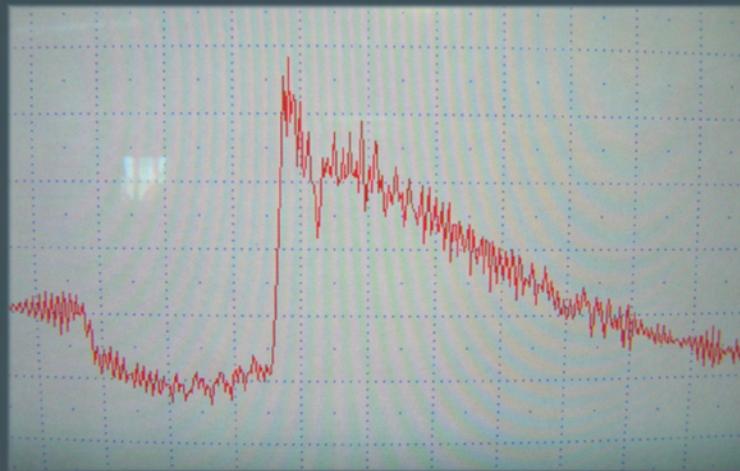


ASPEKTE DER DOPAMINBEHANDLUNG IM HIRNTOTEN ORGANSPENDER BEI NIERENTRANSPLANTATION

SIMONE HÖGER



INAUGURAL-DISSERTATION

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

édition 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 2007

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.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aspekte der Dopaminbehandlung im hirntoten Organspender bei Nierentransplantation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Simone Höger

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und

Aus der V. Medizinischen Klinik

(Nephrologie/Endokrinologie/Rheumatologie)

der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim

der Universität Heidelberg

Betreuer: PD Dr. C. Braun

Aspekte der Dopaminbehandlung im hirntoten Organspender
bei Nierentransplantation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Simone Höger

Tierärztin aus Mannheim

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth

PD Dr. C. Braun

Tag der Disputation: 08.05.2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I-III Inhalt

IV-VI Abkürzungen

1. Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Terminale Niereninsuffizienz und Nierentransplantation	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Transplantat-Abstoßung.....	3
1.1.2.1 Immunologische Faktoren	3
1.1.2.2 Immun-unabhängige Faktoren.....	5
1.2 Transplantation und Spendervorbehandlung	8
1.2.1 Konzepte zur Spendervorbehandlung	8
1.2.2 Dopamin.....	9
1.2.2.1 Allgemeines.....	9
1.2.2.2 Dopamin und Transplantation	10
2. Fragestellung.....	12
3. Material und Methoden	13
3.1 Allgemeines.....	13
3.2 Versuchstiere und ihre Haltung	13
3.3 Substanzen.....	14
3.3.1 Dopamin.....	14
3.3.2 N-Oktanoyl-Dopamin (NOD)	14
3.3.3 Urapidil (Ebrantil®).....	15
3.3.4 Propranolol und Doxazosin.....	15
3.3.5 SCH-23390 und Domperidone.....	15
3.3.6 Pergolid.....	16
3.4 Versuchsdesign und Gruppeneinteilung.....	17
3.4.1 Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Präkonditionierung	17
3.4.2 Wirkmechanismen der Dopamin-Präkonditionierung im hirntoten Spendertier	19
3.4.3 Präkonditionierung des Organspenders- allogene Transplantation und akute Abstoßung	21
3.5 Operationsmethoden	22

3.5.1	Übersicht.....	22
3.5.2	Grundlagen.....	22
3.5.3	Hirntod im Spendertier.....	23
3.5.4	Tracheotomie und Blutdruckmessung im nicht hirntote Spendertier.....	26
3.5.5	Explantation der Spenderniere.....	27
3.5.6	Implantation der Spenderniere.....	30
3.5.7	Fixierung der Niere.....	35
3.5.7.1	Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Prä-konditionierung.....	35
3.5.7.2	Wirkmechanismen der Dopamin-Präkonditionierung im hirn-toten Spendertier.....	35
3.5.7.3	Präkonditionierung des Organspenders- allogene Transplan-tation und akute Abstoßung.....	36
3.6	Histologische Untersuchungen.....	37
3.6.1	Anfertigen von Paraffinschnitten.....	37
3.6.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	38
3.6.2.1	H&E- Färbung.....	38
3.6.2.2	Banff-Klassifikation.....	38
3.6.3	Immunhistochemie.....	39
3.7	FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	40
3.7.1	FACS- Färbung.....	41
3.7.2	Flow- Zytometrie und Datenanalyse.....	42
3.8	Gen-Expressionsanalyse.....	43
3.8.1	RNA- Isolation.....	43
3.8.2	Real time PCR (Roche Light Cycler®).....	43
3.9	Ausschlusskriterien.....	45
3.10	Statistische Auswertungen.....	45
4.	Ergebnisse.....	46
4.1	Zeit-Wirkungs-Analyse.....	46
4.1.1	Hämodynamik.....	46
4.1.2	Renale Inflammation.....	50
4.2	Wirkmechanismen der Dopamin-Spendervorbehandlung.....	56
4.2.1	Einfluss der Hämodynamik auf renale Inflammation.....	56
4.2.2	Adrenerge bzw. dopaminerge Rezeptor-Antagonisierung und renale Inflammation.....	61
4.2.3	Einfluß von Hirntod und Dopaminbehandlung auf die Expression von Hämoxygenase-1.....	69
4.2.4	Beeinflussung der Expression von Oberflächenmolekülen im peripheren Blut durch Hirntod und Dopamin.....	70

4.3	Spendervorbehandlung und allogene Transplantation	72
4.3.1	Zeichen der akuten Abstoßung – Lichtmikroskopie und Banff-Klassifikation.....	72
4.3.2	Zeichen der akuten Abstoßung -Immunhistochemie.....	75
5.	Diskussion	77
5.1	Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Vorbehandlung	78
5.2	Wirkmechanismen der Dopamin-Vorbehandlung im hirntoten Spendertier	80
5.2.1	Einfluss von Dopamin auf die Hämodynamik	80
5.2.2	Einfluß von Dopamin und dopaminergen/adrenergen Rezeptoren auf die renale Inflammation	83
5.2.3	Einfluss von Dopamin auf HO-1.....	85
5.2.4	Einfluss von Hirntod und Dopamin auf Aktivierung von Entzündungszellen im peripheren Blut....	87
5.3	Präkonditionierung des Organspenders mit Dopamin- allogene Transplantation und akute Abstoßung.....	89
6.	Zusammenfassung.....	91
7.	Summary	93
8.	Literaturverzeichnis.....	95
9.	Erklärung.....	101
10.	Im Rahmen der vorliegenden Dissertation veröffentlichte Arbeiten	102
10.1	Publikation	102
10.2	Kongressabstract	102
11.	Danksagung.....	104

Abkürzungen

APC	Antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAN	Chronische Allograft Nephropathie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DAF	<i>Decay Accelerating Factor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
Eb	Ebrantil
EEG	Elektro-Enzephalographie
Ex	Explantation
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
HD	Hämodialyse
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HO-1	Hämoxigenase-1
HO(CH ₂ O) _n H	Paraformaldehyd
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ht	hirntot
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Cell</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kg	kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
MAP	<i>Mean Arterial Pressure</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
mg	milligramm
µg	mikrogramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
NOD	N-Oktanoyl-Dopamin
NS	Nicht Signifikant
P	<i>Probability</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PD	Peritonealdialyse
PFA	Paraformaldehyd
PTEC	<i>Proximal Tubular Epithelial Cells</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted</i>
Rez.antag.	Rezeptor-antagonist
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	R-Phycoerythrin
RT-PCR	<i>Realtime- Polymerase Chain Reaction</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
sPSGL	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
T3	Trijodthyronin
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Veh.	Vehikel
vs.	versus

ZNS

Zentrales Nervensystem

1. Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Terminale Niereninsuffizienz und Nierentransplantation

1.1.1 Allgemeines

Die terminale Niereninsuffizienz ist der Endzustand einer fortgeschrittenen Einschränkung der exo- und endokrinen Funktionen der Niere, die ein Überleben des betroffenen Patienten ohne eine Nierenersatztherapie unmöglich macht. Zu Beginn des Jahres 2004 betrug die Anzahl der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Deutschland knapp über 80.000 (Quasi-Niere 2005). Die häufigsten Ursachen sind hierbei die diabetische Nephropathie, Hochdruckschäden und entzündliche Nierenerkrankungen (Quasi-Niere 2005). Als Nierenersatztherapie stehen die verschiedenen Dialyseverfahren und die Nierentransplantation zur Verfügung. Die Dialyseverfahren können selbst im günstigsten Falle nur ca. 10 % der ausgefallenen exkretorischen Nierenfunktion und keine der endokrinen Funktionen ersetzen (Felten, Kuhlmann et al. 1999). Es wundert deshalb nicht, dass Nierentransplantation in Hinblick auf die Lebensqualität der Patienten und ihr Langzeitüberleben deutliche Vorteile im Vergleich zu den Dialyseverfahren bietet (Schnuelle, Lorenz et al. 1998; Wolfe, Ashby et al. 1999). So liegt das mittlere Überleben für Dialysepatienten auf der Warteliste bei 10 Jahren, das für Transplantatempfänger von Nieren hirntoter Organspender bei 20 Jahren (Zhang, Kumar et al. 2004).

Auch aus volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten heraus bietet die Nierentransplantation Vorteile. Eine Transplantation verursacht einmalig Kosten in Höhe von ca. 50.000 € und jährliche Folgekosten von bis zu 10.000 €. Dem stehen jährliche Kosten von 22.500 bis 45.000 € für eine chronische Dialysebehandlung gegenüber (Arbeitskreis Organspende, website).

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde 1954 durch Murray in Boston bei eineiigen Zwillingen durchgeführt (Murray 1982). Durch die Einführung der modernen Immunsuppressiva und die Fortentwicklung der Gewebstypisierung ist die Nierentransplantation heute zu einem Routineverfahren geworden, welches bei hierfür geeigneten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz als Standardbehandlung angesehen werden kann (Kuman 2004). Die augenblickliche 1-Jahres Überlebensrate von Transplantat-Nieren liegt bei 87,8% für Leichenspenden und 92,5% für Lebendspenden (Opelz 2000).

Trotz aller Fortschritte in der Transplantationsmedizin ist die mittlere Überlebenszeit der Transplantate im letzten Jahrzehnt kaum angestiegen. Sie betrug im Jahr 2005 nur 8 Jahre für Nieren von Patienten mit nephrologischer Grunderkrankung und 15 Jahre für Nieren von Patienten mit urologischer Ätiologie (Cacho, Pique et al. 2005). Augenfällig ist hierbei, dass Transplantatnieren von lebenden Spendern mit einer schlechten HLA-Übereinstimmung eine bessere Prognose haben (3 - Jahresüberlebensrate 85%) als Nieren mit einem guten HLA-Matching von hirntoten Spendern (3 - Jahresüberlebensrate 70%) (Terasaki, Cecka et al. 1995). Dies deutet darauf hin, dass bei Organen hirntoter Organspender nicht-immunologische Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die zum Transplantatverlust führen können. Zu den wichtigsten gehören akute und chronische Transplantatabstoßung, Nephrotoxizität einiger Immunsuppressiva und Rezidive der renalen Grunderkrankung im Transplantat. Heute ist die chronische Transplantatabstoßung die häufigste Ursache von Organverlusten im Bereich der Transplantationsmedizin (Carpenter 1995; Nagano and Tilney 1997). Die akute Abstoßung hat dank verbesserter immunsuppressiver Therapie, standardisierter Entnahme- und Transporttechniken und Fortschritten im HLA-Matching zwischen Spender und Empfänger an Bedeutung eingebüßt (Keith, DeMattos et al. 2005; Vathsala 2005).

1.1.2 Transplantat-Abstoßung

1.1.2.1 Immunologische Faktoren

Eine Abstoßungsreaktion bei allogener Transplantation ist die humorale und zelluläre Immunantwort auf Fremd-MHC-Moleküle des Spenders. Es gibt drei Arten der Abstoßungsreaktion.

Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung ist eine Antikörperreaktion gegen Blutgruppenantigene und polymorphe MHC-Antigene, die innerhalb von Minuten nach Transplantation zur komplementabhängigen Abstoßung führt (Terasaki 2003; Cai and Terasaki 2005). Durch vorangegangene Bluttransfusionen oder Transplantationen hat der Empfänger bereits Antikörper gegen Antigene des Transplantats gebildet. Die Antikörper können mit Antigenen auf dem Gefäßendothel im fremden Gewebe reagieren und die Komplement- sowie Gerinnungskaskade aktivieren (Cai and Terasaki 2005). Dies führt zu einem Verschuß der Gefäße im Transplantat und somit zum Absterben des Gewebes. Die hyperakute Abstoßung ist durch verbesserte Untersuchungsmethoden vor Transplantation heute allerdings selten geworden (Braun 2002; Gallon, Leventhal et al. 2002).

Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung wird vor allem durch T-Zellen vermittelt. Es handelt sich hierbei um zytotoxische CD8- und CD4-T-Zellen. Die T-Zellen sind gegen fremde MHC-Moleküle gerichtet, weshalb Unterschiede in den MHC-Loci die stärksten Auslöser einer Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat sind (Janeway, Bottomly et al. 1985). T-Zellen, Freisetzung von Zytokinen und Rekrutierung von weiteren immunkompetenten Zellen führen in Tagen bis Wochen zur Gewebszerstörung. Die Alloantigene in Transplantaten werden auf zwei verschiedene Arten erkannt. Die direkte Erkennung eines übertragenen Organs als fremd erfolgt über T-Zellen, deren Rezeptoren für die allogene MHC-Klasse-I-oder Klasse-II-Moleküle in Kombination mit einem Peptid spezifisch sind (Hong, Sant'Angelo et al. 1997). Antigenpräsentierende Zellen (APCs) des Spenders, die sowohl das allogene MHC-Molekül exprimieren als auch kostimulierend wirken, aktivieren diese allo-reaktiven Zellen. Die indirekte Erkennung des Transplantats erfolgt über T-Zellen, deren Rezeptoren für allogene

Peptide aus dem übertragenen Organ spezifisch sind. Proteine aus dem Transplantat werden von den antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers verarbeitet und deshalb von körpereigenen MHC-Klasse-I oder Klasse-II-Molekülen dargeboten. Indem man die MHC-Typen von Spender und Empfänger aufeinander abstimmt, gelang es, die Erfolgsquote von Transplantationen signifikant zu erhöhen (Solheim, Engebretsen et al. 1977; Solheim, Flatmark et al. 1977). Trotzdem sind Abstoßungsreaktionen nicht ausgeschlossen. Zum einen macht es der Polymorphismus der MHC-Moleküle fast unmöglich, identische MHC-Typen zu finden. Zum anderen können vom HLA-System unabhängige Nebenhistokompatibilitätsantigene auch bei MHC-identischen Transplantaten zur Abstoßungsreaktion führen. Nebenhistokompatibilitätsantigene sind Peptide aus polymorphen Proteinen, die von MHC-Molekülen auf dem Transplantat präsentiert werden. Spender und Empfänger stimmen zwar in ihren MHC-Typen überein, unterscheiden sich jedoch in anderen Genloci. Reaktionen gegen diese Antigene verlaufen langsamer, da weniger spezifisch reaktive T-Zellen vorhanden sind. Daneben können auch Antikörper gegen MHC-Antigene, durch eine zytotoxischen Reaktion am vaskulären Endothel, zu einer akuten Abstoßung führen (Terasaki 2003; Cai and Terasaki 2005; Terasaki and Cai 2005). Alle Transplantatempfänger müssen deshalb immunsuppressive Medikamente erhalten, um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern (Stallone, Infante et al. 2005).

Chronische Abstoßung

Die Hauptursache für ein spät eintretendes Organversagen ist die chronische Abstoßung. Diese ist im Transplantat pathohistologisch gekennzeichnet durch konzentrische arteriosklerotische Ablagerungen in den Blutgefäßen, begleitet von glomerulärer Sklerose und tubulärer Atrophie. T-Zellen setzen Zytokine frei, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel stimulieren. Chemokine locken Monocyten an, die im Transplantat zu Makrophagen reifen (Heemann, Tullius et al. 1993). Diese sezernieren v.a. IL-1, TNF- α und MCP, was eine weitere Mobilisierung von Makrophagen zur Folge hat. Nach heutiger Lehrauffassung wird die chronische Abstoßung sowohl von alloreaktiven als auch von nichtalloreaktiven Mechanismen verursacht. Zu den nichtalloreaktiven Ursachen zählen die perioperativ auftretenden Ischämie-Reperfusionsschäden, die chronische Calcineurininhibitor-Toxizität und die Infektion mit Cytomegalievirus. Die Bedeutung dieser nichtimmunologischen Ursachen findet ihren Niederschlag auch in der jüngsten Banff-Klassifikation von 1999. Die Trias tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose und fibröse Intimaverdickung bildet dabei die pathohistologische Basis für die Diagnose der chronischen

Allograft-Nephropathie in der Banff-Klassifikation (Solez, Axelsen et al. 1993; Solez, Benediktsson et al. 1996; Racusen, Solez et al. 1999).

1.1.2.2 Immun-unabhängige Faktoren

Ischämie-Reperfusionsschaden und Kaltpräservierung

Im Rahmen einer Nierentransplantation ist eine warme Ischämie unvermeidlich. Hierunter versteht man die Zeit vom Beginn des Abklemmens der A. renalis bis zum Beginn der Perfusion des Spenderorgans mit Präservationslösung. Ab diesem Zeitpunkt bis zur Reperfusion der A. renalis im Empfänger spricht man von kalter Ischämie oder Kaltpräservierung. Die Kaltpräservierung ist oft nötig, weil sich Organspender und Organempfänger meist nicht am gleichen Ort befinden. Die Organe werden vielmehr von Eurotransplant nach festgelegten Vergabekriterien an die Empfänger vermittelt. Die notwendige Kühlung führt zu Schäden, da sie in vorgeschädigten Zellen eine Apoptose induzieren kann (Salahudeen, Joshi et al. 2001; Salahudeen, Haider et al. 2004). Dabei ist die absolute Dauer der Ischämiezeit von zentraler prognostischer Bedeutung, da sich eine verlängerte Kaltischämiezeit negativ auf die initial einsetzende Nierenfunktion und das Langzeitüberleben des Transplantats auswirkt (Hetzl, Klein et al. 2002). Auch die Reperfusionsschädigung unmittelbar nach Transplantation kann zu einer verzögert einsetzenden Initialfunktion der Niere führen, die ihrerseits wiederum ein prognostischer Faktor für das Auftreten einer chronischen Rejektion und das Langzeitüberleben der Niere ist (Burne-Taney, Yokota et al. 2005).

Ursache hierfür sind schwere strukturelle und funktionelle Schäden, die durch Ischämie mit nachfolgender Reperfusion hervorgerufen werden. Es kommt zu unspezifischen inflammatorischen Reaktionen, bei denen eine verstärkte Rekrutierung von Leukozyten, Endothelzellaktivierung und -schädigung und eine erhöhte Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen beobachtet werden können (De Greef, Ysebaert et al. 1998; Burne-Taney and Rabb 2003). Auch freie Sauerstoff-Radikale spielen in der Entstehung von Ischämie-Reperfusionsschäden eine zentrale Rolle zugeschrieben. Freie Sauerstoffradikale entstehen dabei sowohl durch Ischämie als auch bei der folgenden Reperfusion, da eine vermehrte Degradation von ATP zu Hypoxanthin stattfindet. Dieses Hypoxanthin wird unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu Xanthin abgebaut, wobei als Nebenprodukt Sauerstoffradikale entstehen (Paller, Hoidal et al. 1984; Paller 1992). Es kommt zu einer

Schädigung von Membranen und anderer Makromoleküle und in diesem Zusammenhang zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren und proteolytischer Enzyme (Granger, Benoit et al. 1989; Granger and Kubes 1994). Geschädigte Endothelzellen verlieren einen Teil ihrer Barrierefunktion, was zu Ödemen und hämorrhagischen Blutungen im transplantierten Organ führen kann (Carbognani, Spaggiari et al. 1995). Ergebnis ist ein nicht-immunologisch medierter Entzündungsprozess des Transplantorgans, der sowohl das akute als auch das chronische Überleben negativ beeinflusst.

Hirntod des Spenders

Der Hirntod wird definiert als Zustand des irreversiblen Erlöschenseins der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms bei einer durch kontrollierte Beatmung noch aufrechterhaltenen Herz-Kreislauffunktion (Zweite Fortschreibung der "Kriterien des Hirntodes" des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer vom 29.6.1991). Obwohl der Hirntod aus neurologischer Sicht gut definiert ist, weiß man doch bis heute relativ wenig über die Veränderungen im Organismus, die infolge des Hirntodes ausgelöst werden. Am häufigsten führen ein Trauma oder eine intrakranielle Blutung zum Hirntod. Es kommt zu einer Erhöhung des intrakraniellen Druckes mit nachfolgender Hirnstammeinklemmsymptomatik und zu einer Kompression der venösen und arteriellen Gefäße bis hin zum völligen Verlust der intrakraniellen Zirkulation, was schließlich zum Koma führt (Mertes, 1996). Gehirnaktivität, Spontanatmung und Hirnstammreflexe setzen irreversibel aus.

Neuere wissenschaftliche Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der Hirntod bei der Entstehung bzw. der Aggravierung von „Immunogenität“ des Transplantats eine wichtige Rolle spielt. Die mutmaßliche Bedeutung des Hirntodes wird durch die Tatsache belegt, dass Transplantatnieren von lebenden Spendern mit einer schlechten HLA-Übereinstimmung eine deutlich bessere Langzeitprognose haben als Nieren mit einem guten HLA-Matching von hirntoten Spendern (Terasaki, Cecka et al. 1995). Proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF- α konnten im peripheren Blut hirntoter Tiere nachgewiesen werden (Huber, Kluger et al. 1991; Takada, Nadeau et al. 1998; Skrabal, Thompson et al. 2005). Genexpressionsstudien von Nierengewebe im Tiermodell zeigten eine Hochregulierung von Cytokinen, Chemokinen, Selektinen und Fibrinogen, besonders bei hämodynamisch instabilen Tieren (Schuurs, Gerbens et al. 2004). Mit dieser Hochregulation geht auch eine deutliche Infiltration mit Entzündungszellen einher (van der Hoeven, Ploeg et al. 1999; van der Hoeven, Molema et al. 2003). Die Gruppe von Tilney (Kusaka, Pratschke et al. 2000)

konnte im Tiermodell nachweisen, dass Hirntod des Spenders im Transplantat die Einwanderung von Granulozyten, die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie E- und P-Selektinen, Komplement, Interleukin-1beta und anderer pro-entzündlicher Chemokine und Zytokine induziert. Auch konnte eine Hochregulation der Expression von MHC II und ICAM-1 gezeigt werden. Als Ergebnis weitergehender Untersuchungen (Pratschke, Wilhelm et al. 2001; Pratschke, Wilhelm et al. 2001) konnte neben den sich innerhalb weniger Stunden einstellenden entzündlichen Veränderungen auch festgestellt werden, dass Hirntod den Ischämie-Reperfusionsschaden verstärkt und die akute und chronische Abstoßung beschleunigt. Hierbei spielt der bei der Induzierung des Hirntods plötzliche rasante Blutdruckanstieg mit anschließender Hypotension wahrscheinlich eine entscheidende Rolle (Pratschke, Neuhaus et al. 2005). Im Rahmen einer explosiven Steigerung des intrakraniellen Druckes kommt es zu einer starken Sympathikus-Aktivierung mit Steigerung der endogenen Katecholamin-Spiegel bis auf das 1000fache (Shivalkar, Van Loon et al. 1993). Die darauf folgenden pathophysiologischen Mechanismen werden als „autonomic storm“ bezeichnet und sind durch einen starken Blutdruckanstieg und eine maximale Vasokonstriktion gekennzeichnet (Pia 1886). Es folgen hämodynamische Instabilität, Hypothermie, Koagulopathie und Verschiebungen im Elektrolythaushalt (Pratschke, Neuhaus et al. 2005). Die durch periphere Vasokonstriktion entstehende Ischämie kann zu tubulären Nekrosen und verstärkter Entzündungsreaktion führen. Auch kalte Ischämie kann zur Nekrose von parenchymalen Nierenzellen führen (Salahudeen, Huang et al. 2000; Salahudeen, Joshi et al. 2001), wobei hier Sauerstoffradikale eine wesentliche Rolle spielen, welche auch nach Reperfusion freigesetzt werden (Chien, Lee et al. 2001). Auch andere hormonelle Regelkreise werden beeinträchtigt. So wird durch Hirntod häufig die Verbindung zwischen Hypothalamus und Hypophyse zerstört, was das Auftreten eines zentralen Diabetes insipidus zur Folge hat (Pratschke, Neuhaus et al. 2005). Die hohen Katecholamin-Spiegel und die verminderten T₃- und Cortisol-Spiegel führen zu stark erhöhten zytosolischen Ca⁺⁺-Werten, die wiederum einen vermehrten ATP-Verbrauch zur Folge haben, so dass es zu einer mangelhaften Energieversorgung der Zelle kommt (Powner, Hendrich et al. 1990; Pratschke, Wilhelm et al. 1999).

1.2 Transplantation und Spendervorbehandlung

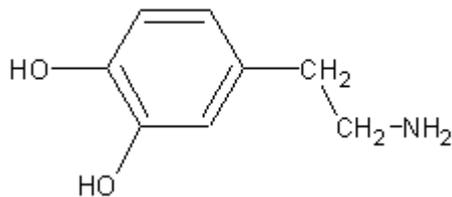
1.2.1 Konzepte zur Spendervorbehandlung

Es herrscht eine starke Diskrepanz zwischen dem Angebot an geeigneten Organen und der stetig zunehmenden Nachfrage. Es warten zurzeit ca. 10.000 Menschen in Deutschland auf eine Nierentransplantation; demgegenüber werden jährlich ca. 2.000 Transplantationen vorgenommen. Daraus folgt eine statistische Wartezeit von 5 Jahren. Es ist daher von besonderer Bedeutung, Konzepte zur Spendervorbehandlung zu entwickeln, um so die vorhandenen Organe vor Schädigungen zu schützen und vielleicht sogar den Donorpool zu erweitern, indem auch zunehmend sogenannte „marginale“ Organe verwendet werden können. Der Ansatz der Spendervorbehandlung besteht darin, durch Induktion zytoprotektiver Mechanismen oder durch Modulation der Transplantat-Immunogenität die perioperative Organschädigung und deren Folgen zu minimieren.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulation des antioxidativen Enzyms Hämoxigenase-1 (HO-1) im Spender die Langzeitfunktion von Transplantaten verbessert (Tullius, Nieminen-Kelha et al. 2002; Martins, Kessler et al. 2005; Kotsch, Francuski et al. 2006). Eine perioperative Behandlung von hirntoten Spendertieren mit Steroiden konnte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine weitgehend unterdrücken und das Transplantatüberleben verbessern (Pratschke, Kofla et al. 2001). Auch durch Gabe von löslichem P-Selektin-Glykoprotein-Liganden (sPSGL) zur Hemmung der P-Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion wurde das Langzeitüberleben verbessert (Pratschke, Kofla et al. 2001).

Eine Behandlung hirntoter Organspender mit Katecholaminen scheint ebenfalls vielversprechend. So konnte unsere Gruppe in retrospektiven Fall-Kontroll-Studien in verschiedenen Kohorten zeigen, dass die Vorbehandlung von Organspendern mit Katecholaminen zu einer deutlich geringeren Abstoßungsinzidenz und einem wesentlich besseren Transplantatüberleben führt (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004). Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass im Tiermodell eine Dopaminspendervorbehandlung in hirntoten Ratten die renale Inflammation dosisabhängig reduzieren und die renale Perfusion verbessern kann (Schaub, Ploetz et al. 2004).

1.2.2 Dopamin



Strukturformel von Dopamin

Summenformel: C₈H₁₁NO₂

1.2.2.1 Allgemeines

Dopamin ist ein endogenes Katecholamin und die direkte Vorstufe von Norepinephrin. Es ist ein Alpha und Beta-Sympathomimetikum und bewirkt sowohl direkt als auch indirekt durch Freisetzung von Adrenalin die Stimulierung der Alpha- und Beta₁-Rezeptoren. Dopamin stimuliert außerdem die dopaminergen Rezeptoren vom postsynaptischen Typ1 und den praesynaptischen Typ2 in den peripheren Gefäßen. Bisher konnten 5 spezifische Dopamin-Rezeptoren (D1 bis D5) identifiziert werden. Diese finden sich bevorzugt im ZNS und im Splanchnikusgebiet. Stimulation der D1 und D5-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung, die der D2 bis D4-Rezeptoren zu einer Hemmung der Adenylatcyclase. D3-Rezeptorstimulation bewirkt, G-Protein-vermittelt, eine Schließung der Calciumkanäle.

Die pharmakologische Wirkung von Dopamin ist dosisabhängig. In niedrigen Dosen (bis 2µg/kg/min) führt Dopamin vor allem zu einer arteriellen Dilatation im Splanchnikusgebiet und in der Niere. In mittleren Dosen (bis 10µg/kg/min) stimuliert Dopamin die Beta₁-Rezeptoren. Es kommt zu einer vermehrten Freisetzung von Norepinephrin und einer Beta-Stimulation am Herzen. Diese positiv inotrope Wirkung führt zu einer verbesserten Organdurchblutung und somit auch zu einer erhöhten Nierendurchblutung mit vermehrter Urinproduktion. Es kommt zu einer Dilatation sowohl des Vas afferens als auch des Vas efferens in der Niere. In hohen Dosen (bis 12µg/kg/min) führt Dopamin durch Stimulation der alpha-adrenergen Rezeptoren zu einer peripheren Vasokonstriktion mit erhöhtem Blutdruck. Der periphere Widerstand nimmt zu, die periphere und renale Durchblutung nimmt ab. Es findet in mittleren bis hohen Konzentrationen vor allem Einsatz auf Intensivstationen zur allgemeinen Kreislaufunterstützung (Holmes 2005). Dopamin besitzt außerdem direkte

Wirkungen an den tubulären Epithelzellen der Niere und fördert die Ausscheidung von Natrium. Dopamin hat auch eine wichtige Funktion als Neurotransmitter. Es ist an der Steuerung der extrapyramidalen Motorik im nigrostriatalen DA-System beteiligt. Die höchsten Dopamin-Konzentrationen finden sich in der Substantia nigra im Hirnstamm. Projektionen des mesolimbischen DA-Systems scheinen mitverantwortlich für die Entwicklung von Psychosen und auch von Suchtverhalten zu sein (Goodman and Gilman 1995).

