnte. Studien der letzten Jahre zeigten eine Korrelation akuter Abstoßungsepisoden mit der Ausprägung der TVP (Stoica, S.C. et al., 2006). In der vorliegenden Studie diente CSA, der Prototyp der immunsuppressiven Therapie mit weitestgehend bekannten Wirkmechanismen, als Referenzsubstanz.

In der vorliegenden Studie sollte der in-vivo-Effekt von SFA und somit eine pharmakologische Modulation der DC in vivo auf die akute und chronische Abstoßung untersucht werden (Abb. 9).

### In-vivo-Modulation der DC durch SFA

In-vivo-Modulation der dendritischen Zellen durch tägliche subkutane Injektionen von SFA beim Transplantatempfänger

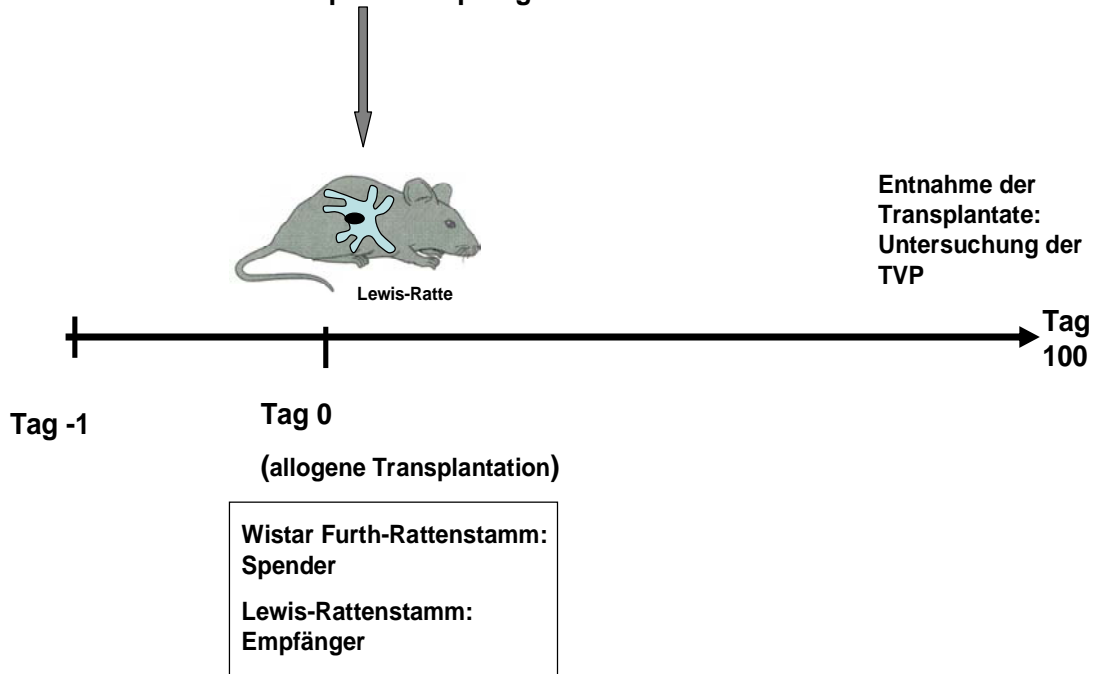


Abbildung 9: Pharmakologische Modulation der DC in vivo durch tägliche Injektionen von SFA.

## Fragestellung

---

Folgende Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit experimentell beantwortet werden:

### I.) Zelltherapeutische Strategie:

1. Lässt sich durch eine Vorbehandlung des Transplantatempfängers mit Spenderzellen (vital, apoptotisch, nekrotisch) das Transplantatüberleben im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe verlängern?
2. Lässt sich durch alleinige Vorbehandlung des Transplantatempfängers mit Spenderzellen (vital, apoptotisch, nekrotisch) ein Langzeittransplantatüberleben erreichen oder benötigt man zum Erreichen des Endpunkts des Beobachtungszeitraumes Tag 100 eine zusätzliche Immunsuppression?
3. Welche Rolle spielen modifizierte autologe dendritische Zellen beim Abstoßungsprozess?
4. Lässt sich durch zelltherapeutische Vorbehandlung mit tolerogenen autologen dendritischen Zellen oder apoptotischen Spenderzellen unter Immunsuppression im chronischen Rattenherztransplantationsmodell eine vaskuläre Toleranz erzeugen, welche sich in geringer ausgeprägter TVP äußert?



II.) Pharmakologische Strategie: Untersuchung der neuen Substanz SFA

1. Wie verhält sich das Transplantatüberleben ohne Immunsuppression? Ab welchem Tag werden die Transplantate abgestoßen?
2. Welche minimale Dosis der Referenzsubstanz CSA ist notwendig, um den Endpunkt Langzeittransplantatüberleben zu erreichen?
3. Lässt sich durch die Immunmodulation mit SFA das Transplantatüberleben verlängern?
4. Zu welchen histologischen Veränderungen kommt es in den Transplantaten im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung?
5. Wie verhält sich die zelluläre Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen (Monozyten, Makropagen und T-Zellen) im zeitlichen Verlauf nach Transplantation (Tag 1, Tag 3, Tag 6, Tag 15)?
6. Welchen Einfluss hat SFA allein bzw. die Kombination SFA und CSA auf die Ausprägung der TVP?

## **3 Material und Methoden**

---

### **3.1 Versuchstiere**

#### **3.1.1 Herkunft**

Als Versuchstiere wurden männliche Inzuchtratten (Tierzuchtlabor Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) eingesetzt. Sämtliche Versuchstiere waren laut Gesundheitszeugnis frei von den gängigen Infektionskrankheiten. Als Organempfänger der heterotopen allogenen Herztransplantationen dienten Lewis Inzuchtratten (LEW, RT11). Die Spenderherzen stammten von Wistar Furth Inzuchtratten (WF, RT1u). Zum Zeitpunkt der Transplantation hatten die Empfängerratten ein durchschnittliches Gewicht von ca. 300 Gramm, die Spendertiere wogen ca. 250 Gramm. Für die isogenen Transplantationen wurden Lewis-Ratten eingesetzt.

#### **3.1.2 Tierversuchsgenehmigung**

Für die Tierversuche lag eine „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ unter dem Aktenzeichen AZ 38/2002 vor.

#### **3.1.3 Tierhaltung**

Während der gesamten Dauer der Experimente wurden die Ratten in Gruppen von höchstens sechs Tieren in Käfigboxen in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Ernährung erfolgte während des gesamten Zeitraumes, auch direkt prä- und postoperativ, mit Trinkwasser und pelletierter Fertignahrung (Harlan Teklad Global Diet, Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland) ad libitum.

## **3.2 Tierexperimenteller Teil**

Zur Untersuchung der Effekte der in der Studie eingesetzten modifizierten Zellen bzw der neuen pharmakologischen Substanz SFA diente ein vollständig allogenes heterotopes Rattenherztransplantationsmodell. Hierbei handelt es sich um ein Standardmodell, bei der im Gegensatz zur orthotopen Transplantation das Transplantat intraperitoneal an den Kreislauf angeschlossen wird (Schmid, C. et al., 1994).

### **3.2.1 Operationstechnik der heterotopen Transplantation**

Die heterotope Transplantation setzte sich aus drei Teilen zusammen. Zuerst erfolgte die Vorbereitung des Empfängertieres, anschließend die Entnahme des Transplantates aus dem Spendertier, woraufhin die eigentliche Transplantation beginnen konnte.

Sämtliche Eingriffe an den Versuchstieren mit Ausnahme der täglichen subkutanen Injektionen erfolgten unter Vollnarkose. Prinzipiell wurde für kurze Narkosen (Transplantatentnahme) ausschließlich das Inhalationsnarkotikum Isofluran (Forene®) verwendet. Die länger andauernde Herztransplantation wurde durch die Injektionsnarkose (Ketamin: 80-100 mg/kg KGW, Xylazinhydrochlorid: 5-10 mg/kg KGW) eingeleitet und mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran aufrechterhalten.

Zur Vorbereitung des Empfängertieres wurde dieses in Rückenlage gebracht. Nach Hautinzision und medianer Laparotomie in der Linea alba wurde die Bauchwand großzügig eröffnet und das Darmkonvolut nach extraabdominal verlagert. Hiernach erfolgte die vorsichtige Präparation, Darstellung und Trennung der großen Bauchgefäße Aorta abdominalis und Vena cava caudalis. Nach Anbringen der Stauschlingen und des Arterienclips an Arterie und Vene erfolgte die Eröffnung der Arterie per Quer- und Längsinzision. Nach Freispülen des Gefäßlumens mit 0,9%iger NaCl-Lösung und Einziehen des mikrochirurgischen Nahtmaterials (Nadel-Faden-Kombination, Prolene® 0,5metric, 7-0) jeweils am kranialen und kaudalen Wundwinkel, wurde das Transplantat beim Spendertier entnommen.

Bei diesem erfolgte nach medianer Laparotomie, Eröffnung des Zwerchfells und anschließender Aufklappung des Thorax nach kranial die Freipräparation des Herzens. Nach Durchtrennung der großen Bauchgefäße des Spendertieres begann die Ischämiezeit des Transplantates. Zunächst wurden die Vena cava caudalis und cranialis kurz vor ihrer Mündung in den rechten Vorhof ligiert. Anschließend wurden die beiden zu anastomosierenden Gefäße, der Truncus pulmonalis und die Aorta descendens, mit einem schnellen Scherenschlag gerade durchtrennt. Danach wurden mittels Massenligatur die verbleibenden Gefäße, einschließlich der Lungenvenen, ligiert. Das so entnommene Herz wurde nun mit physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig mit Druck antegrad durch die Aorta perfundiert, wobei mit der Kanülenspitze sämtliche Klappen zerstört wurden. Auf diese Weise wurden die Koronargefäße freigespült, was sich durch eine Blassfärbung des Herzens zeigte. Während der gesamten Ischämiezeit wurde das Transplantat in regelmäßigen Abständen mit Kochsalzlösung befeuchtet.

Das entnommene Transplantat wurde nun in Anlehnung an die Technik von Ono, K. und Lindsey, E.S., (1969) modifiziert nach Schmid, C. et al. (1994) mittels mikrochirurgischer Technik und unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Zeiss Universal S3, 12,5 fache Vergrößerung) End-zu-Seit kaudal der Nierengefäße an die vorbereiteten Gefäße des Empfängertieres angeschlossen (Abb. 10, Abb. 11).

Nach Separation der beiden Bauchgefäße des Empfängers kaudal der Nierengefäße (Abb. 10 A) erfolgte zuerst die End-zu-Seit Anastomosierung der Aorta des Spenders an die Aorta abdominalis (Abb. 10 B, Abb. 11) des Empfängers. Anschließend wurde die Pulmonalarterie des Spenders an die Vena cava caudalis des Empfängers anastomosiert (Abb. 10 C).

Das Lösen der Stauschlingen hatte die Reperfusion des Transplantates zur Folge, woraufhin sich die Koronargefäße sogleich mit Blut füllten. Innerhalb einer Minute begann das Herz spontan zu schlagen. Nun endete auch die Ischämiezeit des Transplantates, die im Durchschnitt zwischen 30-45 min betrug.

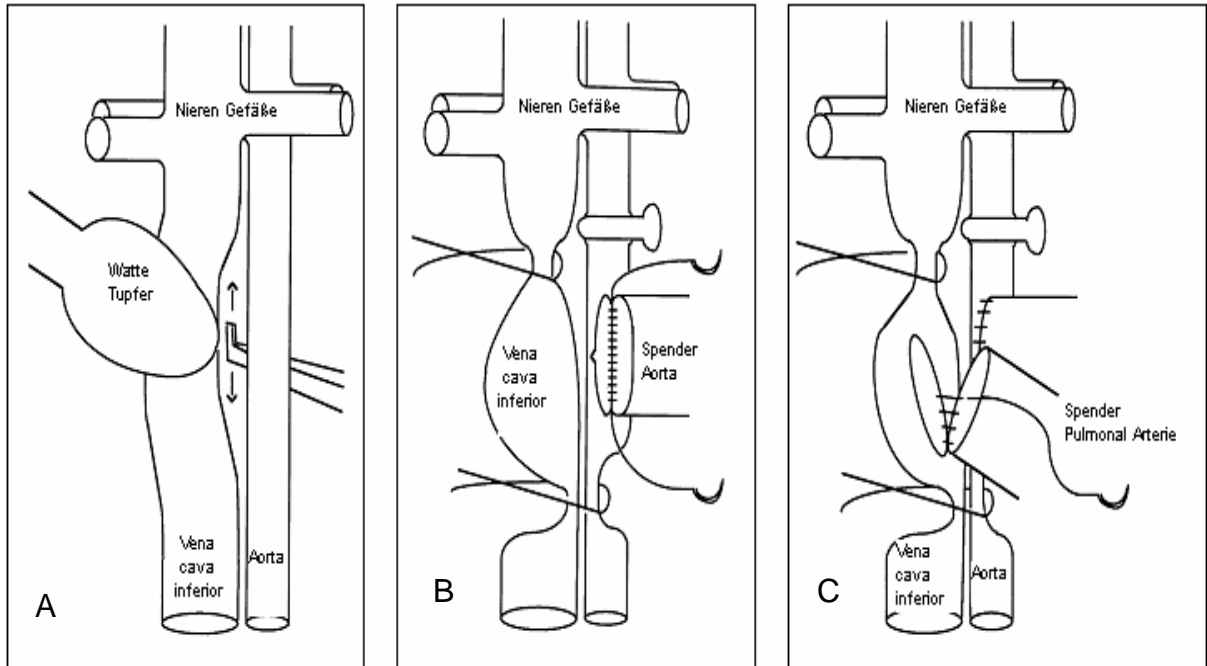


Abbildung 10: Chirurgische Technik der heterotopen Herztransplantation modifiziert nach Schmid, C. et al., 1994.

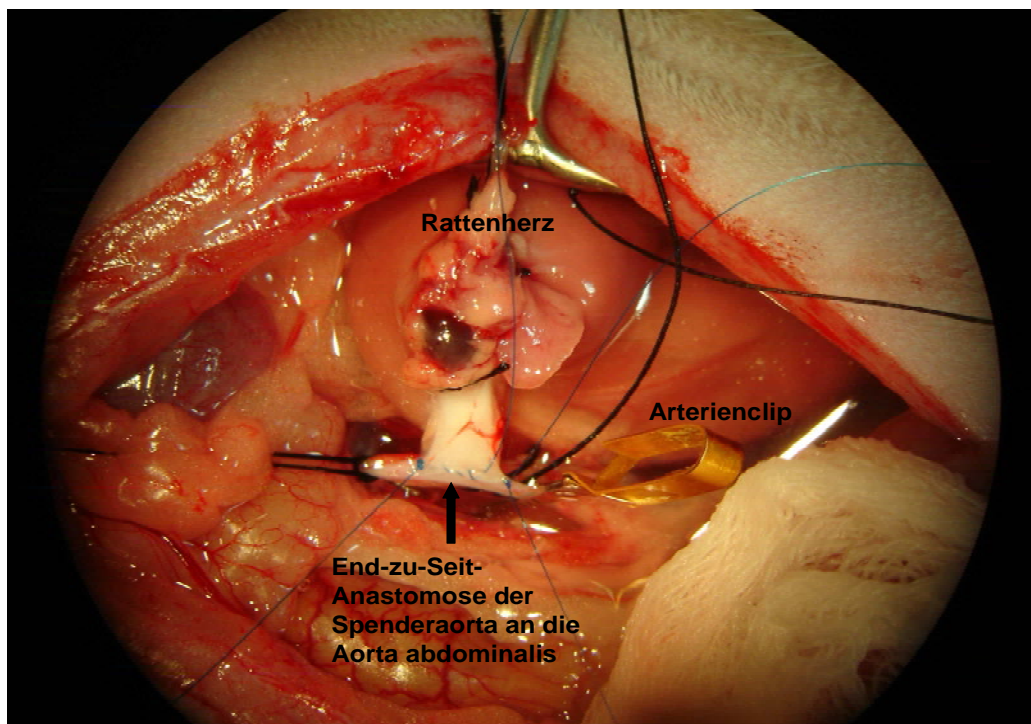


Abbildung 11: Operationstechnik der heterotopen Herztransplantation intra operationem (Ansicht durch das Operationsmikroskop, Primärvergrößerung x 1,25).

Aufgrund der heterotopen Lage des Herzens handelt es sich um ein „non working heart model“. Dies bedeutet, dass das Herz weder gegen den physiologischen Druck arbeiten muss noch physiologisch perfundiert wird. Vielmehr wird das arterielle Blut dem Transplantat via Aorta abdominalis über den Aortenstumpf zugeführt. So werden der linke Vorhof und die linke Kammer retrograd gefüllt und die Koronargefäße, die direkt oberhalb der Semilunarklappen an der Aorta im sog. Bulbus aortae entspringen, werden gleichzeitig mit arteriellem Blut versorgt. Hiermit ist die arterielle Versorgung der Koronarien über das kapillare Bett gewährleistet. Das Blut wird dann auf der venösen Seite des Kapillarsystems gesammelt und gelangt über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof und daraufhin in den rechten Ventrikel. Von hier wird das Blut über die venöse Anastomose bestehend aus dem Stumpf des Truncus pulmonalis und der Vena cava caudalis zurück in den Körperkreislauf gepumpt. So erhält man in den beiden Herzhälften ein Pendelblutvolumen. Dies ist seit der Erstbeschreibung durch Ono, K. und Lindsey, E.S., (1969) ein Standardmodell zur Untersuchung der immunologischen Phänomene der Transplantatabstoßung bei der Ratte.

### 3.2.2 Postoperative Nachsorge und Kontrolle der Transplantatfunktion

Alle Tiere wurden täglich auf den postoperativen Allgemeinzustand und mögliche Wundinfektionen hin untersucht. Zudem erfolgten regelmäßige Gewichtskontrollen. Die Transplantatfunktion wurde täglich durch manuelle Palpation durch die Bauchdecke kontrolliert (Tabelle 3) und nach folgendem international anerkanntem Schema beurteilt (Schmid, C. et al., 1994):

Tabelle 3: Palpationsschema

Grad	Transplantatfunktion
0	Keine spürbare mechanische Herzaktion palpierbar nach Abdomeneröffnung  Keine Kontraktilität des Transplantates sichtbar
1	Minimale Kontraktion palpierbar, rhythmische Restaktivität nach Abdomeneröffnung erkennbar
2	Rhythmische Kontraktionen palpierbar
3	Kräftige rhythmische Kontraktion palpierbar, bei narkotisierten Tieren sieht man das Transplantat durch die Bauchdecke schlagen

Durch die tägliche Kontrolle der Transplantatfunktion können Aussagen über das Transplantatüberleben und die Abstoßung getroffen werden. Das Überleben des Transplantates ist definiert als der letzte Tag mit mechanischer Pumpfunktion des transplantierten Herzens, welcher nach palpatorischer Beurteilung durch Laparotomie verifiziert wird. Ein Transplantat galt als abgestoßen, wenn erstmals keine Kontraktion mehr zu spüren und zu sehen war.

### **3.2.3 Immunsuppression**

Die Immunsuppression erfolgte in Anlehnung an das jeweilige Protokoll (Kap. 3.6.2 und Kap. 3.7; Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18). Im chronischen Modell wurde allen Tieren ab dem Zeitpunkt der Operation bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (100 Tage post operationem) täglich das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Sandimmun®, Sandoz, Ltd., Basel, Schweiz) subkutan verabreicht.

Der zu testende Immunmodulator Sanglifehrin A (SFA) wurde in den im jeweiligen Protokoll angegebenen Konzentrationen angewendet (Kap. 3.7; Tabelle 17, Tabelle 18). SFA (Novartis, Basel, Schweiz) wurde zur Herstellung einer Stammlösung in absolutem Ethanol gelöst und am Tage des Experimentes mit 2,5 % Polysorbat 80, 51 % PEG 300 und 46,5 % sterilem Wasser verdünnt (Reagenzien von Sigma Aldrich, Seelze; Hackstein, H. et al., 2007).



### **3.2.4 Organentnahme und Aufbewahrung**

Die Entnahme der transplantierten Organe erfolgte je nach Protokoll 1, 3, 6, 15 oder 100 Tage nach Transplantation. Unter Isoflurannarkose wurde bei dem auf dem Rücken fixierten Tier das Abdomen großflächig eröffnet, das Transplantat aufgesucht, freipräpariert und die Funktion noch einmal abschließend beurteilt. Nach Entnahme wurde das Transplantat anschließend mit Kochsalzlösung retrograd durch die beiden Gefäßstümpfe sorgfältig gespült. Nach Entfernung der Vorhöfe proximal der Atrioventrikularklappen wurde das Herz durch Transversalschnitte bis auf die Herzspitze in drei gleich dicke Scheiben geteilt. Diese wurden dann auf Korkplättchen mit Hilfe des Gewebeklebers Tissue-Tek® (O.C.T, 4583 Compound, Sakura Fine technical Europe) geklebt und daraufhin in Isopenthan, einem primären Kryogen, schockgefroren. Dieses wurde vorher so lange in flüssigem Stickstoff gekühlt, bis sich Kristalle gebildet hatten (ca.5 min). Die so gewonnenen Proben wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gepackt und dieses in flüssigen Stickstoff transportfähig gemacht. Die Herzspitze wurde in vier gleich große Teile zerlegt, diese in Safe-lock-Tubes® gegeben und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung der Proben wurden diese bei -80°C gelagert.

### **3.3 Histologische Untersuchung**

Für die histopathologischen und die immunhistologischen Färbungen wurden 6 µm dicke Gewebeschnitte, die mittels eines Kryostaten angefertigt wurden, verwendet. Nach 10 minütiger Fixierung in 4°C kaltem Aceton wurden die Schnitte bis zur endgültigen Färbung bei -20°C gelagert.

#### **3.3.1 Hämatoxylin-Eosin/Elastika-Färbung**

Für die histopathologische Beurteilung und Auswertung der Transplantat-abstoßungsreaktion und der Transplantatvaskulopathie wurde eine Elastika-Färbung an den 6 µm dünnen Gewebeschnitten durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst für 24 Stunden in Resorcin-Fuchsin-HCl-Alkohol nach Hart (Chroma, Münster, Deutschland; Tabelle 4) eingelegt und anschließend zusätzlich mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Van-Gieson-Lösung gefärbt (Tabelle 5).

Diese Färbemethode ermöglicht eine gute Darstellung der Gefäßstruktur. Zum einen erkennt man den mehrschichtigen Aufbau der Gefäße und zum anderen werden elastische Strukturen wie die Membrana elastica interna intensiv angefärbt (Tabelle 6). Dies erleichtert die anschließende histologische Beurteilung. Die Präparate wurden mit einem Standardlichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei einer 100-fachen Vergrößerung untersucht.

Tabelle 4: Herstellung der Resorcin-Fuchsin-HCl-Alkohol-Lösung

Chemikalien	Hersteller
5ml Weigerts Resorcin-Fuchsin	Chroma, Münster, Deutschland
96g 70% Alkohol	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
3,6ml 25% HCL	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland

Tabelle 5: Herstellung der Van-Gieson-Lösung

Chemikalien	Hersteller
60ml gesättigte Pikrinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
2ml 2% Säurefuchsin	Fluka, Basel, Schweiz
1ml 1% Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Ergebnis der Färbung

Farbergebnis	Struktur
Violett-schwarz	Elastische Fasern
Rot	Bindegewebe
Gelb	Muskulatur
braun-schwarz	Kerne
Gelb	Erythrozyten

### 3.3.2 Immunhistologische Färbung

In der vorliegenden Studie wurde die hoch sensitive labelled Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode verwendet (Abb. 12). Hierbei nutzt man die starke Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin. Hier verbindet sich ein biotinylierter Sekundärantikörper mit den enzymmarkierten (hier die Alkalische Phosphatase) Streptavidinmolekülen. Das Enzym reagiert in einem nächsten Schritt mit der Substrat-Chromogenlösung zu einem sichtbaren Präzipitat an der Stelle des gesuchten Antigens. Das übliche Substrat für die alkalische Phosphatase in der Immunhistochemie ist Naphthol-AS-Phosphat.

#### Labelled Streptavidin- Biotin (LSAB) –Methode

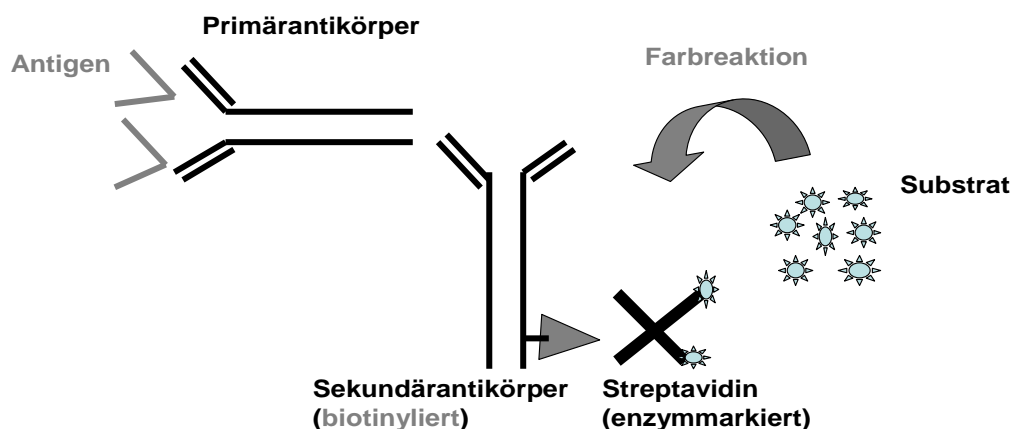


Abbildung 12: Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode.

Zu Beginn der Färbung wurden die 6 µm dünnen Gewebeschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde das Gewebe vor dem Auftragen des Primärantikörpers mit Rattenserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) im Verhältnis 1:100 inkubiert. Folgende Primärantikörper fanden in dieser Studie Verwendung (Tabelle 7):

Tabelle 7: Primärantikörper zum Nachweis der angeführten Oberflächenantigene.

Primärantikörper	Marker für	Hersteller
ED-1 (Mouse-anti-rat ED-1 IgG)	Oberflächenmoleküle auf Monozyten/Makrophagen	Serotec, Oxford, England
MHC-II (Mouse-anti-rat MHC-II IgG)	Oberflächenmoleküle auf MHC-II-positiven Zellen	Serotec, Oxford, England
TCR (Mouse-anti-rat R 73, TCR alpha/beta IgG)	Oberflächen-Rezeptor-Moleküle der T-Zellen	Serotec, Oxford, England

Die Primärantikörper wurden mit einem speziell zubereiteten RPMI 1640-Medium (Tabelle 9) in einem bestimmten Verhältnis verdünnt (Tabelle 8). Pro Schnitt wurden jeweils 100 µl Primärantikörperlösung aufgetragen. Die einzelnen Primärantikörper wurden unterschiedlich lange und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (Tabelle 8). Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit der biotinylierten Sekundärantikörperlösung (Link) und anschließend mit der Lösung aus Streptavidin, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, versetzt (beide Lösungen aus dem Dako LSAB 2 System Alkaline Phosphatase Kit; Dako Corporation, Carpinteria, USA) (Inkubationszeiten laut Tabelle 8).

Tabelle 8: Angaben zum Einsatz der Primärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung (mit modifiziertem RPMI 1640, Tabelle 9)	Zeit und Temperatur der Inkubation	Link/ Streptavidinlösung
ED-1	1:300	24 h bei 4 °C	Je 10 min
MHC II	1:30	4h bei RT	Je 10 min
TCR	1:30	4h bei RT	Je 15 min

Tabelle 9: Herstellung des modifizierten RPMI-Mediums.

Chemikalien	Hersteller
50ml RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
450ml Aqua dest	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
50ml inaktiviertes Rinderserum	Biowest, Nuaille, Frankreich
0,5g Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten drei Mal zweiminütiges Waschen mit einer Tris-HCl-gepufferten Kochsalzlösung (Tabelle 10; Tris-Base und Tris-HCL, Sigma, NaCl, Serva, pH:7,4-7,6).

Tabelle 10: Herstellung des Tris-Puffers.

Chemikalien	Hersteller
1,8g Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
13,7g Tris HCL	USB, Cleveland Ohio, USA
17,5g NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ad 2l Aqua dest.	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland

Anschließend wurden die Präparate für 30 min in eine Neufuchsin-haltige Entwicklerlösung (Tabelle 11) gegeben, um die antikörpermarkierten Zellen sichtbar zu machen. Die Entwicklerlösung musste vor jeder Färbung neu angesetzt werden.

Die Herstellung der Entwicklerlösung (Tabelle 11) erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Sie umfasste folgende Schritte: Glas C wurde zu Glas A gegeben und gemischt; danach wurde der Inhalt von Glas B dazu geben und der pH Wert auf 8,7 eingestellt. Vor Gebrauch wurde diese Entwicklerlösung filtriert.

Tabelle 11: Herstellung der Entwicklerlösung

Glas A: Entwicklerlösung (für 60ml bestehend aus 2 Lösungen)		
Lösung 1 (44ml)	4,9g Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	1,5g Tris HCL	USB, Cleveland Ohio, USA
	8,7g NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Ad 1l Aqua bidest	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Lösung 2 (15,5ml)	25mg Aminomethylpropandiol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	Ad 1l Aqua bidest	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Glas B		
	31mg Naphtol-As-Bi-Phosphat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	375µl Dimethylformamid	Label ident, Schweinfurt, Deutschland



Glas C		
	12,8mg Na-Nitrit	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	320µl Aqua bidest	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
	5g Neufuchsin	Fluka, Basel, Schweiz
	100ml 2N HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland

Nach anschließender Spülung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 25 Sekunden (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland), um die Zellstrukturen sichtbar zu machen. Eine Rotfärbung bedeutete die positive Detektion der Zielzellen. Abschließend wurden die Schnitte mit Glycergel Mounting Medium (Dako Corporation, Carpitoria, USA) eingedeckelt.

