

α -Liponsäure hemmt die Entstehung der Transplantatvaskulopathie durch ICAM-1- /VCAM-1-Suppression in transplantierten Herzen bei der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Stark, Thorsten
aus Düsseldorf

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Leiter: Prof. Dr. H. Tillmanns
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. H. Hölschermann

Gutachter: PD Dr. V. Grau

Tag der Disputation: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.1.1 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie	1
1.1.2 Klinik und Pathologie der Transplantatvaskulopathie	2
1.1.3 Pathogenese der Transplantatvaskulopathie	4
1.1.4 ICAM-1 und VCAM-1 (Adhäsionsmoleküle)	7
1.1.5 α -Liponsäure (Antioxidantien)	11
1.2 Fragestellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Versuchsaufbau	14
2.2 Versuchstiere	14
2.2.1 Tierversuchsgenehmigung	14
2.2.2 Finanzierung	15
2.2.3 Tierhaltung und Betreuung	15
2.2.4 Gruppenbildung (α -Liponsäure vs. Kontrollgruppe)	15
2.3 Technik der heterotopen Herztransplantation	15
2.3.1 Narkose und allgemeine OP-Vorbereitung	16
2.3.2 Allogene heterotope Herztransplantation	16
2.4 Postoperatives Monitoring	18
2.4.1 Gewichtskontrolle	18
2.4.2 Transplantatfunktion	18
2.5 Applikation der Medikamenten	18
2.5.1 Immunsuppression	18
2.5.2 α -Liponsäure	19
2.6 Organentnahme und Asservation	19

2.7	Histologische Aufarbeitung	20
2.7.1	Einbettung, Lagerung und Schnitttechnik	20
2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	22
2.7.3	Elastika-Färbungen nach Weigert	22
2.7.4	APAAP-Färbungen	23
2.8	Auswertung	25
2.8.1	Rattengewicht	25
2.8.2	Funktion des Transplantats	25
2.8.3	Abstoßungsreaktion	26
2.8.4	Transplantatvaskulopathie	28
2.8.5	ICAM-1- und VCAM-1-Expression	31
2.9	Statistik	33
2.9.1	Rattengewicht	33
2.9.2	Funktion des Transplantats	34
2.9.3	Abstoßungsreaktion	34
2.9.4	Transplantatvaskulopathie	34
2.9.5	ICAM-1- und VCAM-1-Expression	34
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Allgemeine Beobachtungen	36
3.1.1	Körpergewicht	36
3.1.2	Transplantatfunktion	36
3.1.3	Abstoßungsreaktion	37
3.1.4	Transplantatvaskulopathie	38
3.1.5	ICAM-1-Expression und Transplantatvaskulopathie	39
3.1.6	VCAM-1-Expression und Transplantatvaskulopathie	43
3.2	Einfluss von α-Liponsäure auf die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie	46
3.3	Hemmung der intimalen Expression von Adhäsionsmolekülen unter Einfluss von α-Liponsäure	49
3.3.1	Hemmung der ICAM-1-Expression in transplantierten Herzen	50
3.3.2	Hemmung der VCAM-1-Expression in transplantierten Herzen	53
4	DISKUSSION	56
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	65

7	SUMMARY	67
8	LITERATURVERZEICHNIS	69
	ANLEITUNGEN	82
	ANSÄTZE	85
	REAGENZIER	86
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	87
	DANKSAGUNG	88
	LEBENS LAUF	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: α -Liponsäure ist ein zyklisches Disulfid der Oktan-6,8-dithiolsäure	13
Abbildung 2: Abstoßungsreaktion Grad 0 (HE-Färbung)	27
Abbildung 3: Abstoßungsreaktion Grad 3 mit deutlicher Nekrosebildung und ausgeprägter mononuklearer Zellinfiltration (HE-Färbung).....	27
Abbildung 4: Gefäß ohne Transplantatvaskulopathie (Grad 0, Elastika-Färbung)....	29
Abbildung 5: Transplantatvaskulopathie Grad 1 (Einengung des Gefäßlumens <10%, Elastika-Färbung)	29
Abbildung 6: Transplantatvaskulopathie Grad 2 (Einengung des Gefäßlumens 10-50%, Elastika-Färbung)	30
Abbildung 7: Transplantatvaskulopathie Grad 3 (Einengung des Gefäßlumens > 50%, Elastika-Färbung)	30
Abbildung 8: Gefäß ohne intimale ICAM-1-Färbung und ohne Transplantatvaskulopathie (APAAP- Färbung)	32
Abbildung 9: Kräftige intimale ICAM-1-Färbung (Grad 3) in einem nahezu vaskulopathiefreien Gefäß (APAAP-Färbung)	32
Abbildung 10: Kräftige intimale VCAM-1-Färbung (Grad 3) in einem Gefäß mit einer Einengung des Gefäßlumens um 10-50% (APAAP- Färbung)	33
Abbildung 11: Abstoßungsreaktion (α -Liponsäure vs. Kontrolle)	37
Abbildung 12: Abstoßungsreaktion Grad 2 (HE-Färbung)	38
Abbildung 13: Intimale ICAM-1-Expression und beginnende Transplantatvaskulopathie (APAAP-Färbung)	40
Abbildung 14: Leichtgradige intimale ICAM-1-Färbung (Grad 1) im Nativ-Herzen (APAAP-Färbung).....	41
Abbildung 15: Intimale VCAM-1-Expression und beginnende Transplantatvaskulopathie (APAAP-Färbung)	44
Abbildung 16: Leichtgradige intimale VCAM-1-Färbung (Grad 1) in einem Nativ-Herzen (APAAP-Färbung)	44

Abbildung 17: Ausprägung der Transplantatvaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Zahl der Gefäße und Unterteilung nach prozentualer Gefäßverengung.....	47
Abbildung 18: Ausprägung der Transplantatvaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahl der Gefäße (Median) und Unterteilung nach prozentualer Gefäßverengung.....	48
Abbildung 19: Durchschnittlicher Schweregrad der Vaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle).....	48
Abbildung 20: VCAM-1-Expression im Bereich von Intima, Adventitia sowie Interstitium im durch Transplantatvaskulopathie geschädigten Herzen (Gefäßverengung 10-50%, APAAP-Färbung).....	49
Abbildung 21: Intimale ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Gefäßzahlen und Unterteilung nach Färbescorers (Grad 0-3).....	51
Abbildung 22: Intimale ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahl der Gefäße (Median) und Unterteilung nach Färbescorers (Grad 0-3).....	52
Abbildung 23: Durchschnittliche Scores der intimalen ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle).....	52
Abbildung 24: Intimale VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Gefäßzahlen und Unterteilung nach Färbescorers (Grad 0-3).....	54
Abbildung 25: Intimale VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahlen der Gefäße (Median) und Unterteilung nach Färbescorers (Grad 0-3).....	55
Abbildung 26: Durchschnittliche Scores der intimalen VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle).....	55
Abbildung 27: Vereinfachtes Wirkungsmodell der α -Liponsäure im Endothel des transplantierten Herzen	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Transplantatvaskulopathie und koronare Herzkrankheit im Vergleich	3
Tabelle 2: Nicht-immunologische Einflussfaktoren auf die TVP	5
Tabelle 3: Immunologische Einflussfaktoren auf die Transplantatvaskulopathie.....	5
Tabelle 4: Funktion und Lokalisation von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin Supergen-Familie [40]	9
Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen: ICAM-1- und VCAM-1-Färbung (APAAP)	23
Tabelle 6: Einteilung der Transplantatfunktion	26
Tabelle 7: Einteilung der Abstoßungsreaktion.....	26
Tabelle 8: Schweregrad der Transplantatvaskulopathie (Abbildung 4 bis Abbildung 7)	28
Tabelle 9: Intensitätsskala zur Beurteilung von intimaler ICAM-1- und VCAM-1- Anfärbung und Expression	31
Tabelle 10: Ausprägung der TVP in der Kontrollgruppe unterteilt nach prozentualer Gefäßverengung.....	39
Tabelle 11: Ausprägung der TVP in der α -Liponsäuregruppe unterteilt nach prozentualer Gefäßverengung.....	39
Tabelle 12: ICAM-1-Expression in den Herztransplantaten der Kontroll-Gruppe unterteilt nach Färbescores	41
Tabelle 13: ICAM-1-Expression in den Herztransplantaten der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores	42
Tabelle 14: ICAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der Kontrollgruppe unterteilt nach Färbescores.....	42
Tabelle 15: ICAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores	42
Tabelle 16: ICAM-1-Expression in den Herzen der Gruppe ohne Transplantation unterteilt nach Färbescores	43
Tabelle 17: VCAM-1-Expression in den Herztransplantaten der Kontroll-Gruppe unterteilt nach Färbescores	45

Tabelle 18: VCAM-1-Expression in den Herztransplantaten der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores	45
Tabelle 19: VCAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der Kontrollgruppe unterteilt nach Färbescores	45
Tabelle 20: VCAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores	46
Tabelle 21: Färbescores der VCAM-1-Färbung der Herzen aus der Gruppe ohne Transplantation	46

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivierungs-Protein-1
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
CRP	C reaktives Protein
DHLA	Dihydroliponsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F	Fisher
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JLU	Justus-Liebig Universität
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
Lew	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAdCAM	mucosal addressin cellular adhesion molecule
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAC	N-acetylcysteine
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NF	nuclear factor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitritoxid-Synthase
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Privat Dozent
PDGF	platelet derived growth factor
PDTC	Pyrrolidin Dithiocarbamat
PECAM	platelet endothelial cellular adhesion molecule

pH	pondus Hydrogenii
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ROS	reactive oxygene species
s.	siehe
S.	Seite
s. a.	siehe auch
sCAM	soluble cellular adhesion molecule
SOD	Superoxid-Dismutase
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TVP	Transplantat Vaskulopathie
u. a.	unter anderem
VCAM	vaskulare cellular adhesion molecule
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Pathogenese der **Transplantatvaskulopathie** (im folgenden kurz: TVP) ist noch nicht vollständig erforscht. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der Schwierigkeit, eine genaue Definition für die TVP zu finden, wieder. Die TVP wird jedoch allgemein als besonders aggressive, diffuse Sonderform der koronaren Herzerkrankung im transplantierten Herzen beschrieben [8, 69]. Es werden multiple Synonyme in der Literatur verwendet: accelerated atherosclerosis, chronic rejection, allograft vasculopathy, graft arteriosclerosis, chronic vascular rejection und transplant associated CAD (coronary artery disease).

1.1.1 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie

Die Herztransplantation ist heute eine akzeptierte und erfolgreiche Methode zur Behandlung von irreversiblen Herzerkrankungen im Endstadium [13]. Bei zunehmender Anzahl an Herztransplantationen und durch die kontinuierliche Verbesserung der Operationstechnik sowie durch eine verbesserte Immunsuppression, insbesondere durch Ciclosporin A seit Mitte der 70er Jahre [13, 31], liegt die mittlere Überlebensdauer nach einer Herztransplantation heute bei 9,3 Jahren. Nach Überleben des ersten Jahres nach OP verlängert sich die erwartete Lebensdauer sogar auf 11,8 Jahre [43]. Obwohl diese Behandlungsmethode erst seit der ersten orthotopen Herztransplantation 1967 zur Verfügung steht [7], hat sie viel zu einer Verlängerung des Lebens sowie zu einer Verbesserung der Lebensqualität beitragen können [13]. Allein in Deutschland wurden zwischen 1995 und 2004 jährlich zwischen 393 und 562 Herzen transplantiert, ohne, dass diese Methode ein Weg zur endgültigen Heilung ist. Die 1-Jahres-Überlebensrate lag dabei bei 78% sowie die 5-Jahres-Überlebensrate bei fast 70% (1994-2003, n=2255) [27]. Hauptindikationen, die zu einer Herztransplantation führten, waren in Deutschland im Jahr 2004 die medikamentös nicht zu beherrschende ischämische und dilatative Kardiomyopathie (>50%) sowie die koronare Herzkrankheit (im folgenden kurz: KHK) (ca. 28%) im Endstadium [27].