1.2.2.2 Dopamin und Transplantation

Der Einsatz von Katecholaminen wird in der Transplantationsmedizin widersprüchlich diskutiert. Einige Forschungsgruppen schlugen den Gebrauch zumindest bei hämodynamisch instabilen Patienten vor (Raftery and Johnson 1979; Link, Rohling et al. 1990). Marshall fand ein schlechteres Outcome bei Dopamin-Vorbehandlung (Marshall, Ahsan et al. 1996), Pienaar fand keinen Effekt (Pienaar, Schwartz et al. 1990). Positive Auswirkungen wurden in der Regel mit der Verbesserung der Perfusion erklärt (Manaka, Okamoto et al. 1990). So ist auch Chamorro der Meinung, dass Katecholamine weiterhin uneingeschränkt bei Organspendern für Herztransplantationen aufgrund verbesserter coronarer Durchblutung und möglicher immunmodulatorischer Effekte zum Einsatz kommen sollten (Chamorro, Silva et al. 2003). Eine Reihe von Faktoren spielen in der Pathogenese der Transplantatabstoßung eine entscheidende Rolle, die durch Dopaminbehandlung positiv beeinflusst werden können. Zu diesen Faktoren gehören initiale Schäden im Organ, die sogenannte Danger-Signale freisetzen und damit eine Immunantwort initiieren oder verstärken können (Matzinger 1994). Danger-Signale können bereits vor der eigentlichen Transplantation durch Hirntod des Spenders, Kaltpräservierung, warme Ischämie sowie die Reperfusion verursacht werden. Die Gruppe von Tilney hat im Tiermodell nachgewiesen, dass Hirntod des Spenders im Transplantat die Einwanderung von Granulozyten und die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und pro-entzündlichen Chemokinen und Zytokinen induziert (Kusaka, Pratschke et al. 2000; Kusaka, Pratschke et al. 2001; Kusaka, Yamada et al. 2005). Ischämie kann zur Induktion von MHCII Molekülen in der Niere (Goes, Urmson et al. 1995; Goes, Urmson et al. 1995) und zur Nekrose parenchymaler Nierenzellen (Salahudeen, Joshi et al. 2001) führen. Ischämie und Reperfusion können die Apoptose von Nierenzellen induzieren (Salahudeen, Huang et al. 2000; Salahudeen, Joshi et al. 2001; Salahudeen, Huang et al. 2003; Salahudeen, Haider et al.

2004) und das Immunsystem aktivieren (De Greef, Ysebaert et al. 1998; Burne-Taney and Rabb 2003; Burne-Taney, Yokota et al. 2005).

Wir konnten sowohl in klinischen Studien als auch in *in vitro* und *in vivo* Experimenten zeigen, dass Vorbehandlung mit Dopamin einen positiven Einfluß auf solche schädigenden Faktoren ausübt. In einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie wurde festgestellt, dass die Vorbehandlung von Organspendern mit Katecholaminen zu einer deutlich geringeren Abstoßungsinzidenz und einem wesentlich besseren Transplantatüberleben führt (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Katecholamine das Transplantat auf mindestens 3 Ebenen günstig beeinflussen können. Dopamin (DA) kann *in vitro* Hämoxigenase-1 (HO-1) in Endothelzellen und in proximalen tubulären Epithelzellen (PTEC) induzieren. Dopamin kann also eine indirekt anti-oxidative Wirkung zugeschrieben werden. Diese Wirkung wurde durch den Zusatz von Dopamin-Rezeptor-Antagonisten nicht gehemmt, wohl aber durch Beimischung von Antioxidantien (Berger, Hunger et al. 2000). DA kann die Zytokinproduktion in Endothelzellen und in PTEC modulieren. Es ist außerdem in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen in PTEC zu modulieren (Kapper, Beck et al. 2002; Yard, Beck et al. 2004). Wir konnten zeigen, dass Katecholamine über einen anti-oxidativen Mechanismus die kälte-induzierte Nekrose von Endothelzellen *in vitro* (Yard, Beck et al. 2004) und *in vivo* (Gottmann, Notheisen et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006) in der Niere fast völlig verhindern können. Im Tiermodell haben wir festgestellt, dass Vorbehandlung des Nierentransplantatspenders mit Dopamin die initiale Nierenfunktion verbessert, den Endothelzellschaden nach Kaltpräservierung reduziert und die Nierenfunktion nach 60minütiger Warmischämie verbessert (Gottmann, Notheisen et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006). Dopaminvorbehandlung im hirntoten Spendertier ist in der Lage, die hirntod-induzierte inflammatorische Antwort in der Niere dosisabhängig zu reduzieren und die renale Durchblutung in dosisabhängiger Weise zu verbessern (Schaub, Ploetz et al. 2004). Von allen Katecholaminen übt nur Dopamin diese protektiven Effekte aus. Die genauen Wirkmechanismen sind allerdings nach wie vor nicht geklärt.

2. Fragestellung

In der retrospektiven Studie von Schnuelle et al. konnte gezeigt werden, dass die Organe von hirntoten Spendern, die aufgrund einer instabilen Kreislaufsituation mit Katecholaminen behandelt wurden, ein besseres Outcome hatten als das Vergleichskollektiv von hirntoten Spendern mit stabiler Kreislauf-Funktion (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004). Schaub et al. (Schaub, Ploetz et al. 2004) konnten im Tiermodell anhand einer Dosis-Wirkungs-Analyse die protektiven Effekte einer Dopaminvorbehandlung im hirntoten Spendertier auf die renale Inflammation und renale Perfusion demonstrieren.

Ziel dieses Projektes war es, in einem standardisierten Tiermodell die Effekte und möglichen Wirkmechanismen einer Dopaminspendenvorbehandlung weitergehend zu untersuchen. Mit der vorliegenden Arbeit sollen deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Hat eine Dopaminspendenvorbehandlung auch dann protektive Effekte, wenn sie nicht über die gesamte Hirntoddauer erfolgt (Zeit-Wirkungs-Analyse)? Lassen sich die benefitären Effekte zeitabhängig optimieren?
- 2.) Welche Wirkmechanismen der Dopaminspendenvorbehandlung können den protektiven Effekten zugrunde liegen?
- 3.) Wie wirkt sich eine Dopaminspendenvorbehandlung über den optimalen Behandlungszeitraum im hirntoten Spendertier auf die akute Abstoßung in einem allogenen Transplantationsmodell aus?

3. Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Der Versuch wurde gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Fakultät durchgeführt. Die Genehmigung des Regierungspräsidiums Karlsruhe wurde am 02.04.2004 unter dem Aktenzeichen AZ 35-9185.81/G-27/04 erteilt.

3.2 Versuchstiere und ihre Haltung

Als Organspender dienten männliche Ratten vom Stamm Fisher (F 344, RT^{lv1}), als Organempfänger im Transplantations-Modell männliche Ratten vom Stamm Lewis (LEW, RT^l). Die Tiere wurden ausschließlich von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen.

Beide Stämme unterscheiden sich lediglich im Minor-Histokompatibilitätskomplex (bei sonstiger MHC Klasse I und II-Kompatibilität). Dadurch kommt es bei einer allogenen Transplantation nur zu einer milden akuten Abstossung und Transplantat-Dysfunktion, welche die Tiere in der Regel auch ohne Immunsuppressiva überleben (Lee, Sakurai et al. 2006).

Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend ihres Sozialverhaltens bis zu Versuchsbeginn in Gruppen zu je 5 Tieren. Postoperativ wurden die Empfängertiere einzeln gehalten, um Wundheilungsstörungen zu vermeiden. Die Umweltbedingungen wurden bei einer Temperatur von 21 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem Tag-Nacht-Zyklus im Wechsel von je zwölf Stunden (8⁰⁰ / 20⁰⁰) konstant gehalten. Die Tiere erhielten sowohl Trinkwasser als auch Futtermittel ad libitum. Das Futtermittel bestand aus einer Standard-Diät der Firma Sniff (Soest, Deutschland) mit 19 % Protein- und 0,25 % Kochsalzgehalt.

Die Gewöhnungszeit der Tiere an diese Bedingungen betrug mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn. Zu Versuchsbeginn lag ein Ausgangsgewicht zwischen 200 und 250g vor.

3.3 Substanzen

3.3.1 Dopamin

Dopamin bezogen wir als Dopaminhydrochlorid von der Firma Fresenius Kabi Deutschland GmbH. Dopamin ist ein Alpha- und Beta-Sympathomimetikum und bewirkt sowohl direkt, als auch indirekt durch Freisetzung von Adrenalin die Stimulierung der Alpha- und Beta₁-Rezeptoren. Dopamin stimuliert außerdem die dopaminergen Rezeptoren, den postsynaptischen Typ1 und den praesynaptischen Typ2 in den peripheren Gefäßen. Die pharmakologische Wirkung von Dopamin ist dosisabhängig. In niedrigen Dosen führt Dopamin vor allem zu einer arteriellen Dilatation im Splanchnikusgebiet und in der Niere. In mittleren Dosen stimuliert Dopamin die Beta₁-Rezeptoren. In hohen Dosen führt Dopamin durch Stimulation der alpha-adrenergen Rezeptoren zu einer peripheren Vasokonstriktion mit erhöhtem Blutdruck (Goodman and Gilman 1995).

3.3.2 N-Oktanoyl-Dopamin (NOD)

Bei N-Oktanoyl-Dopamin handelt es sich um ein von uns in Zusammenarbeit mit Herrn Dr.R. Lösel aus dem Institut für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Mannheim modifiziertes Dopamin. Über eine chemische Modifikation wird eine stark lipophile Oktanoyl-Kette in N-Position an Dopamin angefügt, wodurch N-Oktanoyl-Dopamin (NOD) entsteht. Hierbei wird Dopamin in zweierlei Weise modifiziert: Zum einen wird die Lipophilie von Dopamin um ein mehrfaches erhöht. Auf der anderen Seite verliert NOD durch die Addition der Oktanoyl-Seitenkette weitgehend die Fähigkeit zu dopaminergem und adrenerger Rezeptorstimulation. Hierdurch lassen sich die hämodynamischen Eigenschaften ausschalten.

3.3.3 Urapidil (Ebrantil®)

Urapidil bezogen wir als Urapidilhydrochlorid von der Firma Altana Pharma Deutschland GmbH. Urapidil ist ein Alpha_1 -Rezeptor-Antagonist, der vorwiegend die postsynaptischen Alpha_1 -Rezeptoren blockiert. Dadurch können die Katecholamine nicht mehr vasokonstriktorisch wirken. Dies führt zu einer Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks durch Verminderung des peripheren Widerstandes. Zentral moduliert Urapidil die Aktivität der Kreislaufregulationszentren und bewirkt vorwiegend eine Senkung des Sympathikotonus (Goodman & Gilman 1995).

3.3.4 Propranolol und Doxazosin

Propranolol bezogen wir von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Propranolol ist ein nichtselektiver Beta-Adrenozeptor-Antagonist ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität (Goodman and Gilman 1995).

Doxazosin (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ist ein selektiver Alpha_1 -Adrenorezeptor-Antagonist. Es führt nicht zu einer Blockade präsynaptischer Alpha_2 -Rezeptoren und somit zu keiner vermehrten Noradrenalinfreisetzung. Doxazosin ist infolge seiner gefäßerweiternden Wirkung als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Antihypertensiva bei arteriellem Hypertonus indiziert (Goodman & Gilman and Gilman 1995).

3.3.5 SCH-23390 und Domperidone

SCH-23390-hydrochlorid bezogen wir von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Es handelt sich um ein 7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine und ist ein selektiver D_1 - Rezeptor-Antagonist (Jose, Asico et al. 1998).

Domperidone bezogen wir ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Es ist ein Benzimidazolderivat. Es handelt sich um einen peripheren D_2 - Rezeptor-Antagonisten. Es kann die Blut-Hirn-Schranke kaum penetrieren und hat sowohl prokinetische als auch antiemetische Eigenschaften (Goodman and Gilman 1995).

3.3.6 Pergolid

Pergolid (8 β -(Methylthiomethyl)-6-propylergolin) bezogen wir von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Es handelt sich um einen D1/D2-Rezeptoragonisten, der zur Therapie der Parkinson-Krankheit beim Menschen eingesetzt wird. Darüberhinaus unterstützt es die Wirkung blutdrucksenkender Medikamente (Velasco and Luchsinger 1998).

3.4 Versuchsdesign und Gruppeneinteilung

Der Versuchsaufbau wurde in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wurde in einer Zeit-Wirkungs-Analyse die Zeitdauer bestimmt, bei welcher eine Dopaminbehandlung (10µg/kgKG/min) im hirntoten Spendertier die besten protektiven Effekte auf die Nieren erzielen konnte. Nach Ermittlung der optimalen Behandlungszeit wurde in einem zweiten Versuchsabschnitt der Wirkmechanismus dieser protektiven Effekte näher untersucht. Im dritten Abschnitt wurde ein allogenes Transplantationsmodell durchgeführt, wobei die Auswirkung der Dopaminspendervorbehandlung über den ermittelten optimalen Zeitraum auf die akute Abstoßung Gegenstand der Untersuchung war.

3.4.1 Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Präkonditionierung

Im Einzelnen wurden folgende Tiergruppen untersucht:

Gruppe 1: Kontrollgruppe nicht hirntot, beatmet (Veh. nicht ht) (n=6)

Es handelte sich um die nicht hirntote beatmete Kontrollgruppe ohne Dopamin-Präkonditionierung. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Um die Narkosetiefe über 6 Stunden konstant zu halten, erhielten die Tiere zusätzlich zu einer NaCl-Infusion (1ml/h) Ketamin (Hostaket[®], Hoechst Roussel Vet, Bad Soden, Deutschland; 50mg/kgKG/h) und Xylazin (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen; 3mg/kgKG/h) i.v. und zur Analgesie Sufentanildihydrogencitrat (Sufenta[®]; Janssen-Cilag GmbH Deutschland; 0,3µg/kgKG/h i.v.).

Gruppe 2: Kontrollgruppe hirntot, (Veh ht) (n=8)

Es handelte sich um die hirntote beatmete Kontrollgruppe ohne Dopamin-Präkonditionierung. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 3: Versuchsgruppe Dopamin (DA) 6h (DA 6h ab ht) (n=6)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10µg/kg/min Dopamin i.v. über 6 h ab Hirntod-Induktion (Schaub, Ploetz et al. 2004). Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 4: Versuchsgruppe DA 3h (DA 3h ab ht) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10µg/kg/min Dopamin i.v. über 3 h ab Hirntod-Induktion. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 5: Versuchsgruppe DA 1h (DA 1h ab ht) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10µg/kg/min Dopamin i.v. über 1 h ab Hirntod-Induktion. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 6: Versuchsgruppe DA 3h vor Explantation (Ex.) (DA 3h vor Ex.) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10µg/kg/min Dopamin i.v. über die letzten 3 h vor Nierenexplantation. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 7: Versuchsgruppe DA 1h vor Ex. (DA 1h vor Ex.) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10µg/kg/min Dopamin i.v. über 1 h vor Nierenexplantation. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

3.4.2 Wirkmechanismen der Dopamin-Präkonditionierung im hirntoten Spendertier

Gruppe 8: Versuchsgruppe N-Octanoyl-Dopamin (NOD) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt N-Octanoyl-Dopamin (3,3 μ l/kg/h) i.v. über 3 h ab Hirntod-Induktion. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 9: Versuchsgruppe DA und Ebrantil (DA+Ebrantil 3h ab ht) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10 μ g/kg/min Dopamin und Ebrantil (10mg/kg) i.v. über 3 h ab Hirntod-Induktion (Bunag, Thomas et al. 2002). Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 10: Versuchsgruppe DA und α/β -Rezeptorantagonisten (DA+adr.Rez.antag.)

(n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10 μ g/kg/min Dopamin über 3 h ab Hirntod-Induktion und Propranolol/Doxazosin (10/5mg/kg/d p.o.) an Tag -1,0 prae op (Gottmann, Oltersdorf et al. 2003). Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 11: Versuchsgruppe DA und D1/2-Rezeptorantagonisten (DA+D-Rez.antag.)

(n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt 10 μ g/kg/min Dopamin und SCH-23390 (10 μ g/kg/min) i.v. über 3 h ab Hirntod-Induktion und Domperidone (10mg/kg p.o.) an Tag -1,0 prae op (Haga, Asano et al. 1994; Jose, Asico et al. 1998). Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 12: Versuchsgruppe D-Rezeptoragonist Pergolid (D-Agonist) (n=8)

Die hirntote beatmete Versuchsgruppe erhielt Pergolid (0,5 mg/kg i.p.) zu Versuchsbeginn verabreicht (Fischer, Ferger et al. 2002). Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h).

Gruppe 13: Kontrollgruppe naiv (naiv)

(n=4)

Den Ratten wurden sofort nach Narkose die Nieren entnommen. Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet.

Gruppe	Hirntodinduktion (t = 0 h)	Behandlung	Nierenexplantation (t = 6 h)
III	DA 6 h ab ht		(NaCl)
IV	DA 3 h ab ht		(NaCl)
V	DA 1 h ab ht		(NaCl)
VI	(NaCl)		DA 3 h vor Ex.
VII	(NaCl)		DA 1 h vor Ex.
VIII	NOD		(NaCl)
IX	DA + Ebrantil 3h ab ht		(NaCl)
X	DA + α/β -Rez-antag.		(NaCl)
XI	DA + D-Rez. antag.		(NaCl)
XII	D-Agonist		(NaCl)

Tab. 1 Behandlungsschema der Versuchsgruppen

3.4.3 Präkonditionierung des Organspenders- allogene Transplantation und akute Abstoßung

Es erfolgte eine Allotransplantation von Fisher auf Lewis. Postoperativ wurden die Tiere analgetisch versorgt (Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®); Essex Pharma GmbH Deutschland; 0,01 mg/kgKG s.c.) und erhielten eine Standarddiät ohne Zusatz. Alle Ratten hatten im Anschluss an die Operation freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Gruppe A: Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet (Veh. nicht ht) (n=8)

Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere wurden beatmet und erhielten keine Dopamin-Präkonditionierung. Um die Narkosetiefe über 6 konstant zu halten, erhielten die Tiere zusätzlich zu einer NaCl-Infusion (1ml/h) Ketamin (Hostaket®, Hoechst Roussel Vet, Bad Soden, Deutschland; 50mg/kgKG/h) und Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen; 3mg/kgKG/h) i.v. und zur Analgesie Sufentanildihydrogencitrat (0.006µl/gKG/h i.v.). Als Empfängertiere wurden Lewis-Ratten verwendet. Die Beobachtungszeit betrug 10 Tage post transplantationem.

Gruppe B: Allograft / Vehikel hirntot (Veh. ht) (n=8)

Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere wurden beatmet und erhielten keine Dopamin-Präkonditionierung. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h). Als Empfängertiere wurden Lewis-Ratten verwendet. Die Beobachtungszeit betrug 10 Tage post transplantationem.

Gruppe C: Allograft / DA 3h (DA 3h ab ht) (n=8)

Als Spendertiere wurden Fisher-Ratten verwendet. Die Tiere wurden beatmet und erhielten 10µg/kg/min Dopamin über 3 h ab Hirntod-Induktion. Die Tiere erhielten eine NaCl-Infusion (1ml/h) über die gesamte Dauer des Hirntodes (6h). Als Empfängertiere wurden Lewis-Ratten verwendet. Die Beobachtungszeit betrug 10 Tage post transplantationem.

3.5 Operationsmethoden

3.5.1 Übersicht

Alle Operationen wurden unter Verwendung mikrochirurgischer Techniken durchgeführt. Hierzu standen ein binokuläres Kaltlichtmikroskop (Leica MZ 6) mit einer 6 bis 40-fachen Vergrößerung, mikrochirurgisches Operationsbesteck (FST, Heidelberg, Deutschland), Wärmeplatten und ein Elektrokauter zur Verfügung. Bei den Spendertieren kamen zusätzlich eine Bohrmaschine (Proxxon Mikromot 40, Proxxon, Deutschland), ein Beatmungsgerät (Rodent Ventilator 7025, UGO Basile, Comerio (VA), Italien), Blutdrucktransducer samt Verstärker (MVU-0600, MVU-0610 Mean Pressure, MVU-0601 Pressure Amplifier, FMI GmbH, Seeheim, Deutschland) und Mikroinfusionspumpen (CMA/100 Microinjection pump, CMA/ Microdialysis, Schweden) zum Einsatz.

Bei der verwendeten mikrochirurgischen Transplantations-Technik handelt es sich um eine Modifikation der erstmals von Lee (Lee, 1967) beschriebenen Nierentransplantation an der Ratte.

Während der Operation wurden alle Tiere auf einer Wärmeplatte bei 37°C gelagert. Volumenverluste wurden bei Spendertieren mittels Infusion (0,9% NaCl; 1ml/h) ausgeglichen, während der Laparatomie erfolgte eine kontinuierliche Befeuchtung des Operationsfeldes.

3.5.2 Grundlagen

In Vorversuchen wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits das in der Literatur beschriebene Verfahren zur Beatmung von Ratten (Takada, Nadeau et al. 1998) modifiziert. Hierzu wurde mittels wiederholter Blutgasanalysen über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Stunden plus jeweils zwei Stunden für Vor- und Nachbereitung ein optimales Beatmungs-Regime festgelegt (Abb.3).

Zur Etablierung des Hirntod-Modells bei Spendertieren in unserem Labor führte unsere Arbeitsgruppe verschiedene Versuche durch, um den Hirntod zu verifizieren. Hierzu verwendete sie EEG-Monitoring und überprüfte sowohl Korneal- und Atemreflexe als auch die Reaktion auf Schmerzreize. Als Zeitpunkt des Hirntodes wurde der Zeitpunkt der letzten

spontanen elektrischen Aktivität gewertet (Schaub, Ploetz et al. 2004). Der Hirntod trat innerhalb weniger Minuten nach Hirntodinduktion ein.

3.5.3 Hirntod im Spendertier

Bei den Spendertieren handelte es sich um männliche Ratten vom Stamm Fisher mit einem Gewicht von 200-250g. Die Narkose der Spendertiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin (Hostaket[®], Hoechst Roussel Vet, Bad Soden, Deutschland) und 6 mg/ml KG Xylazin (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen). Nach Rasur von Schädelkalotte, ventraler Halspartie, Abdomen und Leistengegend wurde die freigeschorene Haut gereinigt und desinfiziert. Die Ratten wurden zunächst in Bauchlage auf eine Wärmeplatte gelegt. Mittels Scherenschlag wurde die Haut auf der Schädelkalotte entfernt. Ein Bohrloch (Proxxon Mikromot 40, Proxxon, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,6 mm wurde okzipital angelegt, ohne dabei das Gehirn zu verletzen. Anschließend wurde ein Fogarty-Embolektomiekatheter (Pan Medical Ltd., Hillington, U.K., 3 French) bis in den Subduralraum eingeführt (Abb.1).

Nach Wendung der Tiere in Rückenlage wurden sie an den Extremitäten auf der Wärmeplatte fixiert. Die Freipräparation der Trachea erfolgte durch Hautschnitt in der medianen ventralen Halsseite und Präparation der Speicheldrüsen. Die Tracheotomie wurde mittels Elektrokoagulation durchgeführt. Nach Einführung des Tubus in das Tracheostoma (Abb.2) erfolgte die Beatmung mechanisch mit sauerstoffangereicherter Raumluft volumenkontrolliert (1,5-2 ml Raumluft, Frequenz 85/min, Tidalvolumen gem. Abb. 3). Bei der Eröffnung der Trachea war darauf zu achten, die Schilddrüse nicht zu verletzen, um ein Einschwemmen von Hormonen in die Blutbahn zu vermeiden.

Nach Hautschnitt in der rechten Leistengegend und Freipräparation von V. und A. femoralis dexter erfolgte die Incision beider Gefäße und das Einführen der Katheter zur Messung hämodynamischer Parameter sowie zur Medikamentenapplikation. Der venöse Katheter (Portex Polythene Tubing 0,58mm ID, SIMS Portex, England) wurde zur Medikamentenapplikation an eine Mikroinfusionspumpe (CMA/100 Microinjection pump, CMA/ Microdialysis, Schweden) angeschlossen, der arterielle Katheter (Portex Fine Bore Polythene Tubing 0,4mm ID, SIMS Portex, England) zu hämodynamischen Messungen an einen Blutdrucktransducer samt Verstärker (MVU-0600, MVU-0610 Mean Pressure, MVU-0601 Pressure Amplifier, FMI GmbH, Seeheim, Deutschland). Über den venösen Katheter wurden sowohl Vollelektrolytlösung (1ml/h) als auch Medikamente kontinuierlich infundiert.

Zur Induktion des Hirntodes erfolgte eine Insufflation von 200µl Aqua ad iniectabilia (Aqua ad iniectabilia Braun, Braun, Deutschland) über den Fogarty-Katheter in den Subduralraum. Durch die akute intrazerebrale Drucksteigerung und der daraus resultierenden Einklemmsymptomatik des Hirnstammes kam es innerhalb weniger Minuten zum Hirntod.

Zur Verifizierung des Hirntodes wurden das Ausbleiben des Kornealreflexes sowie die ausbleibende Reaktion auf Schmerzreize überprüft, zusätzlich erfolgte ein Apnoe-Test über eine Zeitdauer von 30 Sekunden. Die künstliche Beatmung wurde eingestellt und das Tier auf spontane Atembewegungen hin untersucht. Mittels Blutdruckmonitoring konnte der typische „autonomic storm“ verfolgt werden (Abb. 5). Der Blutdruckverlauf wurde über 6 Stunden graphisch aufgezeichnet (Dasylab5.0, measx, Deutschland). Nach 6-stündiger Hirntoddauer erfolgte die Explantation der Nieren.

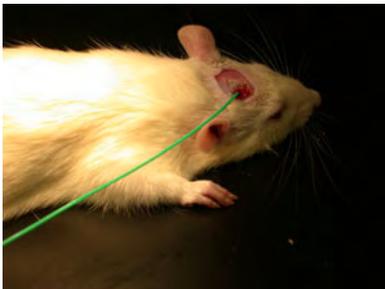


Abb.1 Okzipitales Bohrloch mit Fogarty-Katheter

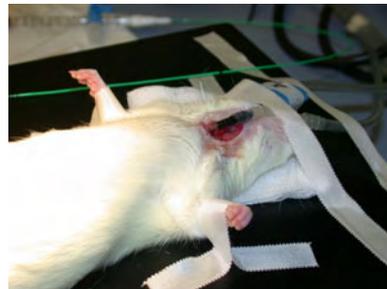
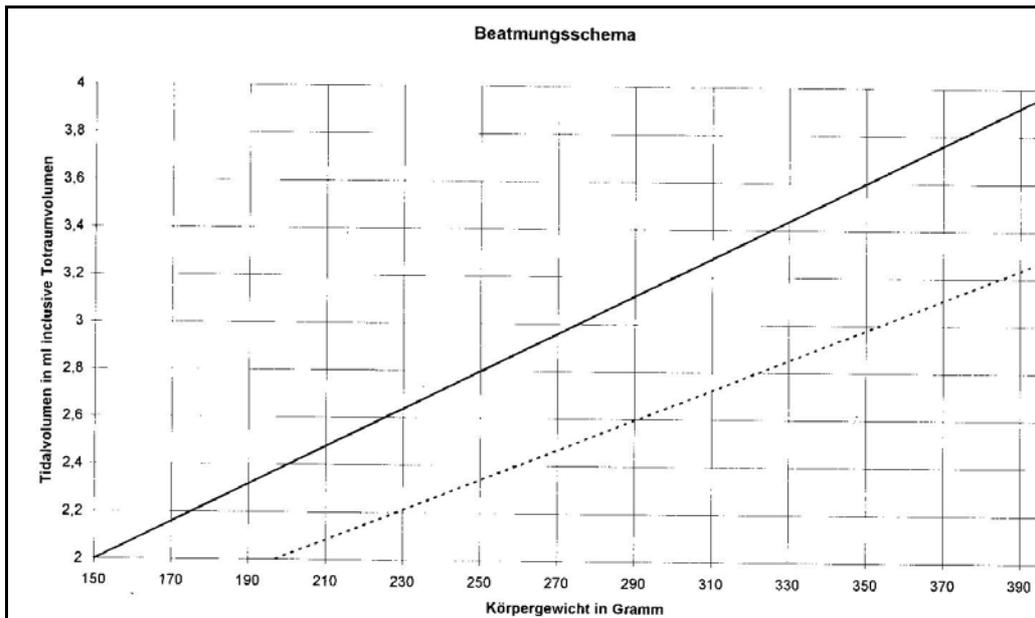


Abb.2 Tracheotomie und Intubation



Der Bereich zwischen den Linien entspricht dem optimalen Tidalvolumen pro Gramm Körpergewicht, wobei die durchgezogene Linie für das maximal, die unterbrochene Linie für das minimal anwendbare Tidalvolumen steht.