### **3.4 Zelltherapeutischer in-vitro-Teil**

Die Aufbereitung, Kultivierung und Fertigstellung der Zellsuspensionen zur intravenösen Verabreichung an die Empfängertiere erfolgte durch die Mitarbeiter im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Effekte der Zelltherapie im Rattenherztransplantationsmodell.

#### **3.4.1 Gewinnung von dendritischen Zellen**

Zur Gewinnung von DC wurden zunächst Knochenmarkzellen aus den Femurknochen des Empfängerrattenstammes (Lewis) isoliert. Nach Entnahme beider Femurknochen und Entfernung grober Gewebereste erfolgte die Aufnahme in PBS (PAA, Pasching, Österreich) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen. Anschließend wurde zuerst das distale Ende des Femurknochens mit einer Knochenschere eröffnet und 7 min in 25 ml PBS + 250 µl Gentamicin (PromoCell; Heidelberg) inkubiert. Dann erfolgte die Eröffnung des proximalen Endes und vorsichtiges Aufsuchen des Knochenmarkkanales mit einer 20 G Nadel. Nach Punktion des Kanales erfolgte die Spülung mit 25 ml PBS + 250 µl Gentamicin (PromoCell; Heidelberg). Daraufhin wurde die so gewonnene Lösung durch einen Sterilfilter (BD Falcon, Cellstrainer 70 µm, Bedford, USA) gegeben und das gewonnene Material 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Resuspension mit 1 ml eiskaltem RBC-Lysis Solution (Qiagen, Basel, Schweiz) versetzt. Nach 2 min erfolgte die Abstopfung mit 50 ml Dendritenmedium. Jetzt wurde nochmals 5 min bei 300 x g zentrifugiert und die so gewonnenen Zellen in frischem Medium (Tabelle 12) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung und die weitere Kultivierung der Zellen.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Zellkultur für die Kultivierung von dendritischen Zellen.

Substanz	Benötigtes Volumen (ml)	Hersteller, Ort
RPMI 1640	25 ml	PAA, Pasching, Österreich
FCS (101)	5 ml	PAA, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	5 ml	Carlsbad, California, USA
NAS	5 ml	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES	5 ml	Carlsbad, California, USA
Penicillin/Streptomycin	5 ml	PAA, Pasching, Österreich

Für die Studie wurden dendritische Zellen der Transplantatempfänger in unterschiedlichen Reifestadien verwendet (Tabelle 13, Tabelle 14).

A) Kultivierung voll ausgereifter dendritischer Zellen („reife“ DC)

Die Kultivierung der DC der Empfänger wurde durch Zugabe verschiedener Zytokine (PromoCell, Heidelberg, Deutschland, Tabelle 13) induziert.

Tabelle 13: Kultivierung voll ausgereifter dendritischer Zellen („reife“ DC).

Aufbereitung	Zytokinzugabe (sofortige Ergänzung)	Inkubation	Medium- wechsel an Tag	Hersteller (Zytokine)
Kultivierung: in 6- Well Platten, 3ml/Well  Konzentration: $1 \times 10^6$ Vorläuferzellen/ ml.	rR-GM-CSF (5ng/ml)  rR-IL-4 (5ng/ml)  rR-FLT3- Ligand (25ng/ml)	8 Tage bei 37°C und 4% CO <sub>2</sub>	3, 5 und 7	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Der erste Mediumwechsel erfolgte an Tag 3, wobei 1,5 ml Medium pro Well vorsichtig aspiriert und in einem 50 ml Falcon Röhrchen gesammelt wurde. Anschließend wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Hiernach wurde das Pellet dann in äquivalenter Menge Medium aufgenommen, gut gemischt und 1,5 ml pro Well wieder zu den Platten hinzugegeben. Darauf folgte die erneute Hinzugabe der Zytokine. Beim zweiten und dritten Mediumwechsel wurden jeweils pro Well 1,5 ml Medium abgenommen und verworfen. Es folgte dann die Auffüllung mit 1,5 ml frischem Medium und anschließend die Hinzugabe der Zytokine (Tabelle 13).

B) Kultivierung unvollständig ausgereifter DC („semireife“ DC):

Die Ausreifung der DC der Empfänger wurde durch Zugabe verschiedener Zytokine (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) zu definierten Zeitpunkten beeinflusst: Die Unterbrechung der Ausreifung erfolgte an Tag drei durch die Gabe von Interleukin 10 (Tabelle 14).

Tabelle 14: Kultivierung unvollständig ausgereifter dendritischer Zellen („semireife“ DC).

Aufbereitung	Zytokinzugabe (sofortige Ergänzung)	Zytokin- zugabe an Tag 3	Zugabe von SFA an Tag 7	Inkubation	Medium- wechsel an Tag
Kultivierung: in 6-Well Platten, 3ml/Well  Konzentration: 1x10 <sup>6</sup> Vorläufer- zellen/ ml.	rR-GM-CSF (5ng/ml)  rR-IL-4 (5ng/ml)  rR-FLT3- Ligand (25ng/ml)	rR-IL10 (10ng/ml)  rH-TGF-β (10 ng/ml)	1μmol	8 Tage bei 37°C und 4% CO <sub>2</sub>	3, 5 und 7

Der Reifegrad der dendritischen Zellen wurde mittels FACS-Analysen kontrolliert, die im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg erfolgte. Kriterium war in erster Linie die Expression der Oberflächenmoleküle CD 80, CD 86 und des MHC-II-Komplexes. Die tolerogenen DC sind durch eine reduzierte Ausstattung mit MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen (CD 40, CD 80, CD 86) und durch eine reduzierte IL-12 und vermehrte IL-10 Produktion charakterisiert und befinden sich in einem frühen Reifestadium (Lutz, M.B. und Schuler, G., 2002; Penna, G. et al., 2005).

### 3.4.2 Gewinnung von Milzzellen

Nach Entnahme der Milz aus dem Spendertier (allogener Rattenstamm Wistar Furth) wurde diese per Spritze mehrmals mit sterilem Medium durchspült bis die austretende Flüssigkeit klar erschien. Anschließend wurde die Milz in kleine Stücke zerschnitten und diese Lösung durch einen Sterilfilter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Nun wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 1 ml RBC-Lysis Solution gelöst und nach 2 min der Lysevorgang mit 50 ml Dendritenmedium abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 300 x g) wurde der Überstand verworfen. Aus diesem Pellet wurden anschließend nekrotische oder apoptotische Zellen hergestellt.

Zur Herstellung von nekrotischen Milzzellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$ / ml wurde das Pellet in PBS aufgenommen. Von dieser Lösung wurde je 1 ml in ein Kryoröhrchen gegeben und 3 Mal hintereinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut.

Zur Gewinnung apoptotischer Zellen in derselben Konzentration ( $5 \times 10^6$ / ml) wurde das Pellet in Dendritenmedium resuspendiert und je 1 ml der Lösung in eine 6 Well-Platte gegeben. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Platte (ohne Deckel) mit 0,01J UVB.

### 3.4.3 Pulsung der dendritischen Zellen

Zur Pulsung wurden 8 Tage alte dendritische Zellen des Empfängers (unvollständig ausgereift: „semireif“ oder vollständig ausgereift: „reif“, Kap. 3.4.1; Tabelle 13, Tabelle 14) aus allen Kulturansätzen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Hiernach erfolgte die Aufnahme der Zellen in frisches Medium (Konzentration:  $5 \times 10^6$ / ml).

In einem zweiten Schritt erfolgte die Herstellung apoptotischer oder nekrotischer Spendermilzzellen (Konzentration:  $5 \times 10^6$ / ml) und die Verteilung von jeweils 1 ml auf eine 6-Well-Platte. In jedes Well wurde dann 1 ml DC-Zellsuspension ergänzt. Dieser Zellsuspension aus dendritischen Empfängerzellen und apoptotischen bzw nekrotischen Spendermilzzellen wurden die Zytokine rR-GM-CSF (5ng/ml), rR-IL-4 (5ng/ml) und rR-FLT3-Ligand (25ng/ml) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) zugesetzt und anschließend wurde 24h bei 37°C und 4 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach der Übernacht-Kultur wurden die gepulsten DC vorsichtig abpipetiert, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und das Pellet in PBS aufgenommen, aliquotiert und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Diese Zellsuspensionen wurden den Transplantatempfängern 7 Tage vor der Transplantation i.v. in die Penisvene injiziert.

### **3.5 Versuchsaufbau**

Die vorliegende Studie setzte sich aus einem in-vivo- und einem in-vitro-Teil zusammen, die dazu dienen sollten, die Effekte der Zelltherapie mit modulierten dendritischen Zellen bzw. der pharmakologischen Modulation dendritischer Zellen mit SFA sowohl auf die akute als auf die chronische Abstoßung hin zu untersuchen.

#### **3.5.1 In-vivo-Teil: Bestimmung des Transplantatüberlebens**

Bei beiden Ansätzen sollte zunächst deren Effekt auf die akute Abstoßung untersucht werden. Hier wurde in einem ersten Schritt das Transplantatüberleben bestimmt. Die Bestimmung des Transplantatüberlebens dient zur Abklärung der Effektivität der eingesetzten Substanz (pharmakologisch/ nicht pharmakologisch): findet man einen überlebensverlängernden Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe?

#### **3.5.2 In-vitro-Teil: Untersuchung der akuten und chronischen Abstoßung**

Für die in-vitro-Untersuchungen wurden zunächst Herzen transplantiert und die Empfängertiere je nach Protokoll immunsupprimiert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Entnahme funktionierender Transplantate zu definierten Zeitpunkten nach der Transplantation, um o.g. in-vitro-Untersuchungen (Histologie und Immunhistologie) durchführen zu können. Hierzu wurden im Akutmodell Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 15 herangezogen, die es ermöglichten, die Früh-, Intermediär- und Spätphase nach der Transplantation labortechnisch zu untersuchen. Zur Untersuchung des Effektes der beiden Ansätze auf die Langzeitfolgen nach Herztransplantation, die sich in Form der TVP äußern, wurde das chronische Modell herangezogen. Hierbei wurden den Empfängertieren tägliche immunsuppressive Gaben in therapeutischen Dosen verabreicht, um den Endpunkt des Beobachtungszeitraumes Tag 100 zu erreichen. Nach 100 Tagen erfolgte dann die histologische Untersuchung der TVP.



### **3.5.3 Vorbehandlung der Transplantatempfänger**

Bei beiden Versuchsansätzen wurden die Empfängertiere je nach den im Anschluss beschriebenen Protokollen subkutan (SFA/ CSA) oder intravenös (Zelltherapie: 1 ml Zellsuspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen in die Penisvene) vorbehandelt (Kap. 3.6 und Kap. 3.7, Tabelle 15, Tabelle 16, Tabelle 17).

### 3.6 Zelltherapeutischer Ansatz

Bei der Zelltherapie wurden die experimentellen Gruppen intravenös mit einer Zellsuspension ( $5 \times 10^6$  Zellen) sieben Tage vor der Transplantation vorbehandelt (Abb. 13).

#### 3.6.1 In-vivo-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die akute Abstoßung

Zunächst sollte der Effekt der i.v.-Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit Spendermilzzellen auf das Überleben der Transplantate getestet werden (Abb. 13, Tabelle 15). Hierzu wurden vitale, apoptotische oder nekrotische Spendermilzzellen ausgewählt und den Transplantatempfängern sieben Tage vor Transplantation intravenös appliziert (Abb.13). Die Transplantatempfänger erhielten keine medikamentöse Immunsuppression. Hier sollte herausgefunden werden, ob die Zelltherapie mit Spenderzellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (ohne Immunmodulation) einen verlängernden Effekt auf das Transplantatüberleben hat.

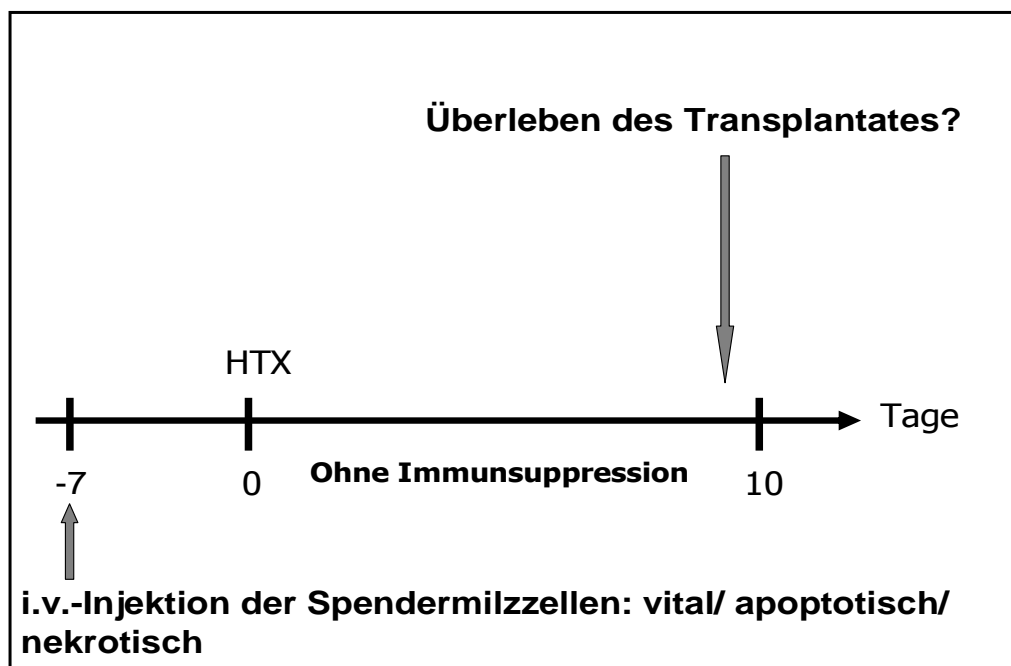


Abbildung 13: Ermittlung der Überlebenszeit des Transplantates nach Zelltherapie.

Tabelle 15: Versuchsgruppen zur Bestimmung des Transplantatüberlebens bei der Zelltherapie

Protokoll der Versuchsgruppen	n=
Kontrolle Akut	5
Vitale Spendermilzzellen	6
Nekrotische Spendermilzzellen	7
Apoptotische Spendermilzzellen	7

n= Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.

Die Gewinnung, Kultivierung und Herstellung der Spendermilzzellen erfolgte entsprechend den Angaben aus Kap. 3.4.2. Sieben Tage vor Transplantation erfolgte die intravenöse Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit den Spendermilzzellen (jeweils 1 ml Zellsuspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen).

### **3.6.2 In-vitro-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

Zur Induktion von Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 erfolgte eine zusätzliche basale CSA-Immunsuppression in einer Dosierung von 1,25 mg/kg KGW. Auf diese Weise sollte der Effekt der Zelltherapie auf die Ausprägung der TVP untersucht werden (Abb. 14).

Bei den Versuchsgruppen erfolgte die intravenöse Vorbehandlung der Transplantatempfänger sieben Tage vor der Transplantation, bei der jeweils 1 ml Zellsuspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen in die Penisvene injiziert wurden (Abb. 14).

Zum einen wurden manipulierte Empfänger-DC mit unterschiedlichen Reifegraden und unterschiedlicher Beladung mit apoptotischen bzw. nekrotischen Spendermilzzellen den Transplantatempfängern injiziert. Zum anderen erfolgte die i.v.-Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit apoptotischen bzw. nekrotischen Spendermilzzellen. Zusätzlich erhielten alle Transplantatempfänger eine Immunsuppression mit Cyclosporin A (CSA) ab dem Tag der Transplantation. An Tag 100 erfolgte die Entnahme der Transplantate und deren histologische Auswertung.

Bei der Studie sollten die beiden Möglichkeiten der DC-Technologie getestet werden (Kap. 2.6; Abb. 7, Abb. 8).

Bei der Zelltherapie mit dendritischen Zellen sind hier zwei Versuchsansätze zu unterscheiden: Die direkte bzw. indirekte Immunmodulation durch DC.

Bei der direkten Immunmodulation durch DC sollte eine Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit Empfänger-DC, die mit nekrotischen Spendermilzzellen beladen worden waren, mit dem Effekt einer Vorbehandlung mit Empfänger-DC, verglichen werden, die mit apoptotischen Spendermilzzellen beladen worden waren. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss verschiedener Reifegrade und Beladungsformen der Empfänger-DC untersucht.

Hierbei wurden zum einen unvollständig ausgereifte, hier bezeichnet als „semireife“ Empfänger-DC und vollständig ausgereifte Empfänger-DC, hier als „reife“ DC bezeichnet (Herstellung siehe Kap. 3.4.1. bis 3.4.3.) mit nekrotischen Spendermilzzellen beladen. Im anderen Versuchsansatz wurden die „semireifen“ und „reifen“ Empfänger-DC mit apoptotischen Spendermilzzellen beladen (Kap. 2.6; Abb. 7, Tabelle 16).

Die indirekte Immunmodulation durch DC in vivo sollte durch die i.v.-Verabreichung von apoptotischen und nekrotischen Spendermilzzellen erfolgen (Kap. 2.6, Abb. 8; Tabelle 16). Alle Transplantatempfänger erhielten eine tägliche Immunsuppression (Tabelle 16).

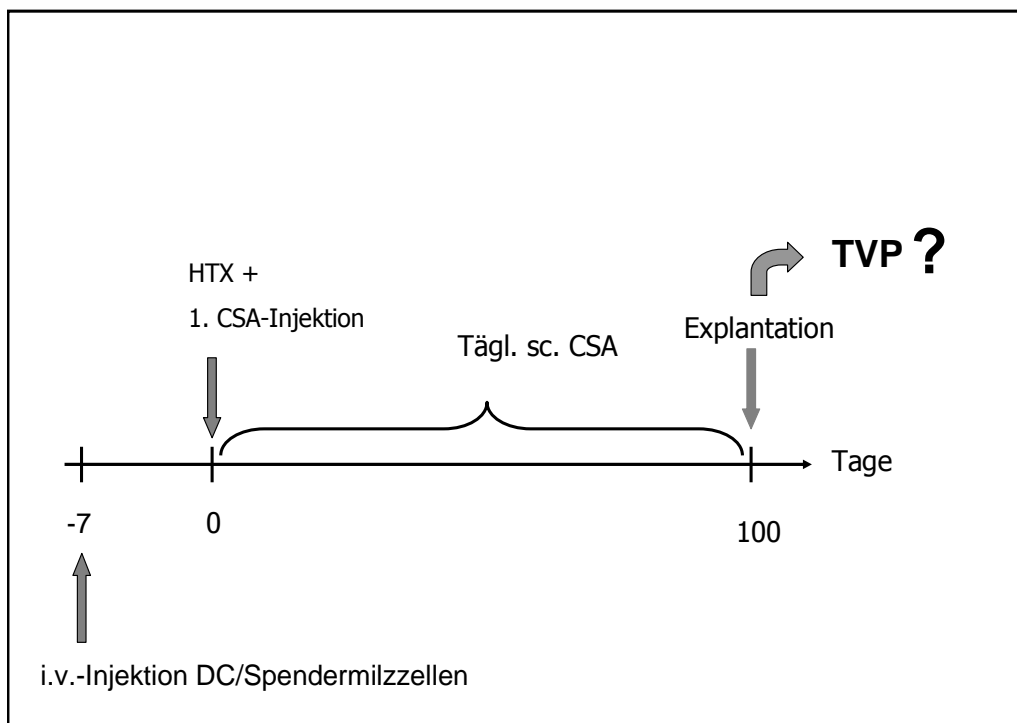


Abbildung 14: Ermittlung des Einflusses der Zelltherapie auf die Entstehung der Transplantatvaskulopathie (TVP).

Tabelle 16: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Transplantatvaskulopathie nach Zelltherapie bei zusätzlicher Immunsuppression.

Protokoll der Versuchsgruppen	CSA mg/kg KGW	Explantation an Tag	n=
Native Kontrollherzen des Spenders (nicht transplantiert)	-	-	4
1. Kontrolle CSA 1,25 (ohne Zelltherapie)	1,25	100	6
2. Semireife dendritische Zellen (Empfänger) gepulst mit nekrotischen Spendermilzzellen	1,25	100	4
3. Reife dendritische Zellen (Empfänger) gepulst mit nekrotischen Spendermilzzellen	1,25	100	7
4. Nekrotische Spendermilzzellen	1,25	100	6
5. Semireife dendritische Zellen (Empfänger) gepulst mit apoptotischen Spendermilzzellen	1,25	100	6
6. Ungepulste dendritische Zellen (Empfänger)	1,25	100	6
7. Apoptotische Spendermilzzellen	1,25	100	9
8. Isotransplantate	-	100	9
9. Isotransplantate mit Immunsuppression	1,25	100	4

n= Anzahl der Tiere pro Gruppe.

### 3.7 Pharmakologische Modulation dendritischer Zellen durch Sangliferin A

#### 3.7.1 In-vivo-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute Abstoßung

Zur Untersuchung der Effekte der Immunmodulatoren SFA und CSA auf das Überleben der allogenen Transplantate dienten vier verschiedene experimentelle Gruppen, bei denen SFA allein und in Kombination mit CSA täglich subkutan verabreicht wurde (Abb. 15, Tabelle 17). SFA wurde einen Tag vor der Transplantation in einer Dosierung von 5 mg/kg KGW, ab dem Zeitpunkt der Transplantation bis Tag 10 in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KGW. Anschließend erfolgte eine Reduktion auf 1 mg/kg KGW. CSA wurde in einer Dosierung von 0,625 mg/kg KGW verabreicht.

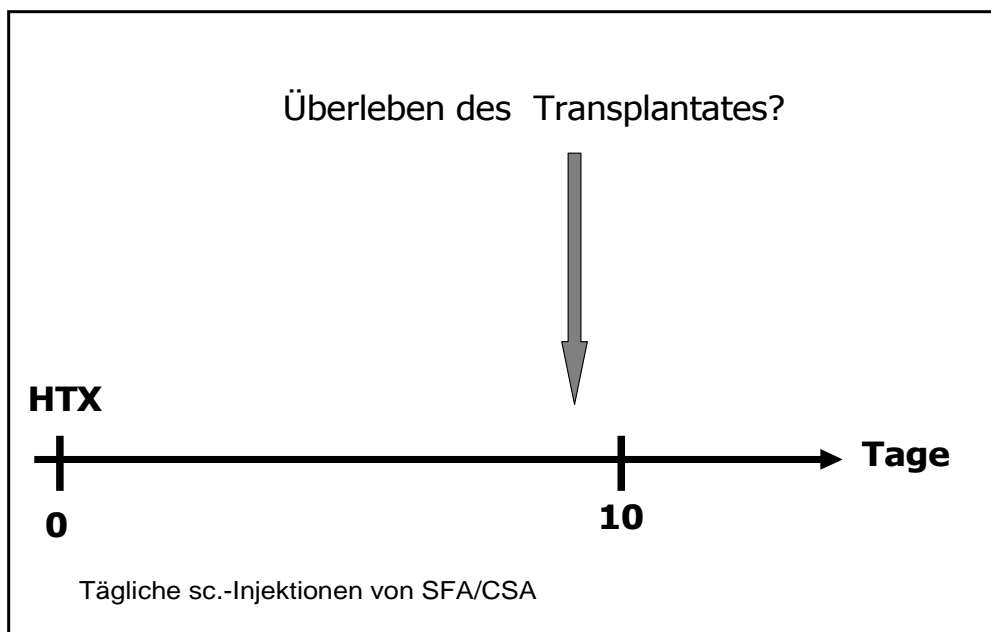


Abbildung 15: Ermittlung der Überlebenszeit des Transplantates nach immunsuppressiven Gaben von SFA und CSA.

Tabelle 17: Versuchsgruppen zur Bestimmung des Transplantatüberlebens nach Pharmakotherapie mit SFA und CSA.

Protokoll der Versuchsgruppen	Immunsuppression		n=
1. Kontrolle Akut	ohne		5
2. SFA-Gruppe	SFA: -Tag 1:5,Tx-Tag 9: 2,5,ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW		4
3. CSA-Gruppe	CSA: 0,625 mg/Kg KGW		5
4. CSA + SFA-Kombinationsgruppe	SFA:-Tag 1: 5,Tx-Tag 9: 2,5, ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW	CSA: 0,625 mg/Kg KGW	5

n= Anzahl der Tiere pro Gruppe, Tx= Tag der Transplantation; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.



### **3.7.2 In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute und chronische Abstoßung**

Zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung der akuten Abstoßung bzw. der Transplantatvaskulopathie (TVP) wurden Transplantate herangezogen, die zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation entnommen wurden (Abb. 16).

Hierzu wurden im Akutmodell Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 15 herangezogen, die es ermöglichten, die Früh-, Intermediär- und Spätphase nach der Transplantation labortechnisch zu untersuchen. Durch Entnahme funktionierender Transplantate zu definierten Zeitpunkten sollte die zelluläre Infiltration der Transplantate bei den einzelnen Gruppen verglichen werden.

Zur Untersuchung des Effektes auf die Langzeitfolgen nach Herztransplantation, die sich in Form der TVP äußern, wurde das chronische Modell herangezogen. Tag 100 (Langzeittransplantatüberleben) stellte den Endpunkt des Beobachtungszeitraumes dar. Nach Erreichen des Endpunktes Tag 100 erfolgte die Entnahme der Transplantate und deren histologische Untersuchung.

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Verabreichung der Pharmaka auf die zelluläre Infiltration bzw. auf die Ausprägung der TVP hat. Die Immunsuppression der einzelnen Gruppen ist der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen (Tabelle 18).

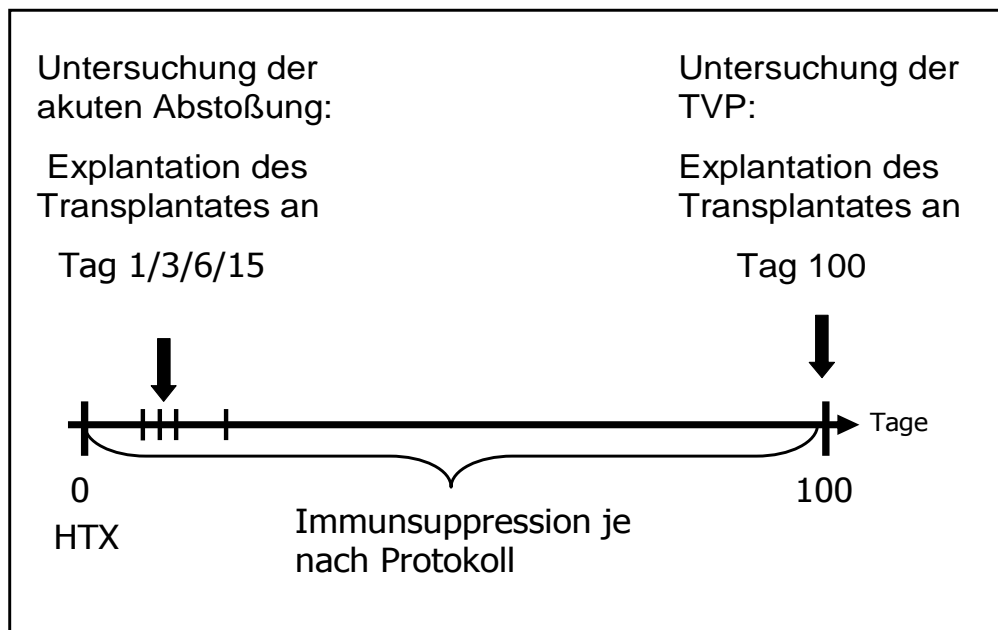


Abbildung 16: Untersuchung der akuten und chronischen Abstoßung zu definierten Zeitpunkten.

### 3.7.3 In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute Abstoßung

Zur Untersuchung der akuten Abstoßung wurden zehn verschiedene Gruppen herangezogen, die je nach Protokoll eine Immunsuppression mit CSA oder SFA erhielten (Tabelle 18). Die Explantation der Transplantate und deren labortechnische Aufbereitung erfolgte an Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 15.

Tabelle 18: Versuchsgruppen zur Beurteilung der akuten Abstoßungsreaktion zu definierten Zeitpunkten.

Protokoll der Versuchsgruppen	Immunsuppression	Explantation Tag	n=
Kontrollherzen Nativ (WF), nicht transplantiert	ohne	-	4
1. Kontrolle Akut	ohne	1/3/6	Je 6
2. ISO-Gruppe (Isogene Transplantate)	ohne	1/3/6	Je 4
3. SFA-Gruppe	SFA : -Tag 1:5,Tx-Tag 9: 2,5,ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW	1/3/6	Tag 1: 3 Tag 3: 4 Tag 6: 3
4. CSA-Gruppe	CSA: 0,625 mg/Kg KGW	1/3/6	Je 5
5. CSA + SFA-Kombinationsgruppe	CSA: 0,625 mg/Kg	SFA : -Tag 1:5,Tx-Tag 9:	1/3/6 Je 5

Protokoll der Versuchsgruppen	Immunsuppression		Explantation Tag	n=
	KGW	2,5,ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW		
6. CSA-Gruppe	CSA: 2,5 mg/Kg KGW		1/3/6	Tag 1: 9 Tag 3: 8 Tag 6: 9
8. CSA-Gruppe	CSA: 2,5 mg/Kg KGW		15	6
9. CSA-Gruppe	CSA: 0,625 mg/Kg KGW		15	6
10. CSA+ SFA-Kombinationsgruppe	CSA: 0,625 mg/Kg KGW	SFA : -Tag 1:5,Tx-Tag 9: 2,5,ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW	15	6

n= Anzahl der Tiere pro Gruppe, Tx= Tag der Transplantation; Kontrolle Nativ= nicht transplantierte Spenderherzen; WF= Wistar Furth; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.