Bei einem heute standardisiertem Operationsprotokoll liegt der limitierende Faktor für eine längere Überlebensdauer dabei meist im postoperativen Bereich. Sind im ersten

Jahr nach der Transplantation noch Infektion und insbesondere akute Abstoßungsreaktionen als Haupttodesursache vor der TVP bekannt, so ist sie ab dem 1. Jahr nach Transplantation die häufigste Todesursache [11, 23, 38, 92]. Dabei ist es insgesamt schwierig, eine valide Inzidenz zu bestimmen, da eine frühzeitige Diagnosestellung häufig nicht möglich ist. In der Literatur wird jedoch von einer 3-Jahres-Inzidenz der TVP von 36% bis 44% [38, 88] ausgegangen. Dabei wurde eine jährliche Steigerungsrate von ca. 10% bei routinemäßig durchgeführten angiographischen Kontrollen bei Herztransplantierten beobachtet [88]. Betrachtet man transplantierte Herzen histologisch nach 5 Jahren, so findet sich bei nahezu allen Herzen eine TVP [12, 49].

Aufgrund der häufig diffusen Verteilung der Vaskulopathie bei der TVP sind die üblichen Interventionsstrategien der KHK selten durchführbar. Auch eine hochwirksame medikamentöse Therapie wird bisher nicht beschrieben, so dass bei ausgeprägtem Stadium der Erkrankung die Retransplantation als bisher einzige effiziente Alternative bleibt und somit die Entwicklung spezifischer Therapien von großer Bedeutung ist [69].

1.1.2 Klinik und Pathologie der Transplantatvaskulopathie

Das Krankheitsbild der TVP wurde erstmals 1968 im Rahmen einer orthotopen Herztransplantation am Hund [55] und 1969 am Menschen [84] beschrieben. Das klassische Bild der Angina pectoris wird klinisch nur selten beobachtet, da die transplantierten Herzen in der Regel denerviert sind und zunächst bei diffusem Befall nur schlanke Gefäße komplett stenosieren [12]. Außerhalb von Routineuntersuchungen führen meist Kurzatmigkeit, Synkopen, allgemeine körperliche Schwäche und Herzrhythmusstörungen zur Diagnosestellung. Natürlich können auch akuter Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod als Erstmanifestation der TVP auftreten [4]. Dabei scheint die Diagnostik mittels intravaskulärer Ultraschallbildgebung gegenüber der Angiographie insbesondere zur Detektion früher Läsionen überlegen zu sein [4, 86, 96].

Das morphologische Bild der TVP entspricht einer diffusen, häufig rasch progredienten Verdickung der Intima von Arterien, Arteriolen, Kapillaren und der Venen, wobei Gefäße des Transplantat-Empfängers ausgespart bleiben [12, 63]. Dabei sind sowohl epikardiale, als auch intramyokardiale Gefäße des

transplantierten Herzens betroffen. Der Prozess geht mit einer zunehmend konzentrischen, hyperzellulären, myointimalen Hyperplasie einher und kann bis hin zu einer raschen kompletten Stenosierung führen [12]. Dabei zeigt die Erkrankung verschiedene Befunde von einer Arteriosklerose mit Lipideinlagerungen bis hin zur klassischer Plaquebildung oder einer Arteritis mit mononukleären Zellinfiltraten. Die Intimaverbreiterung zeichnet sich durch eine hohe Dichte an proliferierenden, glatten Muskelzellen aus und betrifft die gesamte Zirkumferenz des betroffenen Gefäßes. Dabei kann in seltenen Fällen insbesondere die entzündliche Komponente bis hin zur kompletten Zerstörung der Lamina elastica interna führen [12]. Der immunhistologische Charakterisierung zufolge besteht die zellreiche intimale Proliferation hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten [12, 46].

Demnach ist die klassische KHK des nicht transplantierten Herzen klar von der TVP abzugrenzen. Sie ist in der Regel ein eher fokaler Prozess mit exzentrischer Proliferation der Intima. Insbesondere betroffen sind proximale Koronarien unter Verschonung der intramyokardialen Gefäße. Das Krankheitsbild der KHK entwickelt sich im Gegensatz zur TVP eher schleichend über Jahre, rasch progrediente Verlaufsformen sind selten (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Transplantatvaskulopathie und koronare Herzkrankheit im Vergleich

Transplantatvaskulopathie	Koronare Herzkrankheit
Wochen/ Monate	Jahre/ Jahrzehnte
diffus, distal	fokal, proximal
kapillar, venös, intramural	kein Befall der Venen
konzentrisch	meist exzentrisch
epi-/ myokardial	epikardial
Elastika meist intakt	Elastika häufig rupturiert
myointimale Hyperplasie	Atherome (Lipide, Nekrose, Kalzifizierung)

1.1.3 Pathogenese der Transplantatvaskulopathie

Die genaue Pathogenese der TVP ist noch nicht exakt geklärt. Verschiedene Ansätze, die eine multifaktorielle Genese vermuten lassen werden diskutiert.

Ein Erklärungsansatz ist der Versuch einer Unterteilung in nicht-immunologische und immunologische Faktoren, die auf das transplantierte Herz einwirken und im Verdacht stehen, die TVP zu verursachen oder zu unterhalten [90]. Allerdings gelingt eine exakte Trennung naturgemäß nicht, so dass der zugrunde liegende Pathomechanismus wahrscheinlich besser als ein, durch nicht-immunologische Faktoren modifizierter, immunologischer Prozess beschrieben wird [54].

Verschiedene Studien haben z. T. sehr variable Ergebnisse zur Evaluation von nicht-immunologischen Faktoren berichtet. So stehen u. a. Infektionen mit Cytomegalie-Virus (CMV), Chlamydia pneumonia, Herpes simplex und Parvovirus sowie Alter, Geschlecht, Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hyperhomocysteinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotin-Abusus (s. Tabelle 2) im Verdacht, Einfluss auf die Ausprägung der TVP zu haben [44, 52, 69, 93]. In einer Multicenter-Studie wurden z.B. hohes Alter und männliches Geschlecht beim Spender und Empfänger sowie Hypertonie beim Spender als Risikofaktor angesehen [24]. 50-80% der herztransplantierten Patienten leiden an Insulin-Resistenz und Hyperlipidämie. Diese Gruppe der Patienten scheint grundsätzlich signifikant häufiger an TVP zu erkranken [51]. Ein weiterer Schwerpunkt der nicht-immunologischen Faktoren sind pathologische Veränderungen des Transplantats, die durch Erkrankungen des Spenders oder auch durch Komplikationen während der Asservation, Lagerung oder Transplantation auftreten können („Input injury“) [90]. Dazu gehören beispielsweise auch Ischämie-Reperfusionsschäden [39], Hirntod des Spenders, Operations-Traumata oder vorbestehende KHK [90].

Tabelle 2: Nicht-immunologische Einflussfaktoren auf die TVP

Empfänger assoziiert:	Spender/ Transplantat assoziiert (Input injury):
Infektionen: Cytomegalie- Virus, Chlamydia pneumonia, Herpes simplex, Parvovirus	Komplikationen bei Asservation, Transport und Aufbewahrung des Transplantats
Alter, Geschlecht	Ischämie-Reperfusionsschäden
Adipositas	Hirntod des Spenders
Dyslipoproteinämie	Operations-Traumata
Hyperhomocysteinämie	KHK
Diabetes mellitus	
arterieller Hypertonus	
Nikotin-Abusus	

Allein die Tatsache, dass die Gefäße des Empfängers von der TVP ausgespart bleiben legt die Vermutung nahe, dass immunologische Faktoren eine große Rolle in der Pathogenese der TVP spielen. Diese These unterstützen im Tiermodell die Entwicklung einer TVP in allogenen Transplantatherzen mit „HLA Mismatch“ sowie das Ausbleiben einer TVP in isogenen Transplantaten [5]. Aus diesem Grund gelten die Zahl der „HLA Mismatches“ und die Anzahl an Abstoßungsreaktionen als Einflussfaktoren auf die Pathogenese der TVP [19, 80], obwohl es auch Untersuchungen gibt, die nur geringe Unterschiede zwischen Patienten mit, bzw. ohne akute Abstoßung im ersten Jahr im Bezug auf die Inzidenz der TVP zeigen [64] (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Immunologische Einflussfaktoren auf die Transplantatvaskulopathie

Immunologische Faktoren
HLA Mismatch
akute Abstoßungsreaktionen
chronische Entzündungsreaktionen

Die Schädigung des Endothels scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der TVP zu spielen. Je nach physiologischer Situation ist das Endothel in der Lage, das

lokale Gefäßmilieu, d.h. die vaskuläre Homöostase zu kontrollieren. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Kontrolle des Tonus des Gefäßes mittels dilatatorischer (Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin) [37] und konstriktorischer (z.B. Endothelin) Faktoren. Zusätzlich produziert das Endothel wachstumsfördernde und –inhibierende Mediatoren (PDGF, bFGF, TGF-beta) und regelt sowohl die Hämostase durch pro- und antikoagulatorische Substanzen, als auch inflammatorische Prozesse durch Expression chemoattraktiver Moleküle und Adhäsionsmoleküle der Zelloberfläche [53, 67, 72, 85]. So ist das Endothel für die Inhibition der Thrombenbildung und der Leukozyten-Adhäsion sowie für die Produktion von glatten Muskelzellen hauptverantwortlich [85]. Eine endotheliale Schädigung kann über diverse, z. T. noch unverstandene Mechanismen mehrere dieser Endothel-Funktionen verändern und eine Kaskade hin zur Entzündungsreaktion, Thrombosierung, Vasokonstriktion oder Proliferation von glatten Muskelfasern anstoßen. Untersuchungen konnten z.B. im Herztransplantatmodell der Ratte zeigen, dass im Rahmen der TVP der Tissue Factor, ein wichtiger Aktivator der Gerinnungskaskade, im kardialen Endothel vermehrt exprimiert wird [45]. Bekannt ist außerdem, dass Endothelzellen der Mikrozirkulation durch Ischämie und Reperfusion während der initialen Transplantation in einen aktivierten Zustand versetzt werden. Aktivierte Endothelzellen können zur Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen (auch: reactive oxygene species, im folgenden kurz: ROS) und zur folgenden Aktivierung von zirkulierenden Makrophagen und Leukozyten führen [26]. Aktivierte Makrophagen und Leukozyten wiederum sorgen für eine Entzündungsreaktion, die zur endothelialen Dysfunktion führt. Oxidativer Stress ist die charakteristische Antwort auf entzündliche Prozesse. Er kann von multiplen Enzymen durch Generierung von ROS erzeugt werden. So ist der wichtigste Erzeuger von ROS in Leukozyten die NAD(P)H-Oxidase (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-Oxidase). Weitere ROS-Produzenten, insbesondere in endothelialen Zellen, sind die Mitochondriale Oxidase, die Xanthine Oxidase und die Nitritoxid-Synthase (NOS) [40]. Durch eine vermehrte Ansammlung von ROS wird die Adhäsion von Zellen des Blutes an das vaskuläre Endothel erleichtert, indem die Produktion weiterer entzündlicher Mediatoren gesteigert wird, der Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor kappa B (im folgenden kurz: NF-κB) aktiviert wird und bereits vorhandene Adhäsionsmoleküle auf der Endotheloberfläche mobilisiert werden (s. 1.1.4). Aber auch durch aktivierte Lymphozyten wird die Produktion von Adhäsionsmolekülen (z.B. intercellular

adhesion molecule-1 im folgenden kurz: ICAM-1, vaskuläre cellular adhesion molecule-1, kurz: VCAM-1 oder E-selectin) gesteigert. Diese Molekülgruppe erleichtert die Interaktion von Entzündungszellen mit dem vaskulären Endothelium. Zusätzlich sezernieren aktivierte Endothelzellen vermehrt verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine (z.B. $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$) [67, 72], die auf die Produktion vaskulärer, glatter Muskelzellen im gesamten Gefäßsystem proliferativen Einfluss haben [53]. Dadurch ist auch eine enge Bindung zwischen T-Zelle und MHC-Antigen möglich. Des Weiteren können Adhäsionsmoleküle nach Bindung an den T-Zell-Rezeptor als Kostimulator zur Proliferation von T-Lymphozyten fungieren sowie eine T-Zell Wanderung durch das Endothelium vermitteln [3]. Zusätzlich wird ein zytotoxischer Effekt durch gesteigerte Bindung von zirkulierenden Leukozyten an das geschädigte Endothel durch ICAM-1 beschrieben [79].