Abb.3 Beatmungsschema - Bestimmung anhand von Blutgasanalysen im Vorversuch

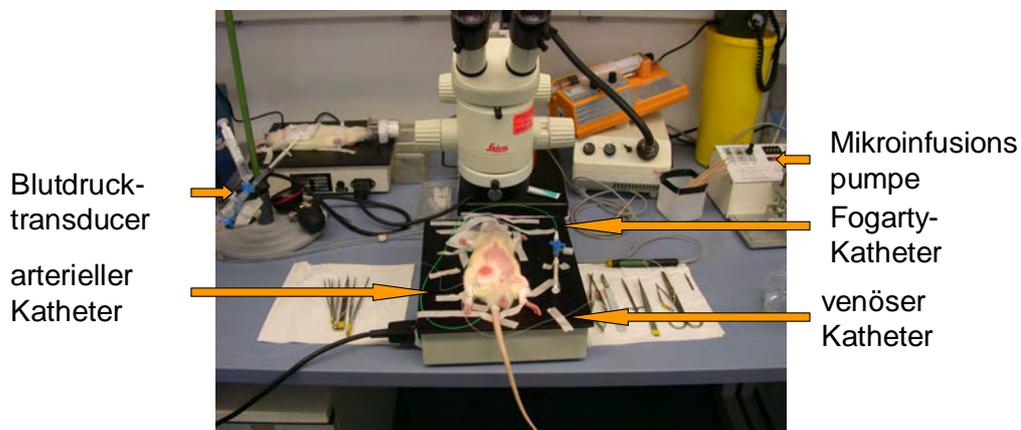


Abb.4 Arbeitsplatz- hirntote Ratte

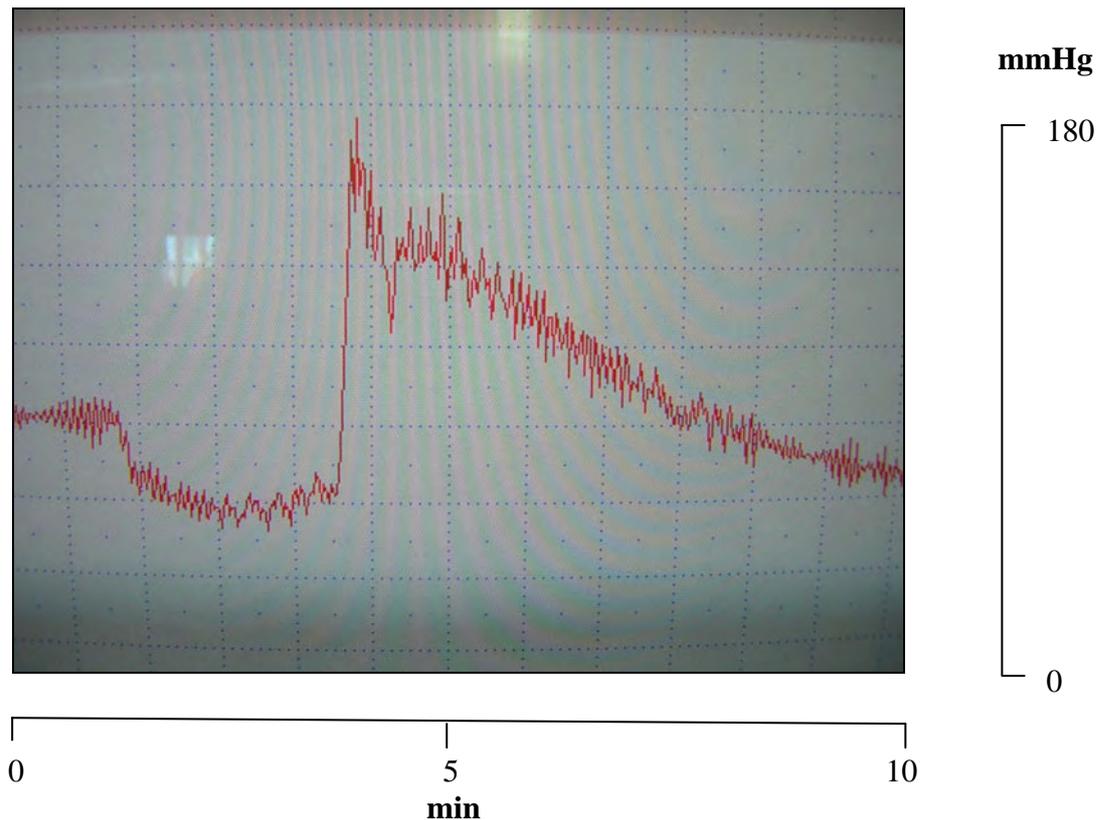


Abb.5 Blutdruckmonitoring- Autonomic storm
 Beginn der Insufflation von 200 μ l Aqua ad iniectabilia über den Fogarty-Katheter in den Subduralraum zum Zeitpunkt $t = 1$ min. Die intrazerebrale Drucksteigerung führt zu dem sogenannten „autonomic storm“, der vor allem durch einen starken Blutdruckanstieg ($t = 4$ min) mit anschließender Hypotension gekennzeichnet ist.

3.5.4 Tracheotomie und Blutdruckmessung im nicht hirntote Spendertier

Bei den Spendertieren handelte es sich um männliche Ratten vom Stamm Fisher mit einem Gewicht von 200-250g. Die Narkose der Spendertiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin (Hostaket[®], Hoechst Roussel Vet, Bad Soden, Deutschland) und 6 mg/ml KG Xylazin (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen). Nach Rasur von ventraler Halspartie, Abdomen und Leistengegend wurde die freigeschorene Haut gereinigt und desinfiziert. Nach oben beschriebener Methode wurden Tracheotomie mit nachfolgender Beatmung und Incision der Gefäße mit anschließender Einführung der Katheter durchgeführt. Allen Tieren wurde in den folgenden 6h Ketamin/Xylazin nach Bedarf und Sufentanilhydrogencitrat (Sufenta[®], Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) mit einer Dosierung von 0,3 μ g/kgKG/h und Vollelektrolytlösung (1ml/h) infundiert. Der Blutdruckverlauf wurde über 6 Stunden graphisch aufgezeichnet (DasyLab5.0, measx, Deutschland). Nach 6 Stunden erfolgte die Explantation der Nieren.

3.5.5 Explantation der Spenderniere

6 Stunden nach Hirntodinduktion oder nach 6-stündiger Narkosedauer ohne Hirntodinduktion sollte die Explantation der Nieren abgeschlossen sein. Nach wiederholter Desinfektion des Abdomens erfolgte eine mediane Laparotomie von der Symphyse bis zum unteren Sternalrand. Zuerst wurde die Bauchhaut durchtrennt. Mit einem weiteren Schnitt entlang der Linea alba wurde der Bauchraum eröffnet. Der Darm wurde mobilisiert, in feuchte Kompressen gehüllt und auf dem Thorax gelagert. Das Colon descendens wurde weitgehend mobilisiert und mit jeweils einem Haken im rechten Ober- und Unterbauch fixiert. Im linken Oberbauch wurden Milz und Magen, geschützt durch eine feuchte Kompresse, mittels eines Hakens außerhalb des Operationsfeldes gehalten. Am linken Unterbauch wurde ebenfalls ein Haken angebracht, wodurch ein rechteckiges Operationsfeld mit Blick auf die linke Niere und die großen Bauchgefäße entstand (Abb.6).

Nach Eröffnung des Retroperitoneums wurden zunächst Aorta und V. cava freipräpariert. Diese Freipräparation erfolgte mit stumpfen Wattestäbchen. Alle Präparationen im Abdomen wurden, soweit als möglich, mit stumpfen Wattestäbchen durchgeführt, um Verletzungen an Gefäßen, Niere und Ureter zu vermeiden. Alle Gefäße, die in die linken Nierengefäße ein- oder ausmünden (A. und V. suprarenalis, V. testicularis) sowie alle Gefäßabgänge aus der Aorta 1cm kranial und 2cm kaudal der linken Nierenarterie wurden mit einem Elektrokauter ligiert. Die Bereiche der späteren Gefäßanastomosen bei der Implantation (Einmündung der li. V.renalis in die V. cava und Aorta ca. 1cm oberhalb des Abgangs der linken Nierenarterie) mussten sorgfältig von Fett und Bindegewebe freipräpariert werden. Anschließend wurde die linke Niere, zusammen mit Nierengefäßen und Ureter, der für seine spätere Fixierung an der Harnblase von ausreichend Fettgewebe umgeben sein sollte, mobilisiert. Der Ureter wurde in unmittelbarer Blasennähe durchtrennt. Danach wurde die Aorta 2-3cm unterhalb der linken Nierenarterie mit einem Faden ligiert (Abb.7).

Die Organentnahme erfolgte in drei Schritten. Der Vorgang der Organentnahme sollte dabei eine Zeitdauer von 30 Sekunden nicht überschreiten.

Der arterielle Blutfluß in der Aorta wurde zunächst mittels einer arteriellen Klemme, die ca. 1cm kranial des Nierenarterienabgangs auf die Aorta gesetzt wurde, gestoppt. Danach wurde die Nierenvene zusammen mit einem Patch von der V. cava getrennt. Anschließend wurde die Aorta kaudal der Nierenarterie und cranial der Fadenligatur punktiert und die Niere retrograd mit 1ml eisgekühlter University of Wisconsin-Lösung (Viaspan®, Bristol-Meyers Squibb GmbH, Deutschland) gleichmäßig perfundiert (Abb.8). Die Niere sollte sich dabei vollständig

und gleichmäßig entfärben. Nach Abtrennen der Aorta direkt caudal der arteriellen Klemme und kaudal der Fadenligatur wurde die Niere samt Nierengefäßen und Ureter entnommen und zur weiteren Aufbewahrung in University of Wisconsin Lösung gelagert. Die rechte Niere wurde ebenfalls mobilisiert, die Nierenkapsel entfernt und die Niere in Hilusnähe von ihren Nierengefäßen und Ureter getrennt. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls in University of Wisconsin Lösung. Die Operationszeit betrug ca. 20 Minuten.

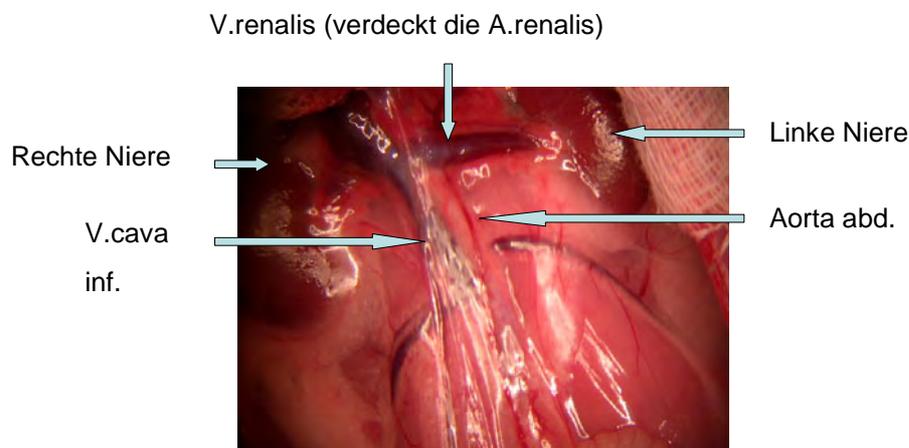


Abb.6 Übersicht Abdomen nach Laparatomie

Ligation der grossen Bauchgefässe

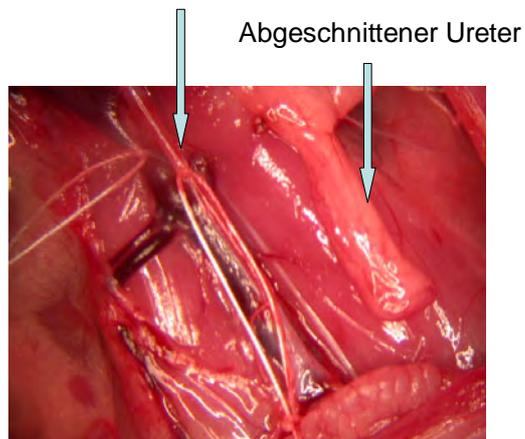


Abb.7 Ligation der grossen Bauchgefässe und Durchtrennung des Ureters

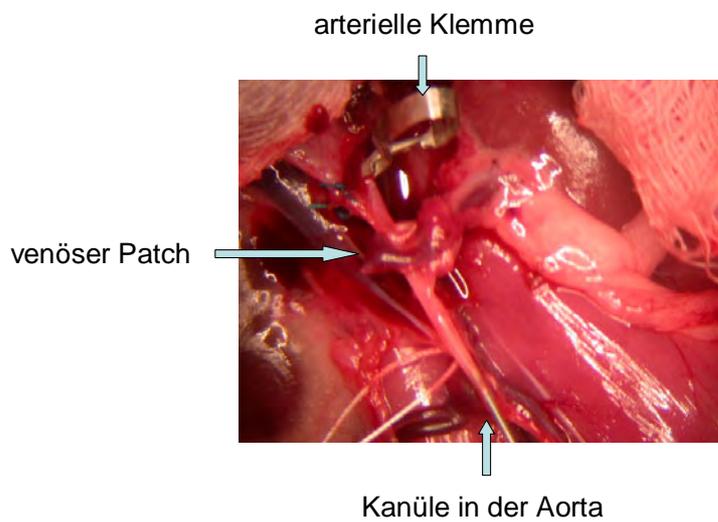


Abb.8 Retrograde Perfusion der Spenderniere

3.5.6 Implantation der Spenderniere

Bei den Empfängertieren handelte es sich um männliche Ratten vom Stamm Lewis mit einem Gewicht von 200-250g.

Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 1 ml/kg KG einer Mischung von 100 mg/ml Ketamin (Hostaket[®], Hoechst Roussel Vet, Bad Soden, Deutschland) und 6mg/ml Xylazin (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen). Nach ca. einer halben Stunde wurde auf Inhalationsnarkose (Isofluran, Forene[®], Abott, Wiesbaden, Deutschland) umgestellt. Die Vorbereitung und Eröffnung des Bauchraumes wurde wie bereits unter 3.5.5 beschrieben durchgeführt.

Zuerst wurde eine Nephrektomie der linken Niere durchgeführt. Hierzu wurde die Nierenkapsel abpräpariert, die Nierengefäße mitsamt Ureter hilusnah ligiert (Ethibond Excel 6/0, Ethicon, Deutschland), durchtrennt und die Niere entnommen (Abb.9).

Nun wurde das Retroperitoneum eröffnet und Bauchaorta und V. cava inf. freipräpariert. Um später die venösen und arteriellen Klemmen setzen zu können, wurde kranial in Höhe des linken Nierenarterienabgangs und kaudal oberhalb der Aortenbifurkation Aorta und V. cava voneinander getrennt (Abb.9). Anschließend wurden alle Gefäßzu- bzw. -abgänge an Aorta und V. cava zwischen diesen beiden Trennungsstellen ligiert. Um den Blutfluß der beiden großen Bauchgefäße zu unterbinden, wurden zunächst die arteriellen Klemmen, anschließend die venösen Klemmen in Blutflussrichtung gesetzt: arterielle Klemme kranial, arterielle Klemme kaudal, venöse Klemme kaudal, venöse Klemme kranial. Mit der Federschere wurde die Aorta auf einer Länge von ca. 3mm von kaudal nach kranial eröffnet. Der Schnitt erfolgte ca. 5mm kranial der kaudalen arteriellen Klemme. Die V. cava wurde ca. 2mm kaudal der kranialen venösen Klemme auf einer Länge von ca. 5 mm vertikal eingeschnitten. Beide Gefäße spülte man sofort mit physiologischer Kochsalzlösung frei, um thrombotisches Material aus den Gefäßlumina zu entfernen.

Die bei 4°C für 24h in University of Wisconsin gelagerte Spenderniere samt Nierengefäßen und Ureter wurde aus dem Kühlschrank entnommen und links im Bauchraum platziert. Das Operationsfeld, im Besonderen auch die Spenderniere, musste immer ausreichend mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet werden. Der kraniale Aortenstumpf wurde auf der Vorderseite mit Einzelknopfnähten (Ethilon 9/0, Ethicon, Deutschland) an der rechten Seite der Aorten-Incision des Empfängertieres angenäht (Abb.10). Der Patch der Spendervene wurde mit fortlaufender Naht auf der rechten Seite der Incision der V.cava des Empfängertieres angenäht (Abb.11). Nach Wenden der Niere auf die Rückseite wurden die

Gefäßanastomosen wie beschrieben fortgesetzt. Vor Abschluss der Naht spülte man die Gefäße nochmals mit Kochsalzlösung, um eventuelle Luftansammlungen in den Gefäßlumina zu entfernen. Der offene kaudale Aortenstumpf der Spenderniere wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich gespült, um das Auftreten einer Luftembolie zu vermeiden. Danach wurde der Aortenstumpf ligiert (Ethibond Excel 6/0, Ethicon, Deutschland).

Anschließend wurden die Klemmen in umgekehrter Reihenfolge, zuerst venös, dann arteriell, entfernt. Hierbei sollte die Zeitdauer vom Setzen der Klemmen bis zu ihrer Entfernung 40 min nicht überschreiten. Die Gefäßanastomosen waren auf gute Durchgängigkeit und Dichtigkeit hin zu überprüfen. Die durchblutete Empfängerniere färbte sich zunächst spontan hellrot, worauf eine kurze reflektorische Vasokonstriktion mit Entfärbung des Parenchyms folgte, um nach wenigen Sekunden die natürliche rote Nierenfarbe anzunehmen (Abb.12). Die Niere wurde nun vorsichtig im linken Bauchraum unter das Peritoneum eingebettet.

Danach wurde der Ureter in die Blase eingenäht (Abb.13). Am Apex vesicae wurde durch Incision der Blasenmuskulatur das Blasenendothel freipräpariert, das sich daraufhin kuppelartig vorwölbte. Das distale Ende des Ureters wurde mittels eines Fadens (Ethibond Excel 6/0, Ethicon, Deutschland) ligiert. Die Nadel des Fadens wurde nun am Apex vesicae durch das Blasenendothel in die Blase eingeführt und an der vorderen Blasenwand wieder ausgeführt, wobei der Ureter durch die Blase gezogen wurde. Anschließend nähte man das periureterale Fettgewebe mit 5-6 Einzelknopfnähten (Ethilon 9/0, Ethicon, Deutschland) am Blasendach rund um das kuppelartig vorgewölbte Blasenendothel an. Dabei sollte der Ureter geschont werden, um Narbenstrikturen zu vermeiden. Es war ebenfalls darauf zu achten, dass weder Fett noch Blasenmuskulatur das Ureterlumen einengten, da sonst die Gefahr einer Hydronephrose bestand. Der nächste Schritt bestand darin, das distale Ende des Harnleiters mitsamt der Fadenligatur abzuschneiden, woraufhin der Ureter in die Blase zurückglitt. Anschließend wurde die Öffnung der Blasenwand mittels einer Sultan'schen Diagonalnaht (Ethilon 9/0, Ethicon, Deutschland) verschlossen.

Der Darm wurde in den Bauchraum zurückverlagert. Um mögliche Flüssigkeitsdefizite des Tieres auszugleichen, wurden 2 ml physiologische Kochsalzlösung in den Bauchraum eingebracht. Die Muskelschicht und Haut wurden mittels fortlaufender Naht (Polyester3/0, medipoint, Deutschland) verschlossen. Die Operationszeit betrug ca. 90 min. Zur Analgesie wurde Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic® 0,01 mg/kgKG s.c.) appliziert. Die Empfängertiere wurden postoperativ zusätzlich bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins mit einer Wärmelampe bestrahlt.

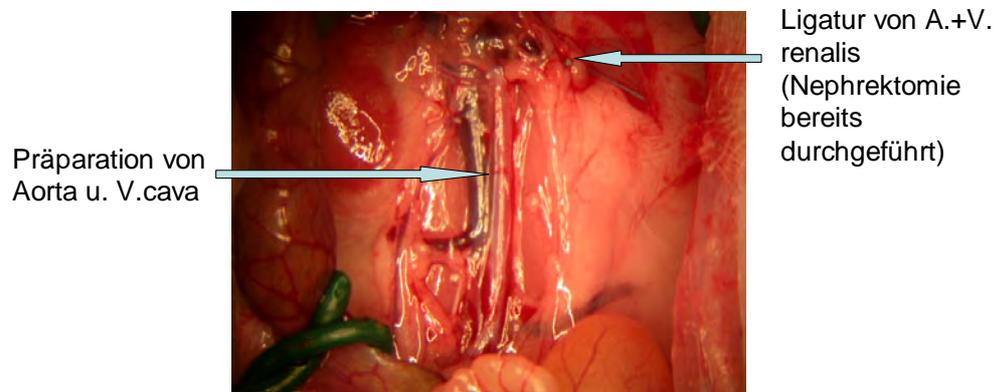


Abb.9 Nephrektomie und Präparation der grossen Bauchgefässe

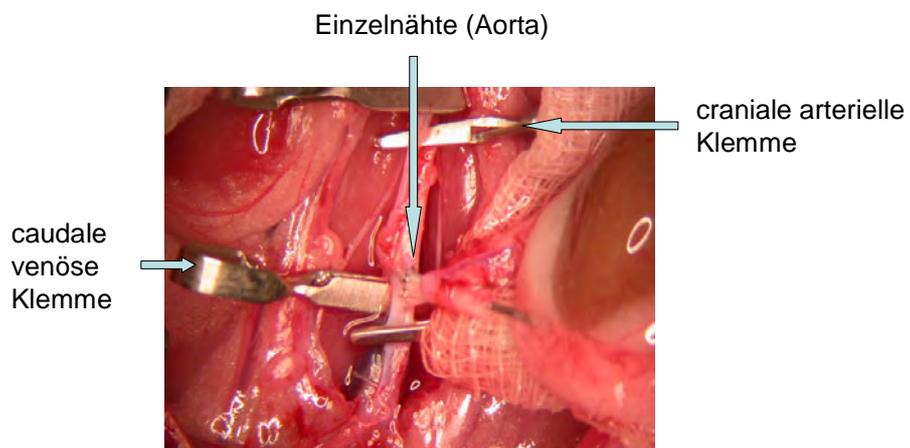


Abb.10 Setzen der Klemmen und Aorten Anastomose

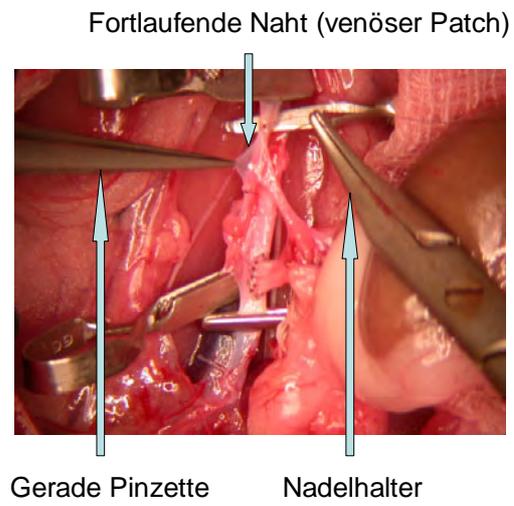


Abb.11 Venöser Patch

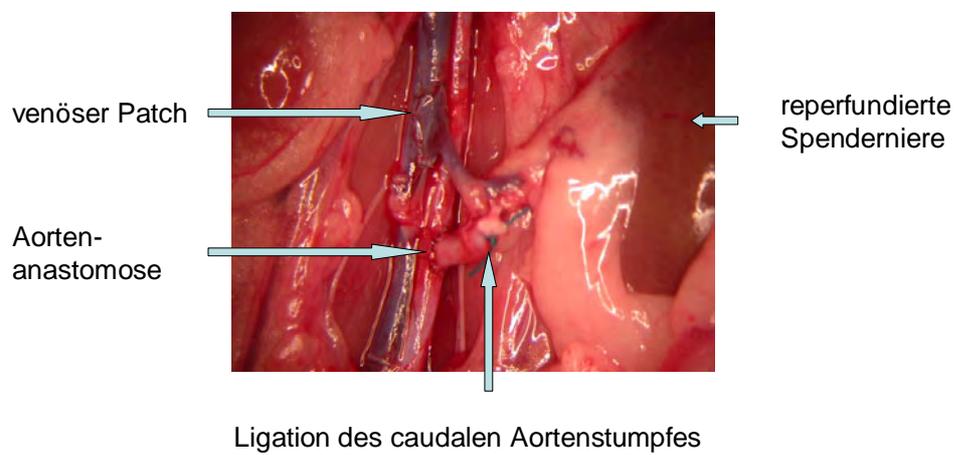


Abb.12 Reperfusion der Spenderniere

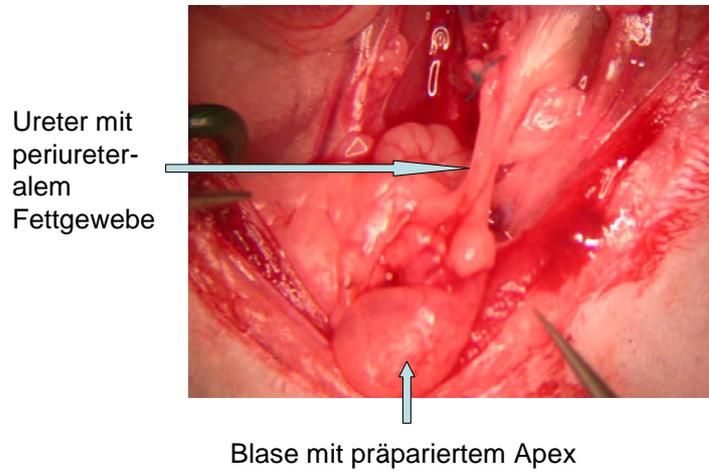


Abb.13 Fixation des Ureters

3.5.7 Fixierung der Niere

3.5.7.1 Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Präkonditionierung

Zur histologischen Untersuchung der Spendernieren wurde die linke Niere direkt nach Perfusion mit University of Wisconsin Lösung von Nierenkapsel, Nierengefäßen und Ureter befreit und durch Querschnitte in 3 Teile geteilt. Der Hilusbereich wurde in 2%iger gepufferter PFA-Lösung (Ansatz siehe unten) eingelegt und bis zur Untersuchung kühl gelagert. Die Nierenpole wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert. Die rechte Niere wurde zur Kaltpräservierung 24h bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung gelagert. Danach erfolgten Fixierung und Lagerung in gleicher Weise wie bei der linken Niere.

Das Ansetzen der Perfusionslösung erfolgte in 2 Schritten:

1) Herstellung eines Phosphatpuffers:

163,6g NaCl, 4,02g KCl, 4,9g KH_2PO_4 und 35,6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden abgewogen und mit destilliertem Wasser auf 2000 ml aufgefüllt.

2) Herstellung der 2%igen Perfusionslösung:

200ml Phosphatpuffer werden mit Aqua dest auf 1000ml. aufgefüllt. Danach werden 40g PFA ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) dazugegeben und bei 80°C so lange gerührt, bis die Lösung klar wird. Anschließend wird mit Aqua dest. auf 2000ml aufgefüllt und filtriert.

Alle dazu verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.5.7.2 Wirkmechanismen der Dopamin-Präkonditionierung im hirntoten Spendertier

Siehe wie unter 3.5.7.1

3.5.7.3 Präkonditionierung des Organspenders- allogene Transplantation und akute Abstoßung

Zur histologischen Untersuchung der rechten Spenderniere wurde die rechte Niere zur Kaltpräservierung 24h bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung gelagert. Nach 24h wurde die Niere durch Querschnitte in 3 Teile geteilt. Der Hilusbereich wurde in 2%iger gepufferter PFA-Lösung eingelegt und bis zur Untersuchung kühl gelagert. Die Nierenpole wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80° Celsius gelagert.

Die linke Spenderniere verblieb post transplantationem für 10 Tage im Empfängertier. Zur histologischen Untersuchung wurden die Transplantate 10 Tage post transplantationem entnommen. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 100mg/kg KG Thiobutabarbital (Inactin, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland). Nach Laparatomie (siehe oben) wurde der Darm extrakorporal gelagert. Nach Setzen der Haken entstand ein rechteckiges Operationsfeld mit Blick auf die linke Niere und die großen Bauchgefäße. Die Niere wurde aus dem Fettgewebe mobilisiert und die Nierenkapsel abpräpariert. Anschließend wurde die Niere in Hilusnähe von ihren Nierengefäßen und Ureter getrennt. Durch Querschnitte wurde die Niere in 3 Teile geteilt. Der Hilusbereich wurde in 2%iger gepufferter PFA-Lösung eingelegt und bis zur Untersuchung kühl gelagert. Die Nierenpole wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80° Celsius gelagert.

3.6 Histologische Untersuchungen

Die oberen und unteren Nierenpole wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren (siehe oben), der Hilusbereich wurde in Formalin eingelegt.

3.6.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

Zum Anfertigen der Paraffinschnitte musste das Nierengewebe zunächst für mindestens 24h in Formalin fixiert werden. Danach erfolgte das Entwässern mit einer Alkohol-Reihe. Als Clearing Reagent diente Xylene. Der letzte Schritt bestand aus dem Einbetten in Paraffin. Die Arbeitsschritte wurden in einem Autotechnikum (Leica, Deutschland) durchgeführt

45min	10% Formalin
45min	50% Alkohol
45min	70% Alkohol
45min	95% Alkohol
45min	100% Alkohol
45min	100% Alkohol
45min	100% Alkohol
45min	Clearing Reagent (Xylene)
45min	Clearing Reagent
45min	Clearing Reagent
1 h	Paraffin
1h	Paraffin

Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom Reichert-Jung Biocut 2030, Reichert Jung, Deutschland) 4µm dicke Nierenschnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Danach liess man die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur trocknen, um sie anschließend in einem 4°C kühlen Aceton/Methanol-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:1) für 1min zu fixieren. Nach nochmaligem Lufttrocknen konnte mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

3.6.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

3.6.2.1 H&E- Färbung

Die Hämatoxilin&Eosin-Färbung wurde bei den Versuchsgruppen A, B und C zur Beurteilung der akuten Abstoßung 10 Tage nach allogener Transplantation durchgeführt. Zuerst wurden die Nierenschnitte entparaffiniert. Dies erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

1. 3×5 min Xylol
2. 2 min 100% Alkohol
3. 2 min 96% Alkohol
4. 2 min 80% Alkohol
5. 2 min 70% Alkohol
6. 2×2 min Leitungswasser

Danach erfolgte die eigentliche Färbung:

1. 12 min Hämatoxilin
2. 3× kurz in Leitungswasser schwenken
3. 15 min bläuen in Leitungswasser
4. 2 min 0,1% wässriges Eosin
5. 1× kurz in Leitungswasser schwenken
6. 1 min 80% Alkohol
7. 1 min 90% Alkohol
8. 2×2 min 100% Alkohol
9. 3×2 min Xylol

Abschließend wurden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

3.6.2.2 Banff-Klassifikation

Zur Bewertung der akuten Abstoßung wurde die international anerkannte Banff-Klassifikation der Nierentransplantationspathologie (Solez, Axelsen et al. 1993; Solez, Benediktsson et al. 1996; Racusen, Solez et al. 1999). Hierzu wurden H&E gefärbte histologische Schnitte untersucht. Die Untersuchung wurde von Herrn Prof. Waldherr (Heidelberg) durchgeführt.