### 3.7.4 In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie

Zur Untersuchung der Langzeiteffekte nach Transplantation wurden fünf experimentelle Gruppen ausgewählt (Tabelle 19). Dabei wurde SFA mit CSA in einer Dosierung von 1,25 mg/kg KGW kombiniert. Nach 100 Tagen wurden die Transplantate entnommen. Als Kontrolle dienten nicht transplantierte Spenderherzen. Zum Ausschließen einer immunologischen Reaktion, die durch die Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens ausgelöst wird, wurden isogene Kontrollgruppen verwendet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Versuchsgruppen zur Beurteilung der Effekte der Pharmakotherapie auf die Ausprägung der Transplantatvaskulopathie

Protokoll der Versuchsgruppen	Immunsuppression		Explantation an Tag	n=
Kontrolle Nativ (WF), Spenderherzen nicht transplantiert	ohne		-	4
1. CSA-Gruppe	CSA: 1,25 mg/Kg KGW		100	12
2. CSA-Gruppe	CSA: 2,5 mg/Kg KGW		100	10
3. CSA+ SFA-Kombinationsgruppe	CSA: 1,25 mg/Kg KGW	SFA : Tag -1: 5, Tx-Tag 9: 2,5, ab Tag 10: 1 mg/Kg KGW	100	4
4 .ISO-Gruppe	ohne		100	9
5. ISO + CSA-Gruppe	CSA: 1,25 mg/Kg KGW		100	4

n= Anzahl der Tiere pro Gruppe, Tx= Tag der Transplantation; WF= Wistar Furth.

## **3.8 Auswertung**

### **3.8.1 Funktion des Transplantates**

Die Funktion des Transplantates wurde täglich durch Palpation der Herzaktion durch die Bauchdecke hindurch beurteilt und nach dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenem Schema beurteilt (Tabelle 3).

### **3.8.2 Histologische Auswertung**

Bei der histologischen Auswertung wurden sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung (TVP) beurteilt.

Zur Beurteilung der akuten Abstoßung wurde mittels immunhistologischer Präparate die zelluläre Infiltration der Transplantate mit MHC-II-positiven Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation quantitativ durch Auszählung von 10 Gesichtsfeldern pro Präparat erfasst. Pro Transplantat und Tier wurden zwei Ebenen bei einer 1000-fachen Vergrößerung (Ölimmersion) mit Hilfe eines Standardlichtmikroskopes beurteilt.

Die Auswertung der Transplantatvaskulopathie myo- und epikardialer Gefäße erfolgte an mit H&E und Elastica van Gieson gefärbten Präparaten unter einem Standardlichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung (Abb. 17, Abb. 18).

In einem ersten Schritt erfolgte die Beurteilung betroffener Gefäße. Dazu wurden die Myocardschnitte systematisch nach orthogonal angeschnittenen arteriellen Gefäßen mit intakter Lamina elastica interna durchsucht und deren Ausprägung der TVP beurteilt (Tabelle 20, Abb. 18). Die Beurteilung erfolgte nach dem von Adams beschriebenen Auswertungsverfahren (Adams, D.H. et al., 1992, Tabelle 20). Grundvoraussetzung zur Beurteilung war die Intaktheit der Lamina elastica interna, die in den histologischen Schnitten gut erkennbar und vollständig ausgebildet sein musste. Es wurden nur gleichmäßig angeschnittene mittelgroße bis größere Gefäße mit gut erkennbarem Lumen beurteilt.

Besonderes Augenmerk wurde auf zwei Kriterien gerichtet:

1. Beurteilung der Verlegung des Gefäßlumens (% Einengung)
2. Betroffenheit der Zirkumferenz des Gefäßes

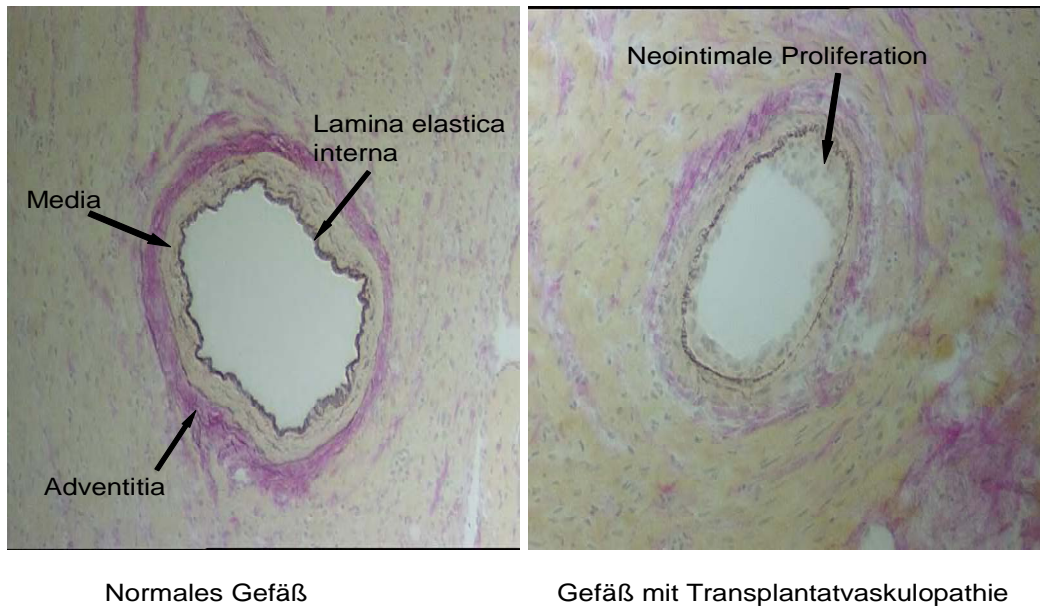


Abbildung 17: Histologisches Bild der Intimaproliferation an H&E und Elastica Van-Gieson gefärbten Myocardschnitten (Primärvergrößerung x 10).

Die linke Abbildung zeigt ein normales Gefäß mit dem typischen dreischichtigen Aufbau der Gefäßwand (Abb. 17). Bei der rechten Abbildung beobachtet man lumenwärts der Lamina elastica interna eine neointimale Proliferation von vorwiegend glatten Muskelzellen, die sog. Transplantatvaskulopathie.

Tabelle 20: Beurteilung der Transplantatvaskulopathie nach dem international anerkannten Auswertungsverfahren von Adams, D.H. et al., 1992.

Grad	Histologisches Bild der Intima-Proliferation	
	Intima	
	% Betroffenheit der Zirkumferenz des Gefäßes	% Einengung des Gefäßes
0	0	0
1	<50	<20
2	50-100	<20
3	100	20-50
4	100	50-80
5	100	>80



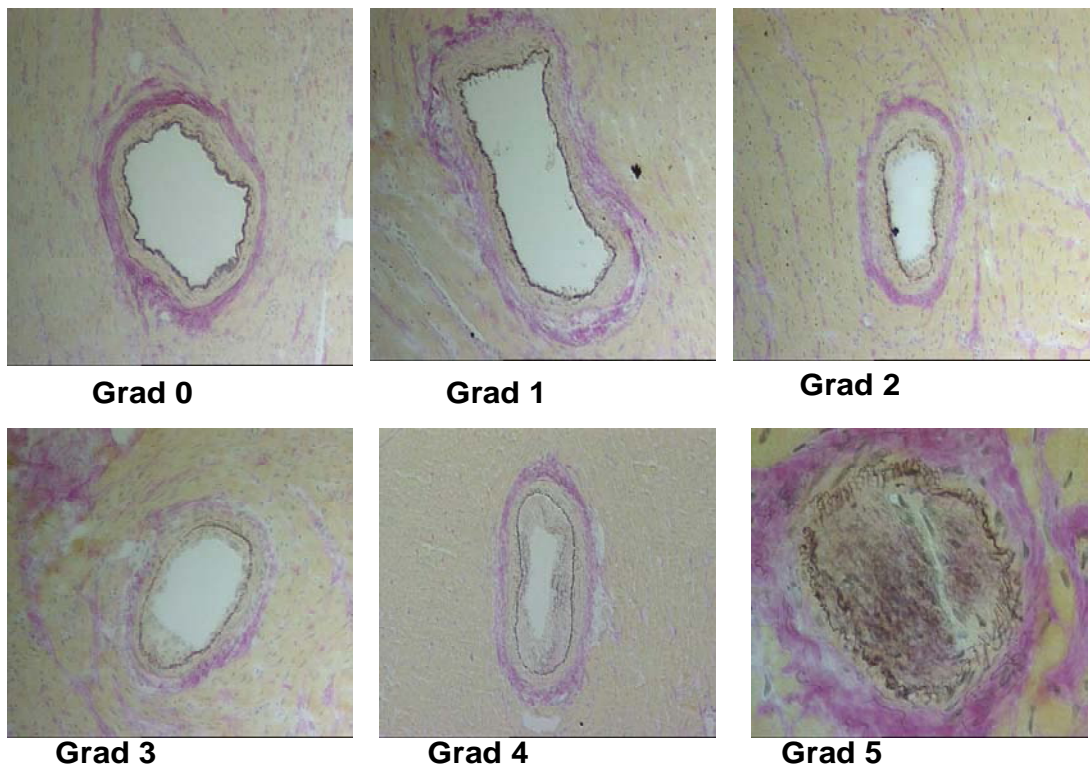


Abbildung 18: Beurteilung der Transplantatvaskulopathie an H&E- und Elastica Van-Gieson gefärbten Myocardschnitten (Grad 0 bis Grad 4: Primärvergrößerung x 10; Grad 5: Primärvergrößerung x 40).

Grad 0 zeigt ein intaktes Gefäß mit normalem Gefäßlumen. Erkennbar ist die Zunahme der intimalen Proliferation durch überwiegend glatte Muskelzellen von Grad 1 (nur geringgradige Proliferation) bis Grad 5 mit nahezu komplettem Verschluss des Gefäßlumens (Abb. 18).

### **3.9 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit StatsDirect statistical software Version 2,2,3 (CamCode, Ashwell, UK). Das Transplantatüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Analysen und dem Log-Rank-Test verglichen. Zur Auswertung der Transplantatvaskulopathie und der Immunhistologie wurde der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-U-Whitney-Test angewendet.

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier Rang-Summen Test zur Prüfung der Signifikanz mehrerer unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz, durch die festgestellt wird, ob die Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen oder lediglich zufällig voneinander abweichen.

Sofern eine Normalverteilung vorlag, wurden arithmetrische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen ( $s$ ) bestimmt. Bei schiefer Verteilung erfolgte eine logarithmische Transformation der Daten und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF). Als signifikant galten Werte  $\leq 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Transplantatüberleben ohne Immunmodulation

In einem ersten Schritt sollte das Überleben der Transplantate ohne jegliche Immunmodulation untersucht werden.

Hierbei beobachtete man, dass die Transplantate ohne Immunsuppression (Kontrolle Akut) innerhalb von sieben Tagen nach Transplantation abgestoßen wurden (Diagramm 1).

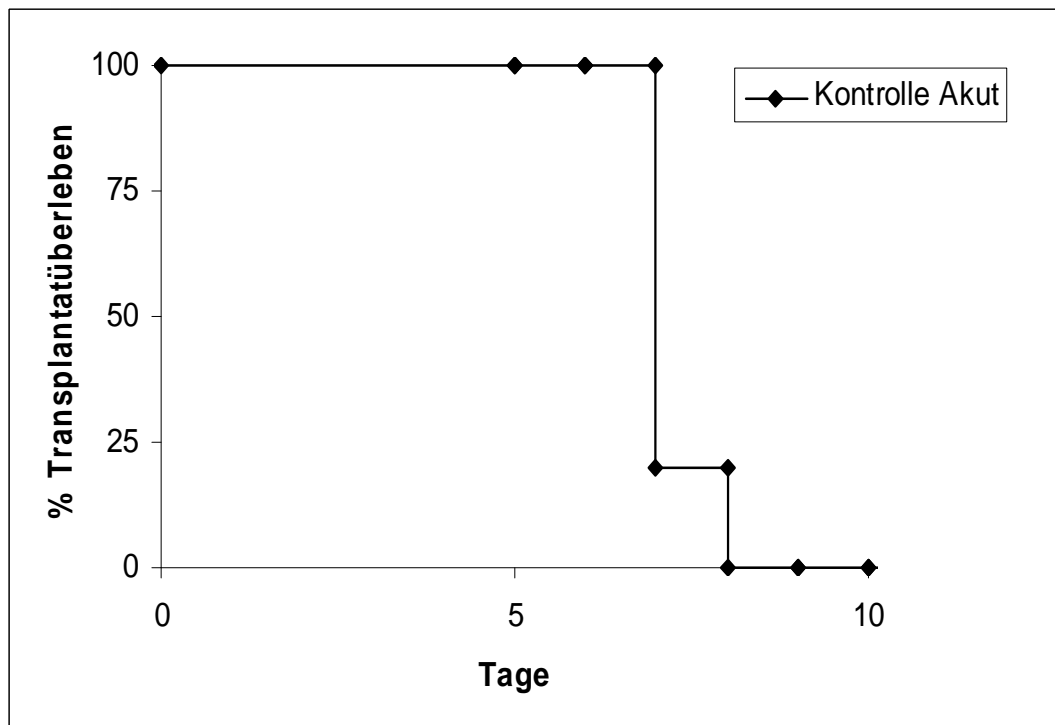


Diagramm 1: Transplantatüberleben ohne Immunmodulation.

Dargestellt sind die absoluten Zahlen schlagender Herzen in Prozent zu der Gesamtzahl der Tiere (n=5).

Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.

## **4.2 Evaluierung der minimalen CSA-Dosis zur Induktion von Langzeittransplantatüberleben**

Das Transplantatüberleben ist zum einen von der Potenz des immunmodulierenden Pharmakons abhängig, zum anderen von der eingesetzten Dosierung. In der vorliegenden Studie sollten zunächst verschiedene CSA-Dosierungen (Tabelle 21) eingesetzt werden, um die für das Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 notwendige Mindestdosis zu bestimmen.

Zur Evaluierung der minimalen CSA-Dosis, die notwendig ist, um ein Langzeittransplantatüberleben zu ermöglichen, wurde in der Studie zunächst eine CSA-Dosis von 0,625 mg/kg KGW gewählt. Diese stellte sich als unzureichend aus, um ein Transplantatüberleben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes Tag 100 zu gewährleisten (Diagramm 2). Die mediane Überlebenszeit betrug 24 Tage (Tabelle 21).

Aus diesem Grund wurde die Dosierung der CSA-Immunsuppression bei zwei weiteren Gruppen jeweils verdoppelt. Die Folgeversuche zeigten, dass ab einer CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW alle Transplantatempfänger den Endpunkt der Beobachtung Tag 100 (Langzeittransplantatüberleben) erreichten (Diagramm 2).

Diagramm 2, welches die Prozentzahl schlagender Herzen zur Gesamtzahl der Tiere pro Gruppe anzeigt, verdeutlicht die Dosisabhängigkeit des Transplantatüberlebens. Bei der subtherapeutisch CSA-immunsupprimierten Gruppe (0,625 mg/kg KGW) findet man ab Tag 30 kein überlebendes Transplantat. Ab einer CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW überlebten 100% der Transplantate bis Tag 100.

## Ergebnisse

Tabelle 21: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate in Tagen bei steigender CSA-Dosis.

Überleben	CSA 0,625 mg/kg KGW	CSA 1,25 mg/kg KGW	CSA 2,5 mg/kg KGW
$x \pm s$	23,4 $\pm$ 5,55	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
Median	24	100	100
n=	5	12	10

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Anzahl der Tiere pro Gruppe.

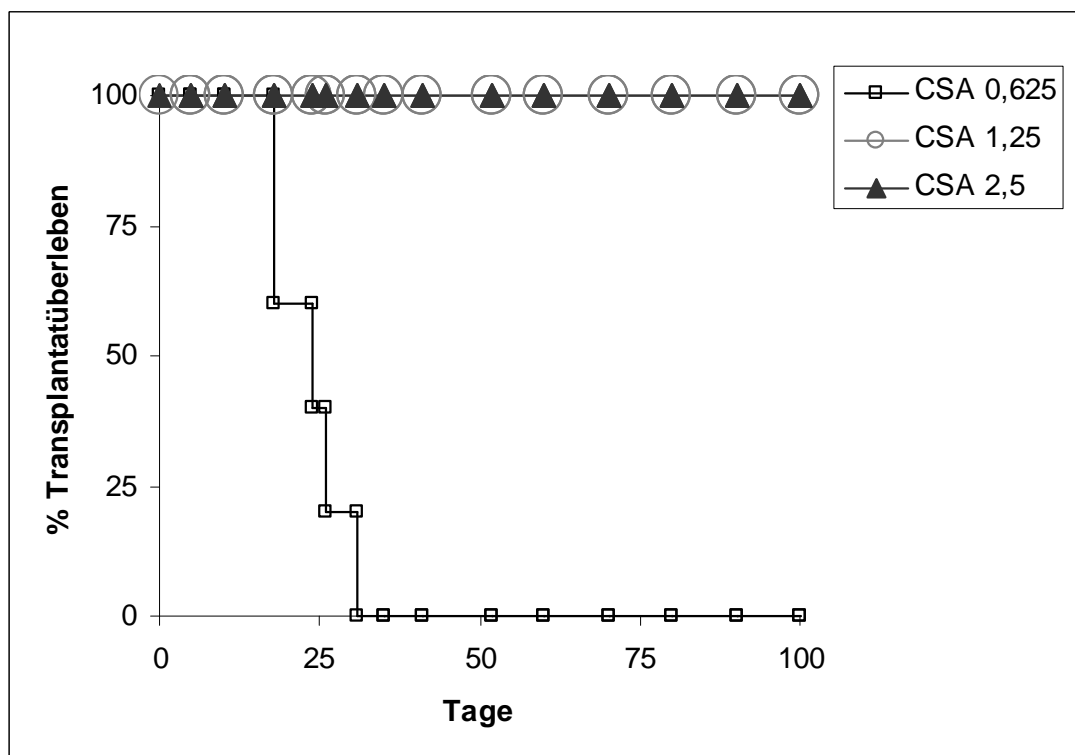


Diagramm 2: Dosisabhängigkeit des Überlebens der Transplantate bei unterschiedlich starker CSA-Immunsuppression.

## 4.3 Akute Abstoßung

### 4.3.1 Kinetik der akuten Abstoßung

Die Kinetik der akuten Abstoßung wurde mit Hilfe histologischer und immunhistologischer Untersuchungen auch morphologisch analysiert.

Im zeitlichen Verlauf der Abstoßungsreaktion kommt es zu einer progredienten Zunahme der zellulären Infiltration des Transplantates mit mononukleären Zellen (Abb. 19). Man beobachtet an Tag 1 eine geringe, fokale perivaskuläre Infiltration. An Tag 3 erfolgt bereits ein Übergreifen der mononukleären Infiltration auf das angrenzende Interstitium, während an Tag 6 eine diffuse starke Infiltration mit Ödembildung und Myozytennekrose zu erkennen ist (Abb. 19).

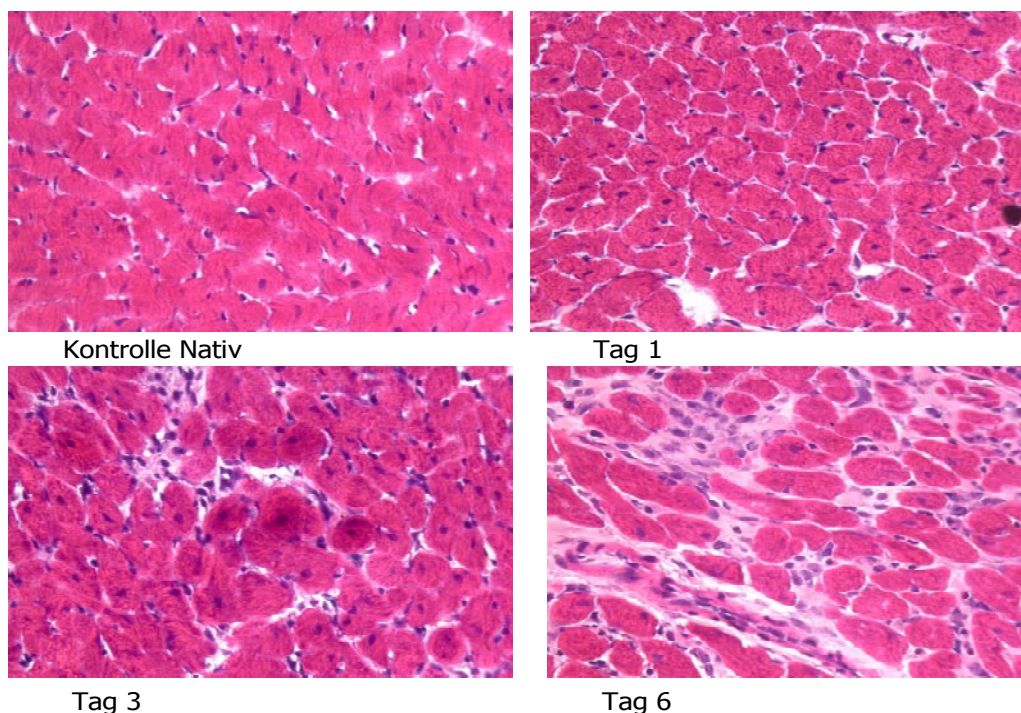


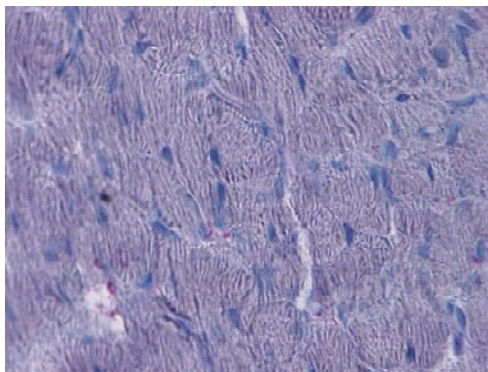
Abbildung 19: Zunehmende Infiltration mit Entzündungszellen bei der akuten Abstoßung an H&E gefärbten Myocardschnitten ohne Immunsuppression. (Primärvergrößerung x 40). Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard. Tag 1, Tag 3, Tag 6= transplantiertes Spendermyocard ohne Immunsuppression.

## Ergebnisse

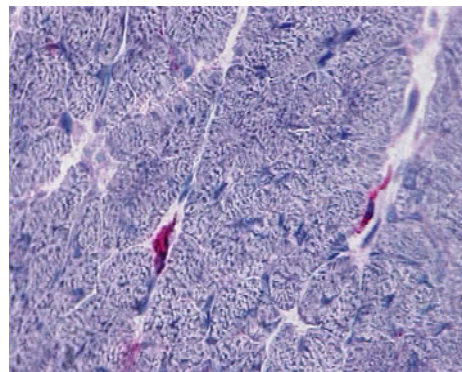
---

Die immunhistologische Charakterisierung der zellulären Infiltration zeigte im Zeitverlauf der Abstoßung eine starke Infiltration mit immunkompetenten, MHC-II-positiven Zellen. Hierbei handelt es sich um  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor positive T-Zellen und um ED-1 positive Zellen, das heißt um Monozyten/ Makrophagen.

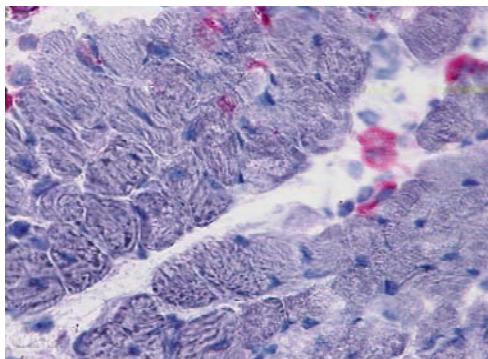
Man beobachtete die positive Reaktion (Rotfärbung) der infiltrierenden Monozyten und Makrophagen (Abb. 20). An Tag 1 beobachtete man eine geringgradige Infiltration, die über Tag 3 zunimmt und an Tag 6 deutlich erkennbar ist.



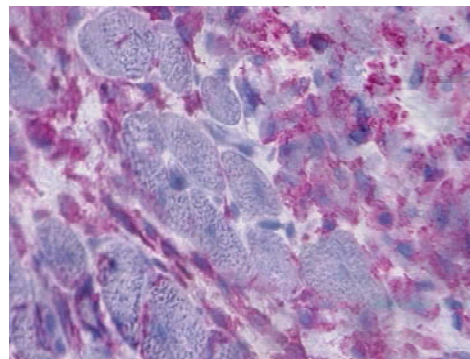
**Kontrolle Nativ**



**Tag 1**



**Tag 3**



**Tag 6**

Abbildung 20: Zunehmende Infiltration mit **ED-1** positiven Zellen (rot gefärbt) im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung ohne Immunsuppression, Myocardschnitte (Primärvergrößerung x 40).

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard. Tag 1, Tag 3, Tag 6= transplantiertes Spendermyocard ohne Immunsuppression.

#### **4.4 In-vitro-Teil: Effekte der Immunmodulation auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

Die akute Abstoßung bzw. der Transplantatverlust lässt sich durch die Wahl einer geeigneten Dosis der CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW verhindern. Mit ausreichender Immunsuppression kann man ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 erreichen (Kap.4.2, Diagramm 2).

Die Langzeitfolgen, die nach Herztransplantation auftreten, ließen sich in der Studie jedoch nicht durch die tägliche Verabreichung einer CSA-Immunsuppression verhindern.

Trotz Immunsuppression zeigte sich eine mittelgradig ausgeprägte TVP (Tabelle 22). Der geometrische Mittelwert der TVP bei einer CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW lag bei dem Score von 1,35. Eine Verdoppelung der CSA-Immunsuppression auf 2,5 mg/kg KGW hatte keine Reduktion der TVP zur Folge ( $x_g = 1,26$ ).

Eine alleinige Erhöhung der CSA-Immunsuppression führte somit in der vorliegenden Studie nicht zu einer Reduktion der TVP.

Diagramm 3 verdeutlicht, dass bei beiden Gruppen, also bei CSA-Immunsuppression mit 1,25 mg/kg KGW und 2,5 mg/kg KGW sämtliche Transplantate ein 100%-iges Transplantatüberleben bis Tag 100 erreichten. Bei beiden Gruppen zeigte sich jedoch eine deutliche Ausprägung der TVP, die sich auch durch Verdopplung der CSA-Immunsuppression nicht reduzieren ließ (Tabelle 22).



Tabelle 22: Geometrische Mittelwerte und Median der Transplantatvaskulopathie.

TVP	CSA 1,25 mg/kg KGW	CSA 2,5 mg/kg KGW
xg;	1,35;	1,26;
SF	2,63	2,69
Median	1	1
n	12	10

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Anzahl der Tiere pro Gruppe

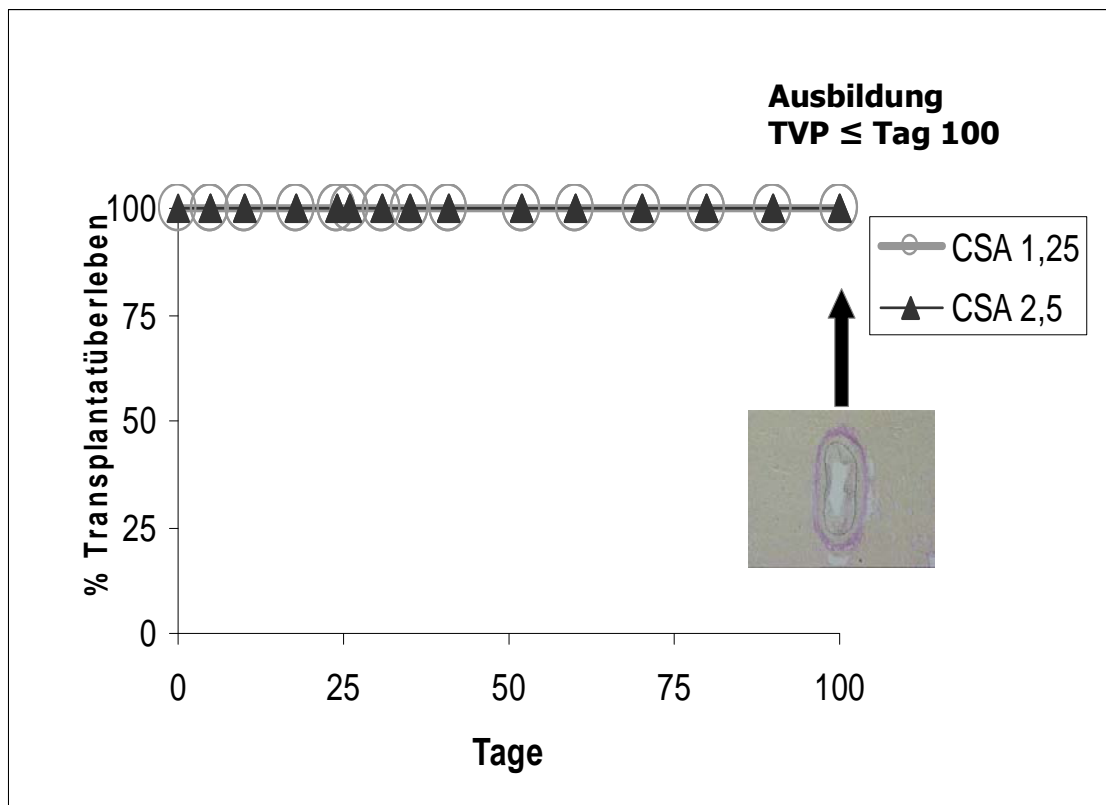


Diagramm 3: Überlebensgraphik nach unterschiedlich starker CSA-Immunsuppression mit Ausbildung von Transplantatvaskulopathie.