Das Endothel bildet die erste mechanische, aber auch immunologische, Barriere des Empfängers zum transplantierten Organ und fungiert sowohl als immunologisches Zielorgan als auch als aktiver Kofaktor. Die Endothelzellen können insbesondere unter dem Einfluss von aktivierten Lymphozyten Alloantigene exprimieren (MHC Klasse I und II Antigene), so dass sie Zielorgan, sowohl für die humorale, als auch für die zelluläre Immunantwort werden.

Bisher gelang es nicht, die gesteigerte Expression von MHC I und Adhäsionsmolekülen abschließend im Zusammenhang mit der Pathogenese der TVP einzuordnen, jedoch scheinen z.B. ICAM-I und MHC I in transplantierten Gefäßen einen fördernden Einfluss auf die TVP zu haben [78]. Am Ende der Kaskade von Aktivierung, Dysfunktion und irreversibler Schädigung des Endothels steht die Stenosierung des Gefäßes durch Migration glatter Muskelzellen in das Endothel. Ein therapeutischer Ansatz zur Durchbrechung dieser Kaskade könnte der Einsatz von Medikamenten mit hemmender Wirkung auf Mediatoren (wie z.B. Adhäsionsmoleküle) dieses pathologischen Vorgangs sein.

1.1.4 ICAM-1 und VCAM-1 (Adhäsionsmoleküle)

Wie bereits zuvor beschrieben (s.1.1.3), spielen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Endothels [72]. Damit besetzen sie wahrscheinlich Schlüsselpositionen in der Pathogenese der TVP [78]. In den letzten Jahren sind mehrere Moleküle dieser Gruppe identifiziert worden, so dass

mittlerweile sechs Familien der Zell-Adhäsionsmoleküle bekannt sind. Adhäsionsmoleküle sind Rezeptoren der Zelloberfläche, die den Kontakt sowohl zwischen einzelnen Zellen, als auch zu Komponenten der extrazellulären Matrix vermitteln und die Migration der Entzündungszellen in die Gefäßwand ermöglichen [3, 41, 48]. Dabei sind sie hauptverantwortlich für die initiale Drosselung der Leukozyten-Geschwindigkeit und sorgen für einen zunächst lockeren Verbund mit dem Endothel („Rolling“). Innerhalb eines gut organisierten Prozesses bildet sich, insbesondere durch Adhäsionsmoleküle, ein fester Verbund („Adherence“), in dem auch die Migration durch das Endothel erfolgen kann [40]. In Abbildung 13 (s. S. 40) wird dieser Vorgang anhand einer beginnenden TVP-Läsion immunhistologisch illustriert: Leukozyten heften sich an das Endothel, während Adhäsionsmoleküle (hier in rot immunhistochemisch dargestellt ICAM-1) durch Endothel und Leukozyten exprimiert werden. Die hauptsächlich in Leukozyten und Endothelien exprimierten Adhäsionsmoleküle werden in die Immunglobulin Supergen-Familie, Integrine, Selektine, Cadherine, Proteoglykane und die Mucine unterteilt [48]. Jede Phase der Leukozyten Rekrutierung wird dabei durch verschiedene Familien der Adhäsionsmoleküle vermittelt [40] (s. Tabelle 4). Fünf Mitglieder der Immunglobulin Supergen-Familie sind insbesondere für die Leukozyten-Endothel Interaktion von Bedeutung: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, platelet endothelial cellular adhesion molecule-1 und mucosal addressin CAM-1 (im folgenden kurz: PECAM-1 und MAdCAM-1) [40, 91] (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Funktion und Lokalisation von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin Supergen-Familie [40]

Adhäsionsmoleküle	Lokalisation	Funktion
ICAM-1	Endothel, Leukozyten	Adhäsion, Emigration
ICAM-2	Endothel, Leukozyten, Thrombozyten	Adhäsion, Emigration
VCAM-1	Endothel	Adhäsion
PECAM-1	Endothel, Leukozyten, Thrombozyten	Adhäsion, Emigration
MAdCAM-1	Endothel	Adhäsion, Emigration

Zirkulierende, lösliche zelluläre Adhäsionsmoleküle könnten in der Zukunft eine noch größere Bedeutung als Marker für die Schwere entzündlicher Herzerkrankungen erlangen [60]. Dabei scheinen insbesondere ICAM-1 und VCAM-1 eine wichtige Rolle im Rahmen der TVP sowie der Transplantatabstoßung zu spielen [3, 5, 62, 78]. Während Adhäsionsmoleküle beim gesunden Menschen noch auf einem niedrigen Level exprimiert werden, kommt es bei einer pathogenen Abstoßungsreaktion zur Hochregulierung [82]. Hierbei scheint die VCAM-1-Expression mit dem Grad der Abstoßung am menschlichen Herzen positiv zu korrelieren [3, 17]. In vitro werden Adhäsionsmoleküle durch Stimulation von diversen Zytokinen vermehrt exprimiert [47]. Dadurch können auch aktivierte, zirkulierende Lymphozyten zunächst unspezifisch an das Endothel binden. In einem zweiten Schritt entsteht aus einer unspezifischen Verbindung durch die Vermittlung von Adhäsionsmolekülen eine spezifische Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Antigen. Sobald die Bindung über den T-Zell-Rezeptor erfolgt, wird die Produktion von Lymphozyten und ihre Diapedese durch das Endothel weiter stimuliert [25, 29, 47,89].

VCAM-1 wird sowohl durch vaskuläre, als auch durch nicht-vaskuläre Zellen exprimiert [65]. Es ist leukozyten-selektiv und seine Expression findet durch Monozyten, Lymphozyten, eosinophile sowie basophile Granulozyten, jedoch nicht durch neutrophile Granulozyten statt [5]. Zahlreiche Autoren äußern den Verdacht, dass VCAM-1 und andere Adhäsionsmoleküle auch in der Pathogenese der

Arteriosklerose des nicht-transplantierten Patienten eine Rolle spielen. So konnte VCAM-1 in Plaques bei fortgeschrittener Arteriosklerose nachgewiesen werden [62].

ICAM-1 wird normalerweise von vaskulären Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und aktivierten Lymphozyten sezerniert [28, 68]. Durch die gesteigerte Bindungsfähigkeit von zirkulierenden Leukozyten an das geschädigte Endothel wurde zusätzlich ein zytotoxischer Effekt von ICAM-1 beschrieben [79]. ICAM-2 wird in ruhenden Endothelzellen exprimiert und wird von der endothelialen Aktivierung nicht beeinflusst [40].

Im Rahmen von Ischämie-Reperfusionstraumata wurde insbesondere die Rolle von ICAM-1 ausgiebig untersucht. Dadurch konnte eine Verbesserung des Befundes nach Ischämie-Reperfusionstraumata durch Blockade von ICAM-1 mit Antisense Oligodeoxynucleotiden oder auch monoklonalen Antikörpern beobachtet werden [30, 81]. ICAM-1 defiziente Mäuse weisen eine Reduktion des leukozytären Infiltrates und der T-Zell Antwort auf [95]. Neben der Wirkung auf Leukozyten wird ICAM-1 auch eine Rolle bei der Migration von glatten Muskelzellen innerhalb der Gefäßwand beigemessen [77].

Insbesondere im Rahmen der TVP ist der genaue Vorgang, der zur Expression von ICAM-1 und VCAM-1 führt nicht bekannt. Eine Schlüsselrolle könnte aber eine vermehrte Produktion von ROS spielen, die besonders während allgemeiner Entzündungsreaktionen und im Zusammenhang mit Ischämie-Reperfusionstraumata beobachtet wurden [26, 40, 58]. Die Wichtigkeit von ROS in der initialen Leukozyten- und Thrombozyten-Endothel Adhäsion wurde insbesondere in Studien mit Reagenzien, die die Produktion von ROS hemmen (N-acetylcysteine (im folgenden kurz: NAC), Pyrrolidin Dithiocarbamat (im folgenden kurz: PDTC)) oder neutralisieren (Superoxid-Dismutase (SOD)) gezeigt [2, 58]. Bei vielen der bekannten Einflussfaktoren der TVP (s. Tabelle 2) [90] spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und führt über eine direkte oder indirekte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des Aktivierungs-Protein-1 (im folgenden kurz: AP-1) zur Gen-Transkription bzw. Expression von Adhäsionsmolekülen [40, 58, 76]. Unabhängig von der Protein-Synthese wird die de novo Expression von Genen, die in Endothelzellen induziert werden, hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene reguliert. Aus diesem Grund ist zur frühen Induktion dieser Gene die Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren notwendig [35]. Für die Aktivierung des Endothels müssen eine Reihe von Genen induziert werden, um die

Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1), aber auch von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- β) und pro-thrombotischen Molekülen (Tissue-factor, plasminogen activator inhibitor) zu ermöglichen [35]. Insbesondere der ubiquitäre Transkriptionsfaktor NF- κ B scheint für die Hochregulierung von Genen der endothelialen Aktivierung und somit auch von ICAM-1 und VCAM-1 wichtig zu sein [9, 35]. Außerdem konnte AP-1 in der Promoter-Region von Genen für endotheliale Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden [40]. Neben oxidativem Stress konnte in vitro eine direkte oder indirekte Aktivierung von NF- κ B in endothelialen Zellen nach Stimulierung mit PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), TNF (Tumor-Nekrose-Faktor), IL-1, Endotoxin, H₂O₂ und durch Virus-Infektion u. a. erreicht werden [6, 14, 66, 76, 95]. Vor der Aktivierung findet sich der transkriptionale Aktivator NF- κ B im Zytoplasma der inaktiven Endothelzellen zunächst in Verbindung mit seinem Inhibitor-Protein I κ B- α . Im Rahmen einer Aktivierung der Zelle durch beispielsweise TNF oder LPS (Lipopolysaccharide) wird I κ B- α phosphoryliert, so dass eine Proteolyse bis hin zur Abspaltung des NF- κ B-Dimers erfolgen kann [9]. Daraufhin können insbesondere die aktiven Untereinheiten p50 (auch NF- κ B1, ein 48-55 kd DNA-bindendes Protein) und p65 (auch RE1A, ein 65-68 kd DNA-bindendes Protein) in den Nukleus transmigrieren und an die Ziel-DNA-Sequenz binden, womit die Transkription aktiviert wird [9, 35, 50, 87]. Durch NF- κ B regulierte Gene werden für die Kodierung von Proteinen der endothelialen Aktivierung verantwortlich gemacht und spielen bei der Sofortantwort auf diverse Pathogene, Infektionen und Stress eine entscheidende Rolle [9].

Es sind bereits mehrere Inhibitoren von NF- κ B bekannt. Zu diesen Inhibitoren zählen Antioxidantien (beispielsweise NAC und α -Liponsäure) [76, 97], Sulfasalazine [34], Steroide u. a. Immunsuppressoren sowie Protease-Inhibitoren [9]. Aus dieser Erkenntnis folgt auch der Versuch, die TVP über eine Hemmung von NF- κ B und damit auch über eine Inhibierung der Sekretion von Adhäsionsmolekülen medikamentös zu beeinflussen. Ein Ansatz zur Beeinflussung dieses Pathogenese-Konzeptes ist die Anwendung von Antioxidantien in Form von z.B. α -Liponsäure (s. 1.1.5).