3.6.3 Immunhistochemie

Einfachfärbung

Zunächst mussten die Paraffinschnitte deparaffiniert werden. Dies erfolgte mittels einer Xylol- und- Ethanolreihe (100%,96%,80%). Die Proben wurden anschließend mit TBS (Tris Buffered Saline) gewaschen. Um die durch das Formalin verursachten cross-links wieder aufzubrechen, wurden die Nierenschnitte danach für 20 min bei ca. 500 Watt mit Citratpuffer (pH 6,0-6,3) inkubiert. Nachdem die Nierenschnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut mit TBS gewaschen waren, erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase mit einem Gemisch aus H₂O₂ und Methanol, wobei der Anteil von H₂O₂ am Gesamtgemisch 2 % betrug. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde der unspezifische Hintergrund für 20 min mit 10% Pferdeserum blockiert. Um das endogene Biotin zu blockieren, wurde danach für 15 min erst Avidin, dann Biotin (Avidin/Biotin Blocking Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurden die Nierenschnitte wieder mit TBS gewaschen und danach für 1h bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper inkubiert (Tab. 2a). Der Erstantikörper wurde mit TBS abgewaschen und anschließend die Nierenschnitte für 45min bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert (Tab.2b) Die Antikörper wurden mit 2% TBS/BSA (Bovines Serum Albumin) verdünnt. Der Zweitantikörper wurde mit TBS abgewaschen und danach ABC-Lösung (horseradish peroxidase, Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland) für 30 min aufgetragen. Die Lösung wurde mit TBS abgewaschen. Anschließend wurden die Nierenschnitte für 1-5 min mit DAB-Substratchromogenlösung (Diaminobenzidin; Peroxidase Substrate Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland) inkubiert. Das Anfärben der Zellen wurde hierbei unter dem Mikroskop beobachtet. Die Reaktion wurde bei Erreichen der optimalen Farbtintensität mittels destillierten Wassers gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte für 5min mit Hämatoxilin. Danach wurden die Nierenschnitte mit einer Ethanol (80%,96%,100%)- und Xylolreihe dehydriert. Als Eindeckmedium diente Eukitt.

Zellpopulationen und Oberflächenmarker wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper markiert. Negativ-Kontrollen beinhalteten das Weglassen des ersten Antikörpers. Pro Schnitt wurden bei einer 400fachen Vergrößerung mindestens 10 Gesichtsfelder ausgewertet. Die Expression von ED1, MHCII und CD3 wurde, soweit möglich, numerisch erfasst. Im Transplantationsmodell wurde die Expression von ED1 und MHCII semiquantitativ auf einer Skala von + bis +++ eingestuft (+ wenig Expression, +++ starke Expression). Positive Zellen

wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung oder \pm SEM der Zellzahl pro 10 Gesichtsfelder ausgedrückt.

ED1 und MHCII- Antikörper wurde bei allen Gruppen eingesetzt.

Die Versuchsgruppen 1-4 wurden auf eine Infiltration mit CD3 positiven Zellen untersucht.

ERSTANTIKÖRPER (LINARIS BIOLOGISCHE PRODUKTE GMBH, DEUTSCHLAND)	VERDÜNNUNG
ED1 (Makrophagen und Monozyten)	1:200
MHCII (Major Histocompatibility Complex II)	1:100
CD3 (T-Zellen)	1:80

Tab.2a. Immunhistochemische Einfachfärbung. Verwendete Erstantikörper und Verdünnungen.

ZWEITANTIKÖRPER (LINARIS BIOLOGISCHE PRODUKTE GMBH, DEUTSCHLAND)	VERDÜNNUNG
Anti-Mouse IgG (H+L),biotinylated	1:200

Tab. 2b Immunhistochemische Einfachfärbung – verwendeter Zweitantikörper und Verdünnung.

3.7 FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Die Durchflußzytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht unter anderem die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einer Flüssigkeit. Mit Hilfe fluoreszenz-markierter Proben können bestimmte Eigenschaften von Zellen (zum Beispiel die Expression von Oberflächenmolekülen) auf Einzelzellebene analysiert werden.

Blutabnahmen erfolgten bei jeweils 2 Tieren der Gruppen B und C zu den Zeitpunkten vor Hirntodinduktion und 6h nach Hirntodinduktion. Zu jedem Zeitpunkt wurden hierbei 500 μ l Blut aus dem arteriellen Katheter entnommen.

Das Blut wurde in heparinisierten Röhren gesammelt. Anschließend sollte die Expression bestimmter proinflammatorischer Oberflächenmoleküle (siehe unten) im peripheren Blut quantitativ bestimmt werden.

3.7.1 FACS- Färbung

Zunächst wurden je 50µl des zu untersuchenden Blutes in für FACS-Analyse geeignete Röhren (BD-Falcon Polystyrene 5ml) gegeben. Jeder Probe wurde anschließend 1ml PBS zugefügt und die Proben für 5 min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Es wurden jeweils 10µl der fluoreszenz-markierten Antikörper (Tab.3a, b) zu 50µl Blut gegeben. Da es sich um eine Doppelfärbung handelte, wurden je 2 Antikörper in eine Probe gegeben, die sich in ihrem Fluoreszenzfarbstoff voneinander unterschieden. Die Negativkontrolle enthielt nur 50µl Blut, den Farbkontrollen wurde nur 10µl des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs zupipettiert. Die Blutproben wurden mit den fluoreszenz-markierten Antikörpern für 30min bei 4°C inkubiert, danach wurde der Überstand abzentrifugiert (5 min bei 1200rpm) und abpipettiert. Den Proben wurde anschließend FACS-Lysis-Lösung zugegeben, weitere 15 min bei 4°C inkubiert und dann für 5 min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und dem Sediment 300 µl Cell-wash zugegeben. Im Anschluß erfolgte die FACS-Analyse.

ANTIKÖRPER (LINARIS BIOLOGISCHE PRODUKTE GMBH)	FLUORESZENZFARBSTOFF
ED-1	FITC
MHCII	RPE
CD18	FITC
CD11a	FITC
CD62L	FITC
CD25	RPE
CD4	RPE
CD4	FITC

Tab.3a Untersuchung zur Expression von proinflammatorischen Oberflächenmolekülen im peripheren Blut nach Hirntod mittels FACS-Analyse. Verwendete Antikörper und korrespondierende Fluoreszenzfarbstoffe.

Antigen	Zelluläre Expression
ED-1	v.a. Monozyten, Makrophagen
MHCII	APC (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen)
CD 18	Leukozyten
CD 11a	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen
CD 62L	B Zellen, T Zellen, Monozyten und NK Zellen
CD 25	T Zellen, B Zellen und Monozyten
CD4	v.a. T-Zellen

Tab.3b Nomenklatur und zelluläre Expression der untersuchten Antigene

3.7.2 Flow- Zytometrie und Datenanalyse

Die FACS-Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Mittels fluoreszenz-markierter Antikörper werden diese Oberflächen-Antigene nachgewiesen. Die Analyse fand im Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) des Universitätsklinikums Mannheim an dem FACS-Analyse-Gerät (FACScalibur, Becton Dickinson, USA) statt.

Zur Analyse wurden die markierten PBMC's aus den Blutproben, durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht, an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt unter Abgabe von Energie (Photonen) auf das Ursprungsniveau zurück. Durch einen Photodetektor wurde die emittierte Photonenkonzentration gemessen. Sie verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Damit erlaubte sie eine Aussage über die Expression von Oberflächenmolekülen wie z.B. ED1 und MHCII, die spezifisch für Monozyten und Makrophagen sind. Durch Lichtbeugung- und streuung wurden weitere Informationen über die Zellen (z.B. Granularität) gewonnen. Es wurden Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet (siehe oben), um so eine gleichzeitige Messung von z.B. ED1 und MHCII positiven Zellen vornehmen zu können.

3.8 Gen-Expressionsanalyse

3.8.1 RNA- Isolation

Die RNA –Isolation erfolgte mit Trizol-Reagent. Hierzu wurde zunächst die Gewebeprobe (50-100mg) zusammen mit 1ml Trizol-Reagent in einem Polytron (Polytron Kinematica, Schweiz) homogenisiert. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min mit 12000 *G bei 4°C. Der homogenisierte Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit der Phasenseparation begonnen. Hierzu wurden die homogenisierten Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200µl Chloroform hinzugefügt und für weitere 3 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15min mit 12000*G bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluß erfolgte die RNA-Präzipitation. Der flüssige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die RNA durch Hinzufügen von 500µl Isopropyl-Alkohol präzipitiert. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur erfolgte erneut die Zentrifugation für 10 min mit 12000*G bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Pellet mit 1ml Ethanol (75%) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte für 5 min mit 12000*G bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Probe bei -20°C bis zur Messung gelagert. Hierzu wurde jeweils schockgefrorenes Nierengewebe (siehe oben) von 4 Versuchstieren der Gruppen 1,2, 4 und 12 untersucht.

3.8.2 Real time PCR (Roche Light Cycler®)

Das Prinzip der light-cycler PCR beruht auf einer normalen Polymerase Ketten Reaktion, d.h. mittels zweier genspezifischer Primer (kurze, synthetisch hergestellte, definierte Starter- DNA Stücke) wird das zu untersuchende Fragment vervielfältigt. Zusätzlich werden 2 sogenannte Hybridisierungssonden verwendet, die sequenzspezifisch an das vervielfältigte PCR Produkt binden. Die Sonden sind mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und binden während des PCR- Zyklus an das entstehende Produkt. Dadurch kommen die beiden Fluorochrome in eine enge Nähe zueinander. Das sog. Donor Fluorochrom wird durch eine Lichtquelle im Light Cycler angeregt und gibt einen Teil seiner Extinktionsenergie an das zweite Fluorochrom, das sog. Akzeptorfluorochrom ab. Dadurch wiederum wird dieses Fluorochrom

angeregt und gibt Licht einer bestimmten Wellenlänge ab, die vom Light Cycler detektiert wird. Dieses Prinzip beruht auf dem sog. FRET (fluorescence resonance energy transfer). Binden die beiden Sonden nicht in einer bestimmten Nähe zueinander an das entstehende PCR Produkt, entsteht auch keine zu messende Fluoreszenz. Dies gewährleistet die hohe Spezifität des Assays, da entstehende unspezifische PCR Produkte im Gegensatz zu einer konventionellen PCR nicht nachgewiesen werden und daher die Auswertung nicht verfälschen. Durch Messung der entstehenden Fluoreszenz kann zu jedem Zeitpunkt während der PCR -Reaktion die Menge des entstehenden Produktes berechnet werden. Durch Verwendung von Standards mit bekannten Konzentrationen am Ausgangsmaterial kann die Menge des in der Probe ursprünglich vorhandenen Targets bestimmt werden (Biotec GmbH, Deutschland).

Hierzu wurde jeweils schockgefrorenes Nierengewebe (siehe oben) von jeweils 4 Versuchstieren der Gruppen 1,2,4 und 12 untersucht. Mittels "oligo-dT priming" wurden 2µg RNA in cDNA überschrieben. Der Oligonukleotidprimer wurde anhand der bekannten cDNA-Sequenz von HO-1 (Sense: ATG TCC CAG GAT TTG TCC GA; Antisense: TAA AGC CTT CCC TGG ACA CCT) erstellt. Als home-keeping Gen diente S16 (Sense: CAC CTA ACC ATA CGC CTT GCT T; Antisense: TGG ATC ATA GGA GCC CAA CTG). Zu dem PCR-Puffer wurden 10 µl cDNA, 0,26 µmol von jedem dNTP, 20 pmol des Primers sowie 1 U Taq-Polymerase gegeben. Nach den entsprechenden PCR-Zyklen wurden die Produkte auf einem 4% Agarosegel (Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) separiert und mit Hilfe eines Bioanalysers (Bio Doc II / NT, Biometra, Göttingen, Deutschland) densitometrisch analysiert.

Die Untersuchung wurde im Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) des Universitätsklinikums Mannheim durchgeführt.

PRIMER (BIOTEC GMBH,GERMANY)	VERDÜNNUNG
HO-1 (Hämoxxygenase-1)	1:4; 1:8
House-keeping-gene S16	1:4; 1:8

Tab.4 Genexpressionsanalyse - verwendete Primer und Verdünnungen bei der Light-cycler - PCR.

3.9 Ausschlusskriterien

Spendertiere, deren mittlerer arterieller Blutdruck einen Wert von 50mmHg im Versuch unterschritt, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Transplantationstiere, bei denen Ureterstenosen, Hydronephrosen, Gefäßstenosen, Thrombosen, Blutungen oder Infektionen vorlagen, wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

3.10 Statistische Auswertungen

Deskriptive und analytische Statistik erfolgten in Absprache mit dem Institut für Biomathematik des Universitätsklinikums Mannheim. Die Angabe von Zahlenwerten erfolgt als Mittelwert mit Nennung der Standardabweichung (SD). Die Blutdruckwerte wurden unter der Annahme einer parametrischen Verteilung mittels 2-Way-ANOVA für wiederholte Messungen auf signifikante Unterschiede untersucht. Kontinuierliche Daten mit angenommener nicht-parametrischer Verteilung wurden mit dem Kruskal-Wallis Test mit Conover-Inman Korrektur für multiple Vergleiche unabhängiger Gruppen ausgewertet. Der Vergleich der histologischen ordinalen Daten erfolgte mit dem Fisher`s Exact Test. Statistische Signifikanz wurde definiert als $P < 0,05$.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der StatsDirect Software (Version 2.2.8).

4. Ergebnisse

4.1 Zeit-Wirkungs-Analyse

4.1.1 Hämodynamik

Auswirkung des Hirntodes auf den Mittleren Arteriellen Druck (MAP)

Hirntot und nicht hirntot beatmete Tiere zeigten in Narkose vor Hirntodinduktion keine signifikanten Unterschiede im Mittleren arteriellen Druck. Alle Tiere hatten physiologische Blutdruckwerte (hirntote Ratten, 110 ± 13 mm Hg; beatmete nicht hirntote Ratten, 104 ± 9 mm Hg; $P =$ Nicht Signifikant [NS]).

Bei den Gruppen mit Hirntodinduktion konnte 2 ± 1 Minuten nach Inflation des Fogarty-Katheters ein signifikanter kurzfristiger Blutdruckabfall über 2 ± 1 Minuten beobachtet werden (82 ± 5 mmHg, $P < 0,05$). Darauf folgte ein signifikanter Blutdruckanstieg (161 ± 5 mmHg, $P < 0,05$). Innerhalb von 20 Minuten nach Hirntodinduktion trat ein signifikanter Blutdruckabfall in der hirntoten Kontrollgruppe ein (70 ± 5 mmHg, $P < 0,05$), der sich im weiteren Verlauf auf diesem Niveau stabilisierte. Eine Hypotension (MAP < 80 mmHg) blieb jedoch bei den Tieren der hirntoten Kontrollgruppe über die gesamte 6-stündige Hirntoddauer bestehen (Abb.14). Dieser Verlauf entspricht dem typischen Ablauf des „autonomic storm“. Verglichen hierzu blieb der Blutdruck in der beatmeten nicht-hirntoten Kontrollgruppe die ersten 3 Stunden der Versuchsdauer konstant (102 ± 6 mmHg). Erst in den letzten 3 Stunden des Versuchs sank der Blutdruck allmählich ab (80 ± 6 mmHg, Abb. 14).

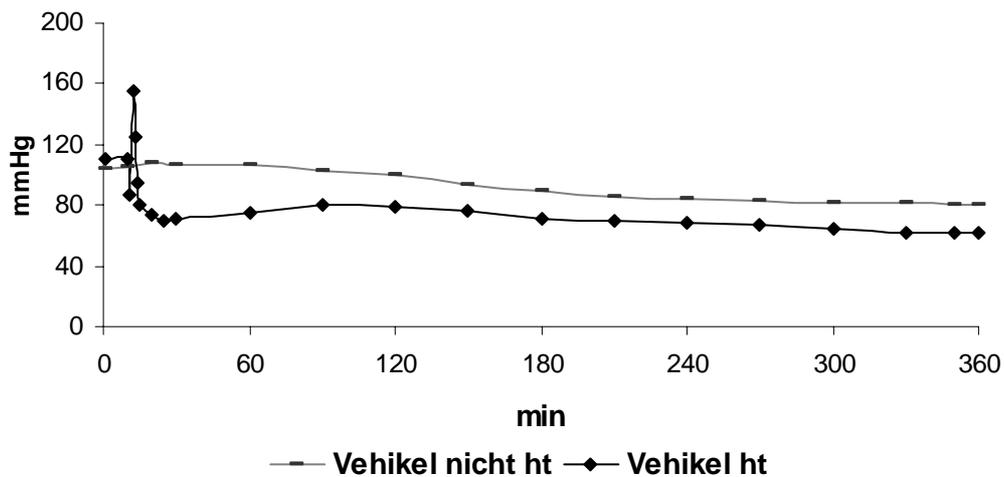


Abb.14 Blutdruckverlauf (MAP) hirntote Kontrollgruppe versus nicht-hirntote Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer von 6 Stunden.

Beeinflussung des Mittleren Arteriellen Druckes durch Dopaminbehandlung

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den anti-inflammatorischen Effekten des Dopamin und seinen hämodynamischen Eigenschaften herzustellen, wurde der Blutdruck auch bei allen Gruppen, die zur Erstellung der Zeit-Wirkungs-Analyse dienten, aufgezeichnet. Dopamin stabilisiert den Blutdruck in hirntoten Ratten (Abb.15-17) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (Kontrollgruppe hirntod vs. Versuchsgruppe DA 6h, $P < 0,05$, Abb.13, Tab.5a, b). Die Dopamingabe führte sowohl unmittelbar nach Hirntodinduktion als auch nach späterem Infusionsbeginn regelhaft zur Blutdruckstabilisierung.

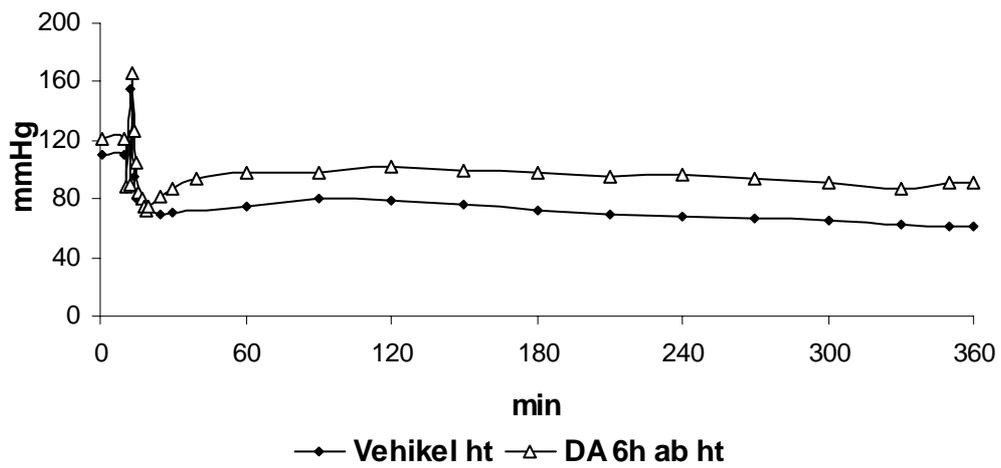


Abb.15 MAP- Zeit-Wirkungs-Analyse mit Dopaminbehandlung. Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA 6h.

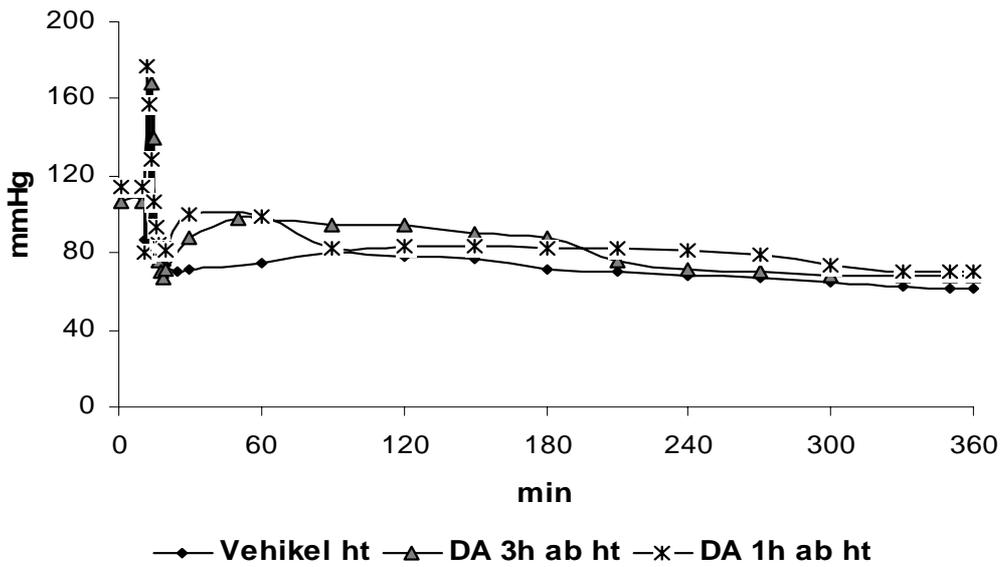


Abb.16 MAP- Zeit-Wirkungs-Analyse mit Dopaminbehandlung. Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA 3h ab ht und DA 1h ab ht.

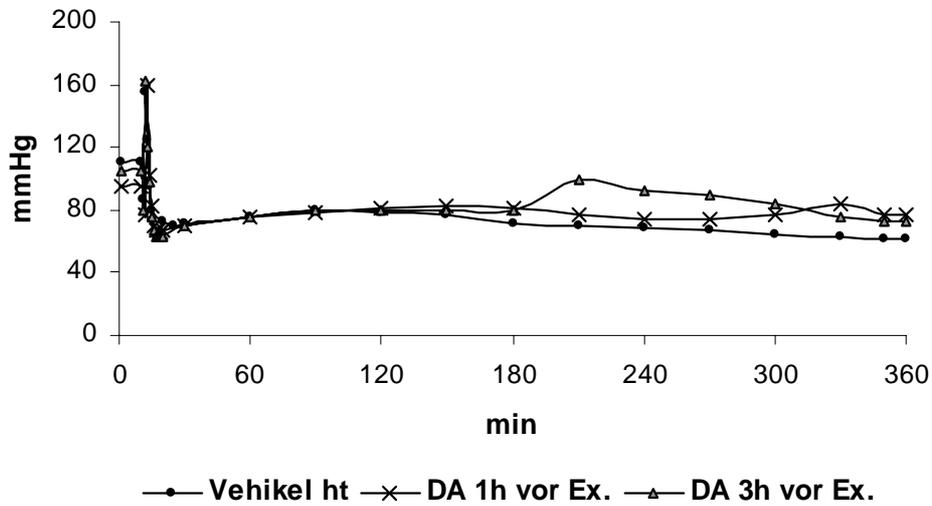


Abb.17 MAP- Zeit-Wirkungs-Analyse mit Dopaminbehandlung. Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA 3h vor Explantation (Ex.) und DA 1h vor Ex.

	Vor Hirntodinduktion	1 h	3 h	6 h
Kontrolle hirntot vs.Kontrolle nicht hirntot	NS	P<0,005	P<0,05	P=NS

Tab5a. Vergleich Blutdruckdaten der Kontrollgruppen über 6 Stunden mittels 2-way-ANOVA. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant erachtet.

	Vor Hirntodinduktion	1h	3 h	6 h
Kontrolle hirntot vs.Versuchsgruppe DA 6 h	NS	P<0,05	P<0,005	P<0,05

Tab5b. Vergleich Blutdruckdaten der Kontrollgruppe hirntot versus Dopaminbehandlungsgruppe über 6 Stunden mittels 2-way-ANOVA. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant erachtet.

4.1.2 Renale Inflammation

Monozyten/Makrophagen (ED1)

In den Nieren der hirntoten Kontrolltiere (Veh.ht) kam es, verglichen mit Nierengewebe der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (Veh. nicht ht), zu einem signifikanten Anstieg der Infiltration mit Monozyten und Makrophagen (ED1 positive Zellen Veh.ht 30 ± 6 vs. Veh. nicht ht 22 ± 3 , $P < 0,005$). Diese Infiltration wurde durch Dopaminbehandlung ab Hirntodinduktion in zeitabhängiger Weise gehemmt. (DA1h ab ht 27 ± 7 vs. Veh.ht, $P = \text{NS}$; DA 3h ab ht 22 ± 5 vs. Veh.ht, $P < 0,005$; DA 6h ab ht 23 ± 3 vs. Veh.ht, $P < 0,05$, Abb.18; Abb.20). Dagegen zeigte eine Dopaminbehandlung, die nicht ab Hirntodinduktion, sondern erst vor Explantation erfolgte, keine positiven Effekte auf die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen (DA 1h vor Ex. 39 ± 9 vs. Veh.ht, $P = \text{NS}$; DA 3h vor Ex. 31 ± 8 vs. Veh.ht, $P = \text{NS}$, Abb.19).

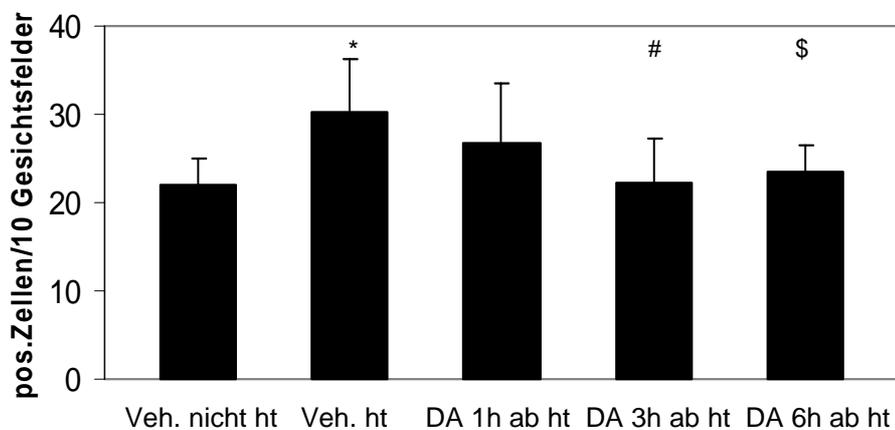


Abb. 18 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung ab Hirntodinduktion. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. Veh. ht, $*P < 0,005$; Veh. ht vs. DA 1h ab ht: $P = \text{NS}$; Veh. ht vs. DA 3 h ab ht, $\#P < 0.005$; Veh. ht vs. DA 6 h ab ht, $\$P < 0.05$).

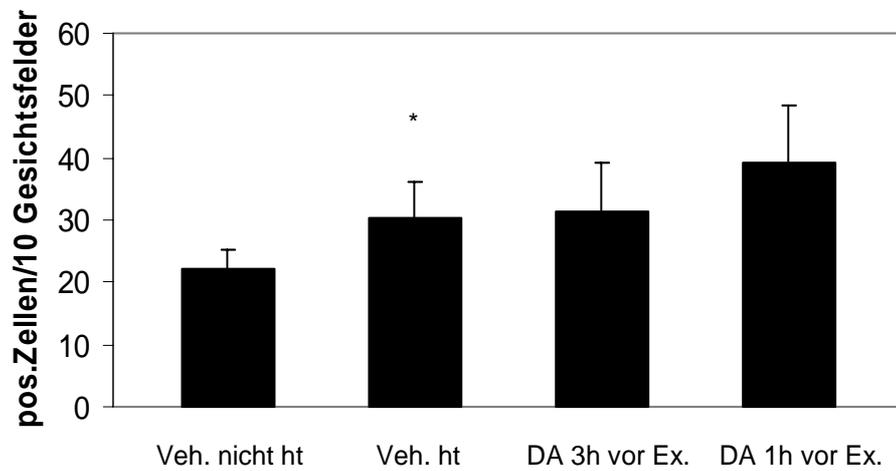


Abb.19 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung vor Explantation. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. Veh. ht, * $P < 0,005$).

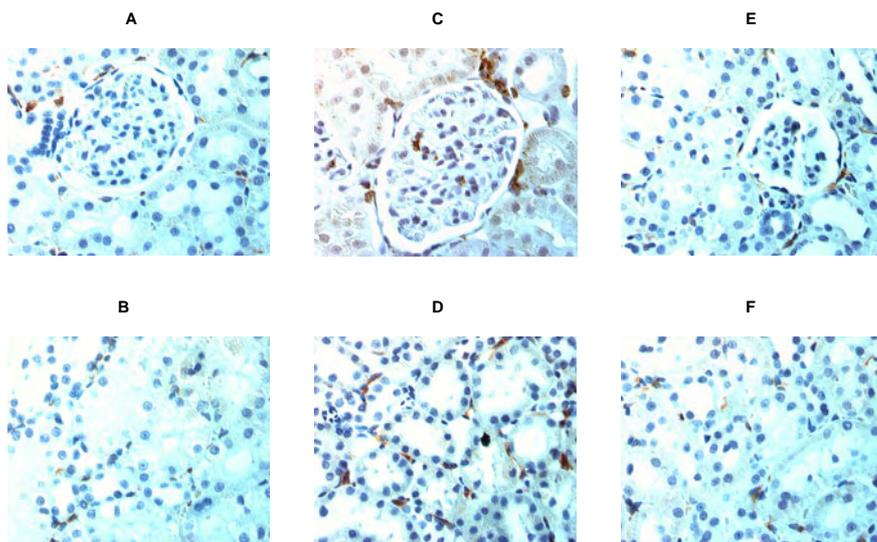


Abb.20 Immunhistochemie – ED1 positive Zellen pro Gesichtsfeld (Braunfärbung der ED1 positiven Zellen mittels DAB-Substratchromogenlösung)

- A. Vehikel nicht hirntot, beatmet - glomeruläre Infiltration
- B. Vehikel nicht hirntot, beatmet – interstitielle Infiltration
- C. Vehikel hirntot – glomeruläre Infiltration
- D. Vehikel hirntot – interstitielle Infiltration
- E. DA 3h ab ht – glomeruläre Infiltration
- F. DA 3h ab ht– interstitielle Infiltration

MHCII positive Zellen

Im Nierengewebe der hirntoten Kontrolltiere (Veh.ht) (101 ± 15) konnte eine signifikante Hochregulation der Expression von MHCII gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (Veh. nicht ht, 68 ± 20 , $P < 0,005$) beobachtet werden. Dopamin war in der Lage, die Expression von MHCII signifikant zu reduzieren (Veh. ht versus DA 6h ab ht 68 ± 15 , $P < 0,005$; Veh. ht versus DA 3h ab ht 56 ± 23 , $P < 0,005$; Veh. ht versus DA 1h ab ht 92 ± 22 , $P = \text{NS}$; Veh. ht versus DA 1h vor Ex. 72 ± 15 , $P < 0,005$; Veh. ht versus DA 3h vor Ex. 63 ± 22 , $P < 0,005$, Abb.21-23).