## 4.5 Zelltherapeutischer Ansatz

### 4.5.1 In-vivo-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die akute Abstoßung

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob sich durch die präoperative i.v.-Vorbehandlung der Transplantatempfänger (7 Tage vor Transplantation) mit antigenen Spendermilzzellen das Transplantatüberleben verlängern lässt bzw. ob man durch alleinige Zelltherapie ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 erreichen kann.

Hierbei wurden vier verschiedene Gruppen untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl eine Vorbehandlung mit nekrotischen als auch mit apoptotischen Spendermilzzellen einen verlängernden Effekt auf das Transplantatüberleben hat (Diagramm 4). Die mediane Überlebenszeit der Transplantate wurde von 7 Tagen (Kontrolle Akut) auf 10 Tage bei Vorbehandlung mit nekrotischen Spendermilzzellen bzw. auf 11 Tage bei Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen verlängert (Tabelle 23). Bei der Verabreichung von vitalen Spendermilzzellen findet man keinen Unterschied zur Kontrollgruppe.

Tabelle 23: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate in Tagen nach Zelltherapie.

Überleben	Kontrolle Akut	Vitale Spender-Milzzellen	Nekrotische Spender-Milzzellen	Apoptotische Spender-Milzzellen
x ± s	7,2 ± 0,45	7,67 ± 1,37	10,14 ± 0,90	9,57 ± 2,82
Median	7	7	10	11
n=	5	6	7	7

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Anzahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte bzw. nicht zelltherapeutisch vorbehandelte Transplantatempfänger.

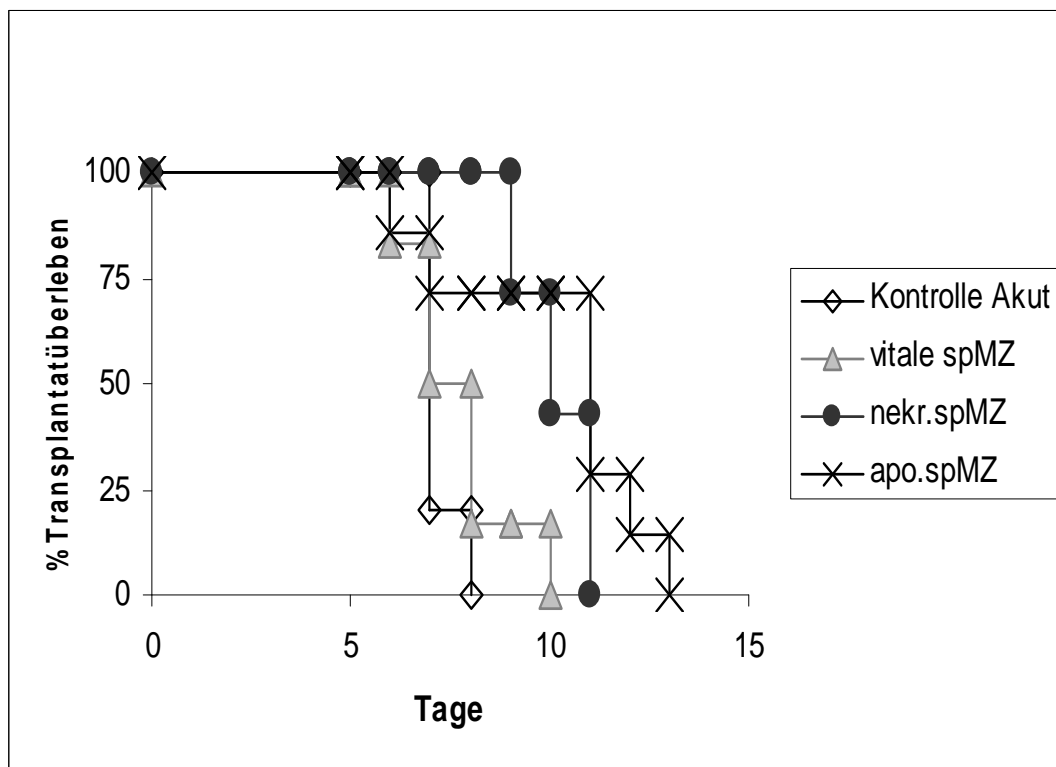


Diagramm 4: Überlebensgraphik nach Zelltherapie mit Spendermilzzellen (vital, apoptotisch, nekrotisch).

Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte bzw. nicht zelltherapeutisch vorbehandelte Transplantatempfänger; spMZ= Spendermilzzellen; nekr. spMZ= nekrotische Spendermilzzellen; apo. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen, vitale spMZ= vitale Spendermilzzellen.

Da die alleinige Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit antigenem Spendermaterial (Milzzellen der allogenen Spenderratten Wistar Furth) nicht ausreicht, längerfristig das Transplantat zu schützen (d.h. den Endpunkt der Untersuchung Tag 100 zu erreichen), wurde in den anschließenden Versuchen zusätzlich eine basale Immunsuppression durchgeführt. Alle Versuchsgruppen erhielten eine CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW, welche als untere Grenze zur Induktion von Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 notwendig ist (Kap. 4.2, Diagramm 2)

Zunächst sollte die Rolle modifizierter dendritischer Zellen im Abstoßungsprozess evaluiert werden. Hierzu wurden modifizierte, mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulste DC herangezogen, die den Empfängertieren sieben Tage vor der Transplantation i.v. verabreicht wurden.

Hierbei zeigte sich, dass Transplantatempfänger, welche sowohl mit reifen als auch mit semireifen Empfänger-DC vorbehandelt wurden, die ihrerseits zuvor mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, trotz Immunsuppression die Transplantate verfrüht abstießen (Diagramm 5). Der Endpunkt der Beobachtung Tag 100 wurde nur bei einem Transplantatempfänger erreicht. Diesem wurden semireife Empfänger-DC verabreicht, die mit nekrotischen Spendermilzzellen beladen worden waren. Im Gegensatz dazu wurde in allen Fällen ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 bei Transplantatempfängern erreicht, die mit unbehandelten autologen DC bzw. mit nekrotischen Spendermilzzellen vorbehandelt wurden (Diagramm 5; Tabelle 24).

## Ergebnisse

---

Tabelle 24: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate nach Zelltherapie (DC + nekrotische Spendermilzzellen) bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Überleben	Kontrolle CSA 1,25	DC unepulst	Nekrot. spMZ	rDC + nekrot. spMZ	srDC + nekrot. spMZ
$x \pm s$	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00	45,57 $\pm$ 37,09	23 $\pm$ 12,96
Median	100	100	100	28	24
n=	6	6	6	7	4

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Zahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; nekrot. spMZ= Nekrotische Spendermilzzellen; rDC + nekrot. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + nekrot. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.

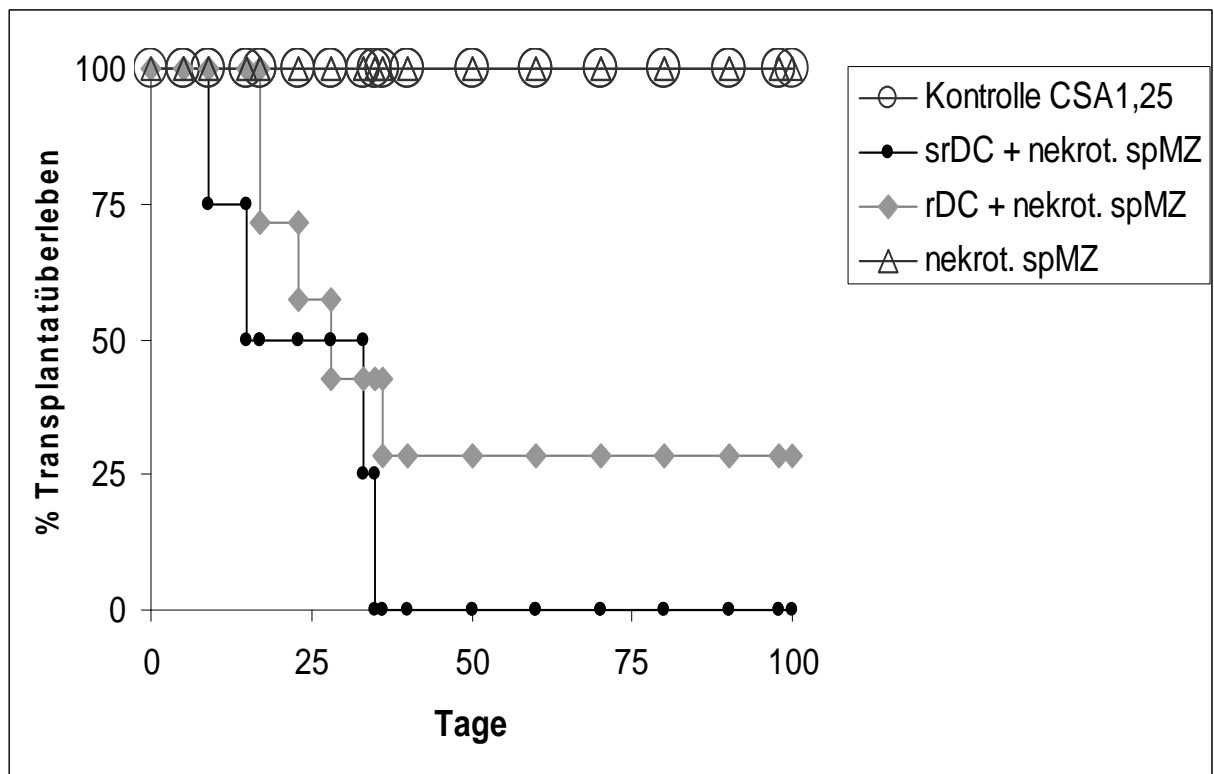


Diagramm 5: Überlebensgraphik nach Zelltherapie (DC + nekrotische Spendermilzzellen) bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; nekrot. spMZ= Nekrotische Spendermilzzellen; rDC + nekrot. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + nekrot. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.

Wie erwartet, hatte die Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit Empfänger-DC, die ihrerseits zuvor mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem der Empfängertiere. Die Transplantate wurden trotz Immunsuppression abgestoßen (Diagramm 5).

In einem nächsten Schritt wurde eine Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit Empfänger-DC durchgeführt, die ihrerseits zuvor mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren (Diagramm 6; Tabelle 25). Sämtliche Transplantatempfänger erhielten eine tägliche CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Hierbei wurde bis auf einen Ausfall bei allen Transplantaten der Endpunkt des Beobachtungszeitraumes Tag 100 erreicht (Diagramm 6; Tabelle 25).

Bei der Gruppe der Transplantatempfänger, die mit semireifen Empfänger-DC vorbehandelt wurden, welche ihrerseits zuvor mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, kam es lediglich bei einem einzigen Transplantatempfänger zur verfrühten Abstoßung (Diagramm 6; Tabelle 25). Bei der alleinigen Verabreichung von apoptotischen Spendermilzzellen und ungepulsten Empfänger-DC beobachtete man in sämtlichen Fällen ein Transplantatüberleben bis Tag 100 (Diagramm 6).

Somit war das Transplantatüberleben bei Verabreichung von Empfänger-DC, die mit apoptotischen Spendermilzzellen beladen worden waren, deutlich höher (Diagramm 6) gegenüber einem Transplantatüberleben bei Verabreichung von Empfänger-DC, die mit nekrotischen Spendermilzzellen beladen worden waren (Diagramm 5).

## Ergebnisse

---

Tabelle 25: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate nach Zelltherapie (DC + apoptotische Spendermilzzellen) bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression.

Über-leben	Kontrolle CSA 1,25	Apopt. spMZ	DC ungepulst	rDC + apopt. spMZ	srDC + apopt. spMZ
x ± s	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	88,33 ± 28,58
Median	100	100	100	100	100
n=	6	9	6	6	6

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Anzahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apopt. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; rDC + apopt. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + apopt. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.



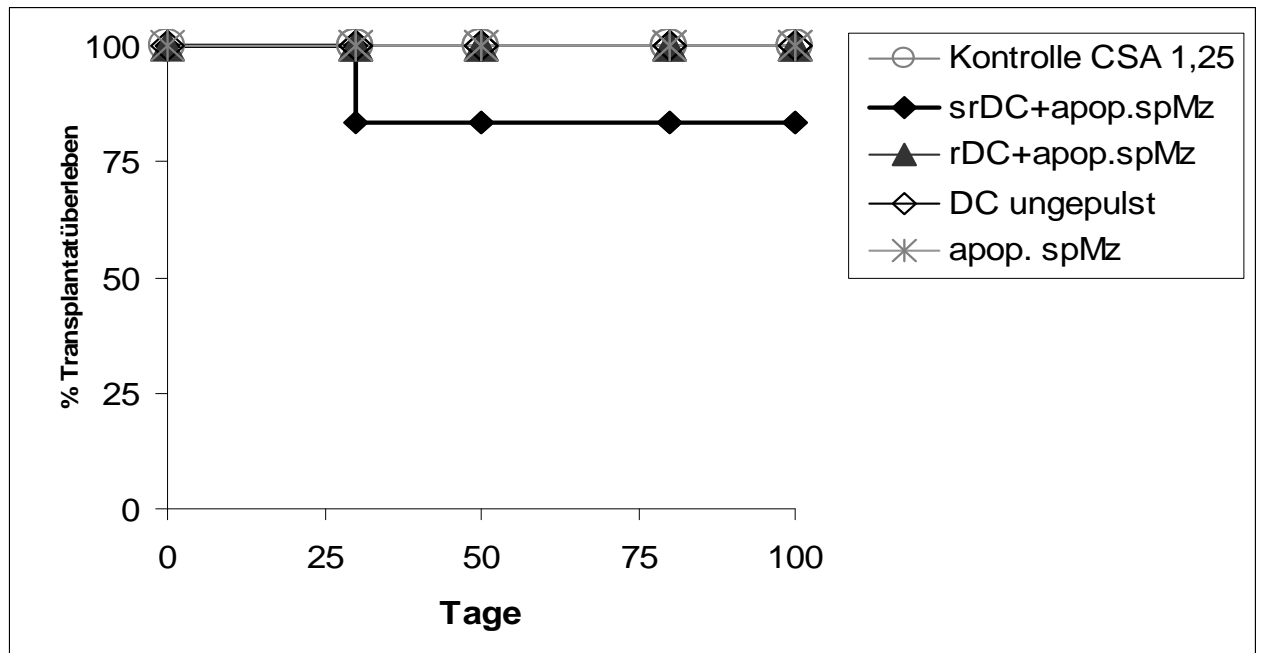


Diagramm 6: Überlebensgraphik nach Zelltherapie (DC + apoptotische Spendermilzzellen) bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apopt. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; rDC + apopt. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + apopt. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; DC ungepulst= nicht mit Spenderantigen beladene DC.

#### **4.5.2 In-vitro-Teil: Effekte der Zelltherapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

Wie aus den Versuchsergebnissen in Kapitel 4.5.1 (Diagramm 4) ersichtlich, konnte durch alleinige Vorbehandlung der Empfängertiere mit Spendermilzzellen keine ausreichende Transplantatprotektion im Sinne von Langzeittransplantatüberleben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes Tag 100 erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die Zelltherapie mit einer täglichen basalen CSA-Immunsuppression von 1,25 mg/kg KGW kombiniert. Eine CSA-Dosis von 1,25 mg/kg KGW stellt die untere Grenze zum Erreichen des Langzeittransplantatüberlebens bis Tag 100 dar (Kap. 4.2, Diagramm 2).

Auf diese Weise sollte die Frage abgeklärt werden, ob sich durch die Vorbehandlung mit modifizierten Zellen des Empfängers bzw. Spenders unter basaler Immunsuppression eine vaskuläre Toleranz induzieren lässt, die sich in einer verringerten Ausprägung der TVP manifestieren sollte. Diese Fragestellung sollte beantwortet werden durch einen Vergleich zelltherapeutisch vorbehandelter Gruppen unter therapeutischer CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) mit einer Gruppe, die lediglich eine CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) verabreicht bekam (Diagramm 7).

Bei der Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit autologen dendritischen Zellen, die ihrerseits zuvor mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, beobachtete man keine wesentliche Reduktion der TVP (Diagramm 7; Tabelle 26). Die Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen zeigte dagegen eine signifikante Reduktion der geometrischen Mittelwerte der TVP ( $x_g=0,83$ ;  $p<0,05$ ) und deutlich weniger stark betroffene Gefäße (Tabelle 27, Tabelle 28) im Vergleich zur alleinigen CSA-Immunsuppression ( $x_g=1,62$ ). Bei den mit apoptotischen Spendermilzzellen vorbehandelten Transplantatempfängern waren weitaus weniger Gefäße schwer betroffen (hauptsächlich Gefäße mit den Scores 0 und 1, Tabelle 27, Tabelle 28).

## Ergebnisse

Somit hatte eine i.v.-Vorbehandlung mit modifizierten Empfänger-DC unter basaler CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) keine die TVP signifikant reduzierende Wirkung, während man diesen Effekt bei der alleinigen Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen unter basaler CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) beobachtete ( $p < 0,05$ ). Die Vorbehandlung mit nekrotischen Spendermilzzellen führte dagegen zu einer etwas stärkeren Ausprägung der TVP im Vergleich zur Kontrollgruppe (Diagramm 7; Tabelle 26).

Tabelle 26: Geometrische Mittelwerte und Median der Transplantatvaskulopathie nach Zelltherapie bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

TVP	Kontrolle Nativ	Iso	Iso+ CSA	Kontrolle CSA 1,25	Apop. spMZ	Nekrot. spMZ	DC ungepulst	srDC+ apop. spMz	rDC+ apop. spMz
xg;	0,52;	0,68;	0,63;	1,62;	0,83;	1,91;	1,23;	1,12;	1,41;
SF	1,17	2,04	1,74	2,51	1,86	2,57	2,51	2,45	2,45
Median	0	0	0	2	1	3	1	1	1
n=	4	9	4	6	9	6	6	6	7

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Anzahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Iso= isogene Transplantate; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apop. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; rDC + apop. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + apop. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; iso= isogene Transplantate.

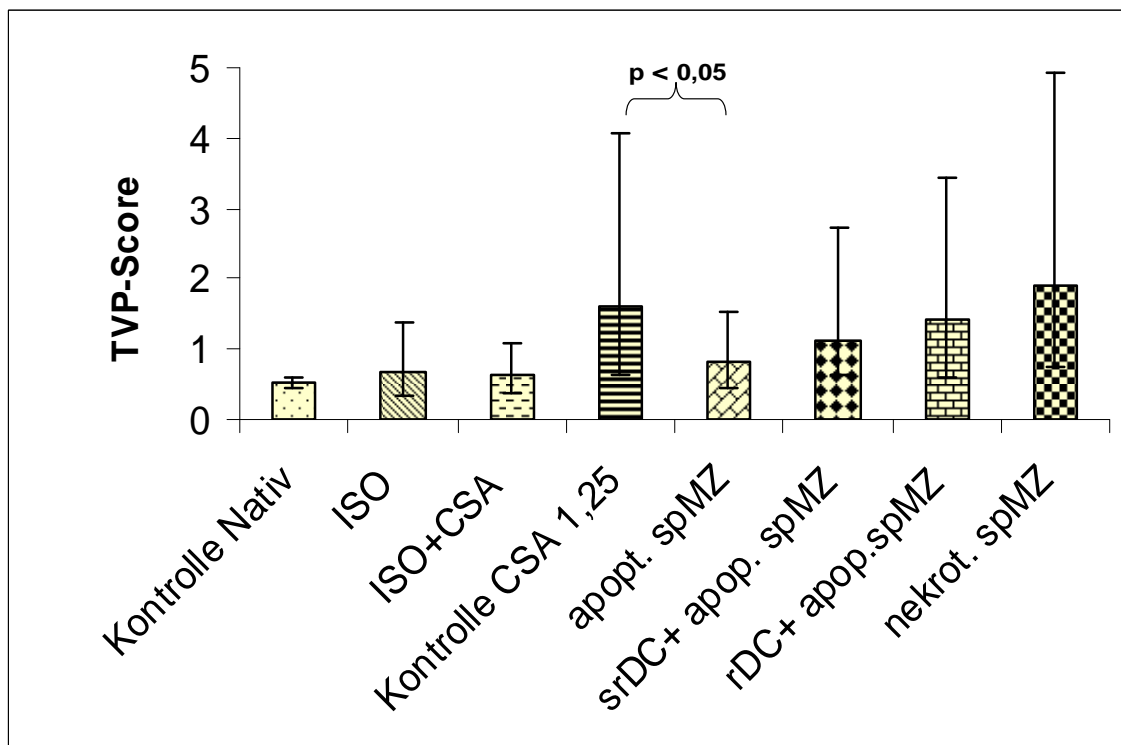


Diagramm 7: Transplantatvaskulopathie nach Zelltherapie bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW), ermittelt als geometrischer Mittelwert von TVP-Scores.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Iso= isogene Transplantate; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apopt. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; rDC + apopt. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; srDC + apopt. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.

## Ergebnisse

Tabelle 27: Anzahl betroffener Gefäße mit Transplantatvaskulopathie nach Zelltherapie bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Anzahl ausgewerteter Gefäße	Kontrolle Nativ	Iso	Iso+ CSA	Kontrolle CSA 1,25	Apop. spMZ	Nekrot. spMZ	DC ungepulst	srDC+ apop. spMz	rDC+ apop. spMz
TVP 0	104	38	22	20	41	6	26	21	15
TVP 1	6	0	2	15	32	7	11	9	13
TVP 2	0	2	2	8	7	0	6	4	7
TVP 3	0	2	0	7	3	4	6	2	2
TVP 4	0	0	1	7	0	3	4	5	1
TVP 5	0	3	0	17	3	9	9	5	12
Gesamt	110	45	27	74	86	29	62	46	50

In der Tabelle sind neben der Gesamtzahl ausgewerteter Gefäße auch deren Verteilung auf die einzelnen Scores dargestellt.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Iso= isogene Transplantate; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apop. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; nekrot. spMZ= nekrotische Spendermilzzellen; srDC + apop. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Milzzellen gepulst worden waren; rDC + apop. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.

## Ergebnisse

Tabelle 28: Prozentualer Anteil betroffener Gefäße mit Transplantatvaskulopathie nach Zelltherapie bei zusätzlicher CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

Prozentualer Anteil betroffener Gefäße	Kontrolle Nativ	Iso	Iso+ CSA	Kontrolle CSA 1,25	Apop. spMZ	Nekr.. spMZ	DC ungepulst	srDC + apop. spMz	rDC + apop. spMz
TVP-Score 0	95	84	81	27	48	21	42	46	30
TVP-Score 1	5	0	7	20	37	24	18	20	26
TVP-Score 2	0	4	7	11	8	0	10	9	14
TVP-Score 3	0	4	0	9	3	14	10	4	4
TVP-Score 4	0	0	5	9	0	10	6	11	2
TVP-Score 5	0	8	0	23	3	31	15	11	24
Gesamt	5	16	19	73	52	79	58	54	70

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Iso= isogene Transplantate; Kontrolle CSA 1,25= CSA-immunsupprimierte Transplantatempfänger ohne zelltherapeutische Vorbehandlung; apop. spMZ= apoptotische Spendermilzzellen; nekrot. spMZ= nekrotische Spendermilzzellen; srDC + apop. spMZ= semireife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren; rDC + apop. spMZ = reife dendritische Zellen, die mit apoptotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren.

## **4.6 Pharmakologische Modulation dendritischer Zellen mit SFA**

Die Untersuchung der Effekte der Zelltherapie gibt Hinweise auf die Beteiligung dendritischer Zellen beim Abstoßungsprozess. Im Falle einer Vorbehandlung der Empfängertiere mit dendritischen Zellen, die ihrerseits zuvor mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, kam es zur Abstoßung der Transplantate trotz Verabreichung therapeutischer CSA-Immunsuppression (Kap. 4.5.1; Diagramm 5).

Da SFA zwei Schlüsselfunktionen der DC in-vitro blockiert, sind dessen Effekte im Transplantationsmodell nun von großem Interesse.

### **4.6.1 In-vivo-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute Abstoßung**

Zur Untersuchung der akuten Abstoßung sollte zunächst das Transplantatüberleben mit und ohne Immunsuppression ermittelt werden. Die Bestimmung des Transplantatüberlebens sollte die Fragestellung abklären, ob sich durch die tägliche subkutane Gabe von SFA das Transplantatüberleben im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe verlängert und ob sich durch Monotherapie mit der in der Studie ausgewählten Dosierung (Tag-1: 5 mg/kg KGW, Tag der Transplantation bis Tag 9: 2,5 mg/kg KGW, ab Tag 10: 1mg/kg KGW) ein Langzeitüberleben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes Tag 100 erreichen lässt.

Bei alleiniger Verabreichung von SFA wurde das Überleben der Transplantate nur geringfügig verlängert im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (Diagramm 8). Unbehandelte Transplantatempfänger (Kontrolle Akut) stießen das Transplantat innerhalb von 7 Tagen ab. Die Verabreichung von SFA verlängert das mediane Transplantatüberleben von 7 Tagen auf 9,5 Tage (Tabelle 29). SFA allein reicht folglich nicht aus, um die Transplantate längerfristig zu schützen.

## Ergebnisse

Tabelle 29: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate unter alleiniger Sangliferin A-Immunsuppression.

Überleben	Kontrolle Akut	Immunmodulation mit SFA
$x \pm s$	$7,2 \pm 0,45$	$9,5 \pm 1,29$
Median	7	9,5
n=	5	4

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Zahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.

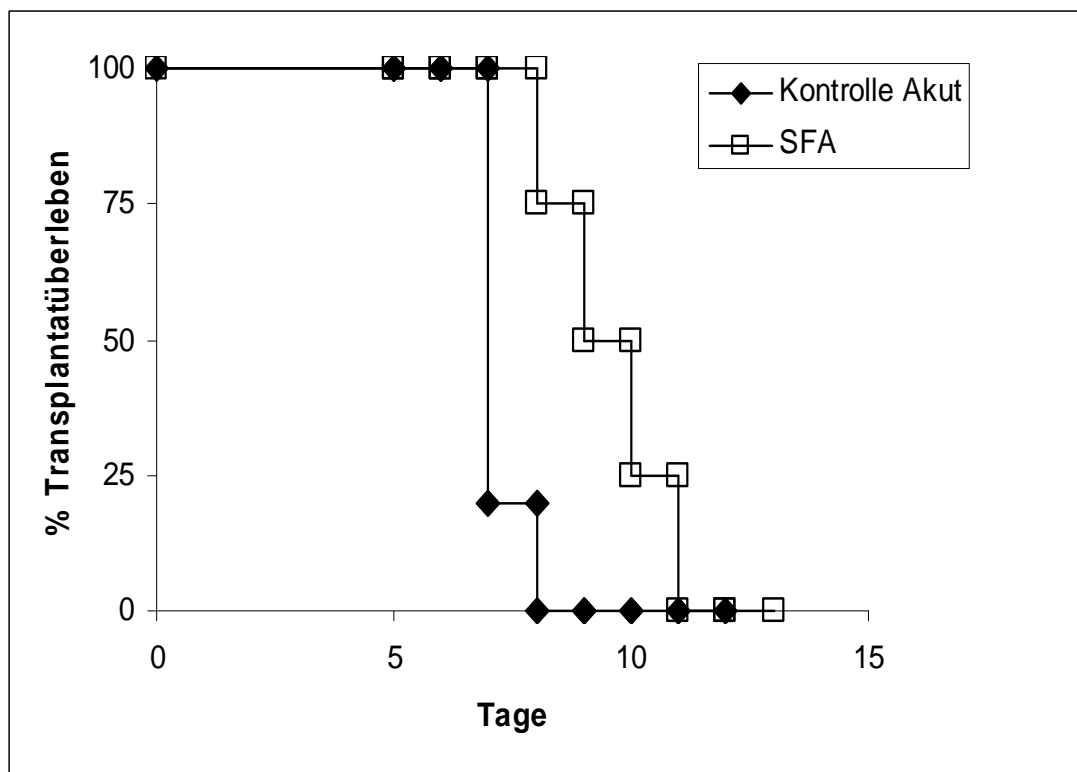


Diagramm 8: Überlebensgraphik bei Applikation von SFA.

Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.



Da es trotz Gabe von SFA zur Abstoßung der Transplantate kam, erfolgte in einem nächsten Schritt die Kombination mit CSA. In dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Versuch wurden verschiedene CSA Dosierungen (täglich subkutan verabreicht) im Hinblick auf Transplantatüberleben verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass mindestens eine Dosis von 1,25 mg/kg KGW notwendig ist, um den Endpunkt Tag 100 zu erreichen (Kap. 4.2, Diagramm 2).

Zunächst sollte nun untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von SFA in Kombination mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) das Transplantatüberleben verlängert und der Endpunkt Tag 100 so erreicht werden kann (Diagramm 9), da die jeweils alleinige Gabe von SFA bzw. CSA (0,625 mg/kg KGW) ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 nicht ermöglicht.

Die oben genannte Therapie bewirkte bei 66% der Transplantatempfänger ein Langzeittransplantatüberleben bis zum Endpunkt der Beobachtung Tag 100. Zwei Transplantatempfänger dieser Kombinationsgruppe stießen das Transplantat zwischen Tag 40 und Tag 50 ab (Diagramm 9).

Die Kombinationstherapie verlängerte folglich signifikant das mediane Transplantatüberleben. Während die Transplantatempfänger bei subtherapeutischer CSA-Immunsuppression lediglich ein medianes Transplantatüberleben von 24 Tagen zeigten, stieg die mediane Überlebenszeit bei der Kombinationstherapie auf mindestens 100 Tage an ( $p < 0,05$ ; Diagramm 9; Tabelle 30).