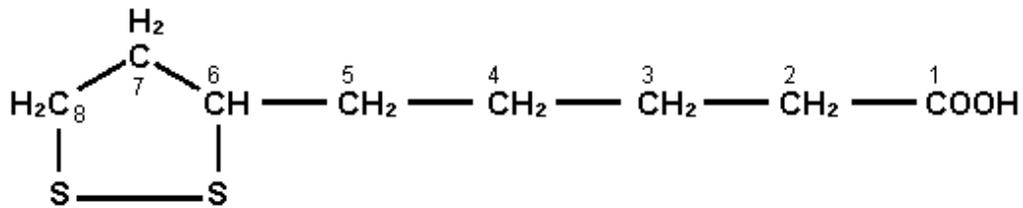
1.1.5 α -Liponsäure (Antioxidantien)

α -Lipoate sind seit den 50er Jahren als natürlich vorkommende, essentielle Kofaktoren im oxidativen Metabolismus bekannt. Die α -Liponsäure ist ein zyklisches

Disulfid der Oktan-6,8-dithiolsäure (s. Abbildung 1). Im englischen ist sie auch unter dem Begriff "1,2-dithiolan-3-pentanoic acid, 1,2-dithiolane-3-valeric acid und 6,8-thioctic acid" bekannt. α -Liponsäure wird seit über 30 Jahren in Deutschland zur Behandlung von Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus, wie z.B. der Polyneuropathie angewendet [97]. Durch radioaktive Markierung konnte im Tierexperiment (Ratte, Hund) mit 80 – 90 % ein überwiegend renaler Ausscheidungsweg über Metaboliten gezeigt werden [30]. In seiner freien, nicht an Proteine gebundenen, Form ist α -Liponsäure neben seiner Rolle als Kofaktor im oxidativen Metabolismus ein potentes Antioxidans und ist in der Lage Metall-Chelate zu bilden. α -Liponsäure wird von diversen Zellen, so auch Endothelzellen, aufgenommen und in den Mitochondrien zum potenten Antioxidans Dihydroliponsäure (im folgenden kurz: DHLA) reduziert. DHLA wird von intrazellulär nach extrazellulär transportiert [10]. Sowohl DHLA, als auch α -Liponsäure fungieren wahrscheinlich als Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung (s. 1.1.4), so dass NF- κ B häufig auch als redox-sensitiver Transkriptions-Faktor bezeichnet wird [71, 97]. Für diese These sprechen, dass 1. mehrere der bekannten Stimuli von NF- κ B (z.B. TNF- α , LPS, IL-1) für eine vermehrte ROS-Produktion bekannt sind [75], 2. H₂O₂ direkt die NF- κ B Aktivierung stimuliert [75, 76] und 3. bereits diverse Antioxidantien bekannt sind, die eine Aktivierung von NF- κ B blockieren können (z.B. PDTC, NAC, Vitamin E Derivate) [59, 76, 97].

Des Weiteren konnte eine Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen durch α -Liponsäure in - durch TNF- α stimulierten - humanen Endothelzellen der Aorta über eine Hemmung der I κ B- α / NF- κ B-Signalkette (s. 1.1.4) gezeigt werden [97]. Die Vermutung liegt also nahe, dass α -Liponsäure auf die Aktivierung von NF- κ B, auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und auf die Aktivierung anderer durch NF- κ B regulierte Gene inhibierend wirkt. Zusätzlich spielt der oxidative Stress in der Pathogenese vieler Einflussfaktoren der TVP (wie z.B. Ischämie-Reperfusionstraumata, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Nikotin-Abusus, Hypercholesterinämie, Hyperhomozysteinämie, Arteriosklerose und allgemein Entzündungsreaktionen) eine wichtige Rolle [26, 40]. Die Anwendung von α -Liponsäure könnte nicht nur bei der Suche nach einem suffizienten Therapieansatz, sondern auch zum besseren Verständnis der Pathogenese der TVP beitragen.

Abbildung 1: α -Liponsäure ist ein zyklisches Disulfid der Oktan-6,8-dithiolsäure



1.2 Fragestellung

Unter der Vermutung, dass die Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen (insbesondere ICAM-1 und VCAM-1) induzierend oder stimulierend auf den Prozess der TVP wirken, wurde im Rahmen einer tierexperimentellen Studie die Entwicklung der TVP im Herzen unter der Verabreichung von α -Liponsäure untersucht. α -Liponsäure ist ein Kofaktor im oxidativen Metabolismus, ein potentes Antioxidans sowie ein Chelatbildner und steht im Verdacht die Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 zu hemmen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen des Versuchsaufbaus wurden zunächst allogene heterotope Herztransplantationen, im Tierversuch durchgeführt. Dabei wurden Herzen von Lewis-Ratten (Lew, RT1) explantiert und Fisher-Ratten (F-344, RT1) implantiert.

In der Folge wurden 2 Gruppen gebildet (siehe 2.2.4), die eine unterschiedliche medikamentöse Behandlung erfuhren. Ein postoperatives Monitoring (siehe 2.4) der Transplantatfunktion und des Gewichtes wurde durchgeführt.

120 Tage nach Transplantation erfolgte die Organentnahme (siehe 2.6) mit anschließenden histologischen, immunhistochemischen und morphologischen Untersuchungen der Herzen, speziell der Blutgefäße (siehe 2.7 und 2.8).

2.2 Versuchstiere

Zur Durchführung des oben aufgeführten Versuchsaufbaus und den damit verbundenen Operationen wurden gesunde Ratten des Tierzuchtlabors Charles River Deutschland GmbH in Sulzfeld, Deutschland verwendet. Dabei handelte es sich um männliche Inzuchtratten mit einem Körpergewicht von 160-300 g. Die verwendeten Rattenstämme sind MHC-I- und MHC-II-kompatibel und unterscheiden sich lediglich in ihren minor-, non-MHC-Antigenen [1].

Ein durch das Tierzuchtlabor ausgestelltes Gesundheitszeugnis belegte die Abwesenheit von relevanten Infektionskrankheiten.

Die Spenderherzen wurden von Lewis-Ratten (Lew, RT1) entnommen und in Fisher-Ratten (F-344, RT1) transplantiert.

2.2.1 Tierversuchsgenehmigung

Zur Durchführung von Tierversuchen lag eine „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ vom 13.11.1999 unter dem Aktenzeichen 17a/ 19c/20 / 15(1) / 39 – 95 – Gi20 / 14 - 1 / 95 – vor.

2.2.2 Finanzierung

Die Versuche wurde im Rahmen des Sonderforschungsprojektes SFB 1622 der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter Leitung von PD Dr. W. Haberbosch und PD Dr. H. Hölschermann finanziert.

2.2.3 Tierhaltung und Betreuung

Die Ratten wurden während der gesamten Versuchsdauer in Gruppen von höchstens 2 Tieren in Käfigboxen in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ernährt wurden die Tiere mit pelletierter Fertignahrung (Altromin, Labortierservice, Lage-Lippe) und frischem Wasser aus Trinkflaschen. Ein Fertignahrung- und Wasserreservoir war an jeder Tierbox vorhanden und für jede Ratte ständig verfügbar (ad libitum). Die Pflege und Betreuung der Tiere wurde von einer ausgebildeten Tierpflegerin durchgeführt.

2.2.4 Gruppenbildung (α -Liponsäure vs. Kontrollgruppe)

Insgesamt wurden 15 Lewis-Rattenherzen in 15 Fisher-Ratten transplantiert. Aus dieser Grundgesamtheit (n=15) wurden randomisiert zwei Gruppen gebildet:

1. Verum-Gruppe: bei 9 transplantierten Tieren erfolgte eine Applikation von α -Liponsäure (Thioctazid®, ASTA Medica AWD Vertriebs GmbH, Frankfurt a. M) (n=9)
2. Kontroll-Gruppe: bei 6 transplantierten Tieren erfolgte eine Applikation von 0,9% NaCl (n=6)

Um eine echte negativ Kontrollen zu erhalten, wurden außerdem jeweils zwei nicht-transplantierten Fisher- und Lewis-Ratten (n=4) Funktionsherzen entnommen und histologisch untersucht. Diese Ratten erhielten keine Medikation, wurden aber ansonsten über einen Zeitraum von 120 Tagen wie transplantierte Ratten behandelt (Futter usw.).

2.3 Technik der heterotopen Herztransplantation

Sämtliche Operationen wurden von Marion Kaiser am medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I des Universitätsklinikum Gießen durchgeführt.

2.3.1 Narkose und allgemeine OP-Vorbereitung

Zur Einleitung der Narkose wurde Äther mittels Inhalation benutzt. Dann wurde das Tier zunächst im Bereich des Thorax und des Abdomen unter Fixierung in Rückenlage rasiert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Narkose auf ein Barbiturat (Pentobarbital) umgestellt. Dieses tröpfelte der Operateur in den Bauchraum, so dass es über das Peritoneum resorbiert werden konnte. Dabei wurde initial ein Bolus von 0,4 ml eines 1:3 Pentobarbital (Nembutal®)/ 0,9% NaCl-Gemisches appliziert. Eine gleichzeitig relaxierender Wirkung des Medikamentes war erwünscht. Abhängig von der Narkosetiefe wurde tropfenweise nachtitriert.

2.3.2 Allogene heterotope Herztransplantation

Die gesamte Präparation und Transplantation wurde aufgrund der geringen Größe der Rattenorgane und des Gefäßsystems unter dem Operationsmikroskop Zeiss Universal S 3 (Fa. Zeiss, Wetzlar, Deutschland), unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischem Instrumentarium, durchgeführt. Dabei wurden sämtliche Operationen an den Ratten nach einer modifizierten Methode der heterotopen Herztransplantation nach I. Heron [42, 74] durchgeführt. Nach Einleitung der Narkose (s. 2.3.1) des Empfängertieres, wurde zunächst eine mediale Laparotomie durchgeführt.

Nachdem die linksseitigen Nierengefäße inklusive Arteria und Vena renalis dargestellt werden konnten, erfolgte eine temporäre Unterbindung des Blutstroms durch die V. renalis mittels Gefäßklemme im proximalen Bereich. Hilusnahe wurden die V. renalis und ihre Abgänge ligiert. Für sämtliche Ligaturen wurde Ethicon-Perma-Handseide® (schwarz, geflochten, 0,5 metric, 7-0) verwendet. Das Gefäß wurde dann mit Hilfe eines ca. 5 mm langen und 2 mm durchmessendem Plastikröhrchens (Cuff) für die Anastomosierung vorbereitet [74]. Für dabei notwendige Haltenähte wurde 7/0 Prolene® (0,5 metric, monofil, Ethicon) verwendet. In ähnlicher Weise wurde, bei geringfügig abweichenden anatomischen Begebenheiten der Vena renalis, auch die Nierenarterie für eine Transplantation vorbereitet. Aufgrund der kleinkalibrigeren Arteria renalis wurde allerdings ein Cuff mit kleineren Ausmaßen verwendet (Länge: 3 mm, Innendurchmesser: 1mm). Nach Überprüfung der Durchgängigkeit beider Anschlüsse (venös und arteriell) wurde die linke Niere

vollständig entfernt. Während der Vorbereitung des Spendertieres und der Transplantatentnahme wurde das Operationsfeld feucht abgedeckt.

Spendertier und Empfängertier erhielten die gleiche Narkose (2.3.1). Um das Herz beim Spendertier freizulegen erfolgte die mediale Laparotomie mit Durchtrennung des Zwerchfells und sämtlicher Rippen möglichst weit dorsal. Venae carva superior et inferior wurden ligiert und anschließend Arteria pulmonalis und Aorta ascendens durchtrennt. Über dem Aortenstumpf wurde das Herz mit ca. 3-5 ml einer 0,9% NaCl-Lösung bei 4°C retrograd gespült (Kardioplegie), so dass die warme Ischämiezeit nur wenige Minuten betrug. Nachdem mit einer Sammelligatur auch die Venae pulmonalis unterbunden wurden, konnte das Transplantatherz entnommen werden.