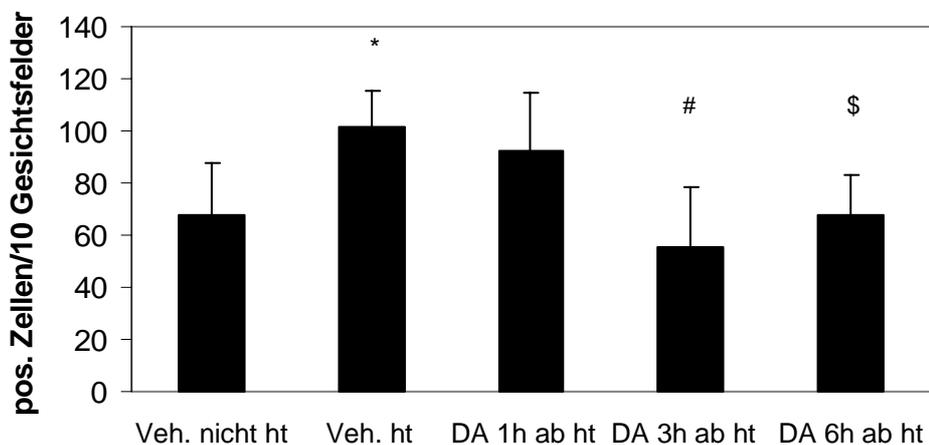


Abb.21 Expression von MHCII bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung ab Hirntodinduktion. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. Veh. ht, $*P < 0,005$; Veh. ht vs. DA 1h ab ht, $P = \text{NS}$; Veh. ht vs. DA 3 h ab ht, $\#P < 0,005$; Veh. ht vs. DA 6 h ab ht, $\$P < 0,005$).

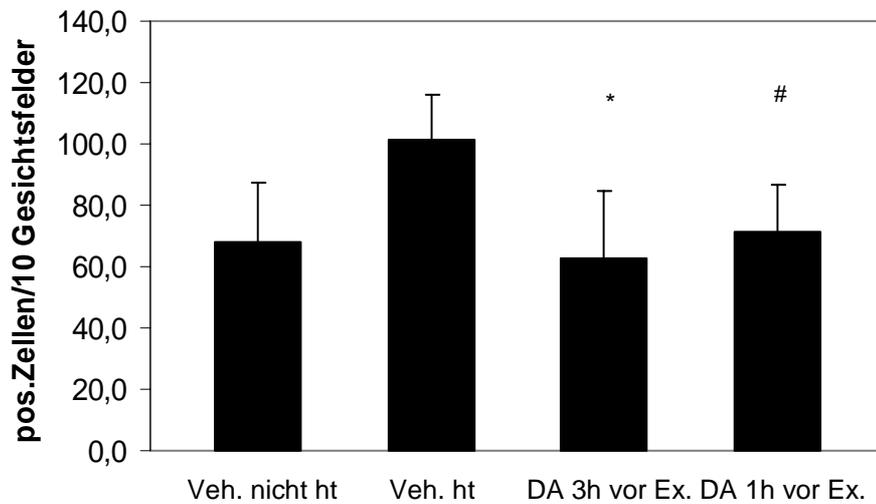


Abb.22 Expression von MHCII bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung vor Explantation. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh. ht vs. DA 3h vor Ex., * $P < 0,005$; Veh. ht vs. DA 1h vor Ex., # $P < 0,005$)

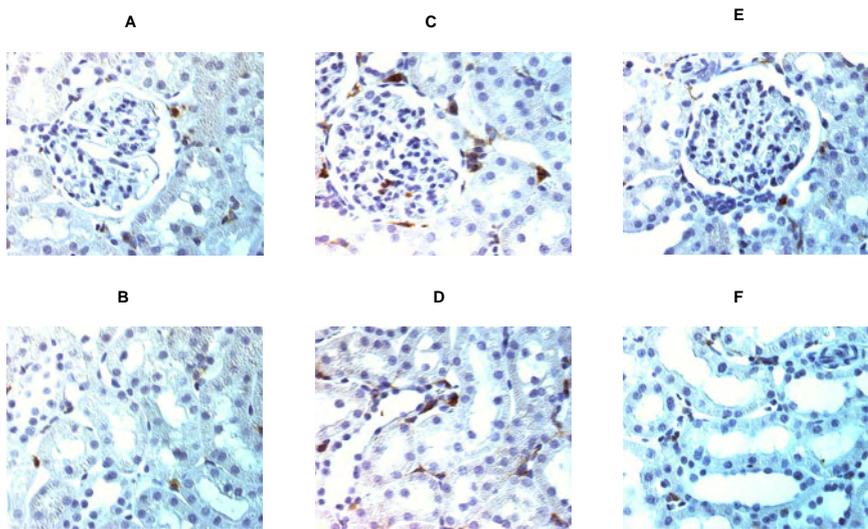


Abb.23 Immunhistochemie – MHC II positive Zellen pro Gesichtsfeld (Braunfärbung der MHC II positiven Zellen mittels DAB-Substratchromogenlösung)

- A. Vehikel nicht hirntot, beatmet - glomeruläre Infiltration
- B. Vehikel nicht hirntot, beatmet – interstitielle Infiltration
- C. Vehikel hirntot – glomeruläre Infiltration
- D. Vehikel hirntot – interstitielle Infiltration
- E. DA 3h ab ht– glomeruläre Infiltration
- F. DA 3h ab ht– interstitielle Infiltration

T-Zellen (CD3)

Das Nierengewebe wurde auch in Hinblick auf eine Infiltration mit T-Zellen (CD3) untersucht. Auch hier zeigte sich eine verstärkte Infiltration in Nieren hirntoter Kontrollratten gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (Veh. ht. vs Veh. nicht ht, 13 ± 5 vs. 8 ± 2 , $P < 0,05$). Dopamin zeigte jedoch keine positiven Effekte auf eine T-Zell-Infiltration im Nierengewebe (Veh. ht vs. DA 3 h ab ht 12 ± 2 , $P = \text{NS}$; Veh. ht vs. DA 6 h ab ht 14 ± 4 , $P = \text{NS}$, Abb.24).

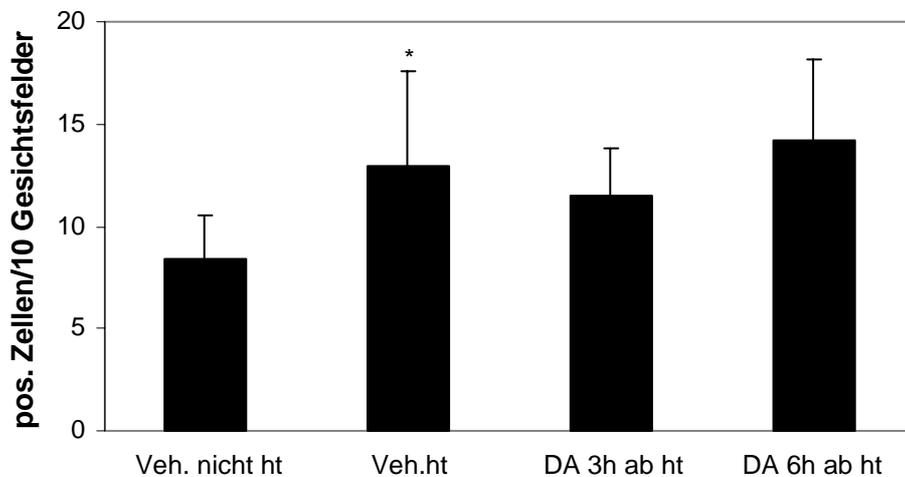


Abb.24 Expression von CD3 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3 und 6 Stunden ab Hirntodinduktion. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. Veh. ht, $*P < 0,05$; Veh. ht vs. DA 3 h ab ht, $P = NS$; Veh. ht vs. DA 6 h ab ht, $P = NS$).

4.2 Wirkmechanismen der Dopamin-Spendervorbehandlung

4.2.1 Einfluss der Hämodynamik auf renale Inflammation

Um den Einfluss einer hämodynamischen Stabilisierung, wie sie bei Dopaminbehandlung erfolgt, auf die renale Inflammation zu untersuchen, wurden zwei Versuchsgruppen mit dem Ziel gebildet, den Blutdruck trotz Dopaminbehandlung auf das Niveau der hirntoten Kontrollgruppe zu senken. Eine Versuchsgruppe erhielt N-Oktanoyl-Dopamin (NOD), ein modifiziertes Dopamin ohne hämodynamische Eigenschaften (Abb.25). Die andere Versuchsgruppe erhielt gleichzeitig Dopamin und Ebrantil zur gezielten Blutdrucksenkung (Abb.26). Beide Versuchsgruppen zeigten ein zur hirntoten Kontrollgruppe vergleichbares Blutdruckniveau (Veh ht vs. NOD, $P = NS$; Veh ht vs. Dopamin+Ebrantil 3h ab ht; $P = NS$).

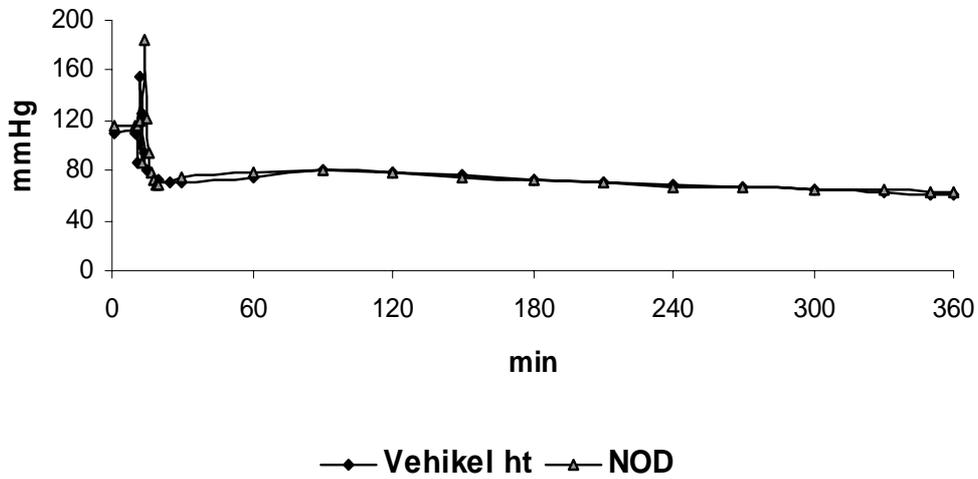


Abb.25 MAP- Dopamin und Blutdrucksenkung. Vergleich Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe NOD (Veh ht vs. NOD, $P = NS$).

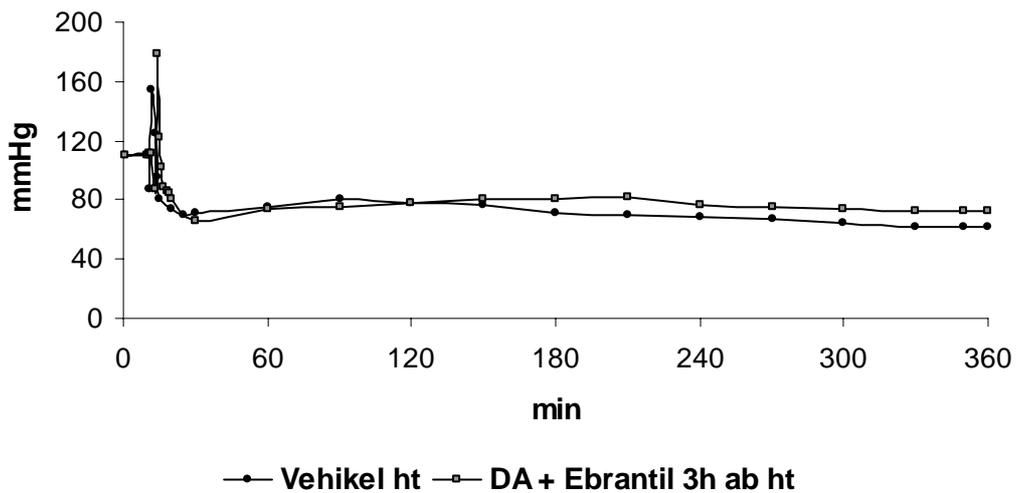


Abb. 26 MAP- Dopamin und Blutdrucksenkung. Vergleich Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA +Ebrantil 3h (Veh ht vs. DA+Ebrantil 3h ab ht; $P = NS$).

Wir konnten einen engen Zusammenhang zwischen renaler Inflammation und hämodynamischer Instabilität bei hirntoten Tieren beobachten. So zeigten alle hämodynamisch instabilen hirntoten Gruppen einen signifikanten Anstieg der ED1 positiven Monozyten und Makrophagen im Nierengewebe im Vergleich zu den hämodynamisch stabilen nicht-hirntoten beziehungsweise hirntoten Kontrollgruppen (NOD 42 ± 7 ; DA+Ebrantil 3h ab ht 38 ± 5 vs. DA3h ab ht 22 ± 5 ; Veh. nicht ht 22 ± 3 ED1+, alle $P < 0,0001$, Abb. 27-28). Diese Effekte konnten sowohl nach dreistündiger Behandlung mit NOD als auch von Dopamin/Ebrantil festgestellt werden.

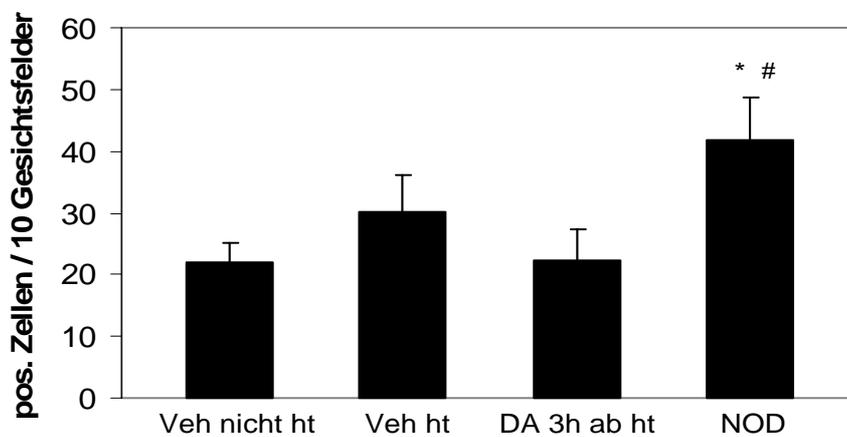


Abb. 27 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und NOD. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. NOD, * $P < 0,0001$; DA 3 h ab ht vs. NOD, # $P < 0,0001$).

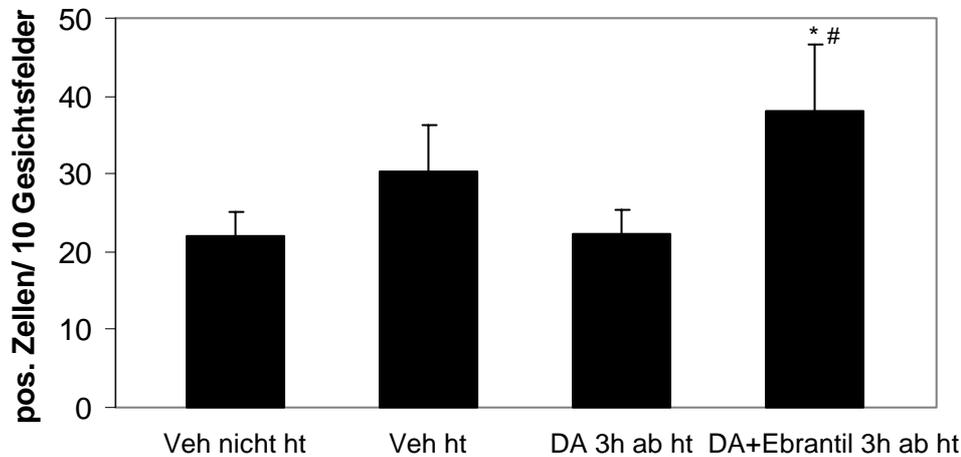


Abb. 28 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und Dopamin+Ebrantil 3h ab ht. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+Ebrantil 3h ab ht, $*P < 0,0001$; DA 3 h ab ht vs. DA+Ebrantil 3h ab ht, $\#P < 0,0001$).

Auch bei der Expression von MHC II konnte bei den zwei Versuchsgruppen eine deutliche Hochregulation gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe und der korrespondierenden Dopamin-Versuchsgruppen beobachtet werden. So zeigte die NOD Versuchsgruppe einen hoch-signifikanten Anstieg der Expression von MHC II (96 ± 21) verglichen sowohl mit der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (68 ± 20 , $P < 0,0001$) als auch mit der Versuchsgruppe DA 3h ab ht (56 ± 23 , $P < 0,0001$, Abb. 29). Vergleichbare Beobachtungen konnten bei der Versuchsgruppe gemacht werden, die zur Blutdrucksenkung zusätzlich zu Dopamin Ebrantil erhalten hatte (78 ± 11). Auch hier war der Anstieg der MHC II Expression sowohl gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (68 ± 20 , $P < 0,05$) als auch der Versuchsgruppe DA 3h ab ht signifikant (56 ± 23 , $P < 0,05$; Abb. 30).

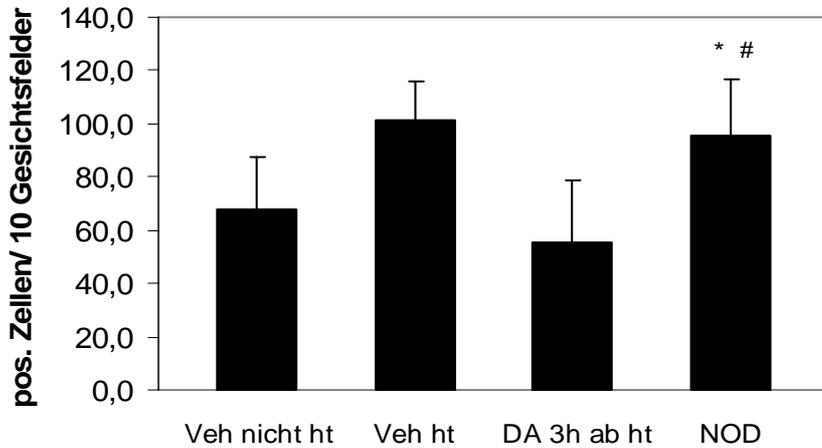


Abb. 29 Expression von MHCII bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und NOD. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. NOD, * $P < 0,0001$; DA 3 h ab ht vs. NOD, # $P < 0,0001$).

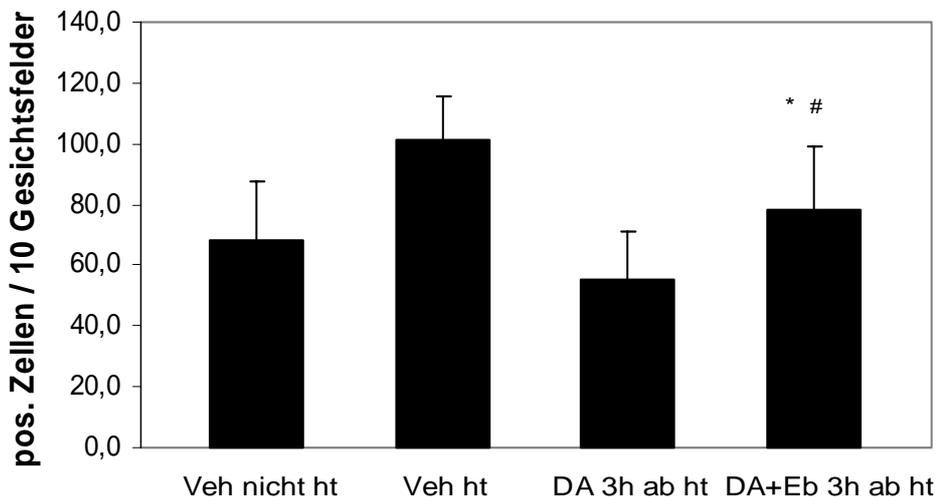


Abb. 30 Expression von MHCII bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und Dopamin+Ebrantil 3h ab ht. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+Eb 3h ab ht, * $P < 0,05$; DA 3 h ab ht vs. DA+Eb 3h ab ht, # $P < 0,05$).

4.2.2 Adrenerge bzw. dopaminerge Rezeptor-Antagonisierung und renale Inflammation

Um eine mögliche Beteiligung von typischen Zielrezeptoren an den protektiven Effekten des Dopamins zu untersuchen, wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Eine Gruppe erhielt gleichzeitig Dopamin und α/β -Rezeptor-Antagonisten (Doxazosin/Propranolol). Die zweite Gruppe erhielt gleichzeitig Dopamin und D1/D2-Rezeptor-Antagonisten (SCH23390/Domperidon).

Die Gruppe, die α/β -Rezeptor-Antagonisten erhalten hat, zeigte einen niedrigeren systolischen Blutdruckpeak gegenüber der hirntoten Kontrolle, der aber nicht signifikant war (Veh ht 155 ± 11 mmHg vs. DA+adr-Rez.antang. 128 ± 6 mmHg, $P = NS$). Nach dem autonomic storm kam es ähnlich wie in der hirntoten unbehandelten Kontrolle zu einem Blutdruckabfall, der sich nicht signifikant von der hirntoten Kontrolle unterschied (Abb.31).

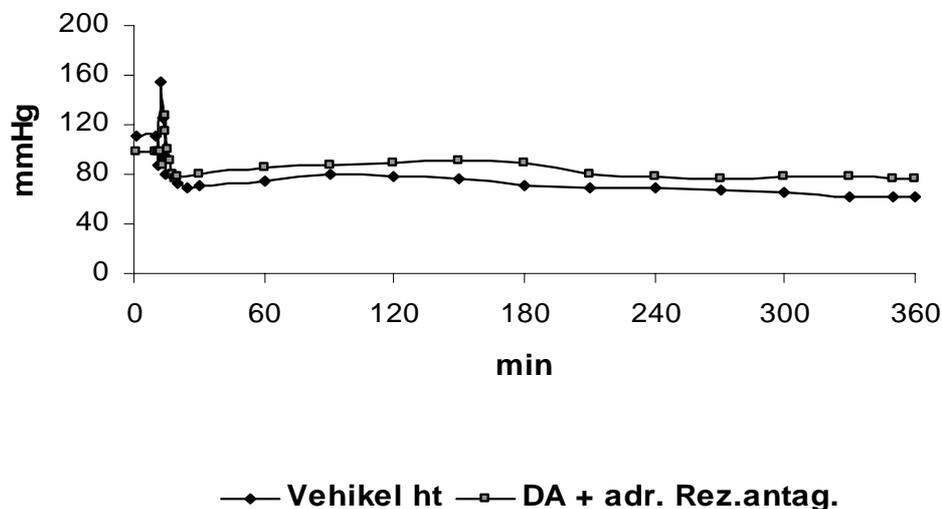


Abb. 31 MAP - Dopamin und Rezeptorantagonisten. Vergleich Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA + adr. Rezantang (Veh ht vs. DA+adr.Rez.antang, $P = NS$).

Die Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg der Infiltration mit ED1 positiven Monozyten und Makrophagen (35 ± 8) im Vergleich zur nicht-hirntoten Kontrollgruppe (22 ± 3 , $P < 0,001$) und auch zur Versuchsgruppe, die nur Dopamin über 3 Stunden ab Hirntodinduktion (DA 3h ab ht 22 ± 5 , $P < 0,001$, Abb. 32) erhalten hatte.

Auch bei der Expression von MHC II konnte in der Versuchsgruppe DA+adr. Rez. antag. eine starke Hochregulation (87 ± 10) gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (56 ± 23 , $P < 0,001$) und der korrespondierenden Dopamin-Versuchsgruppe (68 ± 20 , $P < 0,001$, Abb. 33) beobachtet werden.

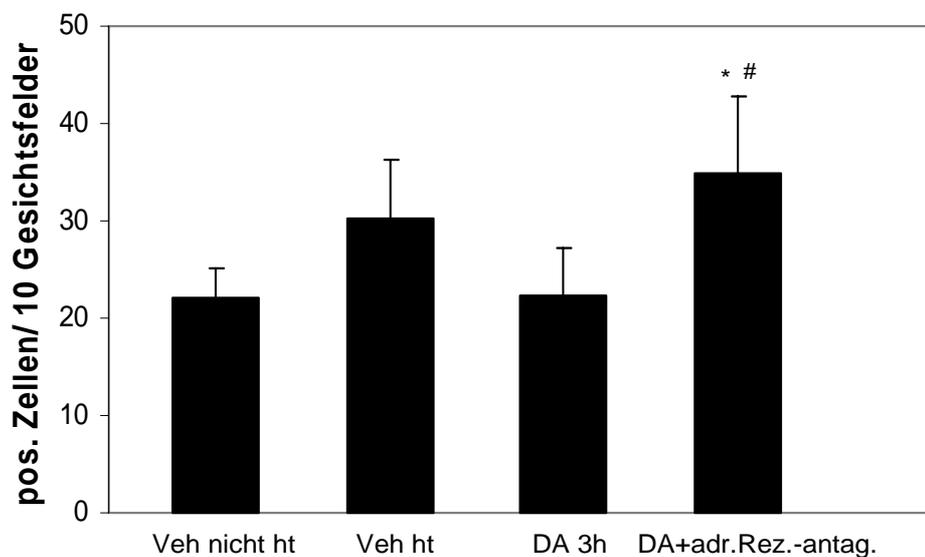


Abb. 32 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und DA+adr.Rez. antag. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+adr.Rez. antag., $*P < 0,001$; DA 3 h ab ht vs. DA+adr.Rez.-antag, $\#P < 0,001$).

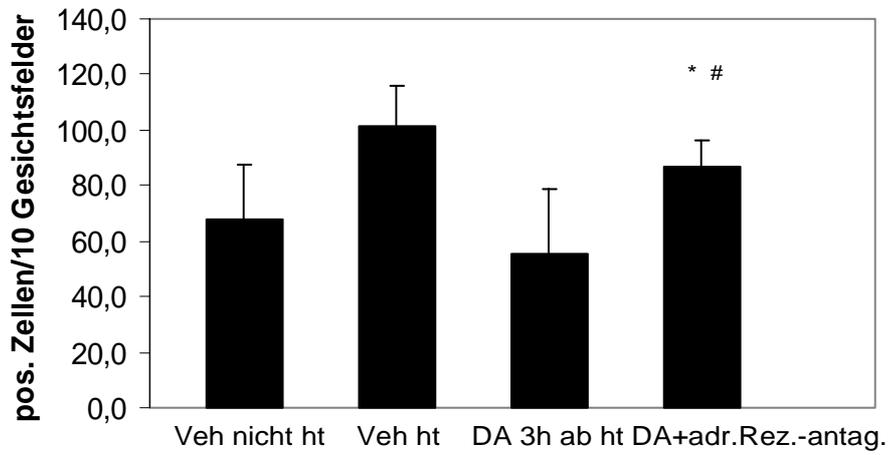


Abb.33 Expression von MHC II bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und DA+adr.Rez.-antag. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+adr.Rez.-antag, $*P < 0,001$; DA 3 h ab ht vs. DA+adr.Rez.-antag, $\#P < 0,001$).

Demgegenüber zeigte die Gruppe, die die beiden D-Rezeptor-Antagonisten erhalten hatte, keine Beeinträchtigung des Blutdruckes. Der Blutdruck wurde signifikant durch die gleichzeitige Dopaminbehandlung stabilisiert (Veh ht vs. DA+D-Rez.antag., $P < 0,001$, Abb. 34).

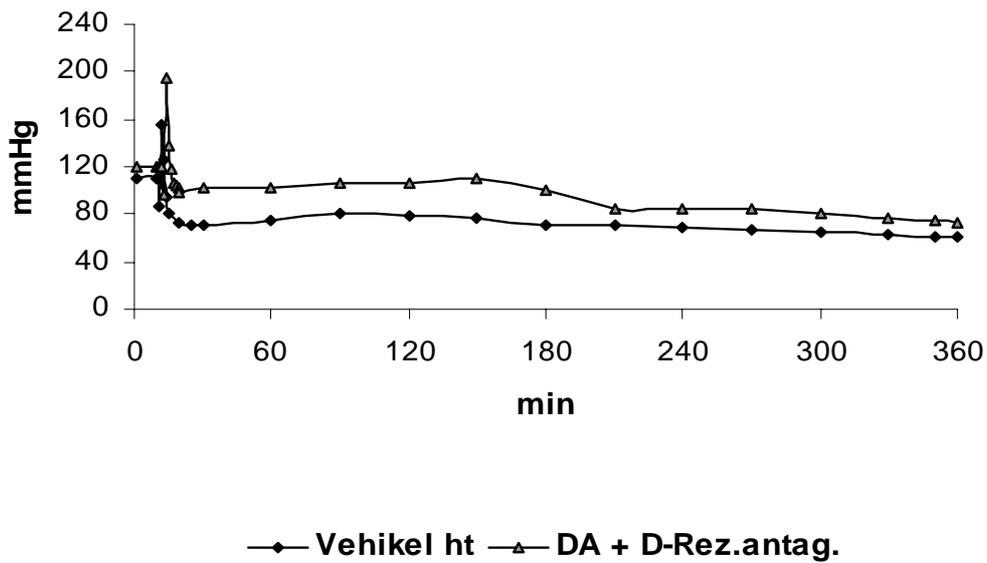


Abb. 34 MAP - Dopamin und Rezeptorantagonisten. Vergleich Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe DA + D- Rezantag (Veh ht vs. DA+D-Rez.antag, $P < 0,001$).

Die Blockade der dopaminergen Rezeptoren verhinderte vollständig den antinflammatorischen Einfluß der Dopaminbehandlung, ohne sich jedoch relevant auf das Blutdruckverhalten auszuwirken. Das Nierengewebe zeigte einen hochsignifikanten Anstieg der Infiltration der ED1 positiven Monozyten und Makrophagen (42 ± 8) im Vergleich sowohl zur nicht-hirntoten Kontrollgruppe (22 ± 3 , $P < 0,0001$) als auch zur korrespondierenden Versuchsgruppe DA 3h ab ht (22 ± 5 , $P < 0,0001$, Abb. 35). Auch die Expression von MHC II nahm in starkem Maß zu. Es konnte in der Versuchsgruppe DA+D-rez.-antag. ein hochsignifikanter Anstieg an MHC II positiven Zellen (97 ± 15) sowohl gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (56 ± 23 , $P < 0,0001$) als auch gegenüber der Versuchsgruppe DA 3h ab ht (68 ± 20 , $P < 0,0001$, Abb. 36) beobachtet werden.

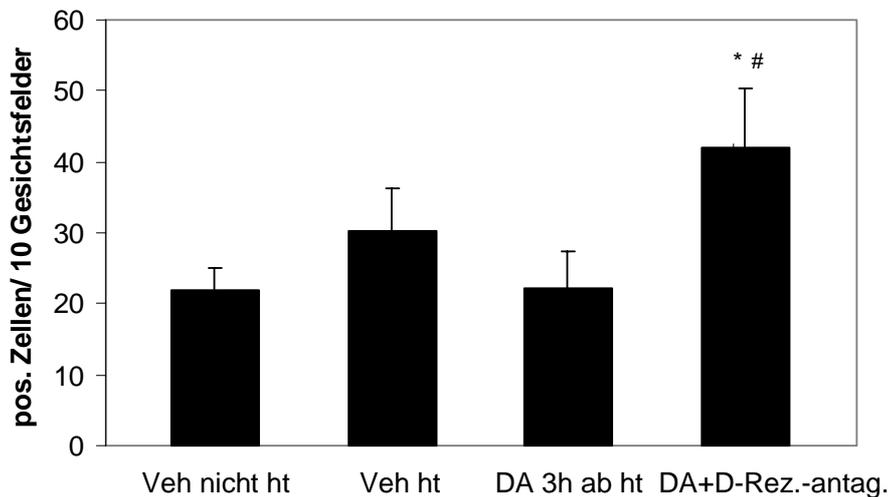


Abb. 35 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und DA+D-Rez.-antag. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+D-Rez.-antag, $*P < 0,0001$; DA 3 h ab ht vs. DA+D-Rez.-antag, $\#P < 0,0001$).