## Ergebnisse

Tabelle 30: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate bei Kombination von subtherapeutischer CSA-Immunsuppression mit Sanglifehrin A.

Überleben	CSA 0,625	CSA 0,625 + SFA
$x \pm s$	23,40 $\pm$ 5,55	82,17 $\pm$ 27,85
Median=	24	100
n=	5	6

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Zahl der Tiere pro Gruppe.

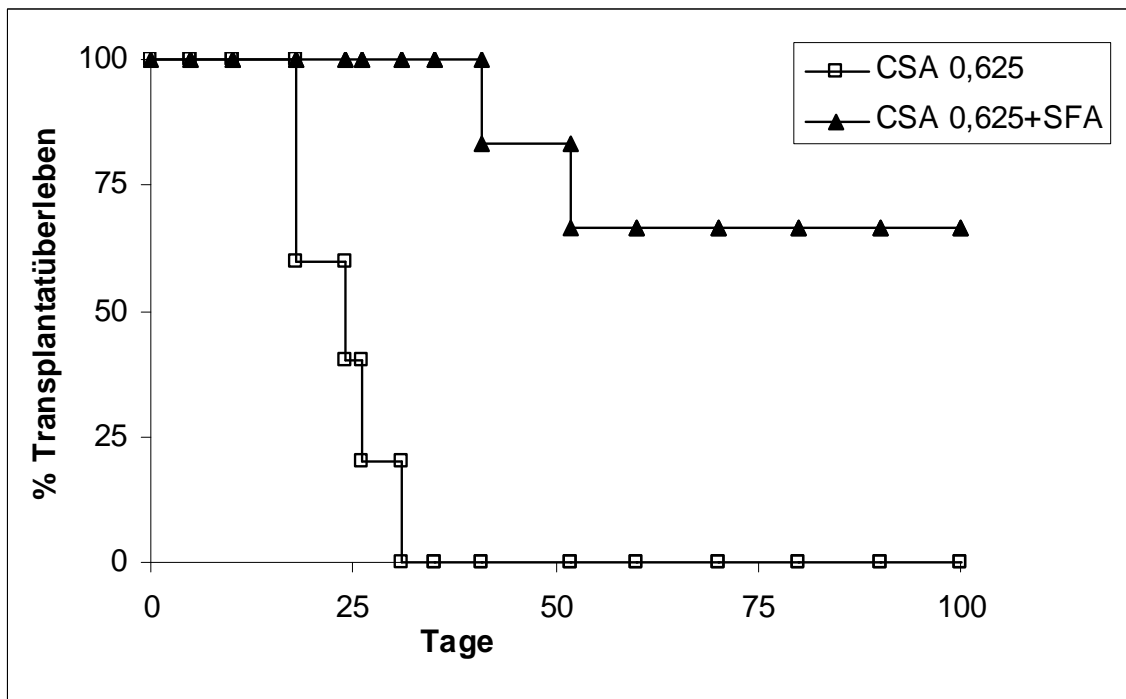


Diagramm 9: Überlebensgraphik bei Kombinationstherapie von SFA mit niedrig dosiertem CSA.

## Ergebnisse

---

Da eine Kombination von SFA mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) nicht ausreicht, um bei allen Transplantatempfängern den Endpunkt Tag 100 zu erreichen, wurde deshalb in einem Folgeversuch eine höhere CSA-Immunsuppression gewählt.

Erhöht man die Dosis der CSA-Immunsuppression auf 1,25 mg/kg KGW bei der Kombination der beiden Pharmaka, so erreicht man in allen Fällen ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 (Diagramm 10; Tabelle 31).

Tabelle 31: Mittlere Überlebenszeit der Transplantate bei Kombination von CSA-Immunsuppression mit Sanglifehrin A.

Überleben	CSA 0,625 + SFA	CSA 1,25 + SFA
$\bar{x} \pm s$	82,17 $\pm$ 27,85	100 $\pm$ 0,00
Median	100	100
n=	6	4

x= arithmetischer Mittelwert; s= Standardabweichung; n= Zahl der Tiere pro Gruppe.

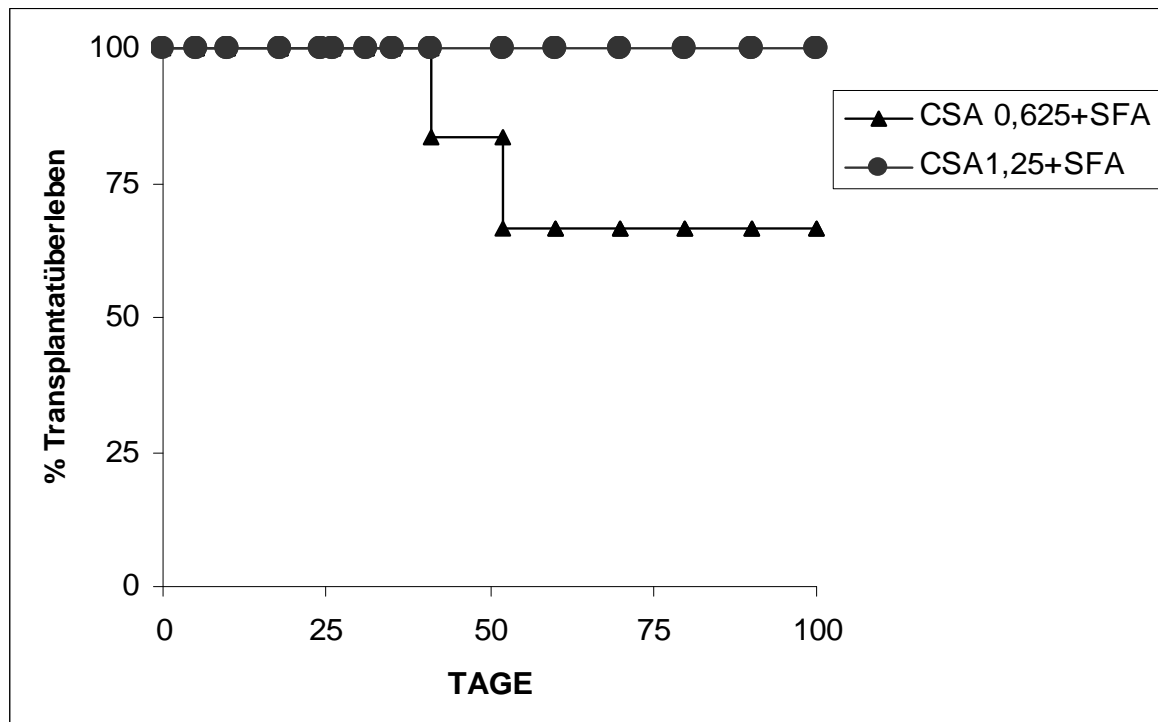


Diagramm 10: Überlebensgraphik bei Kombinationstherapie von SFA und höher dosiertem CSA.

#### **4.6.2 In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute Abstoßung (Immunhistologische Untersuchung)**

Bei der immunhistologischen Untersuchung wurde zunächst die zelluläre Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen untersucht. Die Quantifizierung der Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen soll exemplarisch für Tag 15 dargestellt werden, bei dem die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu finden sind. Die Entnahme und histologische Auswertung zu diesem Zeitpunkt basiert auf den Ergebnissen der Effekte von CSA und SFA auf das Transplantatüberleben.

Bei alleiniger Verabreichung von subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) kam es ab Tag 15 zur Abstoßung der Transplantate (Kap. 4.5.1, Diagramm 9). Bei Kombination dieser subtherapeutischen CSA-Dosis mit SFA erreichten 66% der Transplantatempfänger den Endpunkt der Beobachtung Tag 100.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Abstoßung der Transplantate der subtherapeutisch CSA-immunsupprimierten Transplantatempfänger mit einer verstärkten zellulären Infiltration korreliert. Durch den Vergleich der zellulären Infiltration von 3 verschiedenen Gruppen sollte geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen verkürzter Überlebensdauer und dem Grad der Infiltration der Transplantate gibt.

Hierbei wurden eine Gruppe mit subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW), eine Gruppe mit Kombination von subtherapeutischer CSA-Immunsuppression und SFA und eine Gruppe mit therapeutischer CSA-Immunsuppression (2,5 mg/kg KGW), verglichen. Alle Transplantate der drei Gruppen wurden an Tag 15 entnommen, bei dem sich die Transplantate der subtherapeutisch CSA-immunsupprimierten Gruppe in der Abstoßung befanden.

Bei der Untersuchung der zellulären Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase der akuten Abstoßung) zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Kombinationstherapie CSA und SFA im Vergleich zur Monotherapie mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression von 0,625 mg/kg KGW (Diagramm 11).

## Ergebnisse

Die Kombinationstherapie SFA + CSA bewirkte eine signifikante Reduktion der zellulären Infiltration ( $p < 0,05$ ). Eine höhere Monotherapie der CSA-Immunsuppression (2,5 mg/kg KGW) reduzierte noch stärker die Ausprägung der Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen (Diagramm 11).

Tabelle 32: Zelluläre Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

MHCII Tag 15	CSA 0,625	CSA 0,625 + SFA	CSA 2,5
xg;	60,26;	22,91;	10,47;
SF	1,36	2,63	2,45
n=	6	6	6

xg=geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe.

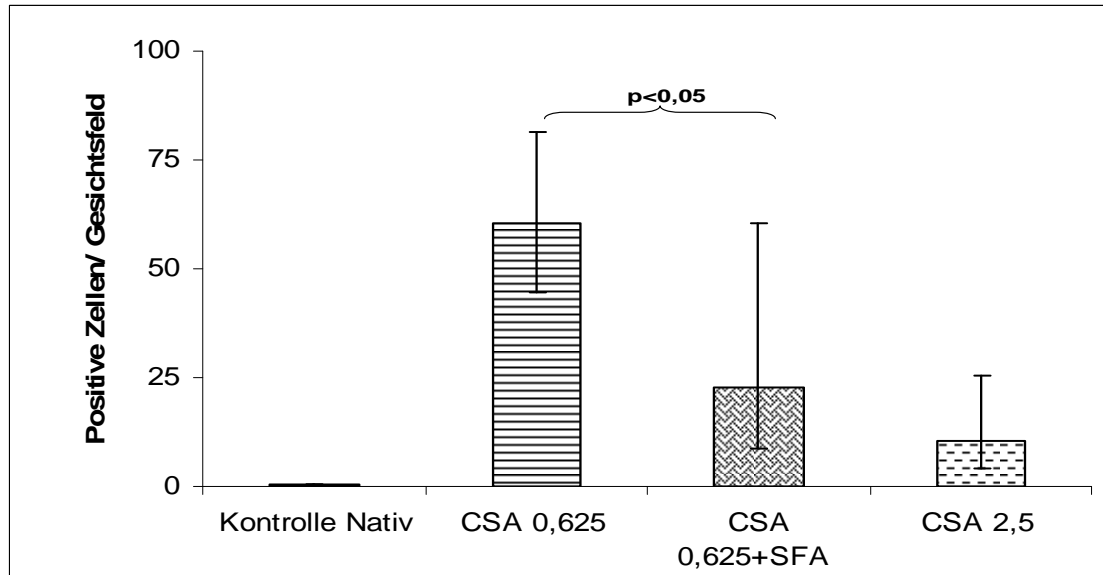


Diagramm 11: Infiltrationsstärke mit **MHC-II**-positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.

### 4.6.2.1 T-Zell Infiltration:

T-Zellen sind durch die Expression des T-Zellrezeptors auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Dieser Rezeptor setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen. Bei R 73 handelt es sich um einen Antikörper gegen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des T-Zellrezeptors und somit um einen Marker für T-Zellen.

In der Frühphase und in der Intermediärphase, d.h. an Tag 1 und an Tag 3 nach Herztransplantation, beobachtete man eine geringfügige, zunehmende Infiltration mit R 73-positiven Zellen. Es zeigten sich aber keine nennenswerten Unterschiede bei den einzelnen Gruppen.

Die zelluläre Infiltration nimmt im zeitlichen Verlauf nach Transplantation kontinuierlich zu (Kap. 4.3.1, Abb. 19). Erst an Tag 6 zeigten sich erste Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (nicht immunsupprimierte Gruppe und isogene Transplantate) und den immunsupprimierten Gruppen (Diagramm 12). Hierbei wies die nicht immunsupprimierte Kontrollgruppe die stärkste zelluläre Infiltration auf. Weder eine subtherapeutische CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) noch die Kombination der subtherapeutischen CSA-Immunsuppression mit SFA konnte die Anzahl infiltrierender Zellen reduzieren. Bei alleiniger SFA-Gabe zeigte sich eine Reduktion der zellulären Infiltration. Auch eine CSA-Immunsuppression von 2,5 mg/kg KGW bewirkte eine geringfügige Reduktion der Infiltration (Diagramm 12).

## Ergebnisse

---

Tabelle 33: Zelluläre Infiltration mit R 73-positiven Zellen (TCR) an Tag 6 (Spätphase) nach Transplantation.

R 73- positive Zellen Tag 6	Kontrolle Nativ	Iso	Kontrolle Akut	CSA 0,625	SFA	CSA 0,625 + SFA	CSA 2,5
xg;	3,98;	6,76;	32,36;	33,88;	15,14;	26,92;	15,85;
SF	3,24	2,4	1,55	1,35	3,8	3,31	2,14
n=	4	4	6	5	3	5	9

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe;  
Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard, Kontrolle Akut= nicht  
immunsupprimierte Transplantatempfänger.



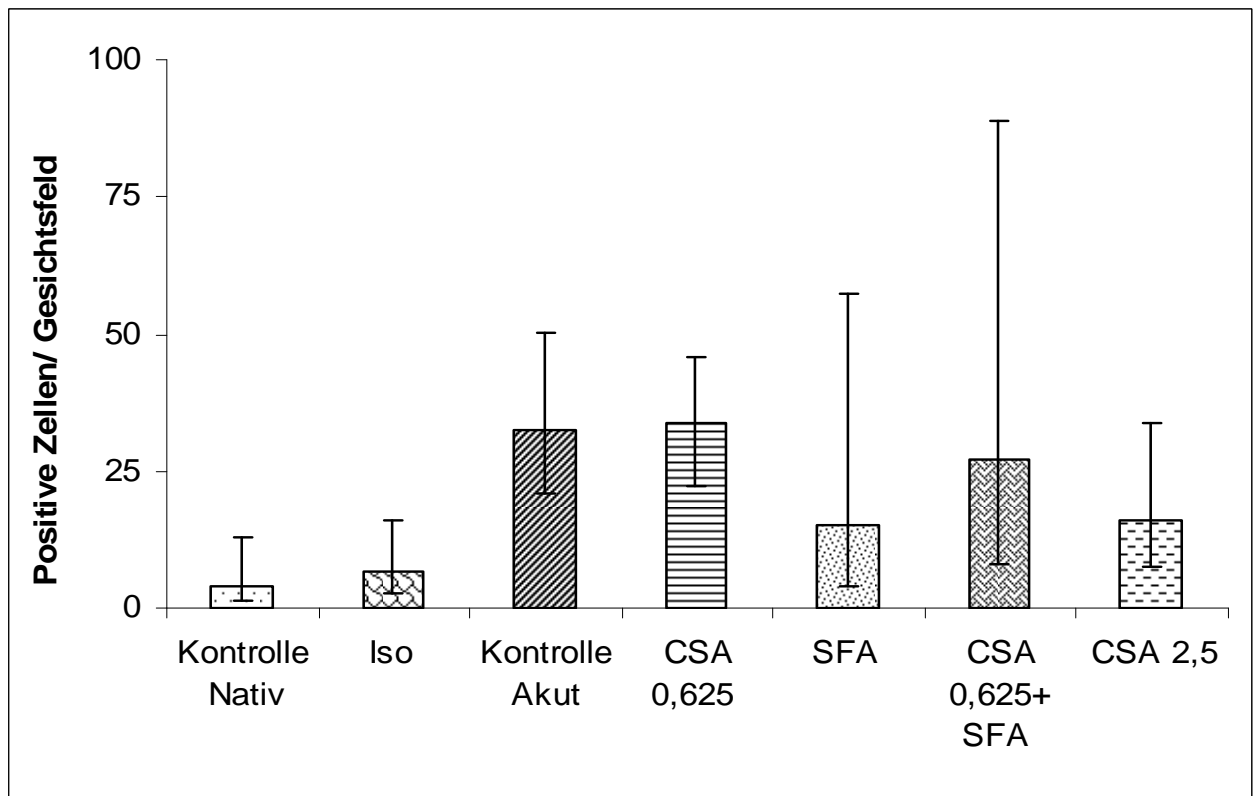


Diagramm 12: Infiltrationsstärke mit **R 73**-positiven Zellen an Tag 6 (Spätphase) nach Transplantation.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard, Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Transplantatempfänger.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Transplantatüberlebens zeigten, dass mit SFA allein der Endpunkt Tag 100 nicht erreicht wurde. Die Kombination von SFA mit subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) verlängerte signifikant das Überleben der Transplantate und ließ 66% der Transplantate Tag 100 erreichen (Kap. 4.5.1; Diagramm 9).

In diesem Zusammenhang sollte nun auch die zelluläre Infiltration mit R 73-positiven Zellen zu einem Zeitpunkt ermittelt werden, bei dem die subtherapeutische CSA-Immunsuppression kein Überleben der Transplantate mehr gewährleistet. Unter subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) wurden die Transplantate ab Tag 15 abgestoßen (Kap. 4.5.1; Diagramm 9).

Um festzustellen, ob die verkürzte Überlebenszeit der Transplantate mit einer verstärkten zellulären Infiltration korreliert, wurden 3 Gruppen untersucht (Diagramm 13, Tabelle 34). Die erste Gruppe erhielt eine subtherapeutische CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW), die zweite Gruppe eine Kombination von subtherapeutischer CSA-Immunsuppression mit SFA und die dritte Gruppe eine therapeutische CSA-Immunsuppression (2,5 mg/kg KGW). Alle Transplantate der drei Gruppen wurden an Tag 15 entnommen, bei dem sich die Transplantate der subtherapeutisch CSA-immunsupprimierten Gruppe in der Abstoßung befanden.

Bei der Untersuchung der Transplantate beobachtete man eine starke Infiltration mit R 73-positiven Zellen bei der subtherapeutisch (0,625 mg/kg KGW) CSA-immunsupprimierten Gruppe (Diagramm 13, Abb. 21): Zusätzliche Gabe von SFA reduzierte signifikant die Anzahl infiltrierender R 73-positiver Zellen ( $p < 0,05$ ). Die therapeutische Immunsuppression mit CSA (2,5 mg/kg KGW) reduzierte noch stärker die zelluläre Infiltration (Diagramm 13, Abb. 21).

## Ergebnisse

Tabelle 34: Zelluläre Infiltration mit R 73-positiven Zellen (TCR) an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

R 73- positive Zellen Tag 15	CSA 0,625	CSA 0,625 + SFA	CSA 2,5
xg;	40,47;	15,85;	3,55;
SF	2,45	3,02	3,47
n=	6	6	6

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe.

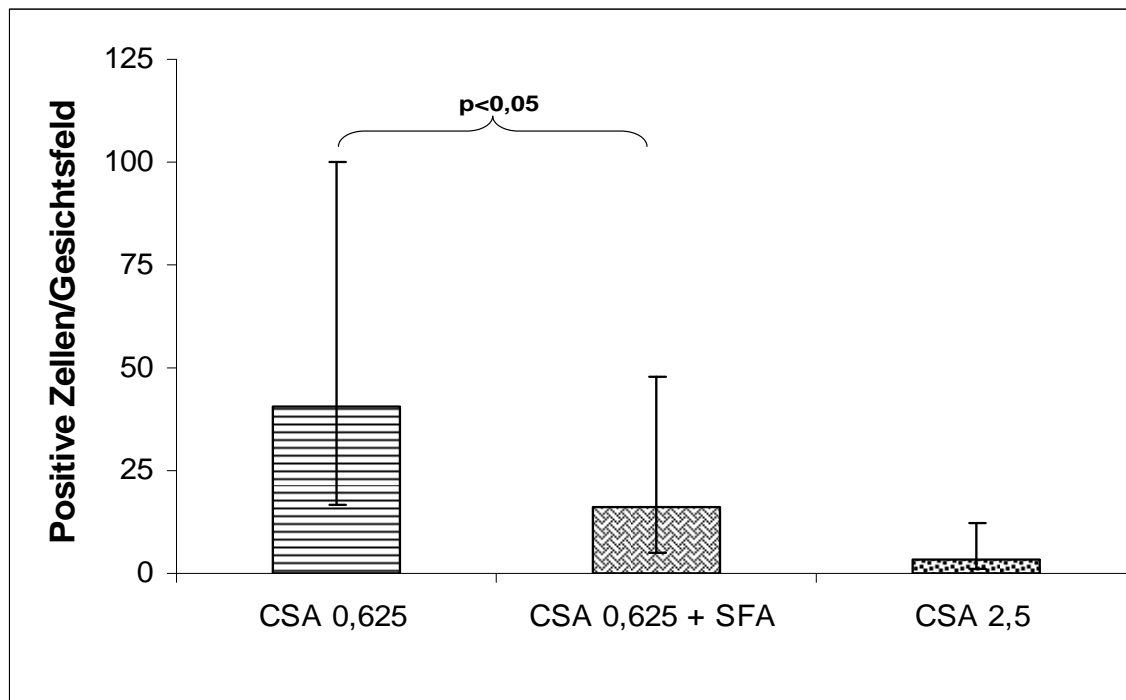
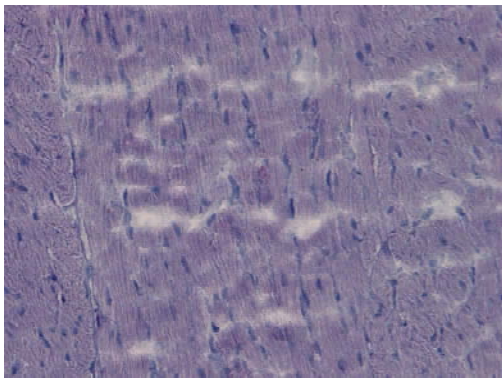
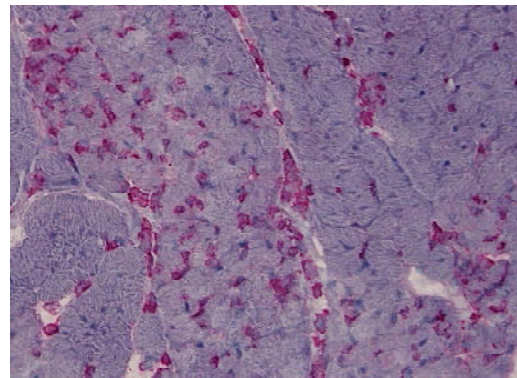


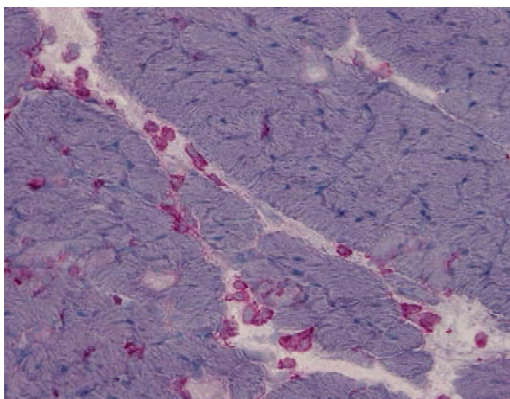
Diagramm 13: Infiltrationsstärke mit R 73-positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.



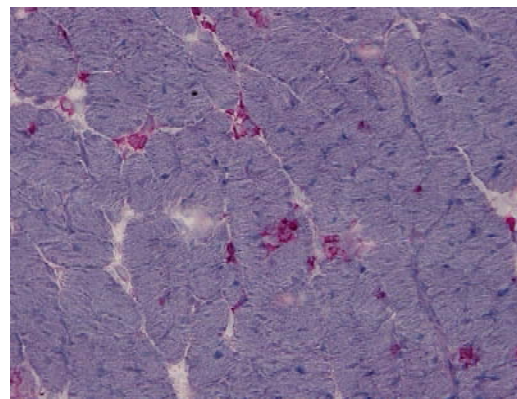
**Kontrolle Nativ**



**CSA 0,625 mg/kg KGW**



**CSA 0,625 mg/kg KGW + SFA**



**CSA 2,5 mg/kg KGW**

Abbildung 21: Unterschiedlich starke zelluläre Infiltration mit **R 73**-positiven (rot gefärbten) Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation nach unterschiedlicher Immunsuppression (Primärvergrößerung x 40).

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.

### 4.6.2.2 Monozyten/Makrophagen-Infiltration

Im zeitlichen Verlauf nach Transplantation kommt es zu einer progredienten Infiltration des Transplantatgewebes mit mononukleären Zellen. Neben T-Zellen infiltrieren auch Monozyten und Makrophagen das Transplantatgewebe.

Analog zur Untersuchung der Infiltration mit R 73-positiven Zellen (T-Zellen) wurde die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen untersucht.

Hierbei wurde beobachtet, dass sich die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen ähnlich verhält wie die mit T-Zellen. Erkennbare Unterschiede zeigen sich erst ab Tag 6 post transplantationem (Diagramm 14). Die nicht immunsupprimierte Gruppe zeigte die stärkste Infiltration mit Monozyten und Makrophagen. Die Kombinationstherapie von subtherapeutisch dosiertem CSA (0,625 mg/kg KGW) und SFA bewirkte eine schwach signifikante Reduktion der Infiltration mit Monozyten und Makrophagen ( $p < 0,05$ ).

An Tag 15 werden die Unterschiede dann noch deutlicher (Diagramm 15; Abb. 22). Hier reduzierte die Kombinationstherapie von subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) mit SFA signifikant die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen ( $p < 0,05$ ; Diagramm 15).

## Ergebnisse

Tabelle 35: Zelluläre Infiltration mit ED-1 positiven Zellen an Tag 6 (Spätphase) nach Transplantation.

ED-1 Tag 6	Kontrolle Nativ	Iso	KontrolleA kut	CSA 0,625	SFA	CSA 0,625 + SFA	CSA 2,5
xg;	1,2;	2,1;	36,31;	30,2;	22,91;	22,39;	22,39;
SF	2,57	3,02	1,58	1,38	2,14	1,58	1,78
n=	4	4	6	5	3	5	9

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe; ED-1: Marker für Monozyten und Makrophagen; Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Kontrollgruppe.

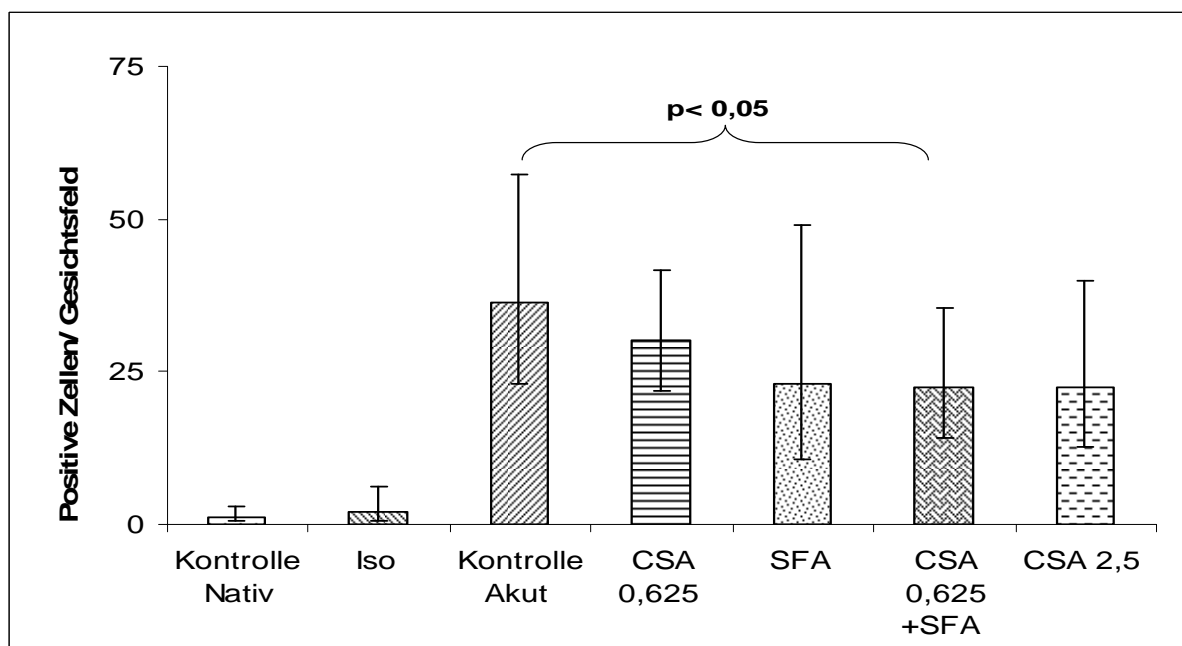


Diagramm 14: Infiltrationsstärke mit **ED-1** positiven Zellen an Tag 6 (Spätphase) nach Transplantation bei unterschiedlicher Immunsuppression.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard; Kontrolle Akut= nicht immunsupprimierte Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

Tabelle 36: Zelluläre Infiltration mit ED-1 positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

ED-1 Tag 15	Kontrolle Nativ	CSA 0,625	CSA 0,625 + SFA	CSA 2,5
xg;	1,2;	38,9;	15,49;	4,17;
SF	2,57	1,91	2,14	3,16
n=	4	6	6	6

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe; ED-1: Marker für Monozyten und Makrophagen; Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.