Unmittelbar nach der Explantation des Herzens wurden die nicht verschlossenen Herzgefäße (Aorta ascendens und Arteria pulmonalis) mit den linksseitigen Nierengefäßen anastomosiert:

Die Aorta ascendens des Transplantats wurde über den arteriellen Cuff, die Arteria pulmonalis über den venösen Cuff des Empfängers gezogen und mit einer Ligatur fixiert.

Diese Art der Anastomosierung hatte zur Folge, dass das Transplantat retrograd über die Arteria renalis des Empfängertieres und den Aortastumpf des Spenderherzens mit arteriellem Blut durchströmt wurde. Auch aufgrund der operationsbedingten Flussrichtung erlangte das Transplantat keine hämodynamische Funktion. Nach Freigabe der Blutzirkulation füllten sich die Koronarien sofort antegrad mit Blut und bereits nach ca. 40 s begann das Herz wieder spontan zu schlagen. Anschließend wurde das Abdomen zweischichtig vernäht. Je nach Tiefe der Narkose erwachte das Empfängertier innerhalb von einigen Minuten unter einem Warmluftgebläse.

Die kalte Ischämiezeit für das Herztransplantat betrug in der Regel 5 bis 10 Minuten, die gesamte Operation dauerte 60 bis 90 Minuten.

Das Blut fließt nach erfolgreicher Transplantation durch die Arteria renalis (Empfängertier) über den arteriellen Cuff retrograd in die Aorta ascendens (Spenderherz). Dann kann antegrad über die Koronararterien und das folgende kapillare Bett die Versorgung des Herzmuskels mit sauerstoffreichem Blut erfolgen. Nach Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff gelangt das Blut über den Sinus

coronarius in den rechten Ventrikel und wird über den venösen Cuff via Vena renalis in die Vena cava inferior geführt.

2.4 Postoperatives Monitoring

2.4.1 Gewichtskontrolle

Als ein Indikator für den Allgemeinzustand der Tiere wurden die Ratten täglich gewogen und eine Wachstumskurve über den gesamten Versuchszeitraum von 120 Tagen erfasst (s. 2.8.1).

2.4.2 Transplantatfunktion

Um die Funktion des transplantierten Herzens zu kontrollieren, wurde ein Palpations-Score erhoben. Dabei wurden die transplantierten Herzen täglich palpiert und die Herzaktion beurteilt. Werte zwischen 0 und 3 wurden verteilt, wobei Herzen ohne palpable mechanische Aktion den Wert 0 und Herzen mit kräftiger und rhythmischer Aktion, den Wert 3 erhielten (s. 2.8.2).

2.5 Applikation der Medikamenten

Standardisiert wurde allen transplantierten Tieren, unabhängig von der randomisierten Verteilung auf Verum- bzw. Kontrollgruppe, Ciclosporin-A (Sandimmun®, Sandoz, Ltd., Basel, Schweiz) verabreicht. Zusätzlich erhielt der eine Teil der Ratten α -Liponsäure (Thioctazid®, ASTA Medica AWD Vertriebs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland), dem anderen wurde lediglich NaCl 0,9% injiziert (2.2.4). Dabei wurde die Applikation streng intra peritoneal (i.p.), täglich, zur jeweils gleichen Tageszeit, vorgenommen. Dafür wurde die Ratte im Bereich der Schwanzbasis manuell kurz fixiert, die Hinterläufe des Tieres angehoben und das Medikament von anterior-inferior mit der anderen Hand injiziert.

2.5.1 Immunsuppression

Zur Prophylaxe einer Transplantatabstoßung, wurde allen Empfängertieren das Immunsuppressivum Ciclosporin A (Sandimmun ®, Sandoz, Ltd., Basel, Schweiz), in standardisierter Dosis, über 120 Tage post operationem appliziert.

Nach einer ersten, intraoperativen Dosis wurden täglich 2mg/kg Körpergewicht i.p. verabreicht. Beginnend mit dem 80. Tag (postoperativ) bis zum Ende der Studie, nach 120 Tagen, wurde die Menge auf $\frac{1}{4}$ der Ausgangsdosis reduziert (0,5 mg/kg Körpergewicht). Die injizierte Lösung hatte eine Konzentration von 2 mg Ciclosporin auf 1 ml NaCl (0,9%).

2.5.2 α -Liponsäure

Beginnend mit dem OP-Tag erhielten alle Tiere der Verum-Gruppe täglich α -Liponsäure (Thioctazid®, ASTA Medica AWD Vertriebs GmbH, Frankfurt a. M.), in einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht. Dabei wurde die α -Liponsäure zusammen mit Ciclosporin, wie unter 2.5 beschrieben, streng intra peritoneal injiziert. Die Dosierung wurde bis zum Ende der Studie beibehalten (120 Tage post operationem). Zusätzlich zur täglichen Ciclosporin-Gabe wurde den Tieren der Placebogruppe, entsprechend ihrem Körpergewicht, eine 0,9%ige Kochsalzlösung injiziert.

2.6 Organentnahme und Asservation

Nach 120 Tagen wurden aus den drei Versuchsgruppen alle Herzen (transplantierte und native) entnommen. Vor Ende des Versuchs wurden Rattengewicht und Funktion des transplantierten Herzens abschließend dokumentiert (s. 2.4).

Das Empfängertier wurde mit inhalativem Äther tief narkotisiert, daraufhin das transplantierte Herz explantiert, makroskopisch beurteilt und asserviert.

Zu diesem Zweck wurde das Abdomen durch einen ca. 10 cm langen Schnitt vom Xiphoid nach kaudal eröffnet und der Thorax, nach latero-dorsaler Rippendurchtrennung, aufgeklappt. Nach erfolgreicher Kanülierung der Aorta abdominalis zur kompletten Blutentnahme (Exsanguierung), wurde abschließend das transplantierte Herz entnommen.

Im Rahmen der Asservation wurde das Herz durch Transversalschnitte in fünf gleich dicke Scheiben unterteilt. Vier dieser Scheiben wurden mit dem Einbettungsmedium Tissue-Tec® (O.C.T, 4583 Compound, Sakura Finetek Europe B.V. Zoeterwoude, Niederlande) auf nummerierte Korkplättchen (1-4) fixiert. Dabei befand sich die Scheibe der Herzspitze auf Platte 1 und die Scheibe der Herzbasis auf Platte 4. Diese komplett mit Tissue-Tec® bedeckten Präparate wurden dann

sofort einzeln in gekühltem Isopentan schockgefroren. Zuvor war das verwendete Isopentan bis zur Kristallbildung in flüssigem Stickstoff gekühlt worden. Die so gewonnenen Herz-Tissue-Tec® -Präparate wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen bei -80°C für spätere Gefrierschnitte gelagert. Jeweils vier Scheiben des transplantierten und des originären Herzens wurden auf diese Weise asserviert. Nur die mittlere Scheibe (Scheibe 3 = Ventrikelbereich) beider Herzen wurde primär in Formalin fixiert, um nach ca. 24 Stunden in Paraffin eingebettet zu werden.

Die gesamte Organgewinnung wurde in einem standardisierten Asservationsprotokoll dokumentiert und dauerte ca. 1 Stunde pro Versuchstier.

2.7 Histologische Aufarbeitung

Nach ordnungsgemäßer Lagerung wurden aus den asservierten Gewebeproben der Herzen (s. 2.6) serielle Gefrier- und Paraffinschnitte auf Objektträgern hergestellt, die nach verschiedenen histochemischen Methoden gefärbt wurden (s. a. Anleitungen, Ansätze und Reagenzien). Dabei kamen sowohl Standardmethoden, als auch immunhistochemische Methoden zum Einsatz. An allen Herzen wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen, s. 2.7.2), Elastika-Färbungen nach Weigert (s. 2.7.3), und in abgewandelter Form Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbungen durchgeführt (s. 2.7.4). Dabei wurden für die APAAP-Färbungen die primären Antikörper ICAM-1 (CD54) (monoclonal Anti-Rat, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) und VCAM-1 (C-19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) sowie diverse Detektions- und Brückenantikörper benutzt [22, 36]. Während, aufgrund von verschiedenen Voruntersuchungen, für die Elastika-Färbungen nach Weigert und für die immunhistologischen Färbungen ausschließlich Gefrierschnitte verwendet wurden, wurden für die HE-Färbungen Paraffinschnitte verwendet.

2.7.1 Einbettung, Lagerung und Schnitttechnik

Nachdem die Herzen aus dem Ratten-Situs entnommen wurden, wurden sie mit dem Skalpell in fünf gleich große Gewebescheiben unterteilt (s. 2.6). Die 3. Herzscheibe (Ventrikelbereich) wurde dann für mindestens 24 Stunden, jedoch nicht länger als 72 Stunden, in 4%-igen Formalin fixiert und anschließend im Eingangslabor der Justus-

Liebig-Universität (pathologisches Institut) in Paraffin eingebettet. Die spätere Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei 14°C im abgedunkelten Raum.

Mit dem Mikrotom (Modell Jung SM2000R, Leica, Nussloch) wurden von jedem Paraffinblock histologische Schnitte von 2-4 µm Dicke angefertigt. Dabei repräsentierten die Schnitte einen Querschnitt durch das jeweilige Herz in der entsprechenden Höhe. Nachdem die Präparate bei 45 °C im Wasserbad gestreckt wurden, wurden sie auf spezielle Objektträger (Typ Superfrost/ 72x 26 mm, Menzel, USA) aufgezogen. Zur besseren Haftfähigkeit wurden die Objektträger vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach Trocknung über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C wurden die Paraffinschnitte bei durchschnittlich 14 °C abgedunkelt gelagert.

Der größte Teil des asservierten Materials (Gewebescheibe 1, 2, 4 und 5) wurde jedoch, nach vorheriger kompletter Eindeckung mit Tissue-Tec® , nativ in flüssigem Isopentan, möglichst gewebeschonend schockgefroren (s. 2.6). Die so gewonnenen, schockgefrorenen Herzscheiben auf Korkplättchen (vier Gewebescheiben pro Rattenherz) wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen aufbewahrt (pro Ratte ein Röhrchen) und anschließend verschlossen, in speziellen, gefächerten Stickstofftonnen gelagert. Bei Normaldruck hat der bei Raumtemperatur ständig siedende Stickstoff eine Temperatur von -195,75°C.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Falcon-Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff in die Schneidekammer des Kryotoms (Modell Jung CM 3000, Leica, Nussloch) überführt, wo die gefrorenen Gewebeproben auf den Korkplatten bei -28°C (±5°C) aus den Falcon-Röhrchen herausgenommen wurden. Die Gewebeproben wurden dann samt Korkplatten mittels Tissue-Tec® an einen Objekthalterstempel festgefroren.

Im nächsten Schritt wurden multiple ca. 5 µm dicke Gefrierschnitte erstellt und über Wärmeadhäsion auf Objektträger aufgezogen, wobei wiederum vergleichbare horizontale Querschnitte in der jeweiligen Höhe des Rattenherzens gewonnen wurden. Die Präparate wurden anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung in einem Gefrierschrank bei -40 °C gelagert.

2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur grundsätzlichen mikroskopischen Beurteilung der Abstoßungsreaktion am transplantierten Herzen wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Färbungen an Paraffinschnitten (s. 2.7.1) durchgeführt.

Vor Anfärbung der Präparate erfolgte zunächst die Entparaffinierung im 10minütigen Xylolbad. Anschließend wurden die Präparate auf den Objektträger für jeweils 3 Minuten durch Alkoholbäder mit absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%, 50%, 30%) wieder in ein wässriges Milieu überführt. Nach einer 3-minütigen Aqua destillata - Spülung, wurden die Präparate, auf – jetzt schlierenfreien - Objektträgern, mit Hämalaun für 7 Minuten gefärbt (Kernfärbung).