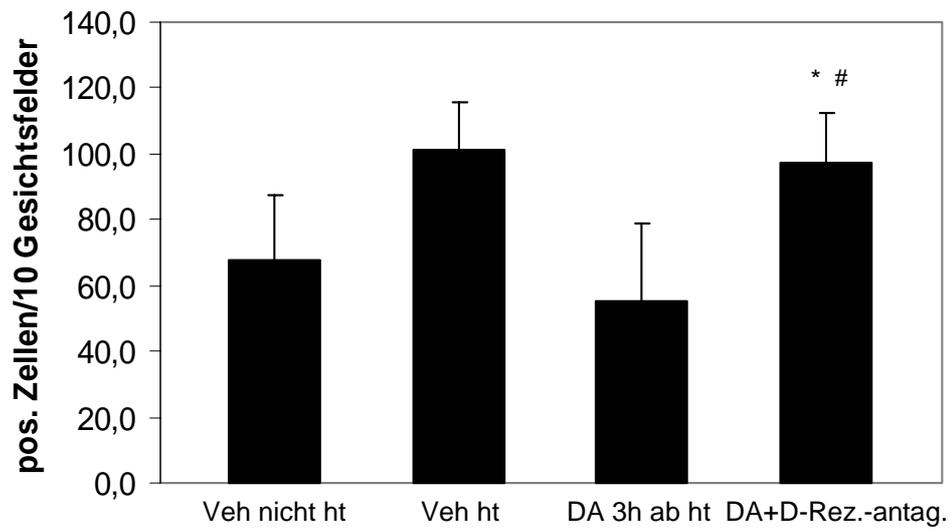


Abb. 36 Expression von MHC II bei den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und DA+D-Rez.-antag. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. DA+D-Rez.-antag, $*P < 0,0001$; DA 3 h ab ht vs. DA+D-Rez.-antag, $\#P < 0,0001$).

Um die Vermutung einer von Blutdruckstabilisierung unabhängigen dopaminergen Rezeptorbeteiligung an den antiinflammatorischen Effekten des Dopamin näher zu untersuchen, wurde im Anschluß eine Versuchsgruppe mit dem D1/D2 Rezeptoragonisten Pergolid behandelt. Pergolid konnte den Blutdruck in den hirntoten Ratten nicht stabilisieren, so dass sich der Blutdruckverlauf nicht signifikant von der hirntoten Kontrolle unterschied (Abb. 37).

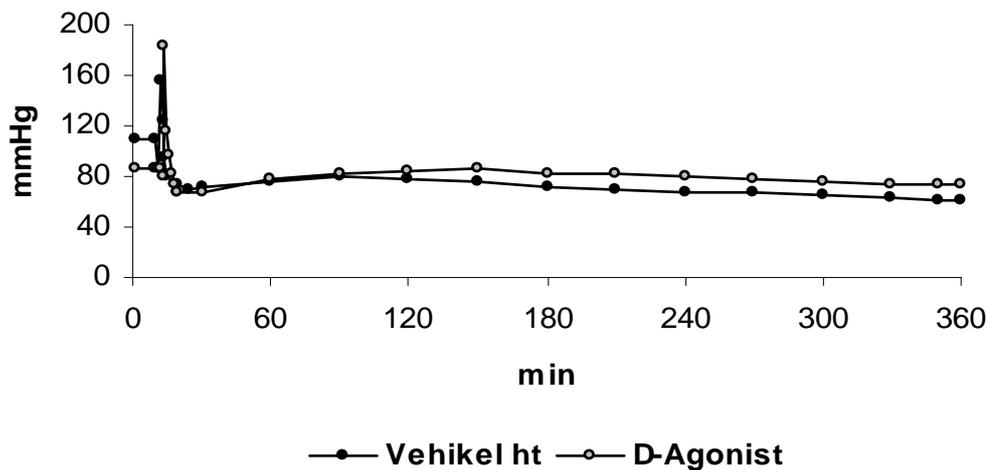


Abb. 37 MAP - Dopamin und Rezeptoragonist Pergolid. Vergleich Kontrollgruppe hirntot versus Versuchsgruppe D-Agonist (Veh ht vs. D-Agonist, $P = NS$).

Durch D-Rezeptorstimulation war Pergolid trotzdem in der Lage, eine Infiltration mit Monozyten im Nierengewebe hirntoter Tiere signifikant zu hemmen (D-Agonist 23 ± 3 vs. Veh.ht 30 ± 6 , $P < 0,05$, Abb. 38), was die Hypothese unterstützte, dass eine D-Rezeptorstimulation eine maßgebliche Rolle bei den antiinflammatorischen Eigenschaften von Dopamin einnimmt.

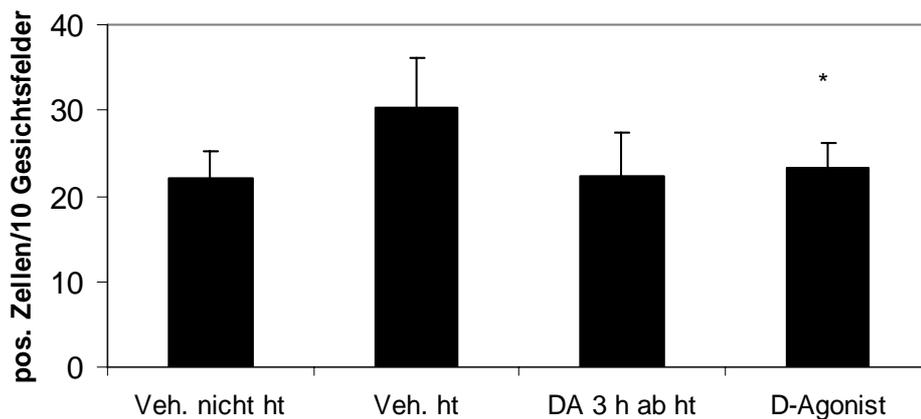


Abb. 38 Expression von ED1 bei den Kontrollgruppen und der Versuchsgruppe mit Dopaminbehandlung 3h ab Hirntodinduktion und der hirntoten Versuchsgruppe mit D-Rezeptorstimulation durch Pergolid. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh. ht vs. D-Agonist, $*P < 0,05$; DA 3 h ab ht vs. D-Agonist, $P = NS$).

4.2.3 Einfluß von Hirntod und Dopaminbehandlung auf die Expression von Hämoxigenase-1

Der mutmaßliche Einfluß von Dopamin auf die Induktion antioxidativer Enzyme wurde anhand der Hämoxigenase 1 (HO-1) untersucht. Die Genexpression von HO-1 war bereits bei einem Vergleich von naivem Nierengewebe ($0,5 \pm 0,19$) mit Nierengewebe der nicht hirntoten Kontrollgruppe (Veh. nicht ht $2,8 \pm 0,5$) signifikant erhöht ($P < 0,05$). Dieser Unterschied wurde beim Vergleich von naivem Nierengewebe zu Nierengewebe der hirntoten Kontrollgruppe (Veh. ht $15,1 \pm 5$) hochsignifikant ($P < 0,0001$). Betrachtet man die beiden Kontrollgruppen nicht-hirntot (Veh. nicht ht $2,8 \pm 0,5$) und hirntot (Veh. ht $15,1 \pm 5$) bleibt ein signifikanter Unterschied bestehen ($P < 0,05$). Auch in den Nieren der Dopaminbehandlungsgruppe (DA 3h ab ht $4,9 \pm 1$) stieg die Expression von HO-1 gegenüber den Nieren der naiven Gruppe ($0,5 \pm 0,2$) signifikant an ($P < 0,001$). Der Anstieg der Genexpression von HO-1 blieb jedoch in der Dopaminbehandlungsgruppe signifikant hinter dem Anstieg in der hirntoten Kontrollgruppe (15 ± 5 , $P < 0,05$, Abb. 39) zurück.

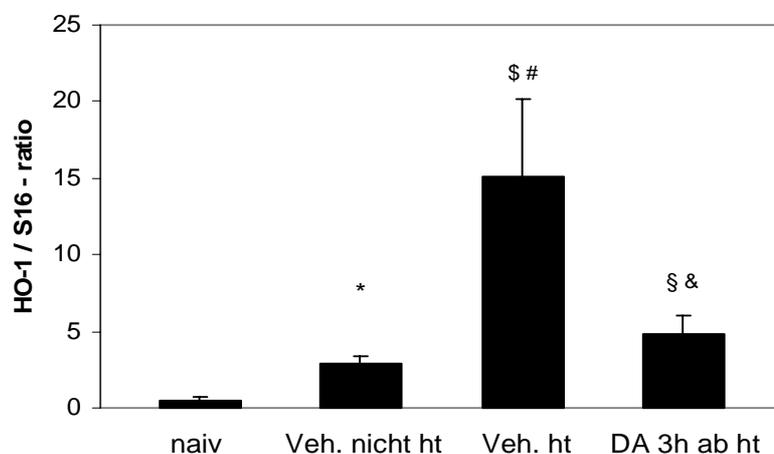


Abb. 39 Genexpression von HO-1 in der Niere ausgewählter Gruppen. Die Ratio ist als Wert \pm Standardabweichung dargestellt (naiv vs. Veh. nicht ht, $*P < 0,05$; naiv vs. Veh. ht, $\$P < 0,0001$; Veh.nicht ht vs. Veh. ht, $\#P < 0,05$; naiv vs. DA 3h ab ht, $\$P < 0,001$; Veh. ht vs. DA 3h ab ht, $\&P < 0,05$).

4.2.4 Beeinflussung der Expression von Oberflächenmolekülen im peripheren Blut durch Hirntod und Dopamin

Bei der FACS-Analyse ergab sich weder in der hirntoten Kontrollgruppe noch in der Dopaminbehandlungsgruppe eine Veränderung in der Expression der untersuchten proinflammatorischen Oberflächenmoleküle im peripheren Blut (siehe 3.7.1) (Abb. 40).

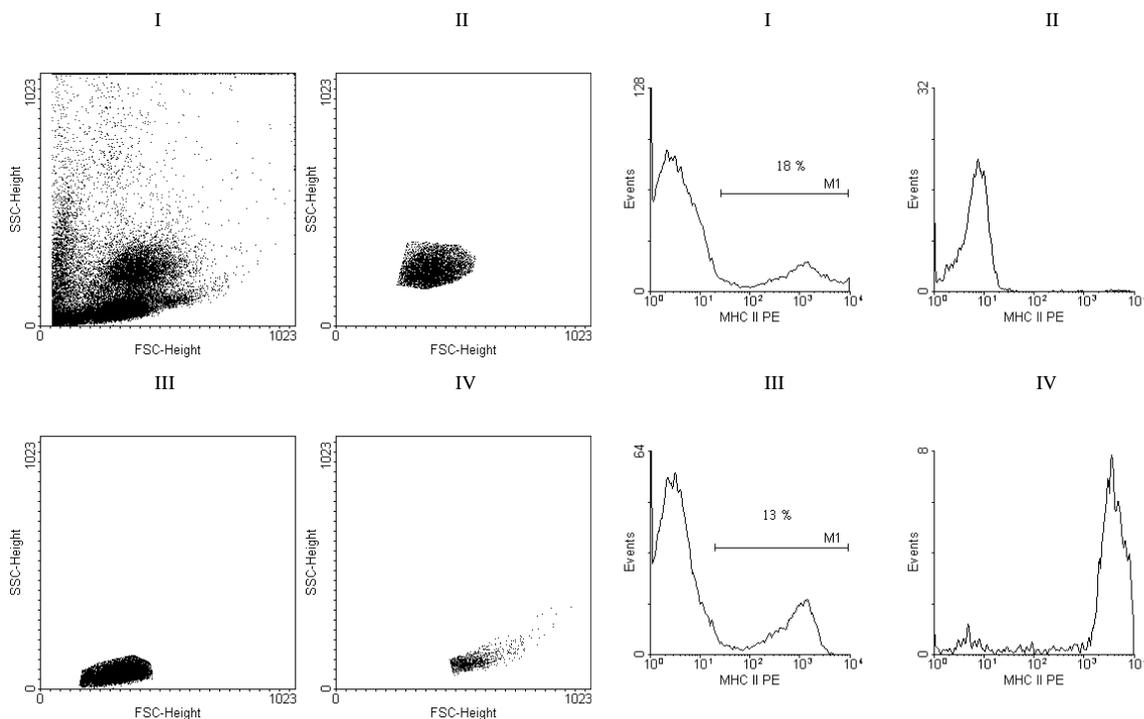


Abb 40a FACS-Analyse – Bestimmung der MHCII positiven Zellen im peripheren Blut. PBMCs wurden mit PE-markierter MHCII-Antikörpern inkubiert (siehe 3.7.1) und anschließend analysiert (siehe 3.7.2). Mittels Sideward Scatter (SSC) und Forward Scatter (FSC) wurden Größe und Granularität der Zellen bestimmt. 18% der gesamten Zellpopulation waren positiv für MHCII (Histogramm I). Die unterschiedlichen Zellpopulationen sind in II-IV dargestellt. Aus Histogramm II-IV wird ersichtlich, in welchen Zellpopulationen sich MHCII positive Zellen aufhalten. In Histogramm II befinden sich keine MHCII positiven Zellen, in Histogramm III beträgt der Anteil der der MHCII positiven Zellen 13%, in Histogramm IV liegt der Anteil der MHCII positiven Zellen bei $\pm 90\%$. Diese starke MHCII Expression zusammen mit der Größe der Zellen in IV spricht dafür, dass es sich bei diesen Zellen um Monozyten handelte.

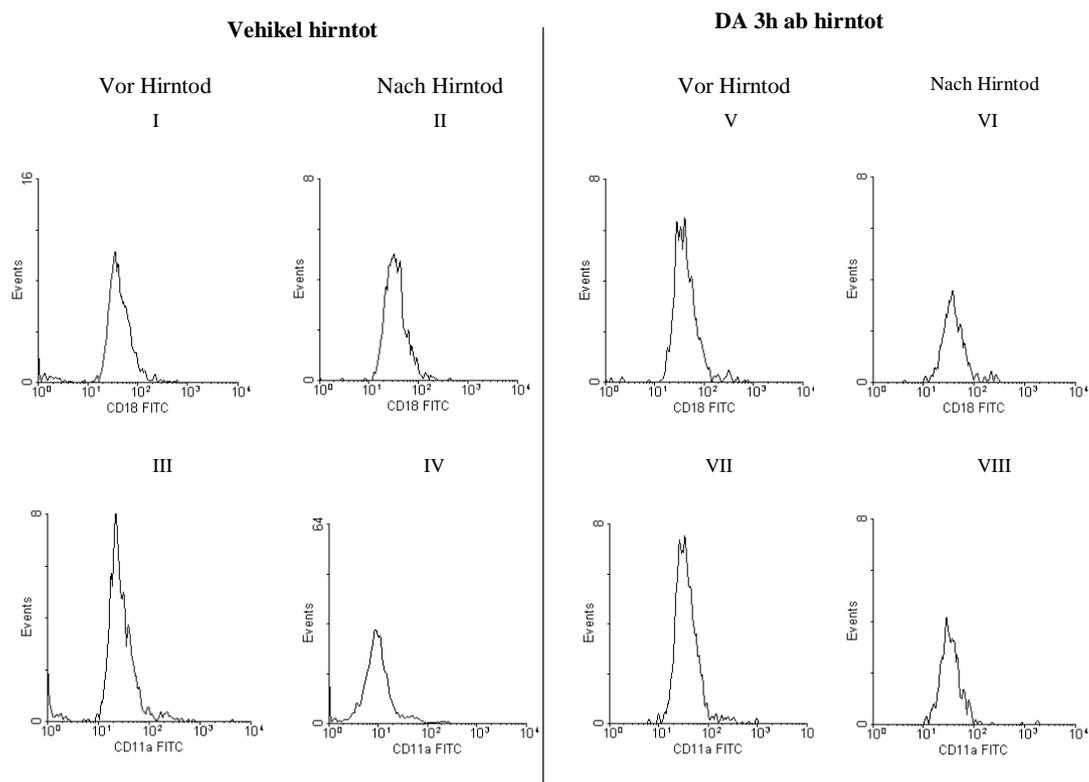


Abb. 40b FACS-Analyse - CD18 und CD11a Expression auf MHCII positiven Zellen (Abb. 40a, IV) in behandelten und unbehandelten Tieren vor und 6 Stunden nach Hirntod. Weder in der hirntoten Kontrollgruppe noch in der Dopaminbehandlungsgruppe konnte eine signifikante Veränderung der Expression von CD18/CD11a beobachtet werden. Die Daten der anderen untersuchten Oberflächenmoleküle (ED1, CD4, CD25, CD62L) wiesen ebenfalls keine signifikanten Veränderungen auf.

4.3 Spendervorbehandlung und allogene Transplantation

4.3.1 Zeichen der akuten Abstoßung – Lichtmikroskopie und Banff-Klassifikation

Erwartungsgemäß fanden sich im Rahmen des akuten Abstoßungsmodells in den untersuchten Nierenschnitten der nicht mit Dopamin vorbehandelten Nieren von hirntoten Spendertieren lichtmikroskopisch gemäß der Banff-Klassifikation schwere interstitielle und vaskuläre Rejektionszeichen. Zwischen hirntoten oder nicht-hirntoten transplantierten unbehandelten Spendernieren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Spendervorbehandlung mit Dopamin zeigte keinerlei protektive Effekte auf die akute Abstoßung 10 Tage nach Transplantation (siehe Tab. 6a-c, Abb. 41).

GRUPPE A ALLOGRAFT/ VEHIKEL NICHT- HIRNTOT	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR MONONUKLEÄRE ZELLINFILTRATION I0-I3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR TUBULITIS T0-T3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR VASKULITIS V0-V3
Tier 1	3	3	3
Tier 2	3	3	2
Tier 3	3	3	3
Tier 4	3	3	3
Tier 5	3	3	3
Tier 6	3	3	3
Tier 7	3	3	3
Tier 8	3	3	3

Tab. 6a Banff-Klassifikation – Beurteilung der akuten Abstoßung in der Kontrollgruppe nicht-hirntot. Gradeinteilung von 0 = keine Veränderungen bis 3 = ausgeprägte Veränderungen.

GRUPPE B ALLOGRAFT/ VEHIKEL HIRNTOT	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR MONONUKLEÄRE ZELLINFILTRATION I0-I3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR TUBULITIS T0-T3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR VASKULITIS V0-V3
Tier 1	3	3	3
Tier 2	3	3	3
Tier 3	3	3	2
Tier 4	3	3	3
Tier 5	3	3	3
Tier 6	3	3	3
Tier 7	3	3	3
Tier 8	3	3	3

Tab. 6b Banff-Klassifikation – Beurteilung der akuten Abstoßung in der Kontrollgruppe hirntot. Gradeinteilung von 0 = keine Veränderungen bis 3 = ausgeprägte Veränderungen.

GRUPPE C ALLOGRAFT/ DA 3H	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR MONONUKLEÄRE ZELLINFILTRATION I0-I3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR TUBULITIS T0-T3	QUANTITATIVE KRITERIEN FÜR VASKULITIS V0-V3
Tier 1	3	3	3
Tier 2	3	3	3
Tier 3	3	3	2
Tier 4	3	3	3
Tier 5	3	3	3
Tier 6	3	3	3
Tier 7	3	3	3
Tier 8	3	3	3

Tab. 6c Banff-Klassifikation – Beurteilung der akuten Abstoßung in der Versuchsgruppe Dopaminspenderbehandlung über 3 Stunden ab Hirntod. Gradeinteilung von 0 = keine Veränderungen bis 3 = ausgeprägte Veränderungen.

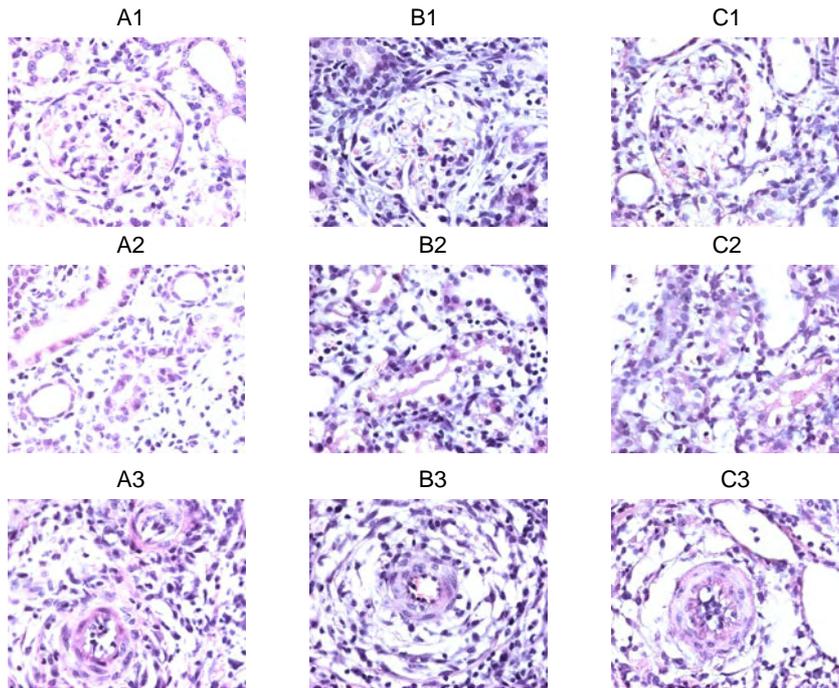


Abb. 41 H&E-Färbung zur Beurteilung der akuten Abstoßung nach der Banff-Klassifikation
 Beurteilung der mononukleären Zellinfiltration (A1-C1) Tubulitis (A2-C2) und Vaskulitis (A3-C3) im Nierenschnitt.

- A1. Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet – Glomerulum und Interstitium
- A2. Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet – Tubuli und Interstitium
- A3. Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet – Gefäß und Interstitium
- B1. Allograft / Vehikel hirntot – Glomerulum und Interstitium
- B2. Allograft / Vehikel hirntot - Tubuli und Interstitium
- B3. Allograft / Vehikel hirntot – Gefäß und Interstitium
- C1. Allograft / DA 3h – Glomerulum und Interstitium
- C2. Allograft / DA 3h - Tubuli und Interstitium
- C3. Allograft / DA 3h – Gefäß und Interstitium

4.3.2 Zeichen der akuten Abstoßung -Immunhistochemie

Monozyten/Makrophagen (ED1)

Es konnte im Nierengewebe von allen drei Versuchsgruppen A, B und C eine massive Infiltration mit Monozyten und Makrophagen festgestellt werden. Die ordinalen Daten ergaben einen Wert von +++ in allen untersuchten Proben auf einer Skala von +, ++, +++ (+ wenig Infiltration; +++ starke Infiltration). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 42).

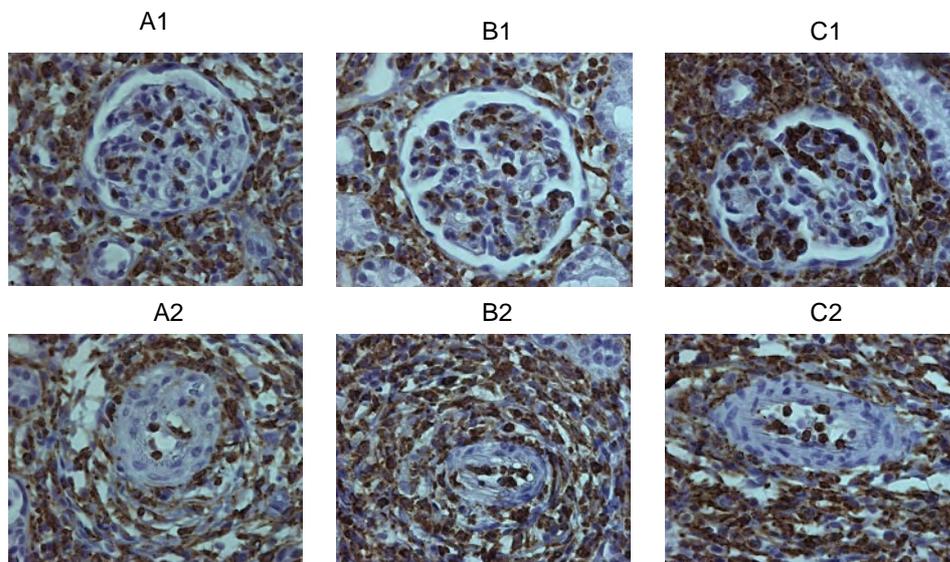


Abb. 42 Immunhistochemie – ED1 positive Zellen pro Gesichtsfeld (Braunfärbung der ED1 positiven Zellen mittels DAB-Substratchromogenlösung)

- A1. Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet - glomeruläre und interstitielle Infiltration
- A2. Allograft / Vehikel nicht hirntot, beatmet – vaskuläre und interstitielle Infiltration
- B1. Allograft / Vehikel hirntot - glomeruläre und interstitielle Infiltration
- B2. Allograft / Vehikel hirntot – vaskuläre und interstitielle Infiltration
- C1. Allograft / DA 3h - glomeruläre und interstitielle Infiltration
- C2. Allograft / DA 3h - vaskuläre und interstitielle Infiltration

MHCII positive Zellen

Die gleiche Beobachtung konnte in allen drei Versuchsgruppen bei der Hochregulation der Expression von MHC II gemacht werden. Auf einer Skala von +, ++, +++ wurden allen Proben ein Wert von +++ zugeordnet. Es konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

T-Zellen (CD3)

Das Nierengewebe wurde auch im Hinblick auf eine Infiltration mit T-Zellen (CD3) untersucht. Hier zeigte sich eine verstärkte Infiltration in Nieren hirntoter Kontrollratten (Veh. ht, 134 ± 39) gegenüber der nicht-hirntoten Kontrollgruppe (Veh. nicht ht 91 ± 8 , $P < 0,05$). Dopamin (DA 3h ab ht, 124 ± 36) zeigte keinen signifikanten Einfluß (Abb. 43).

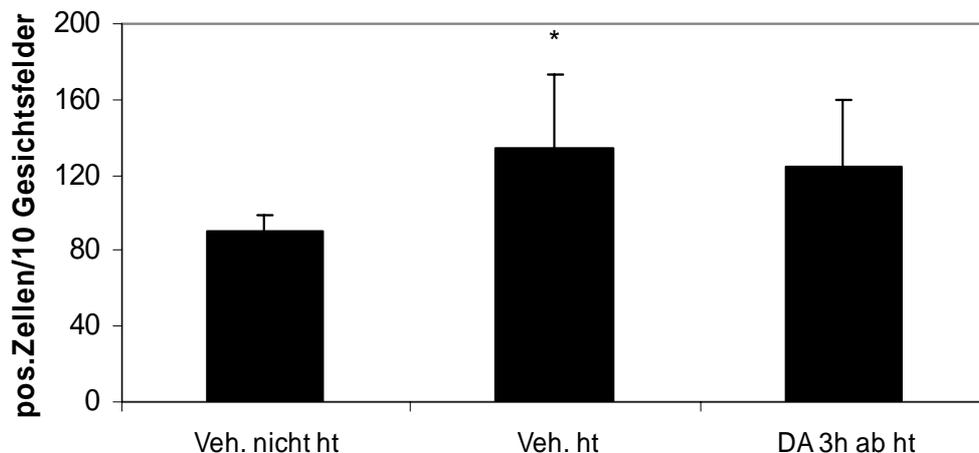


Abb. 43 Expression von CD3 bei den Kontrollgruppen, deren Spendertiere unbehandelt waren und der Versuchsgruppe, deren Spendertiere über 3 Stunden ab Hirntodinduktion mit Dopamin behandelt wurden. Positive Zellen sind als Mittelwert \pm SD der Zellen pro 10 Gesichtsfelder dargestellt (Vergrößerung x400) (Veh.nicht ht vs. Veh. ht, $*P < 0,05$; Veh. ht vs. DA 3 h ab ht, $P = NS$).

5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgende Beobachtungen zusammenfassen:

1. Eine dreistündige Behandlungszeit des Spenders mit Dopamin ab Hirntodinduktion reicht aus, um die Infiltration mit Entzündungszellen ins Nierengewebe signifikant zu reduzieren.
2. Dopamin ist in der Lage, den Blutdruck über den untersuchten Zeitraum von bis zu sechs Stunden nach Hirntodinduktion zu stabilisieren.
3. Eine Blockade von adrenergen Rezeptoren hebt die günstigen Effekte der Dopaminbehandlung sowohl auf die hämodynamische Stabilisierung als auch auf die renale Inflammation vollständig auf. Eine Blockade der dopaminergen Rezeptoren lässt hingegen den Blutdruck unbeeinflusst, führt aber zu einer Aufhebung der antiinflammatorischen Effekte der Dopaminbehandlung.
4. Hirntod führt in der Niere zu einer signifikanten Hochregulation der Hämoxygenase-1. Durch Dopaminbehandlung wird diese Expression signifikant reduziert.
5. Der Hirntod induziert keine Veränderungen ausgewählter proinflammatorischer Oberflächenmoleküle im peripheren Blut.
6. Eine Dopaminspendervorbehandlung über den optimalen Zeitraum von drei Stunden ab Hirntodinduktion zeigt auf die akute Abstoßung 10 Tage nach allogener Transplantation keine protektiven Effekte.