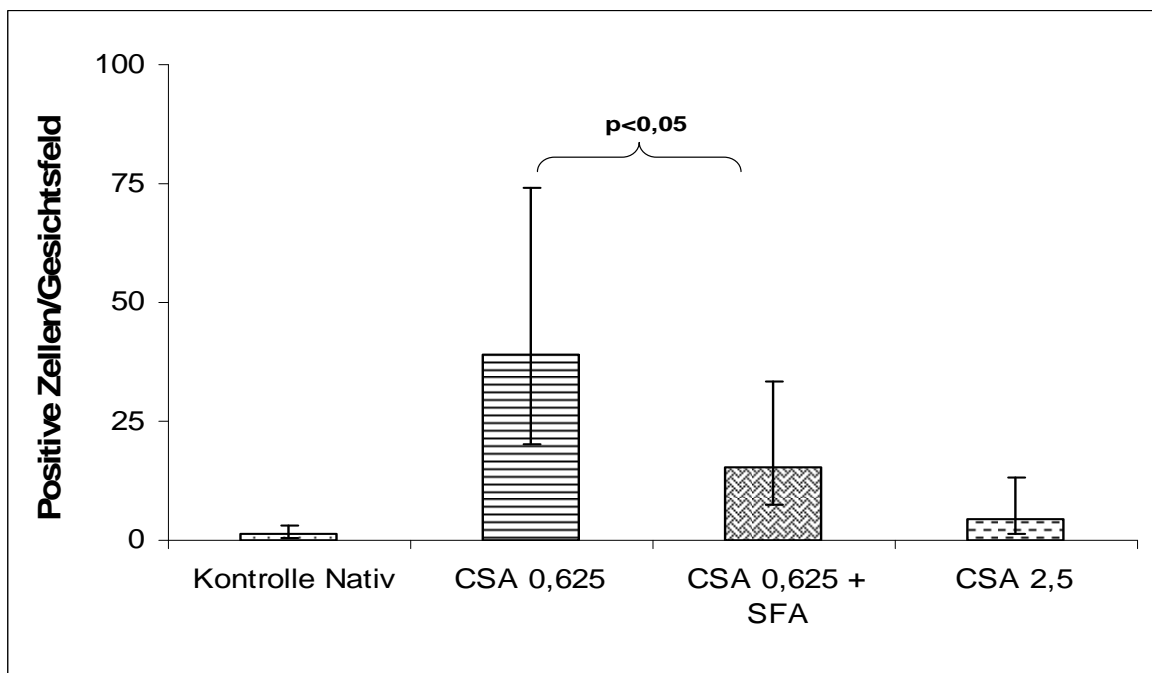
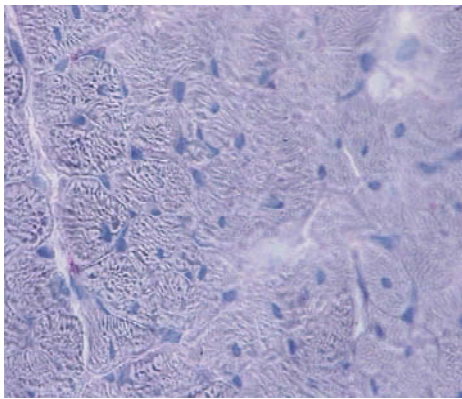
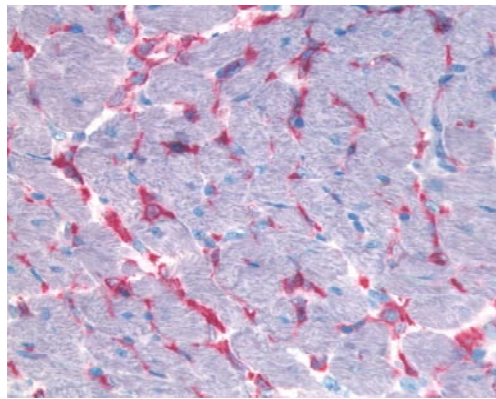


Diagramm 15: Infiltrationsstärke mit **ED-1** positiven Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

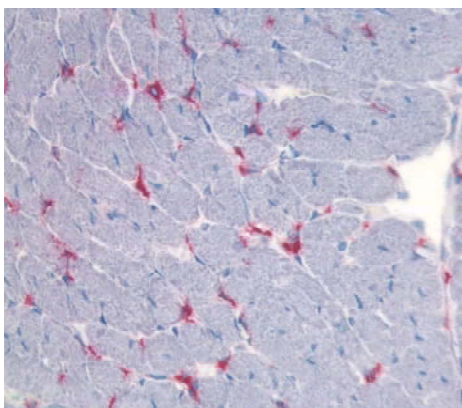
Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.



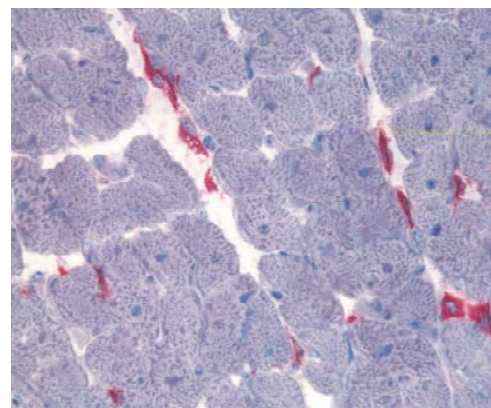
**Kontrolle Nativ**



**CSA 0,625 mg/kg KGW**



**CSA 0,625 mg/kg KGW + SFA**



**CSA 2,5 mg/kg KGW**

Abbildung 22: Unterschiedlich starke zelluläre Infiltration mit **ED-1** positiven (rot gefärbten) Zellen an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation nach unterschiedlicher Immunsuppression (Primärvergrößerung x 40).

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.



#### **4.6.3 In-vitro-Teil: Effekte der pharmakologischen Therapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

Für die Beurteilung des Effektes der Immunsuppression durch SFA bzw. in Kombination mit CSA auf die chronische Transplantatdysfunktion wurden Empfängertiere herangezogen, die den Endpunkt der Beobachtung Tag 100 erreichten. Besonderes Augenmerk lag hier auf dem Vergleich einer Gruppe mit einer höheren CSA-Dosis für die Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) und einer Kombination dieser Dosierung mit SFA. Grundlage der Wahl dieser Dosierung waren die Ergebnisse der Untersuchung des Transplantatüberlebens. Bei dieser Kombination erreichten alle Transplantatempfänger den Endpunkt Tag 100 (Kap. 4.5.1, Diagramm 10). Außerdem wurde beobachtet, dass eine Dosiserhöhung des Immunsuppressivums CSA keine Reduktion der TVP bewirkt (Kap. 4.3, Diagramm 3). Die Dosisreduktion der einzelnen Komponenten der Immunsuppressiva stellt ein langfristiges Ziel der Transplantationsmedizin dar, um die oft beträchtlichen Nebenwirkungen der Immunsuppression möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund wurde auf einen Vergleich mit einer höheren CSA-Dosierung (2,5 mg/kg KGW) als Kombination verzichtet.

Hierbei beobachtete man bei der Kombinationstherapie (CSA 1,25 mg/kg KGW + SFA) eine signifikant geringer ausgeprägte Transplantatvaskulopathie als unter alleiniger CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) ( $p < 0,05$ ; Abb. 23; Diagramm 16). Die Auswertung der TVP bei alleiniger CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) ergab einen geometrischen Mittelwert von 1,35. Zusätzliche Gabe von SFA reduzierte signifikant die Ausprägung der TVP ( $x_g = 0,76$ ).

Bei der Kombinationstherapie von CSA (1,25 mg/kg KGW) mit SFA beobachtete man deutlich weniger schwer betroffene Gefäße als unter Monotherapie mit CSA-Immunsuppression (Tabelle 38, Tabelle 39). Der Hauptteil der Gefäße bei der Kombinationstherapie wies Scores von 0 und 1 auf und zeigte somit nur geringe Anzeichen einer Transplantatvaskulopathie. Hingegen beobachtete man bei der Monotherapie mit CSA (1,25 mg/kg KGW) eine deutlich stärker ausgeprägte TVP mit mehr schwer betroffenen Gefäßen mit den TVP-Scores 3, 4 und 5 (Tabelle 38, Tabelle 39)

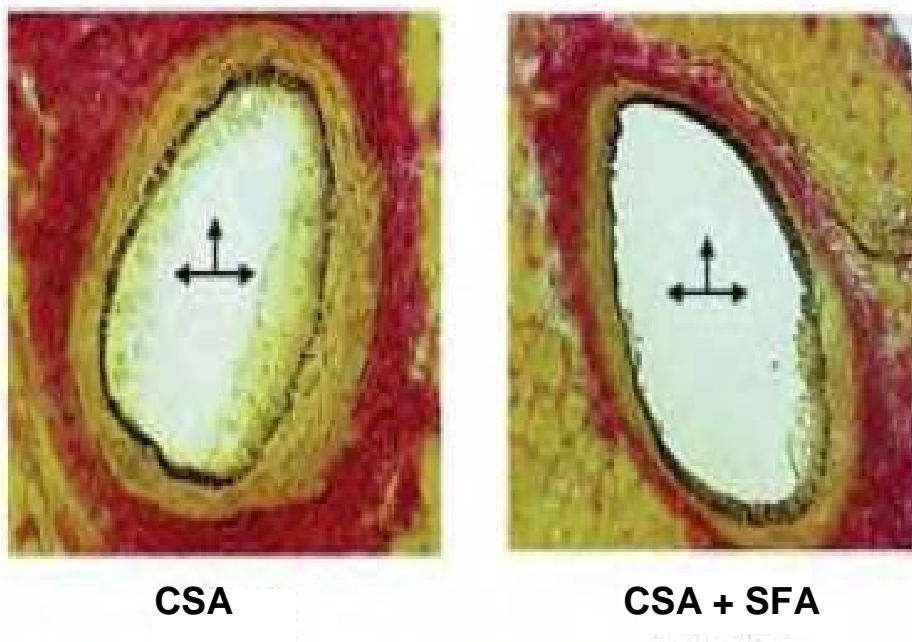


Abbildung 23: Reduzierte Ausprägung der TVP nach kombinierter Immunsuppression von CSA (1,25 mg/kg KGW) + SFA im Vergleich zu alleiniger CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) an H&E und Van-Gieson gefärbten Myocardschnitten (Hackstein, H. et al., 2007; Primärvergrößerung x 10).

## Ergebnisse

Tabelle 37: Geometrische Mittelwerte und Median der Transplantatvaskulopathie nach CSA-Immunsuppression und Kombinationstherapie mit Sanglifhrin A.

TVP	Kontrolle Nativ	Iso	Iso + CSA 1,25	CSA 2,5	CSA 1,25	CSA 1,25 + SFA
xg; SF	0,52; 1,17	0,68; 2,04	0,63; 1,74	1,26; 2,69	1,35; 2,63	0,76; 1,82
Median	0	0	0	1	1	0
n=	4	9	4	10	12	4

xg= geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor; n= Zahl der Tiere pro Gruppe; Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.

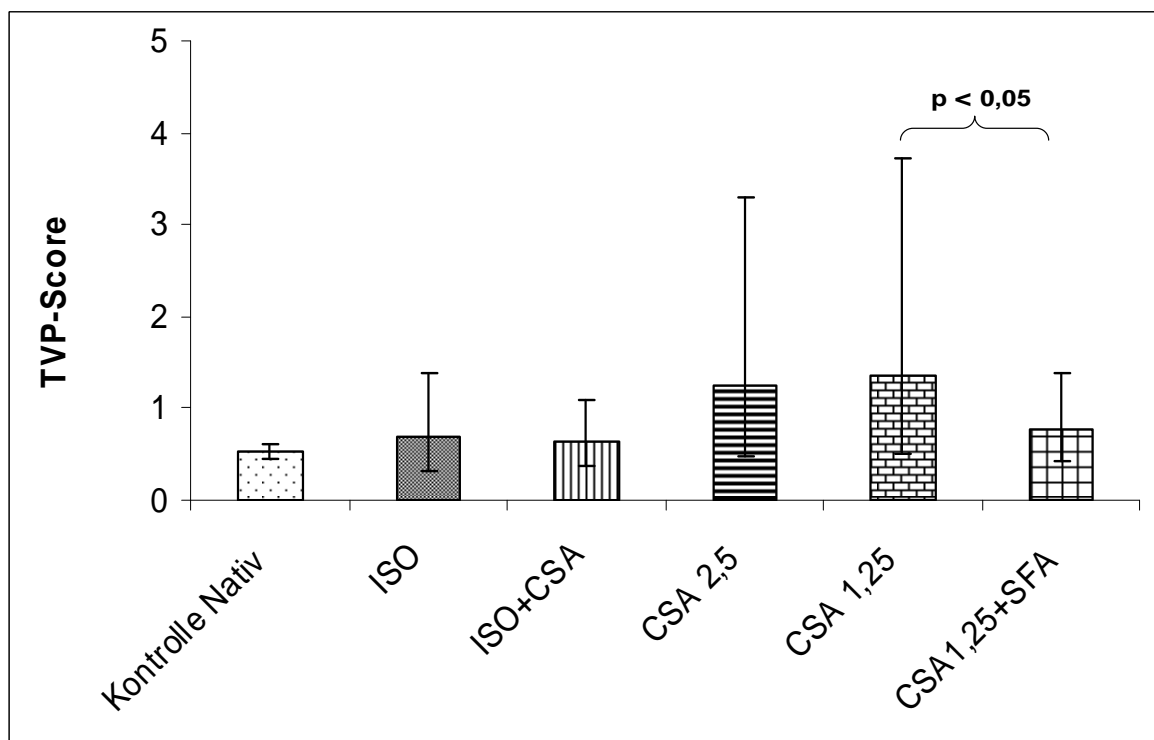


Diagramm 16: Transplantatvaskulopathie nach Applikation von CSA und SFA, ermittelt als geometrischer Mittelwert von TVP-Scores.

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard.

## Ergebnisse

---

Tabelle 38: Anzahl betroffener Gefäße mit Transplantatvaskulopathie nach Immunsuppression mit CSA und SFA.

Anzahl betroffener Gefäße	Kontrolle Nativ	Iso	Iso + CSA 1,25	CSA 2,5	CSA 1,25	CSA 1,25 + SFA
TVP 0	104	38	22	31	36	11
TVP 1	6	0	2	10	7	4
TVP 2	0	2	2	4	5	2
TVP 3	0	2	0	8	13	1
TVP 4	0	0	1	2	5	0
TVP 5	0	3	0	14	16	0
Gesamt	110	45	27	69	82	18

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard, Iso= isogene Transplantate.

## Ergebnisse

Tabelle 39: Prozentualer Anteil betroffener Gefäße mit Transplantatvaskulopathie nach Immunsuppression mit CSA und SFA.

Prozentualer Anteil betroffener Gefäße	Kontrolle Nativ	Iso	Iso + CSA 1,25	CSA 2,5	CSA 1,25	SFA + CSA 1,25
TVP-Score 0	95	84	81	45	44	61
TVP-Score 1	5	0	7	14	9	22
TVP-Score 2	0	4	7	6	6	11
TVP-Score 3	0	4	0	12	16	6
TVP-Score 4	0	0	5	3	6	0
TVP-Score 5	0	8	0	20	20	0
Gesamt	5	16	19	55	56	39

Kontrolle Nativ= nicht transplantiertes Spendermyocard, Iso= isogene Transplantate.

## **4.7 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse der Zelltherapie**

### **4.7.1 Effekte der Zelltherapie auf die akute Abstoßung**

1. Die Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit nekrotischen und apoptotischen Spendermilzzellen hat ein verlängertes Überleben der Transplantate zur Folge. Die akute Abstoßung kann jedoch nicht verhindert werden.
2. Trotz Immunsuppression kommt es bei der Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit autologen DC, die ihrerseits zuvor mit nekrotischen Spendermilzzellen beladenen worden waren, zur akuten Abstoßung des Transplantates. Dies gibt Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung dendritischer Zellen beim Abstoßungsprozess.

### **4.7.2 Effekte der Zelltherapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

1. Bei der Vorbehandlung der Empfänger mit autologen DC, die ihrerseits zuvor mit apoptotischen Milzzellen beladenen worden waren, erreichten diese den Endpunkt des Beobachtungszeitraumes Tag 100. Man findet jedoch keine geringere Ausprägung der TVP.
2. Die alleinige Vorbehandlung mit nekrotischen Spendermilzzellen führt im chronischen Modell nicht zur Abstoßung der Transplantate. Man findet eine stärkere Ausprägung der TVP.
3. Eine Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen allein führt im chronischen Modell zu einer signifikanten Hemmung der TVP.

## **4.8 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse der pharmakologischen Modulation dendritischer Zellen mit Sanglifehrin A**

### **4.8.1 Effekte der pharmakologischen Therapie auf die akute Abstoßung**

1. SFA konnte allein die akute Abstoßung nicht verhindern.
2. SFA in Kombination mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression verlängerte signifikant das Transplantatüberleben im Vergleich zur alleinigen Gabe von subtherapeutisch dosiertem CSA. 66% der Transplantatempfänger erreichten auf diese Weise den Endpunkt der Beobachtung Tag 100.
3. Die immunhistologische Auswertung zeigte eine signifikant verminderte Infiltration mit MHC-II-positiven Zellen bei der Kombinationstherapie CSA (0,625 mg/kg KGW) und SFA an Tag 15 (Spätphase) nach Transplantation.

### **4.8.2 Effekte der pharmakologischen Therapie auf die histologisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie**

Die Kombinationstherapie von SFA mit einer therapeutischen CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) bewirkte eine signifikant geringer ausgeprägte TVP als eine Monotherapie mit CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW).

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Hintergrund der Fragestellung

Trotz modernster Immunsuppressiva ist die Prognose herztransplantierte Patienten durch das Auftreten akuter Abstoßungsepisoden (Costanzo, M.R. et al., 1998; Hauptman, P.J. et al., 1995; Kobashigawa, J.A. et al., 1993) und der TVP limitiert. Die akute Abstoßung ist im ersten Jahr post operationem einer der Hauptgründe für den Transplantatverlust und gilt darüber hinaus als mitverantwortlich für die chronische Transplantatdysfunktion (Stoica, C. et al, 2006; Tullius, S.G. und Tilney, N.L., 1995; Tullius, S.G. et al., 1997), welche letztendlich für die Langzeitprognose entscheidend ist. Bisher konnte die Entstehung der TVP pharmakologisch nicht verhindert werden. In der vorliegenden Studie wurde ein neues Konzept zur effektiven Hemmung der o.g. Abstoßungsprozesse im Tiermodell Ratte getestet, welches auf der Hypothese basiert, dass dendritische Zellen eine Schlüsselfunktion beim Abstoßungsprozess allogener Transplantate spielen. Ziel ist es, durch eine Modulation der DC Hinweise auf eine neue Strategie zu finden, die diesen pathologischen Prozessen entgegen wirkt.



## 5.2 Die Wahl des Transplantationsmodelles

Tiermodelle bieten die Möglichkeit, in-vitro-Forschungsergebnisse in einem komplexen immunologischen System zu testen. Das etablierte Rattenherz-Transplantationsmodell hat diesbezüglich einige Vorteile: Die Verfügbarkeit genetisch genau definierter Inzuchtlinien, eine hohe Erfolgsquote der Transplantation und die relativ einfache artgerechte Haltung der Versuchstiere.

Bei dem hier beschriebenen Modell handelt es sich um ein heterotopes und somit um ein „non-working-heart-model“. Dies bedeutet, dass das Empfängertier zwei schlagende Herzen aufweist. Das originäre Herz hält den Blutkreislauf aufrecht, das transplantierte Herz weist hingegen nur ein Pendelblutvolumen auf und dient der Erforschung der immunologischen Phänomene. Dies bedeutet eine Abweichung von den physiologischen Bedingungen, da das Herz nicht gegen den physiologischen Druck arbeiten muss. Für die immunologischen Untersuchungen spielt diese Tatsache jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Trotz limitiertem Blutflusses in die Ventrikel des transplantierten Herzens wird das Myokard aufgrund der kontinuierlichen Herzkontraktionen adäquat perfundiert und somit dem Immunsystem des Transplantatempfängers ausgesetzt (Rahmani, M. et al., 2006). Die heterotope Form der Herztransplantation gehört seit der Erstbeschreibung von Ono, K. und Lindsey, E.S. (1969) modifiziert nach Schmid, C. et al. (1994) zu den etablierten Modellen.

Das hier ausgewählte Transplantationsmodell weist besondere genetische Unterschiede zwischen den beiden Rattenpopulationen auf (Schaub, M. et al., 1998). Es handelt sich hier um ein vollständig allogenes Transplantationsmodell mit MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Inkompatibilität zwischen Spender- und Empfängertieren. Diese Tatsache spiegelt „immunologisch“ die klinische Situation wider. Von besonderem Vorteil ist die Möglichkeit der Untersuchung der akuten und chronischen Transplantatabstoßung in ein und demselben Modell. Das Akutmodell lässt sich durch tägliche Gaben immunsuppressiver Pharmaka in ein chronisches Abstoßungsmodell überführen, ohne dass es hierdurch zur Toleranzinduktion kommt. Dies bedeutet, dass die Transplantatfunktion durch die immunsuppressive Therapie

## Diskussion

---

gewährleistet wird. Nach Unterbrechung der Immunsuppression kommt es zur Abstoßung.

### **5.3 Die Immunmodulation mit dendritischen und apoptotischen Zellen**

Der Schwerpunkt der zelltherapeutischen Studie bestand darin herauszufinden, welche Rolle dendritische Zellen als Haupt-Antigen-präsentierende Zellen beim Abstoßungsprozess spielen und ob sich durch eine zelltherapeutische Vorbehandlung mit ex-vivo manipulierten autologen DC oder apoptotischen Spenderzellen unter basaler CSA-Immunsuppression das Transplantat derart schützen lässt, dass es zur Reduktion der TVP kommt.

Der Hauptgrund für den Verlust des Transplantates liegt in der Immunantwort des Empfängers gegen die auf dem Spenderorgan befindlichen Alloantigene, die von diesem als fremd erkannt werden. Vermittelt wird die Anti-Spender-Antwort durch das Zusammenspiel immunkompetenter Zellen. Dendritische Zellen als professionelle APC spielen in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle, da sie neben immunstimulierenden auch immunregulatorische Funktionen aufweisen. Die Untersuchung dieses tolerogenen Potentials auch im Hinblick auf allogene Transplantationen war Untersuchungsgegenstand verschiedener Studien in den letzten Jahren (Lechler, R. et al., 2001; Lutz, M.B. und Schuler, G., 2000; Lutz, M.B. et al., 2002; Morelli, A.E. und Wang, Z., 2003; Peche, H. et al., 2005). Es wurde herausgefunden, dass gerade die unreifen /semireifen DC tolerogene Fähigkeiten haben. Der wesentliche Unterschied zu den reifen, die Immunantwort triggernden DC liegt insbesondere in der Ausstattung der DC mit MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen. Die tolerogenen DC sind durch eine reduzierte Ausstattung mit MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen (CD 40, CD 80, CD 86) und durch eine reduzierte IL-12 und vermehrte IL-10 Produktion charakterisiert und befinden sich in einem frühen Reifestadium (Lutz, M.B. et al., 2002; Penna, G. et al., 2005).

Die erste Generation der auf DC basierenden Technik der Induktion einer peripheren spenderspezifischen Toleranz zur Behandlung der Abstoßungsreaktion eines allogenen Transplantates erfordert die in-vitro-Generierung von DC des Empfängers/Spenders, die durch pharmakologische und/oder genetische Manipulation in einen regulatorischen Zustand gebracht werden (Review: Morelli, A.E. und Thomson, A.W., 2003; Hackstein, H. und Thomson, A.W., 2004). Die

Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit auf diese Weise modifizierten DC zeigte in verschiedenen experimentellen Transplantationsmodellen einen verlängernden Effekt auf das Überleben allogener Transplantate (Lutz, M.B. und Schuler, G., 2000; Peche, H. et al., 2005).

Die zweite Generation einer auf DC basierenden immunmodulierenden Therapie stellt die direkte Konfrontation der DC des Transplantatempfängers mit Spenderantigenen in situ dar. Hierbei werden dem Transplantatempfänger die spenderspezifischen Antigene direkt verabreicht, welche dann in einem nächsten Schritt von den DC des Empfängers in den sekundären lymphatischen Geweben phagozytiert, prozessiert und daraufhin den T-Zellen präsentiert werden. In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung, in welchem Zustand sich das verabreichte Spendermaterial befindet. Bei der Immunmodulation durch DC ist nämlich der Vitalitätsgrad der zu prozessierenden Spenderzellen von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der Immunantwort. In diesem Zusammenhang findet man bedeutende Unterschiede bei der Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen Zellen, wobei erstere einen suppressiven (Distler, J.H. et al., 2005; Voll, R.E. et al., 1997), letztere einen stimulatorischen Effekt (Shimamura, H. et al., 2005) auf die Phagozyten und dementsprechend auf die daraus resultierende Immunantwort haben.

Bei der Verabreichung von apoptotischen Zellen findet man in diversen Tiermodellen eine Verlängerung des Transplantatüberlebens (Knochenmark- und Herztransplantat) und einen herunterregulierenden Effekt auf die T-Zellantwort (Morelli, A.E. und Wang, Z., 2003). Dieses apoptotische Zellmaterial wird, nachdem es in die Blutbahn gelangt ist, von unreifen DC der Milz aufgenommen (Iyoda, T. et al., 2002; Morelli, A.E. et al., 2003) prozessiert und T-Zellen präsentiert, was eine verminderte T-Zellantwort zur Folge hat. Berichte hierzu liefern Liu, K. et al. (2002), Ferguson T.A. et al. (2002) und Maeda, A. et al. (2005). Weiterhin findet man in der Literatur Hinweise, dass apoptotische Zellen ein immunsuppressives Potential haben und auch das Transplantatüberleben verlängern (Fadok, V.A. et al., 1998; Sun, E. et al., 2004). DC sind mit ihrer Funktion als APC letztendlich die Zellen, die das weitere Schicksal der apoptotischen Zellen bestimmen, indem sie diese phagozytieren und die Fremderkennung vermitteln.

Im Gegensatz hierzu kann bei Verabreichung von nekrotischem Zellmaterial ein stimulierender Effekt auf die Immunantwort erwartet werden, da die Aufnahme nekrotischen Materials zur Ausreifung der DC (höhere Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen) führt, welche dann in der Lage sind, die T-Zellantwort zu aktivieren (Steinman, R.M., 1991).

Basierend auf diesen Forschungsergebnissen und Berichten sollte nun in der vorliegenden Studie der Effekt modulierter Empfänger-DC und apoptotischer Spendermilzzellen insbesondere auf die chronische Transplantatdysfunktion untersucht werden. Da die akute Abstoßung durch alleinige Zelltherapie sowohl mit dendritischen Zellen als auch mit apoptotischen Spenderzellen nicht zu verhindern ist bzw. sich auf diese Weise kein Langzeittransplantatüberleben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes Tag 100 induzieren lässt, wurde zur Gewährleistung des Transplantatüberlebens eine niedrige therapeutische CSA-Immunsuppression (1,25 mg/kg KGW) verabreicht. In der Literatur findet man einige zelltherapeutische Untersuchungen, die von positiven Effekten im Zusammenhang mit einer geringen Dosierung von immunsuppressiven Substanzen berichten (Beriou, G. et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Studie war es, unter basaler Immunsuppression eine vaskuläre Toleranz zu erzeugen. Dies sollte entweder direkt durch eine gezielte in-vitro Modulation und anschließende i.v.-Applikation tolerogener, mit Spenderantigen beladener DC bzw. indirekt durch Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen erzielt werden. Auf diese Weise sollte schließlich der chronischen Transplantatdysfunktion entgegengewirkt werden.

Die Versuche, bei denen die Empfängertiere mit heterologen Spendermilzzellen unterschiedlichen Zustandes (vital, apoptotisch, nekrotisch) vorbehandelt wurden, bestätigen nur zum Teil die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsergebnisse. So zeigte sich in der vorliegenden Studie bei einer Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit apoptotischen Spendermilzzellen eine Verlängerung des Transplantatüberlebens. Die Applikation vitaler Spendermilzzellen zeigt keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Versuchsergebnisse der Vorbehandlung mit nekrotischen Spendermilzzellen stimmen jedoch nicht mit den bisherigen Forschungsergebnissen überein. Erwartet wurde eine sensibilisierende

Wirkung auf das Immunsystem des Empfängers, die sich in einer verkürzten Überlebenszeit des Transplantates äußern sollte. Jedoch erreichten die Transplantatempfänger eine höhere Überlebenszeit als die Kontrollgruppe.

Dieser Effekt könnte gegebenenfalls darauf zurückzuführen sein, dass das den Empfängertieren verabreichte nekrotische Zellmaterial nicht ausreichend war, um über den Weg der indirekten Präsentation durch DC genug T-Zellen zu stimulieren, welche ihrerseits die Bildung von T-Gedächtnis-Zellen bedingen, welche letztendlich für eine akzelerierte Abstoßung bei der eigentlichen Transplantation verantwortlich wären.

Die Ergebnisse im akuten Modell zeigen, dass die alleinige Vorbehandlung mit Spendermilzzellen nicht ausreicht, das Transplantat langfristig zu schützen. Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse wurde nun im chronischen Modell unter Immunsuppression der Effekt auf die TVP untersucht.

Zum einen sollten die Effekte manipulierter autologer dendritischer Zellen unterschiedlicher Reifegrade und Beladungsformen und zum anderen der Einfluss der Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen untersucht werden.