Die Präparate wurden dann mit Leitungswasser über 10 Minuten gespült.

Nach einer Gegenfärbung mit Eosin (1%, 4 Minuten) wurden die Präparate in Alkoholbädern in jetzt aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 96%, 100%), für je 3 Minuten getaucht. Abschließend wurden die Präparate bis zum zeitnahen Eindecken mit Diatex (Ferdinand Hammer, Frankfurt a. M.) im Xylol-Bad aufbewahrt. Die Auswertung dieser Präparate insbesondere bzgl. der Abstoßungsreaktion wird im Kapitel 2.8.3 ausführlich besprochen.

2.7.3 Elastika-Färbungen nach Weigert

Zunächst wurden mit den vorhandenen Gefrierschnitten (Gewebescheiben 1, 2, 4, und 5, s. 2.7.1) standardisiert Elastika-Färbungen nach Weigert durchgeführt, um eine mögliche Intimaproliferation im Rahmen der TVP besser beurteilen zu können. Hier kamen insbesondere elastische Strukturen wie z.B. die Membrana elastica interna zur Darstellung.

Die Gefrierschnitte wurden nach Entnahme aus dem Gefrierschrank zunächst bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 10 Minuten in Aceton fixiert und erneut luftgetrocknet. Dann erfolgte zunächst eine Resorcin-Fuchsin-Färbung über 20 Minuten sowie danach ein kurzes Aqua destillata-Bad. Zur weiteren Differenzierung kamen die Schnitte dann in 80% Alkohol und danach erneut in ein Aqua destillata-Bad. Im Anschluss erfolgte die Eisenhämoxylin-Färbung nach Weigert über 5 Minuten. Nach einem Leitungswasser-Bad über 5 Minuten wurde die aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 70%, 96%) durchgeführt. Zum Abschluss wurden sämtliche Präparate nach einem Xylol-Bad mit Diatex eingedeckt. Eine ausführliche

Besprechung der Auswertung dieser Präparate insbesondere bzgl. der TVP erfolgt in Kapitel 2.8.4.

2.7.4 APAAP-Färbungen

Alle in Form von Gefrierschnitten aufgearbeiteten Gewebeproben wurden zusätzlich standardisiert mit einer modifizierten, äußerst sensitiven Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)- Methode gefärbt (s. Anleitungen) [22, 36].

Bei dieser immunhistochemischen Methode geht der primär verwendete Antikörper einen Komplex mit dem darzustellenden Antigen ein, so dass das Antigen sowie die antigenexprimierenden Zellen zur Darstellung kommen können. Eine Amplifikation der Reaktionsstärke wird durch wiederholte Inkubation von Brücken- und Detektionsantikörpern erreicht. Die Detektion der letztendlichen Enzymreaktion erfolgte mit Neufuchsin, so dass sich das Zielantigen (z.B. ICAM-1) rot darstellt.

Als primäre Antikörper wurden einerseits der monoklonale Antikörper ICAM-1 (CD54) (Anti-Ratte, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) aus der Maus, sowie andererseits der polyklonale Antikörper VCAM-1 (C-19) (Anti-Human, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) aus der Ziege verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden diverse Verdünnungsreihen durchgeführt und die weiteren Detektions- und Antikörperkonzentrationen optimiert (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen: ICAM-1- und VCAM-1-Färbung (APAAP)

ICAM-1 Färbung: Antikörper	Konzentration	VCAM-1 Färbung: Antikörper	Konzentration
1. ICAM-1 (Anti-Ratte aus d. Maus)	1:400	1. VCAM-1 (Anti-Human aus d. Ziege)	1:200
2. Kaninchen-Anti-Maus Ak (Link)	1:40	2. Maus-Anti-Ziege-Ak	1:500
3. Detektions-Ak APAAP Maus	1:50	3. Kaninchen-Anti-Maus Ak (Link)	1:40
		4. Detektions-Ak APAAP Maus	1:50

Die Gefrierschnitte wurden nach Entnahme aus dem Gefrierschrank zunächst bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 10 Minuten in Aceton fixiert und erneut luftgetrocknet. Danach wurden anatomisch gleichartige Gefrierschnitte mit ICAM-1 (Verdünnung 1:400) oder VCAM-1 (Verdünnung 1:200) über 30 Minuten inkubiert. Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper wurden mit RPMI (s. Ansätze und Reagenzien) verdünnt. Pro Rattenherz wurden jeweils vier ICAM-1- und vier VCAM-1-Antikörperfärbungen durchgeführt (d.h. zwei APAAP-Färbungen pro Herzscheibe).

Nach jeder Inkubation mit einem Antikörper erfolgten - getrennt nach Antikörpern - standardisierte Spülungen mit Tris-Waschpuffer.

Bei der VCAM-1 Färbung wurde zur Anbindung an den primären Antikörper aus der Ziege zusätzlich ein Maus-Anti-Ziege-Antikörper (Verdünnung 1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridgeshire, UK) als Brücken-Antikörper eingesetzt und über 30 Minuten inkubiert (s. Tabelle 5). Danach wurden beide Antikörperfärbungen gemäß dem APAAP-System mit einem monoklonalen Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper (Verdünnung 1:40, DAKO, Glostrup, Dänemark) und anschließend mit dem Detektionsantikörper APAAP Mouse Monoclonal (Verdünnung 1:50, DAKO, Glostrup, Dänemark) über jeweils 30 Minuten inkubiert. Beide Inkubationsvorgänge wurden außerdem für jeweils 10 Minuten wiederholt (s. Anleitungen). Um eine speziesabhängige Kreuzreaktion des Antikörpers mit Serumproteinen der Ratte (unspezifische Hintergrundreaktivität) zu unterdrücken, wurden sowohl dem Maus-Anti-Ziege-Antikörper, als auch dem Kaninchen-Anti-Maus Antikörper Rattenserum (Verdünnung 1:750, Dianova, Hamburg) hinzu gegeben.

Im Anschluss an die Inkubationsschritte wurde die enzymatische Detektion der im Schnitt gebundenen alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin (100 µg/ml) und gleichzeitiger Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase durch Laevamisol (400µg/ml) bei einem pH 8.8 durchgeführt.

Hierzu wurden volumenabhängig Naphtol-AS-BI-Phosphat in N, N-Dimethylformamid und Entwicklungspuffer (s. Ansätze) gelöst. Getrennt wurden Neufuchsin und Laevamisol ebenfalls in Entwicklungspuffer aufgelöst. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben und auf pH-Wert 8.8 eingestellt. Die Entwicklerlösung wurde

rasch filtriert und auf einzelne Glasküvetten verteilt. Die Inkubation der Schnitte in der Entwicklerlösung erfolgte für 20 Minuten auf dem Rüttler bei ca. 150 Umdrehungen/Minute. Um die Zellstrukturen sichtbar zu machen, wurde nach kurzem Spülen unter Leitungswasser, eine Gegenfärbung mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Eine Detektion von ICAM-1 und VCAM-1 zeigte sich durch eine Dunkelrot-Färbung. Zur Eindeckung der Präparate wurden 60-80 °C heißes Glycergel (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Negativkontrollen wurden ohne Inkubation des primären Antikörpers durchgeführt und zeigten nur eine geringfügige Hintergrundreaktion. Alle Reaktionen vollzogen sich bei Raumtemperatur.

2.8 Auswertung

Sämtliche lichtmikroskopische Beurteilungen wurden mit dem Nikon-Mikroskop (Modell Optiphot-2, Japan) durchgeführt. Eine photographische Dokumentation erfolgte (s. Abbildungen) mittels einer konventionellen UFX-II-Fotoeinrichtung. Dabei kamen Diapositiv-Filme (Kunstlichtfilm, 24x36mm, Kodak-Ektachrome 64T) zum Einsatz. Die Filme wurden im institutseigenen Labor (Pathologie) entwickelt.

2.8.1 Rattengewicht

Zur Dokumentation der individuellen Entwicklung wurde jede Ratte während des 120-tägigen Beobachtungszeitraums täglich zur gleichen Tageszeit gewogen. Die Gewichtskontrolle diente auch dazu, um mögliche Störungen in der Entwicklung der initial nicht ausgewachsenen Ratten zu identifizieren.

2.8.2 Funktion des Transplantats

Die Funktion des Herztransplantats wurde täglich durch Palpation des Transplantats über die gut zugängliche Bauchdecke überprüft und beurteilt. Dabei wurde ein täglicher Score erhoben und dokumentiert [74]. Diese Scores wurden dann über den gesamten Beobachtungszeitraum gemittelt (s. Tabelle 6 und 3.1.2).

Tabelle 6: Einteilung der Transplantatfunktion

Grad	Transplantatfunktion
0	keine Kontraktilität, nach Abdomeneröffnung keine Herzaktivität sichtbar
1	keine oder nur minimale Kontraktionen palpabel, nach Abdomen Eröffnung Restaktivität sichtbar
2	schwache bis mäßige Kontraktionen palpabel
3	sehr kräftige, rhythmische Kontraktionen palpabel und durch die Bauchdecke sichtbar

2.8.3 Abstoßungsreaktion

Die Abstoßungsreaktion wurde anhand von HE gefärbten Schnitten (s.2.7.2) durch Lichtmikroskopie beurteilt. Dabei wurde die folgende orientierende histologischen Einteilung verwendet (s. Tabelle 7) [74]: Grad 0 entsprach dabei dem Befund eines gesunden Herzgewebe (s. Abbildung 2), wohingegen sich Grad 3 durch diffuse Ansammlungen von Entzündungszellen, Nekrosenbildung und fokalen Einblutungen auszeichnete (Abbildung 3).

Tabelle 7: Einteilung der Abstoßungsreaktion

Grad	histologischer Befund
0	keine Reaktion, unauffälliges Herzmuskelgewebe
1	leichte Reaktion mit geringer Infiltration von mononuklearen Zellen; keine oder minimale Fibrose
2	moderate Abstoßung mit mittelstark ausgeprägter mononuklearer Zellinfiltration
3	starke Abstoßungsreaktion mit diffuser, ausgeprägter mononuklearer Zellinfiltration, fokale Einblutungen, Nekrosebildung

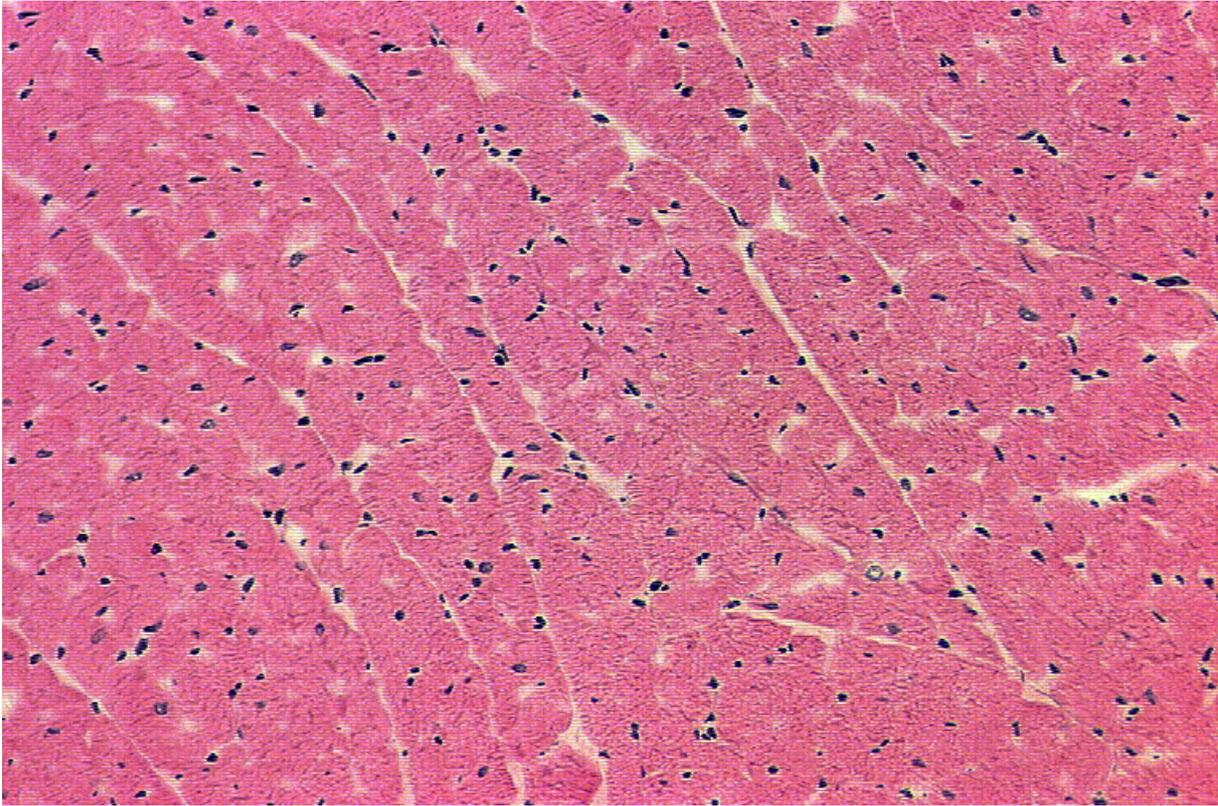


Abbildung 2: Abstoßungsreaktion Grad 0 (HE-Färbung)