5.1 Zeit-Wirkungs-Analyse im Spendertier mit Dopamin-Vorbehandlung

Als Grundlage für diese Versuchsreihe dienten zwei unabhängige retrospektive klinische Studien (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001), die belegen konnten, dass sich eine Dopaminspendenvorbehandlung im hirntoten Organspender günstig sowohl auf die Nierenfunktion direkt nach Transplantation als auch auf das Langzeittransplantatüberleben auswirkt. Zunächst konnte Schnuelle (Schnuelle, Lorenz et al. 1999) an einem monozentrischen Patientenkollektiv von 152 Transplantatempfängern, die die Niere eines hirntoten Organspenders erhalten hatten, zeigen, dass sich sowohl eine Dopamin- als auch eine Noradrenalinbehandlung des hirntoten Spenders günstig auf die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen und auf das längerfristige Transplantatüberleben auswirkten. Er schrieb dies teilweise den immunmodulierenden Eigenschaften dieser Substanzen, speziell dem inhibitorischen Effekt der Katecholamine auf die Expression von Adhäsionsmolekülen in Gefäßendothelien zu. In einer zweiten Studie (Schnuelle, Berger et al. 2001) wurden in einem multizentrischen Patientenkollektiv auf Eurotransplant-Ebene insgesamt 2415 Nieren-, 755 Leber-, und 720 Herztransplantationen retrospektiv untersucht. Hierbei konnte der günstige Effekt der Katecholamine auf das Nierentransplantatüberleben nach hirntoter Organspende bestätigt werden.

Katecholamine werden häufig in der Intensivmedizin zur Stabilisierung des Kreislaufs eingesetzt und finden so auch bei den häufig hämodynamisch kompromittierten hirntoten Patienten Anwendung (Link, Rohling et al. 1990; Scherer, Erhard et al. 1992; Holmes 2005). Eine generelle Indikation zur Behandlung von hirntoten Patienten mit vasoaktiven Substanzen gibt es allerdings derzeit nicht, dies wird vielmehr in der einschlägigen Literatur sehr kontrovers diskutiert. Zurzeit wird vielerorts eine Kombinationstherapie aus Norepinephrin und Dobutamin der traditionellen Therapie mit Dopamin vorgezogen, wobei vergleichende klinische Studien fehlen (Holmes 2005). Alle drei Substanzen verbessern den Blutfluss im Splanchnikusgebiet und können so die Aufrechterhaltung peripherer Organfunktionen unterstützen. Dagegen konnte bei Einsatz von Epinephrin ein negativer Einfluß auf die Organfunktion, bedingt durch viszerale Hypoperfusion, beobachtet werden (Holmes 2005). Andere Forschungsgruppen konnten keinen, manche sogar einen negativen Effekt durch Katecholaminspendenvorbehandlung feststellen. Bei diesen Studien kamen Dopamin, Norepinephrin und Epinephrin sowohl als Mono- als auch als Kombinationstherapie zum Einsatz. Marshall fand bei Katecholaminbehandlung hirntoter Organspender eine signifikant

verschlechterte Initialfunktion und 1-Jahresüberlebenszeit der Transplantatnieren gegenüber Nieren von hirntoten Spendern, bei denen eine kreislaufstabilisierende Katecholaminbehandlung nicht nötig war, unabhängig von der Art der verwendeten Katecholamine (Marshall, Ahsan et al. 1996). O'Brien konnte außerdem in einem Patientenkollektiv von insgesamt 52 Patienten feststellen, dass eine Katecholaminbehandlung in hirntoten Spendern die Entwicklung einer akuten tubulären Nekrose im Nierentransplantat ungünstig beeinflussen konnte (Marshall, Ahsan et al. 1996; O'Brien, Bour et al. 1996).

Hirntod bewirkt neben den zahlreichen Störungen in den physiologischen Regelsystemen (Pratschke, Neuhaus et al. 2005) auch eine erhöhte Immunogenität des Transplantats (Takada, Nadeau et al. 1998; Segel, vonHaag et al. 2002). Auch in der vorliegenden Studie konnten wir im Nierengewebe hirntoter Ratten einen starken Anstieg der Infiltration mit Entzündungszellen nachweisen. So war sowohl die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen als auch die mit T-Zellen gegenüber Nierengewebe nicht-hirntoter Tiere signifikant erhöht. Außerdem kam es zu einer deutlichen Hochregulation der MHCII-Expression. Diese Beobachtungen decken sich mit den Daten anderer Forschungsgruppen (van der Hoeven, Ploeg et al. 1999; van der Hoeven, Molema et al. 2003). Die renale Inflammation konnte durch Dopaminspendervorbehandlung signifikant reduziert werden, wobei die Daten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden konnten, die in einer Dosis-Wirkungs-Analyse eine signifikante Reduktion der Infiltration mit Monozyten, Makrophagen und MHCII - positiven Zellen bei der klinisch relevanten Dosis von 10µg/kg/min Dopamin über die gesamte Hirntoddauer beobachten konnte (Schaub, Ploetz et al. 2004). Basierend auf diesen Erkenntnissen führten wir eine Zeit-Wirkungs-Analyse durch, die belegen konnte, dass schon eine dreistündige Dopaminspendervorbehandlung ausreicht, die renale Inflammation nahezu auf das Niveau von beatmeten nicht-hirntoten Tieren zu senken. Darüberhinaus war Dopamin in der Lage, die durch den Hirntod bedingte Hypotension über den gewählten Versuchszeitraum von sechs Stunden zu stabilisieren.

5.2 Wirkmechanismen der Dopamin-Vorbehandlung im hirntoten Spendertier

5.2.1 Einfluss von Dopamin auf die Hämodynamik

Zunächst sollte anhand der Blutdruckdaten der Kontrollgruppen nicht-hirntot und hirntot überprüft werden, ob das bei uns etablierte Hirntodmodell zu den in der Literatur beschriebenen Modellen vergleichbar war. Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf den durch Hirntodinduktion ausgelösten „autonomic storm“ und die sich anschließende Hypotension als pathognomonische Zeichen einer erfolgreichen Hirntodinduktion. Unsere Beobachtungen decken sich mit den Daten anderer Forschungsgruppen (Shivalkar, Van Loon et al. 1993; van der Hoeven, Ploeg et al. 1999). Auch der bei den nicht-hirntoten Kontrolltieren allmählich abfallende Blutdruck tritt bei anderen Forschungsgruppen auf und erklärt sich sowohl durch die Narkoseart (Xylazin/Ketamin) als auch durch die große Belastungssituation auf den Kreislauf bei sechsständiger Narkosedauer (Henke, Astner et al. 2005).

Wir konnten in unserer Studie einen engen Zusammenhang zwischen hämodynamischer Stabilisierung und reduzierter renaler Inflammation herstellen. Eine Dopaminbehandlung in hirntoten Spendertieren war in der Lage, den Blutdruck zu stabilisieren und während der Gabe auf das Niveau der nicht-hirntoten Kontrollgruppe anzuheben. Betrachtet man die renale Inflammation, so lässt sich ein enger Zusammenhang zwischen Dopaminbehandlungszeit und Infiltration mit Entzündungszellen herstellen. So zeigte eine einstündige Behandlungszeit ab Hirntod noch keinerlei positive Effekte, eine dreistündige Behandlungszeit ab Hirntod reichte aber schon aus, die Infiltration mit Entzündungszellen signifikant zu reduzieren. Die sechsständige Behandlungszeit wirkte, wie auch schon früher gezeigt (Schaub, Ploetz et al. 2004), ebenfalls protektiv. Hob man den stabilisierenden Effekt des Dopamins auf den Blutdruck durch gleichzeitige Gabe eines Blutdrucksenkers (Ebrantil) bzw. durch Einsatz eines modifizierten Dopamins ohne hämodynamische Eigenschaften (NOD) auf, so verlor Dopamin auch seinen günstigen Einfluß auf die renale Inflammation. Wenn die durch den Hirntod induzierte hämodynamische Instabilität nicht korrigiert wird, scheint sich also die Immunogenität in der Niere zu verstärken. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Immunogenität zumindest teilweise auf dem Ischämieschaden beruht. Diese Beobachtung

stimmt mit den Ergebnissen anderen Forschungsgruppen überein (van der Hoeven, Ploeg et al. 1999; van der Hoeven, Molema et al. 2003; Schuurs, Gerbens et al. 2004; Avlonitis, Wigfield et al. 2005). Van der Hoeven untersuchte in einem Tiermodell den Einfluß hämodynamischer Instabilität auf Leber- und Nierenfunktion und die Gewebeaktivierung in hirntoten Ratten. Er konnte beobachten, dass während des Hirntodes die Organfunktionen signifikant abnahmen und es zu einer starken Hochregulation von Entzündungsparametern, Adhäsionsmolekülen und einem signifikanten Anstieg von Leukozyteninfiltration in die untersuchten Organe kam. Schuurs untersuchte Veränderungen in der Genexpression bei hämodynamisch instabilen hirntoten Ratten gegenüber hämodynamisch stabilen Tieren, die mit Gelofusin behandelt wurden. Bei hämodynamisch stabilen Tieren wurden im Verlauf des Hirntodes in der Niere 63 Gene hoch- bzw. runterreguliert, wohingegen bei instabilen Tieren 90 Gene Veränderungen in ihrer Genexpression zeigten. Betroffen waren hiervon vor allem Gene, die sowohl mit Inflammation, Koagulation, Metabolismus und Transport als auch mit Fibrose und Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht werden können (Schuurs, Gerbens et al. 2004). Avlonitis konnte das Phänomen von verstärkter Inflammation in hämodynamisch instabilen hirntoten Ratten auch bei der Untersuchung von Lungengewebe feststellen (Avlonitis, Wigfield et al. 2005).

Bei der Ischämie tritt vor allem oxidativer Streß in Form von Lipidperoxidation auf (Paller, Hoidal et al. 1984). Durch Abfangen sogenannter "Reactive Oxygen Species" (ROS) kann das Nierengewebe geschützt werden (Baker, Corry et al. 1985; Bosco and Schweizer 1988). So konnte Baker in einem Warmischämiemodell an Ratten zeigen, dass das Abfangen von ROS durch Superoxid-Dismutase die Nierenfunktion und das Überleben der Tiere verbesserte. Bosco konnte in einem komplexeren Ischämiemodell an Schweinen, das Warm- und Kaltischämie mit autologer Transplantation in die gleichen Tiere beinhaltete, ebenfalls eine verbesserte Nierenfunktion und einen reduzierten Zellschaden bei Behandlung mit Radikalfängern nachweisen (Bosco and Schweizer 1988). Auch Dopamin wird ein günstiger Effekt auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zugeschrieben (van der Woude, Schnuelle et al. 2004; Fontana, Germini et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006). Schädigungen im Organ, wie sie bei Ischämie und Reperfusion beobachtet werden können, führen zu einer erhöhten Immunogenität und der Freisetzung sogenannter Danger-Signale (Matzinger 1994). Zur Strategie der Organvorbehandlung gehört daher das Abfangen solcher Danger-Signale, zu denen wahrscheinlich auch ROS gezählt werden können. Dopamin ist durch seine antioxidative Potenz, indirekt durch Stimulation von HO-1 und direkt durch sogenannte "Scavenger"-Eigenschaften bzw. Inhibition der ROS-Produktion, in der Lage, die

Schädigung durch ROS in *in vitro* Modellen zu minimieren (Berger, Hunger et al. 2000; Yard, Beck et al. 2004). Gottmann konnte sowohl in einem Warmischämiemodell als auch in einem Transplantationsmodell mit Kaltischämie an Ratten die protektiven Eigenschaften von Dopamin bezüglich des Ischämieschadens bestätigen (Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006). Er fand eine verbesserte Nierenfunktion und geringere Zellinfiltrate nach Dopaminpräkonditionierung. In unserem Tiermodell mit hirntoten Ratten konnte außerdem die renale Perfusion durch Dopaminbehandlung verbessert und so eine Warmischämie verhindert werden (Schaub, Ploetz et al. 2004). Dagegen kam Ueno in einem Tiermodell zu dem Schluß, dass Dopamin die renale Perfusion von hirntoten Kaninchen verschlechtert (Ueno, Zhi-Li et al. 2000).

Aufgrund der Tatsache, dass eine dreistündige Behandlungszeit mit Dopamin ab Hirntodinduktion die renale Infiltration mit Entzündungszellen effektiv hemmen konnte, obwohl nur eine sechsstündige Behandlungszeit den Blutdruck über den gesamten Zeitraum normalisierte, lag allerdings die Vermutung nahe, dass eine hämodynamische Stabilisierung und damit Minimierung des Ischämieschadens nicht die einzigen positiven Effekte des Dopamins sein könnten. Bestärkt wurde diese Hypothese auch durch zwei weitere Ergebnisse unserer Untersuchungen. Erstens konnte bei nur 1-stündiger Dopamingabe ohne relevante hämodynamische Stabilisierung unmittelbar vor Nierenexplantation die Einwanderung MHCII positiver Zellen signifikant gehemmt werden. Zweitens übte eine Dopamingabe bei hirntoten Spendertieren bei gleichzeitiger pharmakologischer Blockade dopaminerger Rezeptoren trotz erfolgreicher hämodynamischer Stabilisierung keine protektiven Effekte auf die renale Inflammation aus. Unterstützt wurde unsere These auch von van der Hoeven, der durch Stabilisierung der Hämodynamik mit Gelofusin in einem Rattenmodell zwar die Infiltration mit Entzündungszellen verlangsamte, aber nicht, wie bei uns mit Dopaminbehandlung, gänzlich aufhalten konnte (van der Hoeven, Molema et al. 2003).

5.2.2 Einfluß von Dopamin und dopaminergen/adrenergen Rezeptoren auf die renale Inflammation

Da die Beeinflussung der Hämodynamik durch Dopamin nicht alle Beobachtungen in unserem Modell hinreichend erklären konnte, untersuchten wir in weiteren Experimenten den potentiellen Einfluß von dopaminergen/adrenergen Rezeptoren auf die renale Inflammation. Hierzu setzten wir spezifische Rezeptorantagonisten bei gleichzeitiger Dopamingabe ein. Wir konnten beobachten, dass eine Blockade der D1/D2-Rezeptoren die hemmenden Effekte des Dopamins auf die renale Inflammation vollständig aufhob, obwohl der Blutdruck durch die gleichzeitige Dopamingabe stabilisiert wurde und sich nicht signifikant von einer Monotherapie mit Dopamin unterschied. Zwar können D1-Rezeptoren prinzipiell eine renale Vasodilatation und damit eine verbesserte renale Perfusion vermitteln (Goldberg 1984). Die von uns verwendeten D1/D2-Rezeptorantagonisten nehmen jedoch auf die renale Perfusion zumindest bei nicht-hirntoten anästhesierten Ratten keinen Einfluß. Dies konnte Jose bei seinen Untersuchungen zur Physiologie der Niere, speziell zum Einfluß von D1 und D2 Rezeptoren auf die Nierenfunktion zeigen (Jose, Asico et al. 1998). Aus diesem Grund ist ein durch D1/D2-Rezeptorblockade induzierter Ischämieschaden in unserem Modell unwahrscheinlich. Um die Hypothese zu belegen, dass dopaminerge Rezeptoren am antiinflammatorischen Geschehen beteiligt sind, behandelten wir im Anschluß eine Versuchsgruppe hirntoter Tiere mit dem D-Rezeptoragonisten Pergolid, um speziell die D1- und D2-Rezeptoren in der Niere zu stimulieren. Auch hier konnten wir eine Hemmung der Infiltration von Monozyten ins Nierengewebe beobachten, wobei der Blutdruck sich nicht signifikant vom Blutdruck der hirntoten Kontrollgruppe unterschied. Wir gehen deshalb davon aus, dass dopaminerge Rezeptoren die inflammatorische Antwort in der Niere hirntoter Ratten in einer blutdruckunabhängigen Weise beeinflussen können.

Bei der Blockade der adrenergen (α/β -) Rezeptoren konnten wir die Beobachtung machen, dass die Infiltration mit Entzündungszellen ins Nierengewebe stark zunahm. Durch Blockade der α/β -Rezeptoren wurde außerdem die durch den „autonomic storm“ ausgelöste Blutdruckentgleisung abgemildert, da die endogen ausgeschütteten Katecholamine nicht mehr in vollem Umfang an die Rezeptoren binden konnten und so die vasokonstriktorische Wirkung nicht voll entfaltet wurde. Eine vergleichbare Abschwächung des Blutdruckanstiegs während des „autonomic storm“ unter Blockade adrenerger Rezeptoren ist in der Literatur beschrieben (Avlonitis, Wigfield et al. 2005). Im weiteren Verlauf führten die von uns verwendeten

adrenergen Rezeptorantagonisten erwartungsgemäß zu einer Aufhebung des blutdruckstabilisierenden Effekts durch die gleichzeitige Dopamingabe (Daul, Elter-Schulz et al. 1995). Wir können deshalb nicht ausschliessen, dass die verstärkte renale Inflammation auf den durch α/β -Antagonisten hervorgerufenen Blutdruckabfall beruht und der mutmaßliche blutdruckunabhängige protektive Einfluss der gleichzeitigen Dopamingabe über dopaminerge Rezeptoren hierdurch antagonisiert wird. Hierdurch könnte ein Ischämieschaden entstehen, der vor allem durch Bildung von Radikalen die Nieren schädigt. Die in vitro gezeigte antioxidative Kapazität von Dopamin scheint in diesem Fall nicht auszureichen (Yard, Beck et al. 2004). Diese Vermutung wurde zusätzlich durch den Einsatz von NOD bestärkt. NOD verfügt über eine 50mal höhere antioxidative Kapazität als Dopamin. Trotzdem war in der mit NOD behandelten Versuchsgruppe ein signifikanter Anstieg der renalen Inflammation zu beobachten. NOD ist außerdem nicht in der Lage, dopaminerge bzw. adrenerge Rezeptoren zu stimulieren. Dies könnte einen weiteren Hinweis für die protektive Bedeutung von Rezeptorstimulation bei hirntoten Spendertieren darstellen.

5.2.3 Einfluss von Dopamin auf HO-1

HO-1 (Hämoxygenase-1) ist ein Katalysator bei der Hämdegradation, die zur Bildung von Kohlenstoffmonooxid, Eisen und Biliverdin, das nachfolgend zu Bilirubin reduziert wird, führt. Die Produkte dieser enzymatischen Reaktion haben unter anderem antioxidative, anti-inflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften. Bei HO-1 handelt es sich um ein Hitzeschockprotein, das auf schädliche Stimuli wie Häm, Hypoxie, Endotoxine, Schwermetalle und anderem zellulären Streß mit vermehrter Expression reagiert. Es sind bisher 3 Isoformen von HO beschrieben worden, wobei HO-2 und HO-3 konstitutiv exprimiert werden und nur HO-1 induzierbar ist (Maines 1988; Bach 2002). HO-1 Überexpression übt in vielen Transplantationsmodellen, die Ischämie-Reperfusionsschaden (Katori, Buelow et al. 2002; Tullius, Nieminen-Kelha et al. 2002; Blydt-Hansen, Katori et al. 2003), Kaltpräervationsschaden (Salahudeen, Jenkins et al. 2001; Katori, Buelow et al. 2002) akute und chronische Abstoßung (Chauveau, Bouchet et al. 2002; Bonnell, Visner et al. 2004; Braudeau, Bouchet et al. 2004) oder sogar Xenotransplantation (Soares, Lin et al. 1998) umfassen, protektive Effekte aus. Die wichtigsten Effekte sind die antioxidativen Eigenschaften, die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation, die modulatorische Funktion auf den Zellzyklus und die anti-inflammatorischen Eigenschaften (Katori, Busutil et al. 2002). Die anti-oxidativen Eigenschaften hängen mit der Hämdegradation und dem damit verbundenen Sauerstoffverbrauch sowie der Biliverdin- und Ferritinbildung zusammen. Die Produktion von Kohlenstoffmonooxid hält durch seine vasodilatatorischen und gegen Plättchenaggregation gerichteten Eigenschaften die Mikrozirkulation aufrecht und ist eventuell an antiapoptischen Mechanismen beteiligt. HO-1 Überexpression kann sich zudem inhibitorisch auf die durch Entzündungszellen vermittelte Immunantwort des Empfängers auswirken, und dadurch anti-inflammatorische und zytoprotektive Effekte ausüben. Auch in Spenderorganen vor Transplantation ist die Expression von HO-1 auf mögliche protektive Effekte hin untersucht worden. So konnte in einem allogenen Transplantationsmodell an Ratten gezeigt werden, dass eine Hochregulation von HO-1 im Lebendspender zu einer verminderten Immunogenität der transplantierten Niere, gekennzeichnet durch eine reduzierte Zahl an dendritischen Zellen, T-Zellen und MHCII - positiven Zellen, führte (Martins, Kessler et al. 2005). Auch Dopamin ist in der Lage, in *in vitro* Versuchen die Induktion von HO-1 in humanen Endothelzellen zu stimulieren und so protektive Eigenschaften zu entwickeln. Diese Stimulation war von D1/D2 Rezeptoren

unabhängig und konnte durch die gleichzeitige Gabe antioxidativer Substanzen, z. B. N-Acetyl-Cystein, gehemmt werden (Berger, Hunger et al. 2000; van der Woude, Schnuelle et al. 2004). Hirntod und der damit verbundene zelluläre Streß scheinen aber per se schon zu einer starken Hochregulation von HO-1 im Nierengewebe führen zu können. Dies konnte sowohl beim Menschen als auch bei Ratten gezeigt werden (Nijboer, Schuurs et al. 2004; Schuurs, Gerbens et al. 2004). Die Literatur ist allerdings diesbezüglich nicht ganz einheitlich (Lemos, Ijzermans et al. 2003). Es stellt sich daher die Frage, ob eine weitere Hochregulation von HO-1 noch möglich oder überhaupt von Nutzen wäre. Mit dieser Fragestellung hat sich auch die Arbeitsgruppe von Pratschke befasst. In ihrem allogenen Rattenmodell wirkte sich eine Induktion von HO-1 in hirntoten Spendertieren positiv auf das Transplantat aus, insbesondere in Hinblick auf die Infiltration mit Entzündungszellen wenige Tage nach Transplantation und auf das Langzeitüberleben (Kotsch, Francuski et al. 2006). Wir konnten ebenfalls beobachten, dass Hirntod einen starken Stimulus auf die Induktion von HO-1 darstellt, welche in den dopaminbehandelten Tieren allerdings signifikant abgeschwächt wurde. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Dopamin durch seine protektiven Eigenschaften, v.a. durch seine blutdruckstabilisierende Wirkung und der damit einhergehenden verringerten Hypoxie in der Niere, in der Lage ist, einen Teil des durch Hirntod bedingten zellulären Stresses abzufangen. Hierdurch würde HO-1 insgesamt in geringerem Maß induziert. Die signifikante Hochregulierung von HO-1 in der nicht-hirntoten Kontrollgruppe gegenüber der naiven Gruppe kann ebenfalls durch vermehrten zellulären Streß, bedingt durch Narkose, Tracheotomie und einer Beatmung über sechs Stunden erklärt werden.

5.2.4 Einfluss von Hirntod und Dopamin auf Aktivierung von Entzündungszellen im peripheren Blut

Hirntod gehört zu einer Reihe immun-unabhängiger Faktoren, die sogenannte Danger-Signale freisetzen und damit eine Immunantwort initiieren oder verstärken können (Matzinger 1994). Proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 oder TNF- α konnten im peripheren Blut hirntoter Hunde nachgewiesen werden (Huber, Kluger et al. 1991; Takada, Nadeau et al. 1998). Auch bei Schweinen wurde eine Hochregulation von IL-6, IL-1 β und TNF- α beobachtet (Skrabal, Thompson et al. 2005). Genexpressionsstudien von Nierengewebe in hirntoten Ratten zeigten eine Hochregulierung von Cytokinen, Chemokinen, Selektinen und Fibrinogen, besonders bei hämodynamisch instabilen Tieren (Schuurs, Gerbens et al. 2004). Bei humanen Nierenbiopsien hirntoter Spender wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg von E-Selektin beobachtet (Nijboer, Schuurs et al. 2004). Eine Hochregulation proinflammatorischer Moleküle induziert auch einen Anstieg infiltrierender Entzündungszellen ins Nierengewebe (van der Hoeven, Ploeg et al. 1999; van der Hoeven, Molema et al. 2003). Daher lag es nahe, nicht nur die Inflammation peripherer Organe, sondern auch die Expression bzw. Aktivierung von Oberflächenmolekülen auf Entzündungszellen im peripheren Blut von hirntoten Spendertieren zum Gegenstand unserer Untersuchungen zu machen. Weiterhin sollte ein möglicher Einfluß von Dopamin auf diese Oberflächenmoleküle im Blut hirntoter Tiere untersucht werden. Zwar existieren in der Literatur zahlreiche Untersuchungen zur Transplantationsabstoßung, das Augenmerk wurde hierbei aber besonders auf T-Zellen und Natürliche Killerzellen (Hanas, Totterman et al. 1989; Totterman, Hanas et al. 1989; Pawlik, Florczak et al. 2003; Pawlik, Florczak et al. 2003), in jüngerer Zeit auch auf zirkulierende Monozyten im Empfängerorganismus (Grau, Stehling et al. 2001; Steiniger, Stehling et al. 2001), nicht auf die Vorgänge im Blut hirntoter Organspender gelegt.

Unsere Untersuchung ergab keine Veränderung der Oberflächenmoleküle im peripheren Blut nach sechsständiger Hirntoddauer im Vergleich zur Expression der Oberflächenmoleküle vor Hirntodinduktion. Auch eine dreistündige Dopaminbehandlung ab Hirntod veränderte die Expression der Oberflächenmoleküle innerhalb von sechs Stunden nicht. Hirntod scheint sich daher direkt auf die gewebsständigen und weniger auf die im Blut zirkulierenden Entzündungszellen auszuwirken. Die Frage, warum sich Hirntod auf periphere Organe negativ auswirkt, kann bis heute nur partiell erklärt werden. Auf den Ischämie-Schaden wurde bereits ausführlich eingegangen. Das periphere Blut scheint ebenfalls kein adäquater

Transmitter, um den Organen die Information über die erloschene Hirnfunktion mitzuteilen. Man würde sonst ein spezifisches Expressionsmuster von proinflammatorischen Molekülen und auch Entzündungszellen erwarten. Naheliegend wäre auch eine Beteiligung des vegetativen Nervensystems. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Parasympathikus antiinflammatorische Eigenschaften aufweist (Borovikova, Ivanova et al. 2000; Tracey 2002; Saeed, Varma et al. 2005). Durch Hirntod und damit auch Beeinträchtigung des Parasympathikus könnte dieser seine protektiven Funktionen einbüßen. Es liegen derzeit hierzu aber keine Daten vor. Ein entsprechender Versuchsaufbau ist in unserer Arbeitsgruppe in Vorbereitung.

5.3 Präkonditionierung des Organspenders mit Dopamin-allogene Transplantation und akute Abstoßung

In unseren bisherigen Versuchen konnten wir zeigen, dass eine Spendervorbereitung mit Dopamin protektive Effekte im Sinne einer signifikant reduzierten Einwanderung immunkompetenter Zellen in die Nieren zur Folge hat. Dopamin ist in der Lage, den Kaltpräservationschaden *in vitro* an HUVECs zu verhindern (Yard, Beck et al. 2004). Dopaminspendervorbehandlung konnte außerdem in einem allogenen Transplantationsmodell mit Kaltpräservierung akute Abstoßungsepisoden minimieren und chronische Abstoßungszeichen reduzieren (Gottmann, Notheisen et al. 2005). Im Hirntodmodell konnte eine Dopaminbehandlung die renale Inflammation im Spenderorgan reduzieren (Schaub, Ploetz et al. 2004). Auch die Daten dieser Studie belegen, dass Dopaminbehandlung von hirntoten Spendertieren die Infiltration mit Entzündungszellen in die Spenderniere signifikant reduzieren kann.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, inwieweit dies sich günstig auf den klinisch relevanten Endpunkt akute Abstoßung in einem Abstoßungsmodell auswirken würde.

In dem von uns gewählten Transplantationsmodell wurden Faktoren kombiniert, die eine zur Humansituation vergleichbare Situation herstellen sollten und die sich ungünstig auf das Überleben des Transplantats auswirken. Zunächst handelte es sich um ein allogenes Transplantationsmodell Fisher auf Lewis. Die Stämme unterscheiden sich im Minor-Histokompatibilitätskomplex, wodurch es bei einer allogenen Transplantation zu einer milden akuten Abstoßung und Transplantat-Dysfunktion kommt (Lee, Sakurai et al. 2006). Zudem handelte es sich bei dem Versuch um ein Tiermodell mit sechsständiger Hirntoddauer bzw. Narkosedauer in der nicht hirntoten Kontrollgruppe. Mit zunehmender Hirntoddauer nimmt die Immunaktivierung in Nieren hirntoter Ratten zu (van der Hoeven, Molema et al. 2003). Es ist vielfach gezeigt worden, dass Nieren von hirntoten Spendern eine wesentlich schlechtere Prognose haben als Nieren von Lebendspendern (Terasaki, Cecka et al. 1995; Kusaka, Pratschke et al. 2000; Pratschke, Wilhelm et al. 2000; Kusaka, Pratschke et al. 2001; Kusaka, Yamada et al. 2005). Der Kaltpräservationschaden war ein weiterer Faktor, der sich negativ auf das Transplantat auswirken konnte (Salahudeen, Nawaz et al. 1999; Salahudeen, Haider et al. 2004). Zudem wurden nach Transplantation keine Immunsuppressiva verabreicht, um die akute Abstoßung zu hemmen (Gasser, Waaga-Gasser et al. 2005; Schweiger, Wasler et al. 2005). In dem von uns verwendeten Transplantationsetting kam es zu einer schweren

Abstoßungsreaktion in allen Transplantationsgruppen unabhängig davon, ob es sich um hirntote oder nicht-hirntote Spendertiere handelte. Lichtmikroskopisch konnten gemäß der Banff-Klassifikation (Solez, Axelsen et al. 1993; Solez, Benediktsson et al. 1996; Racusen, Solez et al. 1999) in allen drei untersuchten Gruppen schwerste kombiniert interstitielle und vaskuläre Rejektionsformen gefunden werden. Eine Dopaminbehandlung war in diesem Modell nicht protektiv. Möglicherweise sind die Effekte der Dopaminvorbehandlung nicht weitreichend genug, um in einem allogenen Abstoßungsmodell mit prolongierter Kaltpräservierung und fehlender Immunsuppressiva lichtmikroskopisch nachweisbar zu sein. Literaturdaten zu Rattenmodellen, die Hirntod und Kaltpräservierung kombinieren, fehlen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist das Auftreten schwerster Abstoßungen auf die kombinierte Schädigung des Spenderorganes und die dadurch erhöhte Immunogenität zurückzuführen, was etwaige vorliegende protektive Effekte des Dopamins überlagern könnte. Dies wird auch durch die Tatsache belegt, dass ein Auslassen der 24stündigen Kaltpräservierung in einem anderen Hirntodmodell eine deutlich geringere Infiltration von Entzündungszellen ins Transplantat nach sich zog. Unser tierexperimentelles Ergebnis kann die Ergebnisse der beschriebenen retrospektiven klinischen Studien bzw. in vitro Studien (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004) nicht weiter untermauern, wobei aber festzuhalten bleibt, dass Schnuelle sein Augenmerk vor allem auf die „delayed graft function“, also das häufig verzögerte Einsetzen der Nierenfunktion nach Transplantation und das Langzeitüberleben des Transplantats legte, zwei Parameter, die nicht Gegenstand unserer Untersuchung waren. Auch wurde in unserem Tiermodell entgegen der Humansituation ohne Immunsuppressiva gearbeitet. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Einsatz von Immunsuppressiva den protektiven Effekt von Dopamin zur Geltung gebracht hätte.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die mit dieser Studie gewonnenen Daten das Konzept der Dopaminspendervorbehandlung unterstützen. Tierexperimentell lassen sich signifikante antiinflammatorische Einflüsse des Dopamins im Spenderorgan nachweisen. Hierbei scheint die Stimulation adrenerger und dopaminerger Rezeptoren eine zentrale Rolle einzunehmen.