Bei der Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit DC, die ihrerseits zuvor mit nekrotischen Spendermilzzellen gepulst worden waren, kam es trotz Immunsuppression sowohl bei den reifen als auch bei den semireifen DC zur Abstoßung. Dieses Versuchsergebnis stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Wirkung nekrotischen Materials auf die dendritischen Zellen überein. Nekrotische Zellen triggern die Immunantwort über das Vorhandensein proinflammatorischer Zytokine, die sehr wahrscheinlich auch bei den semireif verabreichten DC zur weiteren Ausreifung in vivo führten und somit in der vorliegenden Studie einen starken Stimulator der Immunantwort darstellten. Bei alleiniger i.v.-Administration von nekrotischen Spendermilzzellen erreichten sämtliche Empfänger das Endziel Langzeittransplantatüberleben von 100 Tagen, wobei sich in dieser Gruppe die TVP geringgradig verstärkte. Diese Ergebnisse deuten auf die Rolle der DC im akuten Transplantatabstoßungsprozess hin, deren Beteiligung durch diese Versuche bestätigt wird. Aufgrund der Tatsache, dass nekrotische Spendermilzzellen allein die akute Abstoßung unter Immunsuppression nicht beeinflussen und negative

Auswirkungen im Sinne einer verstärkten Ausprägung der TVP erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar werden, muß man davon ausgehen, dass die Abstoßungsreaktion auf die mit nekrotischem Material beladenen DC zurückzuführen ist und nicht auf etwaige Rückstände/Verunreinigungen der applizierten Zellsuspension mit Resten nekrotischen Materials. Falls das nekrotische Material ursächlich an der akuten Abstoßung beteiligt wäre, so müsste dies auch an einer verfrühten Transplantatabstoßung bei jenen Empfängern sichtbar werden, die nur mit nekrotischen Milzzellen vorbehandelt wurden. In diesem Zusammenhang spielt sehr wahrscheinlich auch - wie im Akutmodell - die Effektivität des Zusammentreffens des nekrotischen Materials mit den DC eine Rolle, die im Vergleich zur direkten DC-Verabreichung nur gering sein kann. Außerdem spielen auch andere APC wie Makrophagen bei der Phagozytose des nekrotischen Materials eine Rolle, die gegebenenfalls weniger stimulierend auf die Immunantwort wirken als die potenten reifen DC.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die mit nekrotischem Material beladenen DC eine starke Immunantwort ausgelöst haben. Die i.v.-Vorbehandlung hat somit zu einer Sensibilisierung des Immunsystems geführt, das zu einer verstärkten Generierung von Effektorzellen geführt hat, die letztendlich die akute Abstoßung trotz Immunsuppression bedingen. Die gewählte therapeutische Dosierung des Immunsuppressivums CSA von 1,25 mg/kg KGW stellte sich in diesem Fall als unzureichend heraus und hat im Falle einer akzelerierten Abstoßung vermutlich ein ungenügendes Wirkungsspektrum, da diese Abstoßungsform sowohl T-Zell als auch B-Zell-vermittelt ist.

Betrachtet man die Versuche mit DC, die mit apoptotischem Material beladen worden waren, so findet man deutliche Unterschiede im Hinblick auf das Überleben der Transplantate. Wie erwartet, kam es bei den mit apoptotischen Spendermilzzellen beladenen DC nicht zur akuten Abstoßung unter basaler Immunsuppression. Hier wurde bis auf einen Ausfall bei allen Transplantatempfängern ein Langzeitüberleben von 100 Tagen erreicht. Im Hinblick auf die TVP lässt sich kein Unterschied bzw. keine Reduktion im Vergleich zur alleinigen Immunsuppression verzeichnen. Die Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen dagegen führte zu einer signifikanten Reduktion der TVP, die sich zwischen der isogenen Kontrollgruppe und

der CSA- Gruppe einordnen lässt.

Bei der TVP handelt es sich um ein komplexes, multifaktorielles Geschehen, bei dem sowohl immunologische, als auch nicht-immunologische Prozesse eine Rolle spielen (Behrendt, D. et al, 2000; Mehra, M.R. et al, 2006; Tullius, S.G. und Tilney, N.L., 1995; Weis, M. und Von Scheidt, W., 1997). In beiden Studien liegt der Schwerpunkt auf der Modulation der alloantigenabhängigen Faktoren. Auf nicht-immunologische Einflüsse wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Die Bedeutung alloantigenabhängiger Faktoren im Entstehungsprozess der TVP basiert auf folgenden Beobachtungen:

Zum einen beschränkt sich das Auftreten der TVP ausschließlich auf die Gefäße des transplantierten Organs (Billingham, M.E., 1992; Johnson, D.E. et al., 1998; Liu, G. et al., 1992; Oni, A.A. et al., 1992). Weiterhin tritt die TVP prinzipiell nur bei Allotransplantaten auf, während man bei Isotransplantaten keine oder nur eine geringgradige Ausprägung der TVP findet (Meiser, B.M. et al., 1991; Mennander, A. et al., 1991; Isik, F.F. et al., 1992; Shi, C. et al., 1994; Hirozane, T. et al., 1995). In den Läsionen befinden sich immunkompetente Zellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen und deren Sekretionsprodukte (Lymphokine). Außerdem besteht eine Korrelation akuter Abstoßungsepisoden mit der Entwicklung der TVP (Kobashigawa, J.A. et al., 1995; Narrod, J. et al., 1989; Schutz, A. et al., 1990; Stoica, S.C. et al., 2006; Tullius, S.G. und Tilney, N.L., 1995).

In der Studie wird deutlich, dass die Zelltherapie sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung beeinflusst. Eine Vorbehandlung mit durch Interleukine manipulierten DC konnte nicht die erhoffte vaskuläre Toleranz induzieren. Dagegen konnte dies durch die wesentlich einfacher durchführbare Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen annähernd erreicht werden. Da apoptotische Zellen von APC, d.h. insbesondere von DC, aufgenommen und in prozessierter Form den T-Zellen präsentiert werden, kann man vermuten, dass die Fragmente apoptotischer Zellen regulatorische Signale exprimierten, die zur Induktion tolerogener, das Fremdantigen präsentierender DC führten, die dann einen regulatorischen Einfluss auf die T-Zellen ausübten. Auf diese Weise konnten die antigenabhängigen Faktoren, die ursächlich an der TVP beteiligt sind, minimiert werden, was sich in



einer geringeren Ausprägung der TVP äußerte.

Vergleicht man die beiden zelltherapeutischen Vorbehandlungen, so werden einige Nachteile der ersten Generation der DC-Technologie deutlich: Gerade beim zelltherapeutischen Ansatz mit DC stellt sich die Übertragbarkeit auf die klinische Situation noch immer als sehr schwierig heraus. Als erster problematischer Punkt ist das benötigte Zeitfenster von 5-7 Tagen zur Generierung tolerogener DC zu nennen, das eigentlich nur bei der Lebendspende (Nieren-, Leber-Transplantation) nicht aber bei der Herztransplantation durchführbar wäre. Hinzu kommt die schwierige Steuerbarkeit der Applikationsform: ab dem Zeitpunkt der i.v.-Applikation kann eine weitere in vivo Ausreifung der DC und daraus resultierende Sensibilisierung des Empfängers auf das Spenderorgan nicht gesteuert bzw. verhindert werden und muss als Risiko kalkuliert werden. Außerdem ist schwer vorauszusagen, welcher Anteil der i.v. applizierten modulierten DC seine tolerogene Funktion ausübt (vorwiegend in den sekundären lymphatischen Geweben) und nicht in peripheren Geweben verbleibt, wo die Wahrscheinlichkeit, auf eine entsprechende T-Zellen zu treffen, gering ist (Morelli, A.E., 2006).

Eine Vorbehandlung mit apoptotischen Spenderzellen (indirekte Immunmodulation durch DC) hat dagegen einige Vorteile: Die systemische Administration apoptotischer Spender MHC-Molekül-exprimierender Zellen ist im Vergleich zur DC-Technologie einfacher durchzuführen. Zum einen ist die Generierung apoptotischer Spenderzellen weniger zeitintensiv. Darüber hinaus ist auch die Administration relativ sicher und das weitere Schicksal der apoptotischen Zellen bekannt (Iyoda, T. et al., 2002; Morelli, A.E. et al., 2003; Verbovetski, I. et al., 2002). Von besonderem Vorteil ist auch das Wissen über das Vorhandensein eines immunsuppressiven Signals, das apoptotische Zellen den DC vermitteln (Morelli, A.E. et al., 2003; Stuart, L.M. et al., 2002; Verbovetski, I. et al., 2002).

Da DC als APC letztendlich zu der Zellpopulation gehören, die den T-Zellen die Alloantigene apoptotischer Zellen in-vivo präsentieren (Nouri-Shirazi, M. und Guinet, E., 2002), stellt sich die vorhergehende Präparation der DC von Transplantatempfängern (direkte Immunmodulation durch DC) und deren in vitro-Beladung mit apoptotischem Spendermaterial als nicht erforderlich heraus (Xu, D.L. et al., 2004).

## Diskussion

---

Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt, da die Modulation von Empfänger-DC keine wirkungsvolle Vermeidung der TVP ergab.

## 5.4 Die Immunmodulation mit SFA

Die Untersuchungen der zelltherapeutischen Studie geben Hinweise auf eine Beteiligung der DC am Abstoßungsprozess. Die i.v.-Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit ex-vivo manipulierten und mit nekrotischen Spendermilzzellen beladenen DC führte hier trotz CSA-Immunsuppression zur akuten Abstoßung. Da SFA neben anderen immunmodulierenden Funktionen die Schlüsselfunktionen von DC in-vitro zu blockieren vermag, sollte nun im Transplantationsmodell der Effekt von SFA getestet werden. Der Immunmodulator SFA hat sowohl in *in-vitro* als auch in *in-vivo* Versuchen immunmodulatorische Fähigkeiten gezeigt (Steinschulte, C. et al., 2003; Zang, L.H. et al., 2001; Zenke, G. et al., 2001). Aufgrund dieser immunmodulatorischen Funktionen versprach man sich eine protektive Auswirkung auf das Transplantat.

Ziel dieser Teilstudie war es, den immunmodulatorischen Einfluss des neuen Immunmodulators SFA sowohl im Hinblick auf die akute Abstoßung als auch auf die TVP zu untersuchen.

CSA wurde als Referenzsubstanz eingesetzt. Die ersten Versuche dienten zur Bestimmung einer Mindestdosis CSA, die notwendig ist, um den Endpunkt Langzeittransplantatüberleben von 100 Tagen zu erreichen. Weiterhin wurden immunhistologische Untersuchungen der zellulären Infiltration und histologische Untersuchungen der TVP den Versuchen mit SFA zu Vergleichszwecken vorangestellt. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass es trotz CSA-Immunsuppression zu einer deutlichen Ausbildung der TVP kommt und eine Dosiserhöhung bzw. -verdopplung von CSA den Ausprägungsgrad nicht positiv im Sinne einer Reduktion der TVP zu beeinflussen vermag (CSA 1,25 mg/kg KGW: geometrischer Mittelwert des TVP-Scores:  $x_g=1,35$ ;  $n=12$ ; CSA 2,5 mg/kg KGW:  $x_g=1,26$ ;  $n=10$ )

Bei den Versuchen wurde festgestellt, dass SFA allein nicht ausreicht, die akute Abstoßung wirksam zu verhindern (Hackstein, H. et al., 2007). Aus diesem Grund wurde bei einer zweiten Versuchsgruppe SFA mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW), die allein zur Induktion des Langzeittransplantatüberlebens nicht ausreicht, kombiniert. Auf diese Weise erreichten 66%

der Transplantatempfänger den Endpunkt der Beobachtung Tag 100. Damit erbrachte die Kombinationstherapie einer subtherapeutischen CSA-Dosis mit SFA eine signifikant verbesserte Überlebenszeit der Transplantate.

Bei der akuten Abstoßung handelt es sich in erster Linie um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener immunkompetenter Zellen. Ist die initiale Fremderkennung erfolgt, die in den ersten Tagen nach Transplantation hauptsächlich über den direkten Weg der Fremderkennung läuft, so kommt es über verschiedene Mechanismen zur Infiltration des Transplantates mit immunkompetenten Zellen. Die das Transplantat infiltrierenden Zellen interagieren zytokinvermittelt miteinander. Dies hat schließlich neben der Aktivierung und Fokussierung der unspezifischen Effektorzellen die Konvertierung der immunkompetenten Lymphozyten in potente, auf das Antigen spezifisch geprägte Immunzellen zur Folge. CD3/CD4-positive T-Helfer-Zellen rekrutieren und aktivieren über die Ausschüttung von Lymphokinen (IL-2, IL-4) Monozyten und Lymphozyten und induzieren auf diese Weise deren Konvertierung in zytolytische/ zytostatische Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten, die die direkte Lyse von Endothel- und Parenchymzellen verursachen (Colonna, M. et al., 1993).

In der vorliegenden Studie muss davon ausgegangen werden, dass bei alleiniger Verabreichung von SFA die die Abstoßung triggernden Faktoren nur unzureichend moduliert wurden. Diese Tatsache könnte darin begründet sein, dass SFA nur eine geringfügige, 10 fach schwächere Wirkung als CSA auf die IL-2 vermittelte T-Zell-Proliferation hat (Zenke, G. et al., 2001). Gerade die T-Helfer-Zellen spielen beim Abstoßungsprozess eine zentrale Rolle, da sie die ersten Zellen sind, die mit dem Fremdgewebe interagieren und schließlich die Aktivierung der Immunantwort (vermittelt durch Zytokin- und Chemokinproduktion) triggern (Pattison, J.M. und Krensky, A.M., 1997; Wu, C.J. et al., 1992). Die Bedeutung der T-Zellen als Effektorzellen wurde 1989 in einem Rattenmodell experimentell bewiesen, bei dem gezeigt wurde, dass athymische Ratten das Allograft akzeptieren. Nach Injektion von naiven CD4+-T-Zellen erfolgte die Transplantatabstoßung, deren Heftigkeit noch rasanter bei Applikation geprimter CD4+-T-Zellen verlief (Bolton, E.M. et al., 1998).

In-vitro Untersuchungen der Wirkung von SFA zeigen eine Blockade der Endozytose bei humanen dendritischen Zellen. In experimentellen Versuchen im Mausmodell beobachtete man eine abgeschwächte DC-T-Zell-allostimulatorische Aktivierung und eine Blockade der bioaktiven IL-12p70 Produktion in vivo. Unsere experimentellen Daten zeigen, dass das bisher bekannte immunmodulierende Wirkungsspektrum von SFA in unserem Transplantationsmodell nicht ausreicht, um die akute Abstoßung zu verhindern.

Die akute Abstoßung erfolgt in der ersten Woche nach Transplantation hauptsächlich über den direkten Weg der Fremderkennung, d.h. über mittransplantierte Spender-APC, die von Empfänger T-Zellen direkt erkannt werden. Auf die Interaktion dieser APC mit den T-Zellen des Empfängers hat SFA vermutlich keinen wesentlichen Einfluss, so dass es zur Abstoßung der Transplantate kommt.

Vermutlich greift SFA erst zu einem späteren Zeitpunkt der Abstoßung, wenn die direkte Fremderkennung vermittelnden Spender-APC eliminiert wurden. Eine Blockade der Endozytose bei dendritischen Zellen, also deren Fähigkeit zur Antigenaufnahme, würde in erster Linie Einfluss auf die indirekte Fremderkennung haben. Diese findet nicht sofort nach der Transplantation, sondern erst zeitlich verzögert und dann parallel zur direkten Fremderkennung statt (Caballero, A. et al., 2006). Weiterhin wird vermutet, dass der direkte Weg der Allogenerkennung vor allem für frühe Abstoßungsepisoden verantwortlich ist, während die indirekte Fremderkennung erst später zum Tragen kommt und vor allem zur chronischen Transplantatdysfunktion beiträgt (Caballero, A. et al., 2006).

Diese Beobachtungen könnten die unzureichende Wirkung von SFA als Monotherapie erklären, das, wie beschrieben, nur eine geringe Wirkung auf T-Zellen hat und in unserer Studie nur in Kombination mit CSA ein Langzeittransplantatüberleben bis Tag 100 ermöglicht.

Die Kombination von SFA mit einer subtherapeutischen CSA-Immunsuppression lässt ein Langzeitüberleben von 66% der Transplantate bis zu einem Zeitpunkt von 100 Tagen zu und zeigt somit additive Effekte der beiden Pharmaka, da die beiden Substanzen verschiedene Zellen des Immunsystems modulieren.

Auf zellulärer Ebene könnte dieses Ergebnis mit der Wirkung von CSA auf T-Zellen erklärt werden. Als Calcineurin-Inhibitor verhindert CSA in erster Linie die Produktion des Zytokins Interleukin (IL)-2, welches eine zentrale Rolle in der T-Zell-Aktivierung und Proliferation spielt (Perico, N. und Remuzzi, G., 1997). Gerade in dieser Funktion liegt die transplantatprotektive Wirkung. Da die subtherapeutische CSA-Immunsuppression allein nicht für ein Langzeitüberleben ausreicht, kann man schließen, dass SFA und CSA synergistisch wirken. Immunhistologische Untersuchungen der zellulären Infiltration zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation unterstützen diesen Erklärungsansatz und zeigen eine signifikant verminderte zelluläre Infiltration sowohl mit T-Zellen als auch mit Monozyten und Makrophagen bei der Kombinationstherapie. Man sieht hier eine deutliche Korrelation zwischen geringerer zellulärer Infiltration und verlängertem Transplantatüberleben

Andere Forschungsergebnisse stellen diesen Erklärungsansatz der Transplantatprotektion jedoch in Frage. Eine markante Reduktion der zellulären Infiltration führte in Untersuchungen von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen nicht zur Verlängerung des Transplantatüberlebens in einem allogenen Herztransplantationsmodell bei der Ratte (Fingerhuth, H. et al., 2004; Renkonen, R. et al., 2002).

Neben der Anzahl der das Transplantat infiltrierenden T-Zellen muss auch deren Zugehörigkeit zu bestimmten T-Zell-Subpopulationen (wie T-Helfer-Zellen, regulatorische T-Zellen, zytotoxische T-Zellen) berücksichtigt werden, welche letztendlich über verschiedene Effektormechanismen die Transplantatzerstörung einleiten kann. In dieser Studie konnte nur gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie eine Reduktion der T-Zellen zur Folge hat. Der immunhistologische Marker R 73, der lediglich die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten des T-Zellrezeptors markiert, macht aber keine Aussage über den Aktivierungsgrad der T-Zellen an sich, wodurch eine Unterscheidung zwischen aktivierten, die Immunantwort triggernden, und regulatorischen T-Zellen nicht möglich ist.

Im Hinblick auf die Vermutung eines synergistischen Effektes der beiden Pharmaka muss man jedoch auch deren Pharmakokinetik berücksichtigen wie eventuell einen ähnlichen Weg der Metabolisierung, Biotransformation und Ausscheidung. Dies

könnte bedeuten, dass die beiden Pharmaka eventuell über ähnliche Mechanismen metabolisiert werden und es somit zu einer verlängerten Verweildauer der Pharmaka im Organismus kommen könnte, die sich in einer potenzierten pharmakologischen Wirkung äußern könnte. Klinische und experimentelle Studien zeigten beispielsweise bei Kombination von CSA mit Sirolimus (neueres Immunsuppressivum), dass die Synergie auch auf die Pharmakokinetik zurückzuführen sein kann. Dies kann folglich auch eine gesteigerte Toxizität verursachen (Knight, R.J. und Kahan, B.D., 2006; Podder, H. et al., 2001). In unserem Fall wurde keine gesteigerte Toxizität beobachtet, lediglich eine vermehrte Hautirritation an der Injektionsstelle, die jedoch auf die Zusammensetzung der Lösungsmittel von SFA zurückzuführen sein kann. Über eine gesteigerte Nephrotoxizität kann keine Aussage getroffen werden, da keine Untersuchung an den Nieren auf eine mögliche Toxizität erfolgte.

Betrachtet man die Effekte der Kombinationstherapie auf die Ausbildung der TVP, so zeigte sich in der Studie, dass die Kombination von SFA mit CSA zu einer signifikanten Reduktion der TVP führte.

Lange Zeit sah man die *chronische Transplantatdysfunktion* als ein primär Antikörper-vermitteltes Geschehen an. Histomorphologisch lassen sich Immunglobuline, Komplement- und Endothelzell-spezifische Antikörper in Geweben chronisch abgestoßener Organe nachweisen. Experimentelle Daten belegen die Bedeutung der Immunglobuline, wobei die Bedeutung von Antikörperablagerungen nach klinischer Transplantation für die chronische Transplantatfunktion immer noch Gegenstand lebhafter Diskussionen ist (Tilney, N.L. et al., 1998; Tullius, S.G. und Tilney, N.L., 1995). Neben der humoralen Antwort kommt es in der initialen Phase nach Transplantation zu einer ausgedehnten zellulären Infiltration des Transplantates mit mononukleären Zellen (vor allem Monozyten und Makrophagen). Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt daraufhin zur Endothel- und Fibroblastenaktivierung, die schließlich zu organspezifischen Veränderungen führt. Die Monozyten- und Makrophagen-Infiltration des Organs scheint vor allem in der initialen postoperativen Phase von Bedeutung zu sein. Es zeigt sich, dass vor allem die Expression Makrophagen-assoziiierter Produkte mit der Entwicklung irreversibler struktureller Läsionen korreliert (Hancock, W.H. et al., 1993; Nadeau, K.C. et al., 1995). Diese Beobachtung lässt sich mit den von unserer Arbeitsgruppe

gewonnenen Ergebnissen in Zusammenhang bringen. Die Kombinationstherapie von SFA mit CSA führt zu einer signifikant niedrigeren Infiltration mit Monozyten, Makrophagen und T-Zellen in der Anfangsphase (vor allem sichtbar an Tag 15) nach der Transplantation. Wie bereits beschrieben, interagieren die das Transplantat infiltrierenden Zellen zytokinvermittelt miteinander und zerstören über verschiedene Effektormechanismen das Transplantat (Colonna, M. et al., 1993). Basierend auf diesen Pathomechanismen könnte so vermutet werden, dass es durch die Kombinationstherapie infolge der verminderten Infiltration zu einer Reduktion des initialen Schadens des Transplantates kam, was sich schließlich in einer geringer ausgeprägten TVP äußerte. Gerade auch die eben genannte initiale Phase bzw. das episodentartige Auftreten akuter Abstoßungsprozesse spielt eine Rolle bei der Entstehung der TVP (Stoica, S.C. et al., 2006). Unter den potentiellen Risikofaktoren für die chronische Transplantatdysfunktion scheinen *akute* Abstoßungsreaktionen vor allem in der Frühphase nach Transplantation als antigen-abhängige Faktoren eine herausragende Rolle zu spielen, die als Konsequenz einer „Response to injury“ zu deuten ist (Kobashigawa, J.A. et al., 1995; Narrod, J. et al., 1989; Schutz, A. et al., 1990; Stoica, S.C. et al., 2006; Tullius, S.G. und Tilney, N.L., 1995). Klinisch zeigt sich dies vor allem durch die enge Korrelation zwischen dem Schweregrad der akuten Abstoßungsreaktionen- welche durch Entnahme von Biopsien ermittelt werden- und dem Risiko der chronischen Transplantatdysfunktion (Stoica, S.C. et al., 2006).

Diese Beobachtungen geben Grund zur Annahme, dass die Hemmung der TVP auf die signifikant reduzierte zelluläre Infiltration zurückzuführen sein könnte, die eine Abschwächung der proliferativen Wirkung durch verminderte Freisetzung o.g. Wachstumsfaktoren zur Folge hat. Die verminderte zelluläre Infiltration könnte mechanistisch auch mit dem Effekt von SFA auf die indirekte Präsentation in Zusammenhang gebracht werden. Dieser kommt dann erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation zum Tragen. Die verminderte Potenz der dendritischen Zellen, als Haupt-APC das Fremdartigen aufzunehmen aufgrund der Blockade der endozytotischen Aktivität (Steinschulte, C. et al., 2003; Woltman, A.M. et al., 2004), hat eine verschlechterte Fremderkennung zur Folge, die sich dann auch in verminderter Infiltration des Transplantates mit T-Zellen, Monozyten und Makrophagen äußert. Die verminderte zelluläre Infiltration allein kann die Reduktion



der TVP jedoch nicht ausreichend begründen. Eine höhere CSA-Immunsuppression hat- wie an Tag 15 deutlich erkennbar- eine weitaus geringere zelluläre Infiltration zur Folge, jedoch findet man bei gesteigerter Dosis keine Reduktion der TVP. Gerade bei der Immunsuppression mit CSA muss man jedoch noch weitere Wirkungen von CSA auf den Organismus bedenken. CSA hat negative Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel, Blutdruck und fördert somit alloantigenunabhängige Faktoren, die ihrerseits einen Beitrag zur Entstehung der TVP leisten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SFA in Kombination mit CSA einen protektiven Effekt auf das Transplantat hat, der sich in einer verminderten zellulären Infiltration und einer geringer ausgeprägten TVP äußert. Die experimentellen Ergebnisse lassen jedoch keine definitive Erklärung des Mechanismus der Transplantatprotektion zu, da man zum einen keine genaue Information über die vorliegende Population der infiltrierenden T-Zellen hat und zum anderen eine eventuell ähnliche Pharmakokinetik der beiden Substanzen mit in Betracht ziehen muss.

## **5.5 Einordnung der vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse in einen potentiellen klinischen Kontext**

Um die hier gezeigten positiven Effekte der beiden unterschiedlichen Strategien der Transplantatprotektion genauer einordnen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Im Hinblick auf das neue Immunsuppressivum SFA wären weitere Studien im Tiermodell, die die Reduktion der TVP überprüfen und gegebenenfalls auch bestätigen, sinnvoll. Auch eine Optimierung der zu verabreichenden Dosis sollte in Folgestudien erforscht werden.

Die experimentellen Ergebnisse erlauben nur Vermutungen über den Wirkmechanismus und die Effektivität der beschriebenen Kombinationstherapie SFA und CSA. Bei dem derzeitigen experimentellen Kenntnisstand und insbesondere aufgrund unserer Ergebnisse sollte man sich keinerlei sichere Aussagen über einen wirksamen klinischen Einsatz erlauben. Vor einem möglichen Einsatz in der Humanmedizin müssten zwingend weitere pharmakokinetische Studien und Toxizitätsstudien durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollte eine eventuell auf Pharmakokinetik beruhende Synergie und daraus gegebenenfalls resultierende Toxizitätssteigerung geprüft und bestenfalls ausgeschlossen werden. Die im Tiermodell erzielten Kenntnisse lassen sich keinesfalls ohne weiteres auf den Menschen übertragen. Deshalb lassen die Ergebnisse keine sichere Aussage über eine wirksame Anwendung beim Menschen zu.

Gleiches gilt für die Zelltherapie unter basaler Immunsuppression. Das Hauptproblem liegt auch hier vor allem in der Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen. In verschiedenen Nagetiermodellen konnte Toleranz induziert werden, welche sich jedoch als nicht übertragbar auf andere Spezies mit höherem Körpergewicht als Labornager und den Menschen herausstellten (Lakkis, FG und Sayeh, M.H., 2003).

## Diskussion

---

Unsere experimentellen Ergebnisse zeigen eine Reduktion der TVP durch eine Vorbehandlung mit apoptotischen Spendermilzzellen im Tiermodell Ratte. Dies wäre bei einer Herztransplantation beim Menschen in dieser Form nicht durchführbar und käme gegebenenfalls nur bei den planbaren Nieren- und Lebertransplantationen als Lebendspenden in Frage.

## 6 Zusammenfassung

---

Während die akute Abstoßung durch potente Immunsuppressiva weitestgehend beherrscht wird, stellt die chronische Abstoßung, die sogenannte Transplantatvaskulopathie (TVP), einen limitierenden Faktor für das Langzeitüberleben nach Herztransplantation dar und ist noch immer Hauptursache für Morbidität und Mortalität herztransplantierten Patienten. Das Ziel der Transplantationsmedizin besteht darin, diese Langzeitfolgen zu verhindern.

Die Versuche der vorliegenden Studie wurden an einem vollständig allogenen heterotopen Ratten-Herztransplantationsmodell vorgenommen, das in ein und demselben Tiermodell sowohl die Untersuchung der akuten Abstoßung als auch der chronischen Abstoßung zulässt. Ohne immunsuppressive Therapie erfolgt die Abstoßung der Transplantate innerhalb von 7 Tagen (n=5). Im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung kommt es zu einer starken zellulären Infiltration der Transplantate mit mononukleären Zellen, die durch immunhistologische Untersuchungen (Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 15) dargestellt werden können. Im chronischen Modell findet man unter CSA-Immunsuppression eine ausgeprägte TVP.

In der vorliegenden Studie wurde eine neue Strategie insbesondere im Hinblick auf deren Effekt auf die chronische Abstoßung, die sich als TVP äußert, untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand die Manipulation dendritischer Zellen (DC). Zum einen wurde der Effekt einer Zelltherapie mit manipulierten dendritischen Empfängerzellen und apoptotischen Spenderzellen untersucht. Mittels Zelltherapie wurde versucht, unter minimaler Immunsuppression eine vaskuläre Toleranz zu erzeugen und auf diesem Weg neben der Reduktion der TVP auch die aus der dauerhaften Applikation der immunsuppressiven Pharmaka resultierenden Nebenwirkungen zu minimieren. Zum anderen wurde der Effekt des neuen immunmodulierenden Pharmakons Sanglifehrin A (SFA), welches Schlüsselfunktionen dendritischer Zellen blockiert, getestet. Als Referenzsubstanz diente Cyclosporin A (CSA), dessen Effekte als Vergleich dienten.