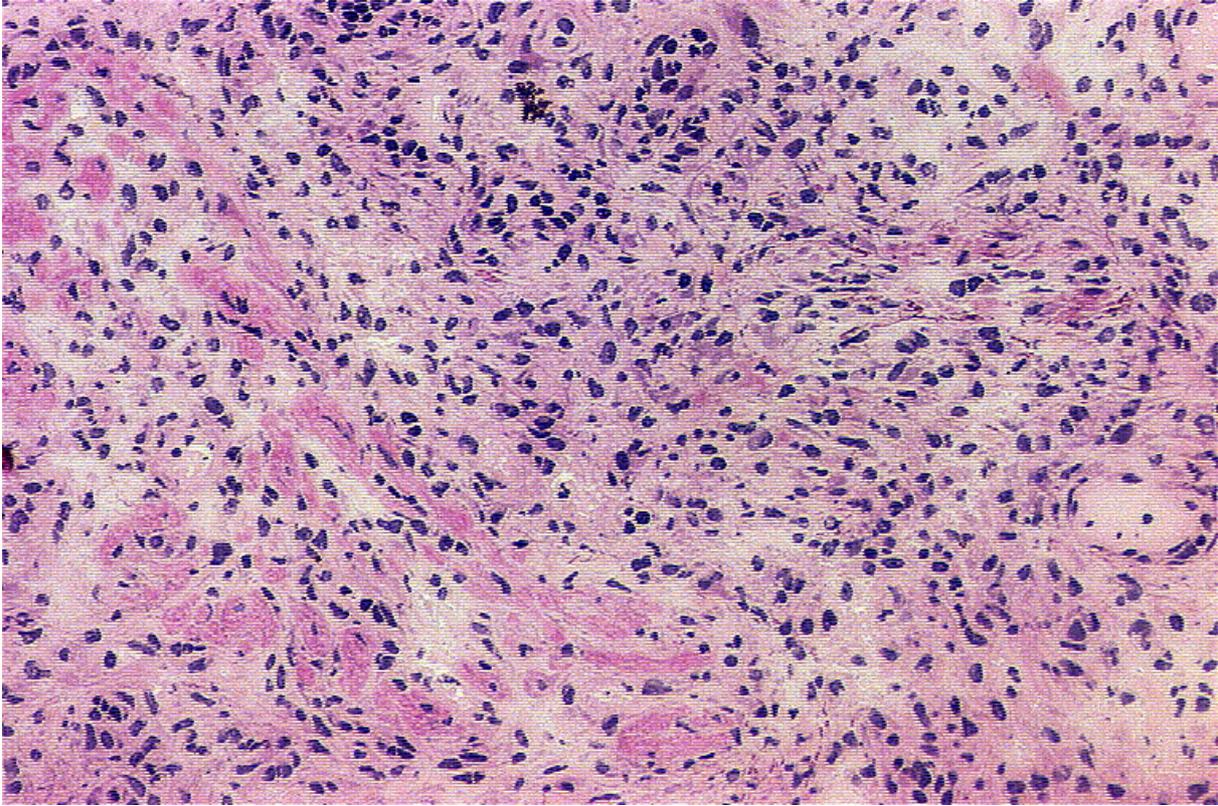


Abbildung 3: Abstoßungsreaktion Grad 3 mit deutlicher Nekrosebildung und ausgeprägter mononuklearer Zellinfiltration (HE-Färbung)

2.8.4 Transplantatvaskulopathie

Die Ausprägung der TVP von myo- und epikardialen Gefäßen wurde mit Hilfe von HE- und Elastika-Färbungen (s. 2.7.2 u. 2.7.3) graduell lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei wurde eine leicht abgeänderte Einteilung nach Sarris et al [74, 73] verwendet (s. Tabelle 8). Beurteilt wurden alle eindeutig identifizierbaren Gefäße des Epi- und Myokards von Transplantat- und Nativ-Herz in Verum- und Kontrollgruppe. Auch die myo- und epikardialen Gefäße der Ratten ohne Transplantat wurden beurteilt. Dabei entsprach ein histologisch unauffälliges Gefäß (Grad 0) dem Bild eines Gefäßes aus einem Nativ-Herzen einer Kontroll-Ratte (Abbildung 4). Im Gegensatz dazu zeichnete sich der Grad 3 durch ausgeprägte, pathologische Veränderungen, bis hin zum kompletten Verschluss des Gefäßlumens aus (Abbildung 7).

Tabelle 8: Schweregrad der Transplantatvaskulopathie (Abbildung 4 bis Abbildung 7)

Grad	histologischer Befund
0	unauffälliges Gefäß
1	Adhäsion von Entzündungszellen entlang der Lamina interna mit Einengung des Gefäßlumens um weniger als 10% (<10%)
2	weiter fortgeschrittene Schädigung mit Einengung des Gefäßlumens um weniger als 50% (10-50%)
3	hochgradige Einengung des Gefäßes um mehr als 50% seines Lumens bzw. kompletter Verschluss (>50%)

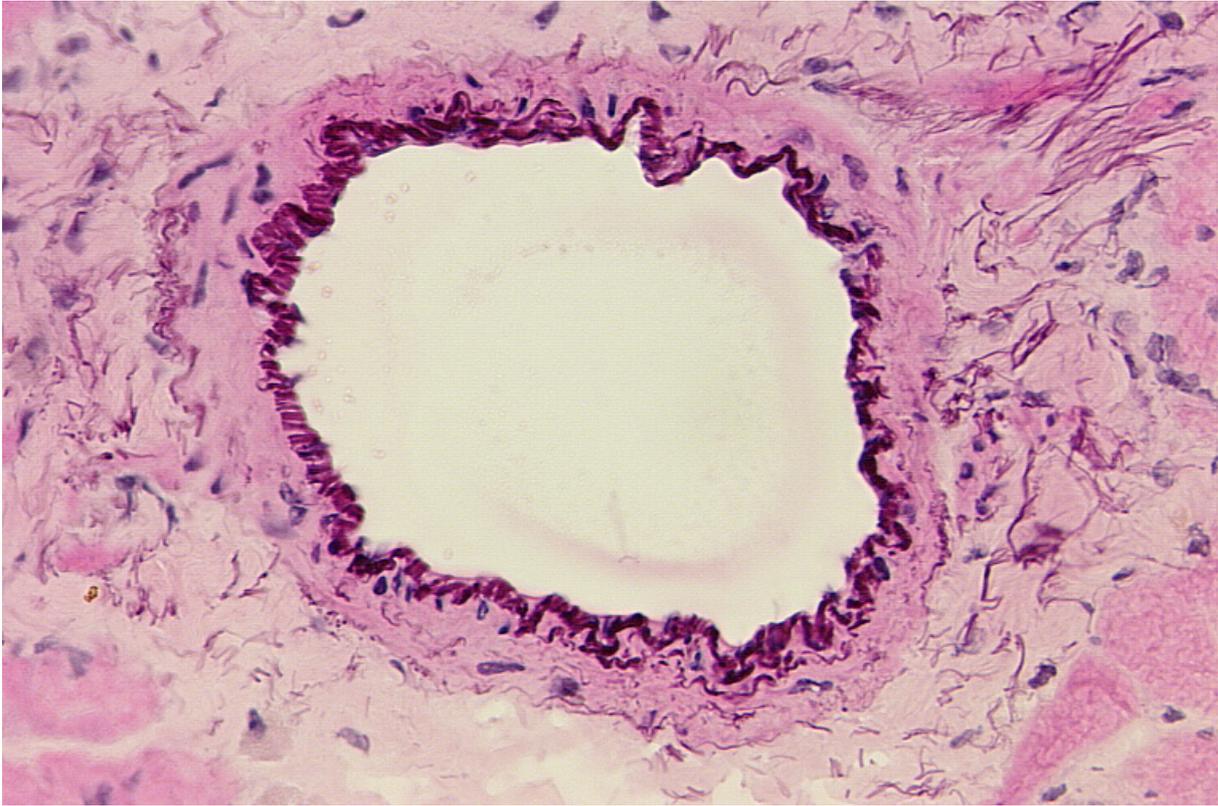


Abbildung 4: Gefäß ohne Transplantatvaskulopathie (Grad 0, Elastika-Färbung)

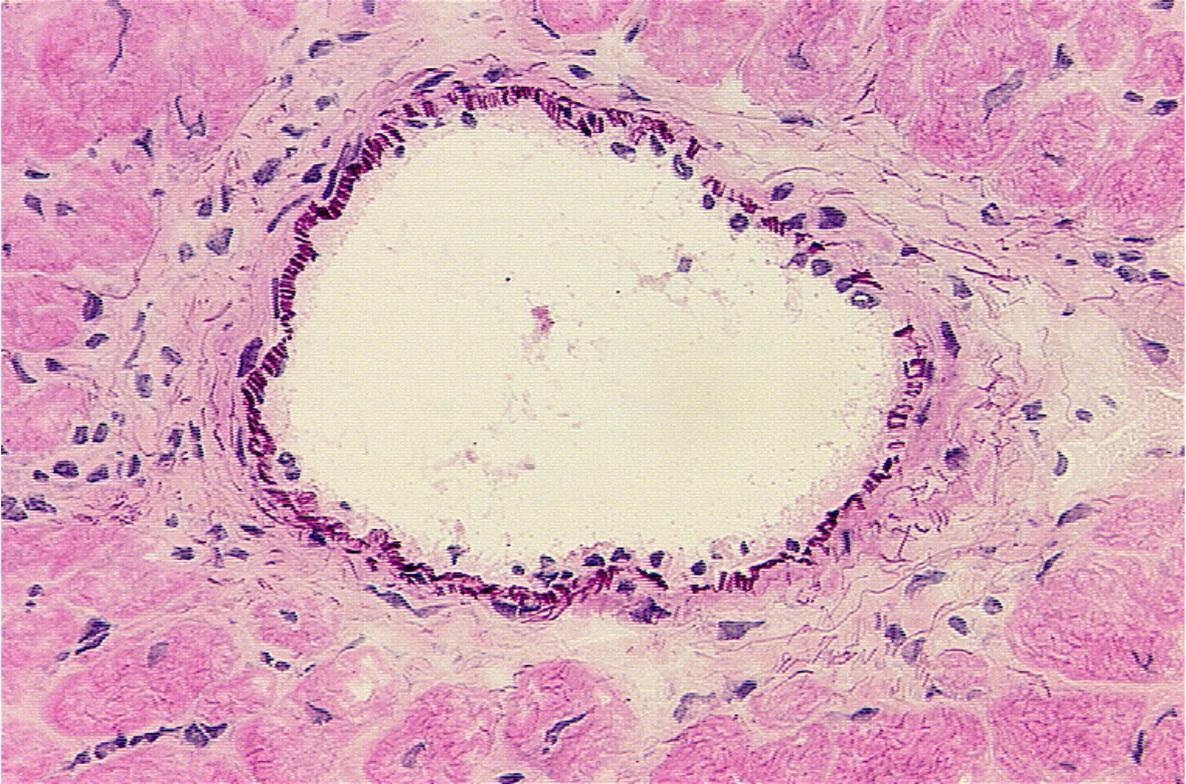


Abbildung 5: Transplantatvaskulopathie Grad 1 (Einengung des Gefäßlumens <10%, Elastika-Färbung)