Im allogenen Transplantationsmodell reichten diese protektiven Effekte allerdings nicht aus, um das Transplantat vor akuten Abstoßungsepisoden im Empfänger zu schützen. Die klinische Relevanz des antiinflammatorischen Einflusses auf das Spenderorgan wird sich erst durch eine randomisierte kontrollierte klinische Studie belegen lassen, wie sie augenblicklich in Zusammenarbeit mit der DSO multizentrisch durchgeführt wird.

6. Zusammenfassung

Transplantatnieren von hirntoten Spendern haben eine wesentlich schlechtere Prognose als Nieren von lebenden Spendern. Schon während des Hirntodes kommt es in der Spenderniere zu einer verstärkten Aktivierung des Immunsystems und somit zu einer erhöhten „Immunogenität“ des Transplantats. Dies wirkt sich negativ auf das Transplantatüberleben aus.

Aufgrund hämodynamischer Instabilität müssen hirntote Patienten häufig mit Katecholaminen behandelt werden. In zwei unabhängigen retrospektiven klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Dopaminbehandlung von hirntoten Organspendern die Nierenfunktion und das Langzeittransplantatüberleben im Transplantatempfänger verbessert. Im Tiermodell konnte außerdem gezeigt werden, dass Dopaminbehandlung von hirntoten Ratten die renale Inflammation in der Spenderniere dosisabhängig reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels einer Zeit-Wirkungs-Analyse ermittelt, ob eine Dopaminspendervorbehandlung auch dann noch protektive Effekte ausübt, wenn sie nicht über die gesamte Hirntoddauer erfolgt. Desweiteren wurden mögliche Wirkmechanismen, die zu den protektiven Effekten der Dopaminspendervorbehandlung beitragen können, untersucht.

Zuletzt wurde in einem allogenen Transplantationsmodell untersucht, inwieweit sich eine Dopaminvorbehandlung über den optimalen Behandlungszeitraum im hirntoten Spendertier auf die akute Abstoßung im Empfängertier auswirken kann.

Als Spendertiere dienten Fisher-Ratten. Die Tiere wurden künstlich beatmet, um im Anschluß den Hirntod zu induzieren. Die Hirntoddauer betrug 6 Stunden. Zur Ermittlung der optimalen Behandlungszeit wurde den Tieren 6 Stunden, 3 Stunden oder 1 Stunde ab Hirntodinduktion bzw. 1 oder 3 Stunden vor Nierenexplantation Dopamin in einer Dosis von 10µg/kg/min verabreicht. Beatmete nicht-hirntote Tiere dienten als Kontrolle. Nach Ermittlung der optimalen Behandlungszeit wurden weitere Gruppen für Untersuchungen zur Hämodynamik und dopaminergen bzw. adrenergen Rezeptoren gebildet.

Es wurden vor und 6 Stunden nach Hirntod Blutproben gesammelt, um die Expression von Oberflächenmolekülen mittels FACS-Analyse zu untersuchen. Nach Explantation wurde das Nierengewebe für immunhistochemische Färbungen und RNA-Analysen fixiert und aufbereitet. Im allogenen Transplantationsmodell wurden die explantierten Nieren für 24 Stunden in University of Wisconsin Lösung kaltpräserviert und anschließend in Lewis-Ratten

transplantiert. Nach 10 Tagen erfolgte die Entnahme der Nieren für histologische Untersuchungen.

Dopamin war in der Lage, den Blutdruck in hirntoten Spendertieren zu stabilisieren und so den Ischämie-Reperfusionsschaden zu minimieren. Zudem konnte die Infiltration mit Entzündungszellen signifikant reduziert und damit die Immunogenität des Transplantats vermindert werden. In der Zeit-Wirkungs-Analyse konnte eine Dopaminbehandlung über 3 Stunden ab Hirntodinduktion als optimale Behandlungszeit ermittelt werden. Dagegen wirkte sich eine Dopamingabe über 3 Stunden vor Explantation trotz hämodynamischer Stabilisierung nicht günstig auf die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen aus. Obwohl durch gleichzeitige Blutdrucksenkung bei Dopamingabe die positiven Effekte auf die renale Inflammation vollständig aufgehoben wurden, müssen noch andere protektive Mechanismen, außer der hämodynamischen Stabilisierung, beteiligt sein. Die Aufhebung der protektiven Effekte auf die renale Inflammation bei Dopaminbehandlung und gleichzeitiger dopaminergischer bzw. adrenerger Rezeptorenblockade lässt eine Beteiligung dieser Rezeptoren an den positiven Eigenschaften des Dopamin vermuten. In Nieren von dopaminbehandelten hirntoten Spendertieren sinkt die Expression von Hämoxxygenase-1 im Vergleich zu unbehandelten hirntoten Kontrollen signifikant ab. Hirntod beeinflusst die Expression ausgewählter Oberflächenmoleküle von Entzündungszellen im peripheren Blut unabhängig von einer Dopaminbehandlung und scheint sich daher direkt auf die gewebsständigen und weniger auf die im Blut zirkulierenden Entzündungszellen auszuwirken. Eine Dopaminbehandlung von hirntoten Spenderratten konnte sich im allogenen Transplantationsmodell nicht protektiv auf akute Abstoßungsepisoden auswirken.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen das Konzept der Dopaminspendervorbehandlung weitgehend. Eine prospektive randomisierte klinische Studie, die die Effekte der Dopaminspendervorbehandlung am Menschen weitreichend untersucht, wird derzeit durchgeführt und unterstreicht die mögliche klinische Bedeutung, die mit dem Konzept der Dopaminspendervorbehandlung einhergeht.

7. Summary

Brain death is a major cause of pre-transplantation injury of allografts. According to the damage hypothesis, pre-transplantation injury would have an important impact on transplantation outcome. Indeed allografts retrieved from brain dead donors show a decreased long-term survival compared to those from living donors. In two independent retrospective clinical studies, we could show a beneficial effect of donor dopamine treatment on graft function and long-term renal allograft survival. In addition, we have recently demonstrated in an animal model that dopamine treatment during brain death reduces monocyte infiltration in renal grafts. In the present study, we investigated the anti-inflammatory response mediated by dopamine in kidneys of brain-dead donor rats with regard to time-dependency and possible underlying mechanisms. Moreover, we investigated the influence of brain-dead donor treatment with dopamine on acute rejection episodes after allogeneic kidney transplantation.

Brain death was induced in Fisher donor rats. Duration of brain death was in all experiments 6 hrs. Apneic animals were mechanically ventilated, and dopamine (10 μ g/kg/min) was given for 6, 3 respectively 1 hrs from the onset of brain death or 1 respectively 3hrs before renal explantation. Ventilated (6 hrs), non-brain-dead animals served as controls. Peripheral blood for FACS analysis was collected before and 6 hrs after brain death from brain-dead controls and dopamine treated animals. Other brain-dead animals received either blood pressure lowering, α/β -adrenergic antagonists, or dopaminergic blockers for investigating hemodynamic and non-hemodynamic mechanisms of dopamine. Immunohistochemistry and RNA analysis were performed in retrieved kidneys. In the transplantation model, explanted kidneys were stored for 24 hrs at 4°C in University of Wisconsin solution and transplanted into Lewis rats.

Whereas in untreated brain-dead animals hypotension occurred, dopamine treatment during brain death completely normalized blood pressure. Concomitantly, the number of infiltrating ED-1+/MHC class II+ monocytes was reduced. Time response experiments revealed that 3 hrs of dopamine treatment from the onset of brain death was sufficient to reduce infiltration and thus, to reduce the graft immunogenicity. Although blood pressure was still improved when dopamine was applied during the last 3 hrs of brain death, this did not influence monocyte infiltration. We therefore concluded that the effect of dopamine is only partly depending upon hemodynamic changes. The beneficial effect of dopamine on infiltration was abrogated by blood pressure lowering and both dopaminergic and α/β -adrenergic receptor

blockers. Moreover application of the D-receptor agonist pergolide inhibited monocyte infiltration in kidneys of brain dead donors. Therefore we suggest that some of the beneficial effects are affected by dopaminergic or adrenergic receptors. Dopamine downregulated gene-expression of HO-1 (hemeoxygenase-1) in renal tissue of brain-dead rats compared to untreated controls. Surface molecules of inflammatory cells in the peripheral blood were not influenced by brain death independent of dopamine treatment. Therefore brain death seems to influence infiltrating cells more than inflammatory cells in the peripheral blood. Brain-dead donor pre-treatment with dopamine had no protective effects on acute rejection episodes in this model of allogeneic kidney transplantation.

These findings confirm and expand findings from two independent retrospective clinical studies and may help to improve the treatment of cadaveric kidney donors. A prospective randomized clinical trial studying the effects of dopamine treatment cadaveric renal transplantation is currently under progress.

8. Literaturverzeichnis

- Avlonitis, V. S., C. H. Wigfield, et al. (2005). "The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor." Am J Transplant **5**(4 Pt 1): 684-93.
- Bach, F. H. (2002). "Heme oxygenase-1 as a protective gene." Wien Klin Wochenschr **114 Suppl 4**: 1-3.
- Baker, G. L., R. J. Corry, et al. (1985). "Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase." Ann Surg **202**(5): 628-41.
- Berger, S. P., M. Hunger, et al. (2000). "Dopamine induces the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro." Kidney Int **58**(6): 2314-9.
- Blydt-Hansen, T. D., M. Katori, et al. (2003). "Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury." J Am Soc Nephrol **14**(3): 745-54.
- Bonnell, M. R., G. A. Visner, et al. (2004). "Heme-oxygenase-1 expression correlates with severity of acute cellular rejection in lung transplantation." J Am Coll Surg **198**(6): 945-52.
- Borovikova, L. V., S. Ivanova, et al. (2000). "Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin." Nature **405**(6785): 458-62.
- Bosco, P. J. and R. T. Schweizer (1988). "Use of oxygen radical scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation." Arch Surg **123**(5): 601-4.
- Braudeau, C., D. Bouchet, et al. (2004). "Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer." Gene Ther **11**(8): 701-10.
- Braun, W. E. (2002). "Update on kidney transplantation: increasing clinical success, expanding waiting lists." Cleve Clin J Med **69**(6): 501-4.
- Bunag, R. D., C. V. Thomas, et al. (2002). "Ketanserin versus urapidil: age-related cardiovascular effects in conscious rats." Eur J Pharmacol **435**(1): 85-92.
- Burne-Taney, M. J. and H. Rabb (2003). "The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury." Curr Opin Nephrol Hypertens **12**(1): 85-90.
- Burne-Taney, M. J., N. Yokota, et al. (2005). "Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury." Kidney Int **67**(3): 1002-9.
- Cacho, D. T., A. A. Pique, et al. (2005). "Living donor renal transplantation: prognostic factors on graft survival." Transplant Proc **37**(9): 3679-81.
- Cai, J. and P. I. Terasaki (2005). "Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment." Hum Immunol **66**(4): 334-42.
- Carbognani, P., L. Spaggiari, et al. (1995). "Pulmonary endothelial cell modifications after storage in solid-organ preservation solutions." J Int Med Res **23**(3): 200-6.
- Carpenter, C. B. (1995). "Long-term failure of renal transplants: adding insult to injury." Kidney Int Suppl **50**: S40-4.
- Chamorro, C., J. A. Silva, et al. (2003). "Cardiac donor management: another point of view." Transplant Proc **35**(5): 1935-7.
- Chauveau, C., D. Bouchet, et al. (2002). "Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection." Am J Transplant **2**(7): 581-92.
- Chien, C. T., P. H. Lee, et al. (2001). "De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion." J Am Soc Nephrol **12**(5): 973-82.

- Daul, A., M. Elter-Schulz, et al. (1995). "Dose-dependent separation of dopaminergic and adrenergic effects of epinine in healthy volunteers." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **352**(4): 429-37.
- De Greef, K. E., D. K. Ysebaert, et al. (1998). "Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury." J Nephrol **11**(3): 110-22.
- Felten, H., M. K. Kuhlmann, et al. (1999). "[Adequate dialysis treatment in hemodialysis and peritoneal dialysis patients]." Internist (Berl) **40**(1): 22-36.
- Fischer, D. A., B. Ferger, et al. (2002). "Discrimination of morphine- and haloperidol-induced muscular rigidity and akinesia/catalepsy in simple tests in rats." Behav Brain Res **134**(1-2): 317-21.
- Fontana, I., M. R. Germi, et al. (2005). "Dopamine "renal dose" versus fenoldopam mesylate to prevent ischemia-reperfusion injury in renal transplantation." Transplant Proc **37**(6): 2474-5.
- Gallon, L. G., J. R. Leventhal, et al. (2002). "Pretransplant evaluation of renal transplant candidates." Semin Nephrol **22**(6): 515-25.
- Gasser, M., A. M. Waaga-Gasser, et al. (2005). "Selectin blockade plus therapy with low-dose sirolimus and cyclosporin a prevent brain death-induced renal allograft dysfunction." Am J Transplant **5**(4 Pt 1): 662-70.
- Goes, N., J. Urmsom, et al. (1995). "Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10." Transplantation **59**(4): 565-72.
- Goes, N., J. Urmsom, et al. (1995). "Acute renal injury in the interferon-gamma gene knockout mouse: effect on cytokine gene expression." Transplantation **60**(12): 1560-4.
- Goldberg, L. I. (1984). "Dopamine receptors and hypertension. Physiologic and pharmacologic implications." Am J Med **77**(4A): 37-44.
- Gottmann, U., P. T. Brinkkoetter, et al. (2006). "Effect of pre-treatment with catecholamines on cold preservation and ischemia/reperfusion-injury in rats." Kidney Int **70**(2): 321-8.
- Gottmann, U., A. Notheisen, et al. (2005). "Influence of donor pretreatment with dopamine on allogeneic kidney transplantation after prolonged cold storage in rats." Transplantation **79**(10): 1344-50.
- Gottmann, U., J. Oltersdorf, et al. (2003). "Oxidative stress in chronic renal allograft nephropathy in rats: effects of long-term treatment with carvedilol, BM 91.0228, or alpha-tocopherol." J Cardiovasc Pharmacol **42**(3): 442-50.
- Granger, D. N., J. N. Benoit, et al. (1989). "Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion." Am J Physiol **257**(5 Pt 1): G683-8.
- Granger, D. N. and P. Kubes (1994). "The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion." J Leukoc Biol **55**(5): 662-75.
- Grau, V., O. Stehling, et al. (2001). "Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression." Transplantation **71**(1): 37-46.
- Haga, K., K. Asano, et al. (1994). "Effect of Y-25130, a selective 5-hydroxytryptamine₃ receptor antagonist, on gastric emptying in mice." Arch Int Pharmacodyn Ther **328**(3): 344-55.
- Hanas, E., T. H. Totterman, et al. (1989). "Circulating T-lymphocyte sub-subsets and NK-like cells in renal transplant patients: patterns associated with rejection." Nephrol Dial Transplant **4**(8): 735-9.
- Heemann, U. W., S. G. Tullius, et al. (1993). "Neutrophils and macrophages are prominent in the pathophysiology of chronic rejection of rat kidney allografts." Transplant Proc **25**(1 Pt 2): 937-8.

- Henke, J., S. Astner, et al. (2005). "Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits." Vet Anaesth Analg **32**(5): 261-70.
- Hetzl, G. R., B. Klein, et al. (2002). "Risk factors for delayed graft function after renal transplantation and their significance for long-term clinical outcome." Transpl Int **15**(1): 10-6.
- Holmes, C. L. (2005). "Vasoactive drugs in the intensive care unit." Curr Opin Crit Care **11**(5): 413-7.
- Hong, S. C., D. B. Sant'Angelo, et al. (1997). "The orientation of a T cell receptor to its MHC class II:peptide ligands." J Immunol **159**(9): 4395-402.
- Huber, T. S., M. J. Kluger, et al. (1991). "Plasma profiles of IL-6-like and TNF-like activities in brain-dead dogs." Am J Physiol **261**(5 Pt 2): R1133-40.
- Janeway, C. A., Jr., K. Bottomly, et al. (1985). "Modes of cell:cell communication in the immune system." J Immunol **135**(2 Suppl): 739s-742s.
- Jose, P. A., L. D. Asico, et al. (1998). "Effects of costimulation of dopamine D1- and D2-like receptors on renal function." Am J Physiol **275**(4 Pt 2): R986-94.
- Kapper, S., G. Beck, et al. (2002). "Modulation of chemokine production and expression of adhesion molecules in renal tubular epithelial and endothelial cells by catecholamines." Transplantation **74**(2): 253-60.
- Katori, M., R. Buelow, et al. (2002). "Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway." Transplantation **73**(2): 287-92.
- Katori, M., R. W. Busuttil, et al. (2002). "Heme oxygenase-1 system in organ transplantation." Transplantation **74**(7): 905-12.
- Keith, D. S., A. DeMattos, et al. (2005). "Factors associated with improvement in deceased donor renal allograft function in the 1990s." J Am Soc Nephrol **16**(5): 1512-21.
- Kotsch, K., M. Francuski, et al. (2006). "Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors." Am J Transplant **6**(3): 477-86.
- Kuman, M. (2004). "[Renal transplantation--effective or useful?]." Vnitr Lek **50 Suppl 1**: S107-9.
- Kusaka, M., J. Pratschke, et al. (2000). "Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death." Transplantation **69**(3): 405-10.
- Kusaka, M., J. Pratschke, et al. (2001). "Early and late inflammatory changes occurring in rat renal isografts from brain dead donors." Transplant Proc **33**(1-2): 867-8.
- Kusaka, M., K. Yamada, et al. (2005). "Gene expression profile in rat renal isografts from brain dead donors." Transplant Proc **37**(1): 364-6.
- Lee, Y. S., M. Sakurai, et al. (2006). "Induction of heat shock proteins in a rat composite tissue allotransplantation model of acute rejection." Plast Reconstr Surg **118**(1): 29-40.
- Lemos, F. B., J. N. Ijzermans, et al. (2003). "Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3278-87.
- Link, J., R. Rohling, et al. (1990). "[Preservation of homeostasis following the onset of brain death]." Anaesthesiol Reanim **15**(4): 249-60.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." Faseb J **2**(10): 2557-68.
- Manaka, D., R. Okamoto, et al. (1990). "Hemodynamic stability and metabolic preservation of the liver under simultaneous administration of vasopressin and epinephrine in brain-dead dogs." Transplantation **49**(6): 1188-90.
- Marshall, R., N. Ahsan, et al. (1996). "Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function." Surgery **120**(4): 663-5; discussion 666.

- Martins, P. N., H. Kessler, et al. (2005). "Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity." Transplant Proc **37**(1): 384-6.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Murray, J. E. (1982). "Reflections on the first successful kidney transplantation." World J Surg **6**(3): 372-6.
- Nagano, H. and N. L. Tilney (1997). "Chronic allograft failure: the clinical problem." Am J Med Sci **313**(5): 305-9.
- Nijboer, W. N., T. A. Schuur, et al. (2004). "Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys." Transplantation **78**(7): 978-86.
- O'Brien, E. A., S. A. Bour, et al. (1996). "Effect of use of vasopressors in organ donors on immediate function of renal allografts." J Transpl Coord **6**(4): 215-6.
- Paller, M. S. (1992). "Free radical-mediated postischemic injury in renal transplantation." Ren Fail **14**(3): 257-60.
- Paller, M. S., J. R. Hoidal, et al. (1984). "Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat." J Clin Invest **74**(4): 1156-64.
- Pawlik, A., M. Florczak, et al. (2003). "The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with chronic kidney graft rejection." Transplant Proc **35**(8): 2902-4.
- Pawlik, A., M. Florczak, et al. (2003). "The increased number of CD4+CD28- T cells in patients after liver transplantation." Ann Transplant **8**(2): 54-6.
- Pienaar, H., I. Schwartz, et al. (1990). "Function of kidney grafts from brain-dead donor pigs. The influence of dopamine and triiodothyronine." Transplantation **50**(4): 580-2.
- Powner, D. J., A. Hendrich, et al. (1990). "Hormonal changes in brain dead patients." Crit Care Med **18**(7): 702-8.
- Pratschke, J., G. Kofla, et al. (2001). "Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor." Ann Surg **234**(6): 732-40.
- Pratschke, J., P. Neuhaus, et al. (2005). "What can be learned from brain-death models?" Transpl Int **18**(1): 15-21.
- Pratschke, J., M. J. Wilhelm, et al. (2000). "Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors." Ann Surg **232**(2): 263-71.
- Pratschke, J., M. J. Wilhelm, et al. (1999). "Activation of proinflammatory genes in somatic organs as a consequence of brain death." Transplant Proc **31**(1-2): 1003-5.
- Pratschke, J., M. J. Wilhelm, et al. (2001). "Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats." J Am Soc Nephrol **12**(11): 2474-81.
- Pratschke, J., M. J. Wilhelm, et al. (2001). "The influence of donor brain death on long-term function of renal allotransplants in rats." Transplant Proc **33**(1-2): 693-4.
- Racusen, L. C., K. Solez, et al. (1999). "The Banff 97 working classification of renal allograft pathology." Kidney Int **55**(2): 713-23.
- Raftery, A. T. and R. W. Johnson (1979). "Dopamine pretreatment in unstable kidney donors." Br Med J **1**(6162): 522.
- Saeed, R. W., S. Varma, et al. (2005). "Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation." J Exp Med **201**(7): 1113-23.
- Salahudeen, A., M. Nawaz, et al. (1999). "Cold storage induces time-dependent F2-isoprostane formation in renal tubular cells and rat kidneys." Kidney Int **55**(5): 1759-62.
- Salahudeen, A. A., J. K. Jenkins, et al. (2001). "Overexpression of heme oxygenase protects renal tubular cells against cold storage injury: studies using hemin induction and HO-1 gene transfer." Transplantation **72**(9): 1498-504.
- Salahudeen, A. K., N. Haider, et al. (2004). "Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts." Kidney Int **65**(2): 713-8.

- Salahudeen, A. K., H. Huang, et al. (2003). "Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells." Am J Transplant **3**(3): 273-80.
- Salahudeen, A. K., H. Huang, et al. (2000). "Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury." Transplantation **70**(10): 1424-31.
- Salahudeen, A. K., M. Joshi, et al. (2001). "Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells." Transplantation **72**(5): 798-804.
- Schaub, M., C. J. Ploetz, et al. (2004). "Effect of dopamine on inflammatory status in kidneys of brain-dead rats." Transplantation **77**(9): 1333-40.
- Scherer, R., J. Erhard, et al. (1992). "[Management of the organ donor]." Zentralbl Chir **117**(12): 637-41.
- Schnuelle, P., S. Berger, et al. (2001). "Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation." Transplantation **72**(3): 455-63.
- Schnuelle, P., D. Lorenz, et al. (1999). "Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation." Kidney Int **56**(2): 738-46.
- Schnuelle, P., D. Lorenz, et al. (1998). "Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up." J Am Soc Nephrol **9**(11): 2135-41.
- Schnuelle, P., B. A. Yard, et al. (2004). "Impact of donor dopamine on immediate graft function after kidney transplantation." Am J Transplant **4**(3): 419-26.
- Schuurs, T. A., F. Gerbens, et al. (2004). "Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death." Am J Transplant **4**(12): 1972-81.
- Schweiger, M., A. Wasler, et al. (2005). "Late acute cardiac allograft rejection: new therapeutic options?" Transplant Proc **37**(10): 4528-31.
- Segel, L. D., D. W. vonHaag, et al. (2002). "Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats." J Heart Lung Transplant **21**(7): 804-11.
- Shivalkar, B., J. Van Loon, et al. (1993). "Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function." Circulation **87**(1): 230-9.
- Skrabal, C. A., L. O. Thompson, et al. (2005). "Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death." J Surg Res **123**(1): 118-25.
- Soares, M. P., Y. Lin, et al. (1998). "Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival." Nat Med **4**(9): 1073-7.
- Solez, K., R. A. Axelsen, et al. (1993). "International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology." Kidney Int **44**(2): 411-22.
- Solez, K., H. Benediktsson, et al. (1996). "Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology." Transplant Proc **28**(1): 441-4.
- Solheim, B. G., T. E. Engebretsen, et al. (1977). "The influence of HLA-A, -B, -C, and -D matching on kidney graft survival." Scand J Urol Nephrol Suppl(42): 28-31.
- Solheim, B. G., A. Flatmark, et al. (1977). "Influence of HLA-A, -B, -C, and -D matching on the outcome of clinical kidney transplantation." Transplant Proc **9**(1): 475-8.
- Stallone, G., B. Infante, et al. (2005). "[Immunosuppressive drugs and renal transplantation]." G Ital Nefrol **22 Suppl 33**: S76-9.
- Steiniger, B., O. Stehling, et al. (2001). "Monocytes in the rat: phenotype and function during acute allograft rejection." Immunol Rev **184**: 38-44.
- Takada, M., K. C. Nadeau, et al. (1998). "Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat." Transplantation **65**(12): 1533-42.

- Terasaki, P. I. (2003). "Humoral theory of transplantation." Am J Transplant **3**(6): 665-73.
- Terasaki, P. I. and J. Cai (2005). "Humoral theory of transplantation: further evidence." Curr Opin Immunol **17**(5): 541-5.
- Terasaki, P. I., J. M. Cecka, et al. (1995). "High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors." N Engl J Med **333**(6): 333-6.
- Totterman, T. H., E. Hanas, et al. (1989). "Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets." Transplantation **47**(5): 817-23.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." Nature **420**(6917): 853-9.
- Tullius, S. G., M. Nieminen-Kelha, et al. (2002). "Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1." Transplantation **74**(5): 591-8.
- Ueno, T., C. Zhi-Li, et al. (2000). "Unique circulatory responses to exogenous catecholamines after brain death." Transplantation **70**(3): 436-40.
- van der Hoeven, J. A., G. Molema, et al. (2003). "Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys." Kidney Int **64**(5): 1874-82.
- van der Hoeven, J. A., R. J. Ploeg, et al. (1999). "Induction of organ dysfunction and activation of inflammatory markers in donor liver and kidney during hypotensive brain death." Transplant Proc **31**(1-2): 1006-7.
- van der Hoeven, J. A., R. J. Ploeg, et al. (1999). "Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors." Transplantation **68**(12): 1884-90.
- van der Woude, F. J., P. Schnuelle, et al. (2004). "Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury." J Investig Med **52**(5): 323-9.
- Vathsala, A. (2005). "Preventing renal transplant failure." Ann Acad Med Singapore **34**(1): 36-43.
- Velasco, M. and A. Luchsinger (1998). "Dopamine: pharmacologic and therapeutic aspects." Am J Ther **5**(1): 37-43.
- Wolfe, R. A., V. B. Ashby, et al. (1999). "Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant." N Engl J Med **341**(23): 1725-30.
- Yard, B., G. Beck, et al. (2004). "Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds." Am J Transplant **4**(1): 22-30.
- Zhang, R., P. Kumar, et al. (2004). "Kidney transplantation: the evolving challenges." Am J Med Sci **328**(3): 156-61.

9. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

10. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation veröffentlichte Arbeiten

10.1 Publikation

Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: The role of hemodynamic stabilization and D-Receptor stimulation

Simone Höger, Uwe Göttmann, Zhenzi Liu, Peter Schnülle, Rainer Birck, Claude Braun, Fokko J. van der Woude, Benito Yard

Transplant International, akzeptiert Mai 2007

10.2 Kongressabstract

Dopamine treatment of brain dead organ donors protects against hemodynamic instability and reduces renal inflammation in rats

Simone Höger, Uwe Göttmann, Zhenzi Liu, Benito Yard, Peter Schnülle, Fokko J. van der Woude, Claude Braun

University Hospital Mannheim (Nephrology, Endocrinology, Rheumatology)

Germany

GFN-Kongress für Nephrologie, Saarbrücken 2005

Anti-inflammatory effect of dopamine treatment in brain-dead rats is partly mediated by hemodynamic stabilization

Simone Höger, Uwe Göttmann, Zhenzi Liu, Benito Yard, Peter Schnülle, Fokko J. van der Woude, Claude Braun

University Hospital Mannheim (Nephrology, Endocrinology, Rheumatology)

Germany

GFN-Kongress für Nephrologie, Essen 2006 - POSTERPREIS

Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects both by hemodynamic stabilization and D-Receptor stimulation

Simone Höger, Uwe Göttmann, Zhenzi Liu, Peter Schnülle, Claude Braun, Fokko J. van der Woude, Benito Yard

ASN-American Society of Nephrology, San Diego 2006

11. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. C. Braun bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation unter seiner Betreuung anzufertigen. Ich möchte mich auch ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. F.van der Woude bedanken, der mich immer sehr unterstützt und gefördert hat.

Für die gute Betreuung bin ich auch Herrn PD Dr. rer. nat. B. Yard und Herrn Dr. U. Goettmann sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. J. Roth danke ich, dass er bereit war, diese Dissertation als externe Doktorarbeit zu betreuen - vor allen Dingen zu korrigieren - und dabei jeder Zeit meine Fragen zu beantworten.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank geht an Susanne Meisinger, die mich in der Durchführung meiner Arbeit immer unterstützt hat. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Kiril Petrov bedanken, der mir bei der Durchführung einiger Experimente eine große Hilfe war.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe „Nierentransplantation“ von Prof. van der Woude, die mir Einblicke in sehr viele Bereiche der Transplantationsmedizin ermöglicht hat.

Ich danke der DFG, die dieses Projekt unterstützt hat (DFG Forschergruppe 406) und der European Graduate School GRK 880: Vascular Medicine, an deren Seminaren ich als Assoziierte teilnehmen konnte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und allen meinen Freunden danken, die immer zur Stelle waren, wenn ich sie gebraucht habe.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5160-2



9 7 8 3 8 3 5 9 5 1 6 0 0 ©