## Zusammenfassung

---

Bei der Zelltherapie hatte die Vorbehandlung des Transplantatempfängers mit Spendermilzzellen (apoptotisch, nekrotisch) einen verlängernden Effekt auf das Überleben der Transplantate, jedoch ließ sich durch alleinige Zelltherapie kein Langzeittransplantatüberleben bis zum Endpunkt der Beobachtung an Tag 100 erreichen. Unter basaler Immunsuppression (CSA 1,25 mg/kg KGW) zeigte die Zelltherapie mit manipulierten Empfänger-DC keinen die TVP reduzierenden Effekt, während die Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit apoptotischen Spendermilzzellen, welche in situ von DC des Transplantatempfängers phagozytiert werden, eine signifikante Reduktion der TVP bewirkte.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Effekte der neuen Substanz SFA zeigten, dass die akute Abstoßung mit SFA allein nicht beherrscht wird. Das mediane Überleben der Transplantate betrug bei SFA-Monotherapie 9,5 Tage. Die Kombination von SFA mit subtherapeutischer CSA-Immunsuppression (0,625 mg/kg KGW) verlängerte hingegen signifikant das Transplantatüberleben ( $p < 0,05$ ). Auf diese Weise erreichten 66% der Transplantatempfänger den Endpunkt des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen (Langzeittransplantatüberleben). Die mediane Überlebenszeit wurde von 24 Tagen bei der Monotherapie mit CSA 0,625 mg/kg KGW auf eine mediane Überlebenszeit von mindestens 100 Tagen bei der Kombinationstherapie erhöht.

Immunhistologische Untersuchungen zeigten in der Spätphase der akuten Abstoßung (Tag 6 und besonders Tag 15) eine signifikante Reduktion der zellulären Infiltration der Transplantate mit MHC-II-positiven Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen bei der Kombinationstherapie (CSA 0,625 mg/kg KGW und SFA) im Vergleich zur alleinigen CSA-Immunsuppression (CSA 0,625 mg/kg KGW).

Die wichtigste Beobachtung in der pharmakologischen Studie war eine signifikante Reduktion der TVP bei der Kombination einer therapeutischen Dosis von CSA (1,25 mg/kg KGW) mit SFA im Vergleich zur Monotherapie mit CSA (1,25 mg/kg KGW).

## Zusammenfassung

---

In beiden Versuchsreihen zeigte sich, dass die unterschiedlichen Strategien einen protektiven Effekt auf die Gefäße des Transplantates haben, welches sich in einer geringer ausgeprägten TVP äußert. Die Kombinationstherapie von therapeutischen Dosen von CSA mit SFA bewirkte noch eine geringfügig stärkere Reduktion der TVP als die Vorbehandlung der Transplantatempfänger mit apoptotischen Spendermilzzellen.

## 7 Summary

---

While acute rejection no longer causes significant problems for transplant recipients due to potent immunosuppressive drugs, chronic rejection still remains a major reason for morbidity and mortality in the long term outcome after heart transplantation. For this reason research is presently focused on new immunomodulatory strategies to prevent transplant vasculopathy (TVP).

A fully allogeneic heterotopic rat heart transplantation model was used to investigate both acute and chronic rejection. Without immunomodulatory therapy grafts were rejected within 7 days (n=5). Grafts were infiltrated with mononuclear cells such as T-cells, monocytes and macrophages during the period of time of acute allograft rejection. In the chronic model, TVP developed despite immunosuppressive therapy with Cyclosporin A (CSA).

The present study evaluated a new therapeutic strategy to specifically target TVP by manipulating dendritic cells. One approach concentrated on the induction of a vascular tolerance induced by the pre-treatment of the recipient with either manipulated dendritic cells or apoptotic donor splenocytes using baseline immunosuppression with CSA. The other approach was the investigation of a new immunomodulatory drug called Sanglifehrin A (SFA), believed to block key functions of dendritic cells.

Considering the effects of cell therapy, a prolongation of median survival time in the acute transplantation model, using donor splenocytes (apoptotic, necrotic) was found. Without immunosuppression, however, no induction of long term survival of the transplants could be obtained.

Under baseline CSA-immunosuppression (1,25 mg/kg bodyweight) manipulated DC did not affect the development of TVP. Pre-treatment of transplant recipients with apoptotic donor splenocytes significantly reduced TVP.

The results of the investigation of the new immunomodulatory drug showed that SFA alone can not prevent acute rejection. Grafts were rejected within 9,5 days.

## Summary

---

The combination of subtherapeutical CSA-immunosuppression (0,625 mg/kg bodyweight, median survival time: 24 days) with SFA allows 66% of the grafts to reach long term survival (median survival time >100 days, n=6).

Immunohistological staining revealed significant differences in cellular infiltration with MHC-II-positive cells on day 6, and particularly on day 15, after transplantation. The combination of subtherapeutical (0,625 mg/kg bodyweight) CSA-immunosuppression and SFA showed a significant reduction of T-cells, monocytes and macrophages compared to subtherapeutical (0,625 mg/kg bodyweight) CSA-immunosuppression alone.

The chronic model revealed that the combination of CSA-immunosuppression (1,25 mg/kg bodyweight) with SFA resulted in a significant reduction of TVP compared to monotherapy with CSA (1,25 mg/kg bodyweight).

The results of both therapeutical approaches show that both strategies have a protective effect on graft blood vessels. The combination of CSA (1,25 mg/kg bodyweight) and SFA is slightly more effective reducing TVP than pre-treatment with apoptotic donor splenocytes.



Literaturverzeichnis

**Abbas, A.K. and Lichtmann, A.H.** Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company. 2005. 369-390.

**Abe, M.; Wang, Z.; De, C.A.; Thomson, A.W.** Plasmacytoid dendritic cell precursors induce allogeneic T-cell hyporesponsiveness and prolong heart graft survival. *Am.J.Transplant.* 2005; **5**: 1808-19.

**Adams, D.H.; Tilney, N.L.; Collins, J.J., Jr.; Karnovsky, M.J.** Experimental graft arteriosclerosis. I. The Lewis-to-F-344 allograft model. *Transplantation* 1992; **53**: 1115-19.

**Ardehali, A.; Drinkwater, D.C., Jr.; Laks, H.; Drake TA.** Cardiac allograft vasculopathy. *Am.Heart J.* 1993; **126**: 1498-502.

**Banchereau, J. and Steinman, R.M.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-52.

**Barry, W.H.** Mechanisms of immune-mediated myocyte injury. *Circulation* 1994; **89**: 2421-32.

**Behrendt, D.; Ganz, P.; Fang, J.C.** Cardiac allograft vasculopathy. *Curr.Opin.Cardiol.* 2000; **15**: 422-29.

**Beriou, G.; Peche, H.; Guillonnet, C.; Merieau, E.; Cuturi, M.C.** Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* 2005; **79**: 969-72.

**Billingham, M.E.** Histopathology of graft coronary disease. *J. Heart Lung Transplant.* 1992; **11**: S38-S44.

**Bolton, E.M.; Gracie, J.A.; Briggs, J.D.; Kampinga, J.; Bradley, J.A.** Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J.Exp.Med.* 1989; **169**: 1931-46.

**Caballero, A.; Fernandez, N.; Lavado, R.; Bravo, M.J.; Mirando, J.M.; Alonso, A.** Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transpl.Immunol.* 2006; **17**: 3-6.

**Calne, R.Y.; White, D.J.; Thiru, S.; Evans, D.B.; Mc Master, P.; Dunn, D.C.; Craddock, G.N.; Pentlow, B.D; Rolles, K.** Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; **2**: 1323-27.

**Caux, C.; it-Yahia, S.; Chemin, K.; de,Bouteiller O.; eu-Nosjean, M.C.; Homey, B.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Zlotnik, A.; Vicari, A. .** Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin.Immunopathol.* 2000; **22**: 345-69.

**Chalasani, G. and Lakkis, F.G.** Immunologic tolerance of organ allografts. *Curr opin organ transplant* 2001, **6** :83-88.

**Colonna, M.; Brooks, E.G.; Falco, M.; Ferrara, G.B.; Strominger, J.L.** Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993; **260**: 1121-24.

**Costanzo, M.R.; Naftel, D.C.; Pritzker, M.R.; Heilman, J.K.,III; Boehmer, J.P.; Brozena, S.C.; Dec, G.W.; Ventura, H.O.; Kirklin, J.K.; Bourge, R.C.; Miller, L.W. MR.** Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *Cardiac Transplant Research Database. J.Heart Lung Transplant.* 1998; **17**: 744-53.

**Denton, M.D.; Magee, C.C.; Sayegh, M.H.** Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; **353**: 1083-91.

**Denton, M.D.; Reul, R.M.; Dharnidharka, V.R.; Fang, J.C.; Ganz, P.; Briscoe, DM.** Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr.Transplant* 1998; **2**: 6-15.

**Distler, J.H.; Huber, L.C.; Hueber, A.J.; Reich, C.F.,III; Gay, S.; Distler, O.; Pisetsky, D.S.** The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis*. 2005; **10**: 731-41.

**Dulkanchainun, T.S.; Goss, J.A.; Imagawa, D.K.; Shaw, G.D.; Anselmo, D.M.; Kaldas, F.; Wang, T.; Zhao, D.; Busuttil, A.A.; Kato, H.; Murray, N.G.; Kupiec-Weglinski, J.W.; Busuttil, R.W.** Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann.Surg.* 1998; **227**: 832-40.

**Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Konowal, A.; Freed, P.W.; Westcott, J.Y.; Henson, P.M.** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J.Clin.Invest* 1998; **101**: 890-98.

**Fehr, T.; Kallen, J.; Oberer, L.; Sanglier, J.J.; Schilling, W.** Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1999; **52**: 474-79.

**Ferguson, T.A.; Herndon, J.; Elzey, B., Griffith, T.S.; Schoenberger, S.; Green, D.R.** Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J.Immunol.* 2002; **168**: 5589-95.

**Fingerhuth, H.; Holschermann, H.; Grimm, H.; Tillmanns, H.; Haberbosch, W.; Braun-Dullaeus, R.C.; Stadlbauer, T.H**  
3-Deazaadenosine prevents leukocyte invasion by suppression of adhesion molecule expression during acute cardiac allograft rejection: involvement of apoptotic cell death. *J.Heart Lung Transplant.* 2004; **23**: 970-78.

**Gould, D.S. and Auchincloss, H. Jr.** Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol.Today* 1999; **20**: 77-82.

**Hackstein, H. and Thomson, A.W.** Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; **4**: 24-34.

**Hackstein, H.; Steinschulte, C.; Fiedel, S.; Eisele, A.; Rathke, V.; Stadlbauer, T.; Thomson, A.W.; Tillmanns, H.; Bein, G.; Holschermann, H.** Sanglifohrin A Blocks Key Dendritic Cell Functions In Vivo and Promotes Long-Term Allograft Survival Together with Low-Dose CsA. *Am.J.Transplant.* 2007; **7**: 789-98.

**Hancock, W.H.; Whitley, W.D.; Tullius, S.G.; Heemann, U.W.; Wasowska, B.; Baldwin, W.M.,III; Tilney, N.L.** Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; **56**: 643-50.

**Hauptman, P.J.; Nakagawa, T.; Tanaka, H.; Libby, P.** Acute rejection: culprit or coincidence in the pathogenesis of cardiac graft vascular disease? *J.Heart Lung Transplant.* 1995; **14**: S173-S180.

**Hirozane, T.; Matsumori, A.; Furukawa, Y.; Sasayama, S.** Experimental graft coronary artery disease in a murine heterotopic cardiac transplant model. *Circulation* 1995; **91**: 386-92.

**Isik, F.F.; McDonald, T.O.; Ferguson, M.; Yamanaka, E.; Gordon, D.** Transplant arteriosclerosis in a rat aortic model. *Am.J Pathol.* 1992; **141**: 1139-49.

**Iyoda, T.; Shimoyama, S.; Liu, K.; Omatsu, Y.; Akiyama, Y.; Maeda, Y.; Takahara, K.; Steinman, R.M.; Inaba, K.** The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J.Exp.Med.* 2002; **195**: 1289-302.

**Johnson, D.E.; Gao, S.Z.; Schroeder, J.S.; DeCampi, W.M.; Billingham, M.E.** The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant* 1989; **8**: 349-59.

**Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Schuler, G.; Knop J.; Enk, A.H.** Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp.Med.* 2000; **192**: 1213-22.

**Kallen, J.; Sedrani, R.; Zenke, G.; Wagner, J.** Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution. *J Biol.Chem.* 2005; **280**: 21965-71.

**Knight, R.J. and Kahan, B.D.** The place of sirolimus in kidney transplantation: can we reduce calcineurin inhibitor renal toxicity? *Kidney Int.* 2006; **70**: 994-99.

**Kobashigawa, J.A.; Kirklin, J.K.; Naftel, D.C.; Bourge, R.C.; Ventura, H.O.; Mohanty, P.K.; Cintron, G.B.; Bhat, G.** Pretransplantation risk factors for acute rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study. The Transplant Cardiologists Research Database Group. *J.Heart Lung Transplant.* 1993; **12**: 355-66.

**Kobashigawa, J.A.; Miller, L.; Yeung, A.; Hauptman, P.; Ventura, H.; Wilensky, R.; Valantine, H.; Wiedermann, J.** Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary artery disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. Sandoz/CVIS Investigators. *J Heart Lung Transplant* 1995; **14**: S221-S226.

**Lakkis, F.G. and Sayegh, M.H.** Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003; **14**: 2402-10.

**Lechler, R.; Ng W.F.; Steinman, R.M.** Dendritic cells in transplantation--friend or foe? *Immunity.* 2001; **14**: 357-68.

**Liu, G. and Butany, J.** Morphology of graft arteriosclerosis in cardiac transplant recipients. *Hum.Pathol.* 1992; **23**: 768-73.

**Liu, G.; Wu, C.; Wu, Y.; Zhao, Y.** Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand.J Immunol.* 2006; **64**: 1-9.

**Liu, K.; Iyoda, T.; Saternus, M.; Kimura, Y.; Inaba, K.; Steinman, R.M.** Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J.Exp.Med.* 2002; **196**: 1091-97.

**Lutz, M.B. and Schuler, G.** Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002; **23**: 445-49.

**Lutz, M.B.; Suri, R.M.; Niimi, M.; Ogilvie, A.L.; Kukutsch, N.A.; Rossner, S.; Schuler, G.; Austyn, J.M.** Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur.J.Immunol.* 2000; **30**: 1813-22.

**Maeda, A.; Schwarz, A.; Kernebeck, K.; Gross, N.; Aragane, Y.; Peritt, D.; Schwarz, T.** Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *J.Immunol.* 2005; **174**: 5968-76.

**Mehra, M.R.; Uber, P.A.; Kaplan, B.** Immunosuppression in cardiac transplantation: science, common sense and the heart of the matter. *Am.J Transplant* 2006; **6**: 1243-45.

**Mehra, M.R.** Contemporary concepts in prevention and treatment of cardiac allograft vasculopathy. *Am.J Transplant* 2006; **6**: 1248-56.

**Meiser, B.M.; Billingham, M.E.; Morris, R.E.** Effects of cyclosporin, FK506, and rapamycin on graft-vessel disease. *Lancet* 1991; **338**: 1297-98.

**Mennander, A.; Tiisala, S.; Halttunen, J.; Yilmaz, S.; Paavonen, T.; Hayry, P.** Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler.Thromb.* 1991; **11**: 671-80.

**Mix, E. and Zettel, K.** Klinische Neurologie: Akutelle Aspekte. De Gryter Verlag. 1999. Seite 266

**Morelli, A.E. and Wang, Z.** Use of donor apoptotic cells in a safe and effective means to prolong graft survival through interaction with recipient DC. *Am.J.Transplant* 2003, **3**: 195.

**Morelli, A.E. and Thomson, A.W.** Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol.Rev.* 2003; **196**: 125-46

**Morelli, A.E.** The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am.J.Transplant.* 2006; **6**: 254-61.

**Morelli, A.E.; Larregina, A.T.; Shufesky, W.J.; Zahorchak, A.F.; Logar, A.J.; Papworth, G.D.; Wang, Z.; Watkins, S.C.; Falo, L.D., Jr.; Thomson, A.W.** Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 2003; **101**: 611-20.

**Nadeau, K.C.; Azuma, H.; Tilney, N.L.** Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995; **92**: 8729-33.

**Narrod, J.; Kormos, R.; Armitage, J.; Hardesty, R.; Ladowski, J.; Griffith B.** Acute rejection and coronary artery disease in long-term survivors of heart transplantation. *J Heart Transplant* 1989; **8**: 418-20.

**Nouri-Shirazi, M. and Guinet, E.** Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage. *Transplantation* 2002; **74**: 1035-44.

**Oni, A.A.; Ray, J.; Hosenpud, J.D.** Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allografts. Evidence demonstrating that transplant coronary artery disease is a manifestation of a diffuse allograft vasculopathy. *Transplantation* 1992; **53**: 1247-51.

**Ono, K. and Lindsey, E.S.** Improved technique of heart transplantation in rats. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1969; **57**: 225-29.

**Pattison, J.M. and Krensky, A.M.** New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am.J.Med.Sci.* 1997; **313**: 257-63.

**Peche, H.; Trinite, B.; Martinet, B.; Cuturi, M.C.** Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am.J.Transplant.* 2005; **5**: 255-67.

**Penna, G.; Giarratana, N.; Amuchastegui, S.; Mariani, R.; Daniel, K.C.; Adorini, L.** Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microbes.Infect.* 2005; **7**: 1033-39.

**Perico, N. and Remuzzi, G.** Prevention of transplant rejection: current treatment guidelines and future developments. *Drugs* 1997; **54**: 533-70.

**Podder, H.; Stepkowski, S.M.; Napoli, K.L.; Clark, J.; Verani, R.R.; Chou, T.C.; Kahan, B.D.** Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2001; **12**: 1059-71.

**Rahmani, M.; Cruz, R.P., Granville, D.J.; McManus; Bruce M.** Allograft Vasculopathy versus Artherosclerosis. *Circulation Research* 2006, **99**: 801-815.

**Ramzy, D.; Rao, V.; Brahm, J.; Santiago, M.; Delgado, D., R.** Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg* 2005 , **48**, 319-327.

**Renkonen, R.; Fukuda, M.N.; Petrov, L.; Paavonen, T.; Renkonen, J.; Hayry, P.; Fukuda, M.** A peptide mimic of selectin ligands abolishes in vivo inflammation but has no effect on the rat heart allograft survival. *Transplantation* 2002; **74**: 2-6.

**Salama, A.D.; Remuzzi, G.; Harmon, W.E.; Sayegh, M.H.** Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J.Clin.Invest* 2001; **108**: 943-48.

**Sanglier, J.J.; Quesniaux, V.; Fehr, T.; Hofmann, H.; Mahnke, M.; Memmert, K.; Schuler, W.; Zenke, G.; Gschwind, L.; Maurer, C.** Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1999; **52**: 466-73.

**Schaub, M.; Stadlbauer T.H.; Chandraker, A.; Vella, J.P.; Turka, L.A.; Sayegh, M.H.** Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1998; **9**: 891-98.



**Schmid, C.; Binder, J.; Heemann, U.; Tilney, N.L.** Successful heterotopic heart transplantation in rat. *Microsurgery* 1994; **15**: 279-81.

**Schutz, A.; Kemkes, B.M.; Kugler, C.; Angermann, C.; Schad, N.; Rienmuller, R.; Fritsch, S.; Anthuber, M.; Neumaier, P.; Gokel, J.M.** The influence of rejection episodes on the development of coronary artery disease after heart transplantation. *Eur.J Cardiothorac.Surg* 1990; **4**: 300-07.

**Schwartz, R.H.** A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; **248**: 1349-56.

**Schwartz; R. and Dameshek, W.** Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959; **183**: 1682-83.

**Shi, C.; Russell, M.E.; Bianchi, C.; Newell, J.B.; Haber E.** Murine model of accelerated transplant arteriosclerosis. *Circ.Res.* 1994; **75**: 199-207.

**Shimamura, H.; Sunamura, M.; Tsuchihara, K.; Egawa, S.; Takeda, K.; Matsuno, S.** Irradiated pancreatic cancer cells undergo both apoptosis and necrosis, and could be phagocytized by dendritic cells. *Eur.Surg Res.* 2005; **37**: 228-34.

**Steinman, R.M.; Hawiger, D.; Nussenzweig, M.C.** Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2003; **21**: 685-711.

**Steinman, R.M.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 1991; **9**: 271-96.

**Steinschulte, C.; Taner, T.; Thomson, A.W.; Bein, G.; Hackstein, H.** Cutting edge: sangliferrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells. *J.Immunol.* 2003; **171**: 542-46.

**Stoica, SC.; Cafferty, T.; Pauriah, M.; Taylor, C.J.; Sharples, L.D.; Wallwork, J.; Large, S.R.;** Parameshwar, J. The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2006; **25**: 420-25.

**Stuart, L.M.; Lucas, M.; Simpson, C.; Lamb, J.; Savill, J.; Lacy-Hulbert, A.** Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J.Immunol.* 2002; **168**: 1627-35.

**Sun, E.; Gao, Y.; Chen, J.; Roberts, A.I.; Wang, X.; Chen, Z.; Shi, Y.** Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell Death.Differ.* 2004; **11**: 1258-64.

**Takada, M.; Nadeau, K.C.; Shaw, G.D.; Tilney, N.L.** Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 1997; **64**: 1520-25.

**Tan, C.D.; Baldwin W.M.III.; Rodriguez, E.R.** Update on cardiac transplantation pathology. *Arch. Pathol. Lab Med* 2007;**131**:1169-1191.

**Tilney, N.L.; Kusaka, M.; Pratschke, J.; Wilhelm M.** Chronic rejection. *Transplant.Proc.* 1998; **30**: 1590-94.

**Tilney, N.L.; Whitley, W.D.; Diamond, J.R.; Kupiec-Weglinski, J.W.; Adams, D.H.** Chronic rejection--an undefined conundrum. *Transplantation* 1991; **52**: 389-98

**Townsend, A. and Bodmer, H.** Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 1989; **7**: 601-24.

**Tullius, S.G. and Tilney, N.L.** Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995; **59**: 313-18.

**Tullius, S.G.; Nieminen, M.; Bechstein, W.O.; Jonas, S.; Steinmuller, T.; Pratschke, J.; Volk, H.D.; Neuhaus, P.** Early acute rejection episodes are reversible following retransplantation into a syngeneic donor and do not progress to chronic rejection. *Transplant.Proc.* 1997; **29**: 3034-35.

**Verbovetski, I.; Bychkov, H.; Trahtenberg, U.; Shapira, I.; Hareuveni, M.; Ben-Tal, O.; Kutikov, I.; Gill, O.; Mevorach, D.** Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J.Exp.Med.* 2002; **196**: 1553-61.

**Voll, R.E.; Herrmann, M.; Roth, E.A.; Stach, C.; Kalden, J.R.; Girkontaite, I.** Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; **390**: 350-51.

**Weis, M. and Von Scheidt, W.** Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997; **96**: 2069-77.

**Wekerle, T. and Sykes, M.** Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 1999; **68**: 459-67.

**Woltman, A.M.; Schlagwein, N.; van der Kooij, S.W.; van KC.** The novel cyclophilin-binding drug sanglifehrin A specifically affects antigen uptake receptor expression and endocytic capacity of human dendritic cells. *J Immunol.* 2004; **172**: 6482-89.

**Wu, C.J.; Lovett, M.; Wong-Lee, J.; Moeller, F.; Kitamura, M.; Goralski, T.J.; Billingham, M.E.; Starnes, V.A.; Clayberger, C.** Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation* 1992; **54**: 326-32.

**Xu, D.L.; Liu, Y.; Tan, J.M.; Li,B.; Zhong, C.P.; Zhang, X.H.; Wu, C.Q.; Tang, X.D.** Marked prolongation of murine cardiac allograft survival using recipient immature dendritic cells loaded with donor-derived apoptotic cells. *Scand.J.Immunol.* 2004; **59**: 536-44.

**Zenke, G.; Strittmatter, U.;Fuchs, S.; Quesniaux, V.; Brinkmann, V.; Schuler, W.; Zurini, M.; Enz, A.; Billich, A.; Sanglier, J.J.; Fehr, T.** Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J.Immunol.* 2001; **166**: 7165-71.

**Zhang, L.H. and Liu, J.O.** Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle. *J.Immunol.* 2001; **166**: 5611-18.

**Zhang, L.H.; Youn, H.D.; Liu, J.O.** Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53. *J.Biol.Chem.* 2001; **276**: 43534-40.

Anhang A:

Materialliste

Material	Hersteller	Ort
Geräte		
Operationsmikroskop	Zeiss Universal S 3	Wetzlar, D
Kryostat	Leica	Wetzlar, D
Verbrauchsmaterial		
Eppendorf Tube®	Eppendorf	Hamburg, D
Fertignahrung	Altramin, Labortierservice	Lage-Lippe, D
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinsonm Labware	Franklin Lakes, USA
Korkplättchen	Roth	Karlsruhe, D
Kulturplatten	Greiner	Pleidelsheim , D
Perma Handseide®	Ethicon	Brüssel, Bel
Petrischalen	Greiner	Pleidelsheim , D
Pipetten	Greiner	Pleidelsheim , D
Safe-Lock Tubes	Eppendorf	Hamburg, D
Tissue-Tek® O.C.T	Sakura Fine Technical	Tokyo, Japan
Vicryl®-	Ethicon	Brüssel, Bel

Kompressen, steril	Fuhrmann	Much, D
Sterilfilter (70 µm)	BD Falcon	Bedford, USA
Spritzen, steril	Greiner	Pleidelsheim , D
Chemikalien		
Aceton	Merck	Darmstadt, D
Eosin	Merck	Darmstadt, D
FCS 101	PAA	Pasching, Österreich
Gentamicin	PromoCell	Heidelberg, D
Hämatoxylin Hämalaun®	Merck	Darmstadt; D
Hepes	Gibco	Carlsbad, California, USA
Isofluran Forene ®	Abbott	Wiesbaden, D
Isopenthan	Roth	Karlsruhe;D
Isotone NaCl-Lösung	Roth	Karlsruhe, D
Ketamin Ketanest®	Insera	Freiburg, D
NaCl, isotone Lösung	Roth	Karlsruhe, D
Natriumpyruvat	Gibco	Carlsbad, California, USA
NAS	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Neufuchsinhaltige Lösung	Merck	Darmstadt, D
PBS	PAA	Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching, Österreich
Rattenserum	Sigma	Deisenhofen, D
RBC-Lysis-Solution	Qiagen	Basel, Schweiz
Resorcin-Fuchsin	Chroma	Königen, D
RPMI 1640	PAA	Pasching, Österreich
Tris-Base	Sigma	Deisenhofen, D
Tris- HCl	USB	Cleveland, Ohio, USA
Xylazinhydrochlorid Rompun®	Bayer	Leverkusen, D
Zytokine		
rR-Flt-3-Ligand	PromoCell	Heidelberg, D
rR-GM-CSF	PromoCell	Heidelberg, D
rR-IL-4	PromoCell	Heidelberg, D
rR-IL-10	PromoCell	Heidelberg, D
rH-TGF- $\beta$	PromoCell	Heidelberg, D

Anhang B:

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
ca.	Circa
CMV	Cytomegalovirus
CSA	Cyclosporin A
g	Zentrifugalbeschleunigung (Früheres „rpm;“ Umdrehungen pro Minute)
H&E	Hämalaun und Eosin
IL-2,6,12..	Interleukin-2, 6,12..
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
KGW	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
MHC (MHC I und MHC II)	Major histocompatibility complex
min	Minuten
MZ	Milzzellen
n.s.	Nicht signifikant



NaCL	Natriumchlorid
NAS	Nicht essentielle Aminosäuren
o.g.	Oben genannt
OP	Operation
PBS	Phosphat gepufferte Saline
R 73	Immunhistofärbung des T-Zellrezeptors
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SFA	Sanglifehrin A
sog.	sogenannt
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tx	Transplantation
TVP	Transplantatvaskulopathie
UV	Ultraviolett
Vs	Versus
WF	Wistar Furth
x <sub>g</sub>	Geometrischer Mittelwert
x	Arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

## Danksagung

---

Danksagung:

Für die Möglichkeit der Durchführung dieser externen Doktorarbeit spreche ich Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Burkhardt meinen besonderen Dank aus. Seine vielfältigen wissenschaftlichen Anregungen waren äußerst hilfreich.

Herrn Prof. Dr. med. H. Hölschermann und Herrn Prof. Dr. med. H. Hackstein danke ich für die Bereitstellung der Thematik und für die Möglichkeit, die Versuche in Zusammenarbeit der beiden Laboratorien, durchführen zu können. Die so entstandene produktive Arbeitsatmosphäre war die Grundlage für das Gelingen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. med. Th. Stadlbauer danke ich für seine tatkräftige Unterstützung. Er erwies sich als ein sehr hilfsbereiter und engagierter Betreuer, der jederzeit bei Fragen zur Verfügung stand.

Den medizinisch technischen Assistenten, Frau B. Parviz, Frau A. Weber und Herrn A. Barth, möchte ich für die große Hilfe und Unterstützung bei den Versuchen und bei labortechnischen Fragen danken. Besonders dankbar bin ich für die emotionale Unterstützung und die immer wieder motivierenden Worte. Unsere konstruktive Teamarbeit und das freundliche Arbeitsklima waren eine wichtige Voraussetzung für den Fortgang dieser Arbeit.

Frau Sandra Iffländer gilt mein Dank für die Versorgung der Versuchstiere sowie ihre hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Herztransplantationen.

Besonderen Dank für die emotionale Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit möchte ich meinen Eltern aussprechen.



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5403-2



9 783835 195403 8



Vorderseite: © Jeff Metzger - Fotolia.com

Rückseite: © Oleg Kozlov - Fotolia.com