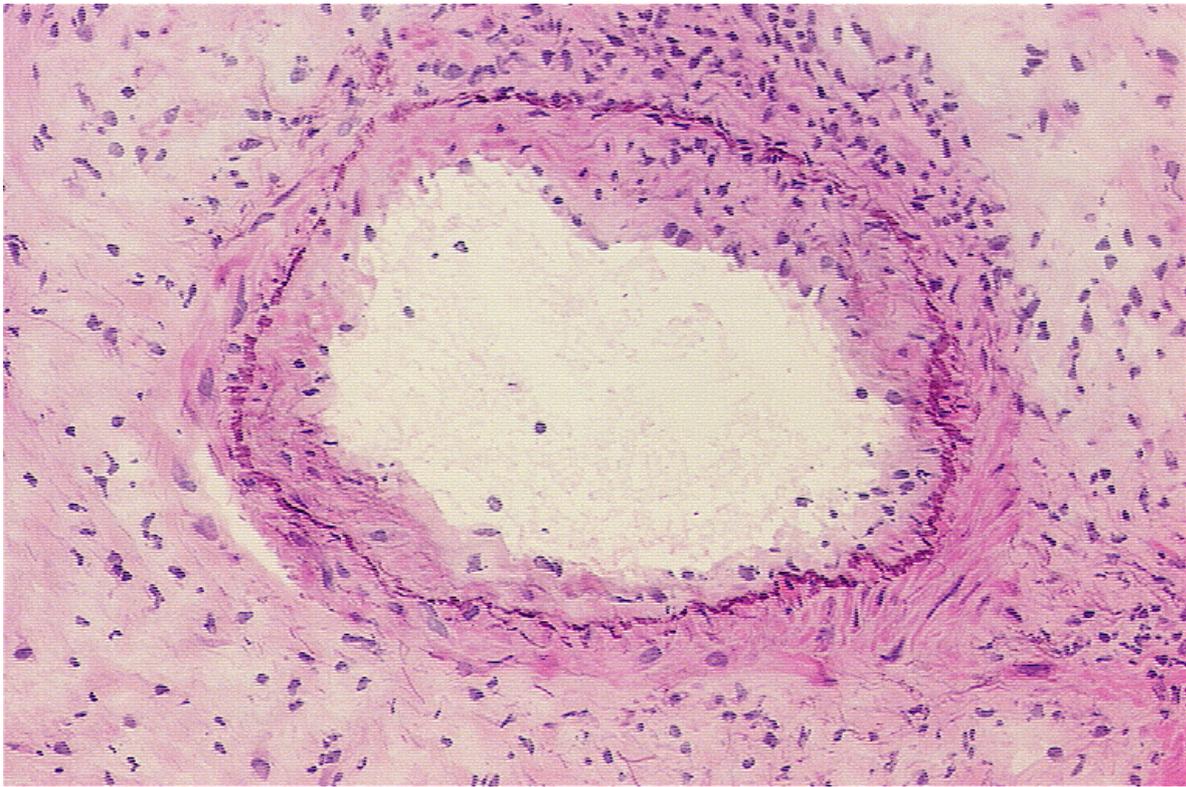


Abbildung 6: Transplantatvaskulopathie Grad 2 (Einengung des Gefäßlumens 10-50%, Elastika-Färbung)

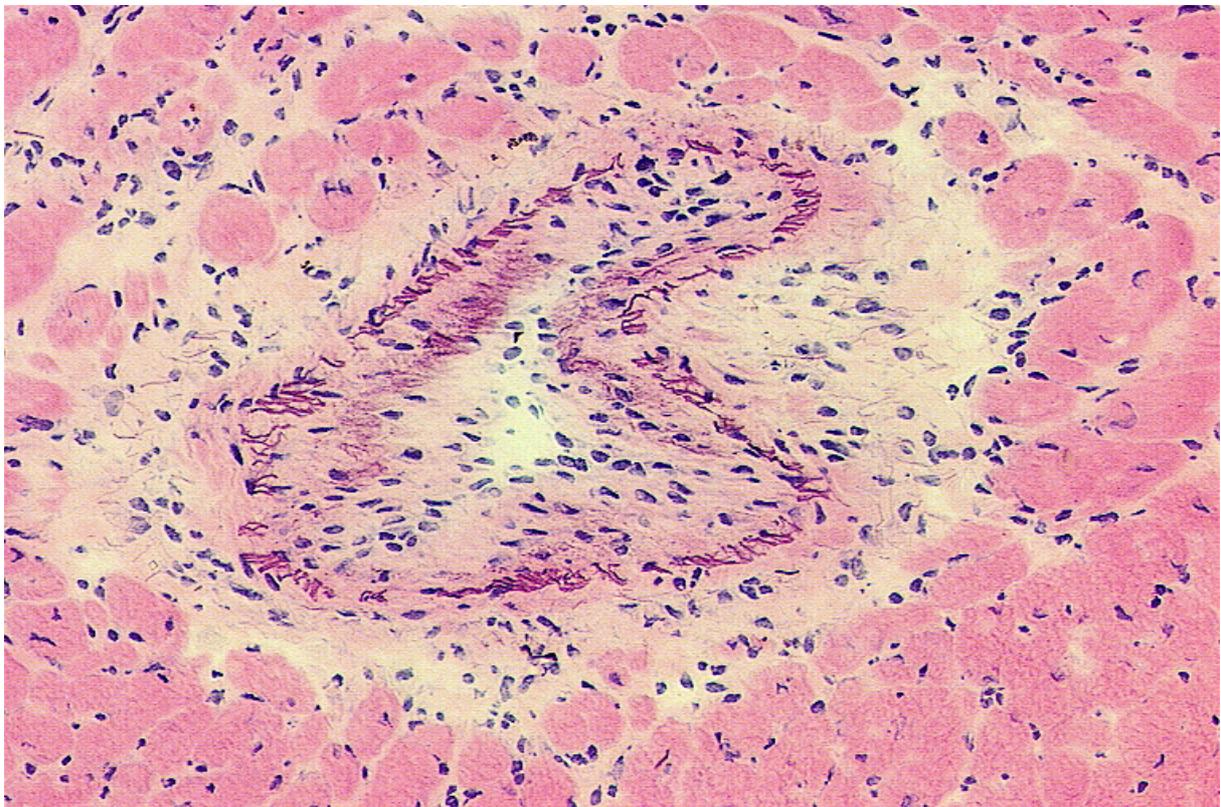


Abbildung 7: Transplantatvaskulopathie Grad 3 (Einengung des Gefäßlumens > 50%, Elastika-Färbung)

2.8.5 ICAM-1- und VCAM-1-Expression

Zur Beurteilung ihrer Intensität wurde die intimale Immunreaktivität von ICAM-1 und VCAM-1 im jeweiligen Gefäß lichtmikroskopisch einer Skala von 0-3 zugeordnet (s. Tabelle 9). Dabei wurde ein Gefäßanschnitt mit dem Grad 0 beurteilt, wenn keine intimale Anfärbung zu erkennen war, das Färberesultat also einer Negativkontrolle entsprach (s. Abbildung 8). Der Grad 3 entsprach der stärksten Farbintensität und damit auch der am stärksten ausgeprägten Expression der jeweiligen Zielantigene (s. Abbildung 9 und Abbildung 10). Zur Orientierung wurden die anatomisch korrespondierenden Elastika-Färbungen hinzugezogen (s. Abbildung 4 bis Abbildung 7). Auf diese Weise wurden alle Herzen der Verum- und Kontroll-Gruppe sowie der nicht transplantierten Ratten bzgl. ihrer ICAM-1- und VCAM-1-Expression beurteilt (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Intensitätsskala zur Beurteilung von intimaler ICAM-1- und VCAM-1-Anfärbung und Expression

Grad	immunhistologischer Befund	ICAM-1 /VCAM-1 Expression
0	keine Färbung, vergleichbar mit dem Bild einer Negativkontrolle	keine Expression
1	leichte Färbung	leichte Expression
2	mäßig starke Färbung	mäßig starke Expression
3	starke Färbung	starke Expression

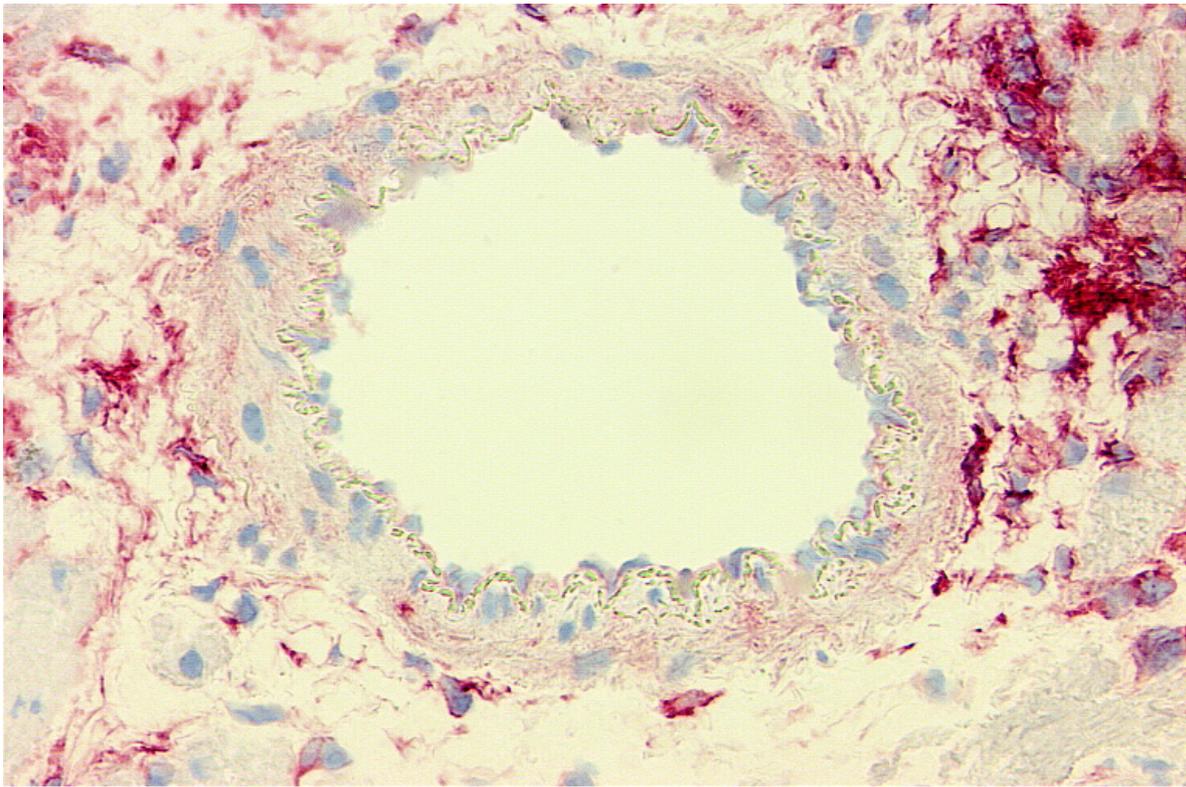


Abbildung 8: Gefäß ohne intimale ICAM-1-Färbung und ohne Transplantatvaskulopathie (APAAP- Färbung)

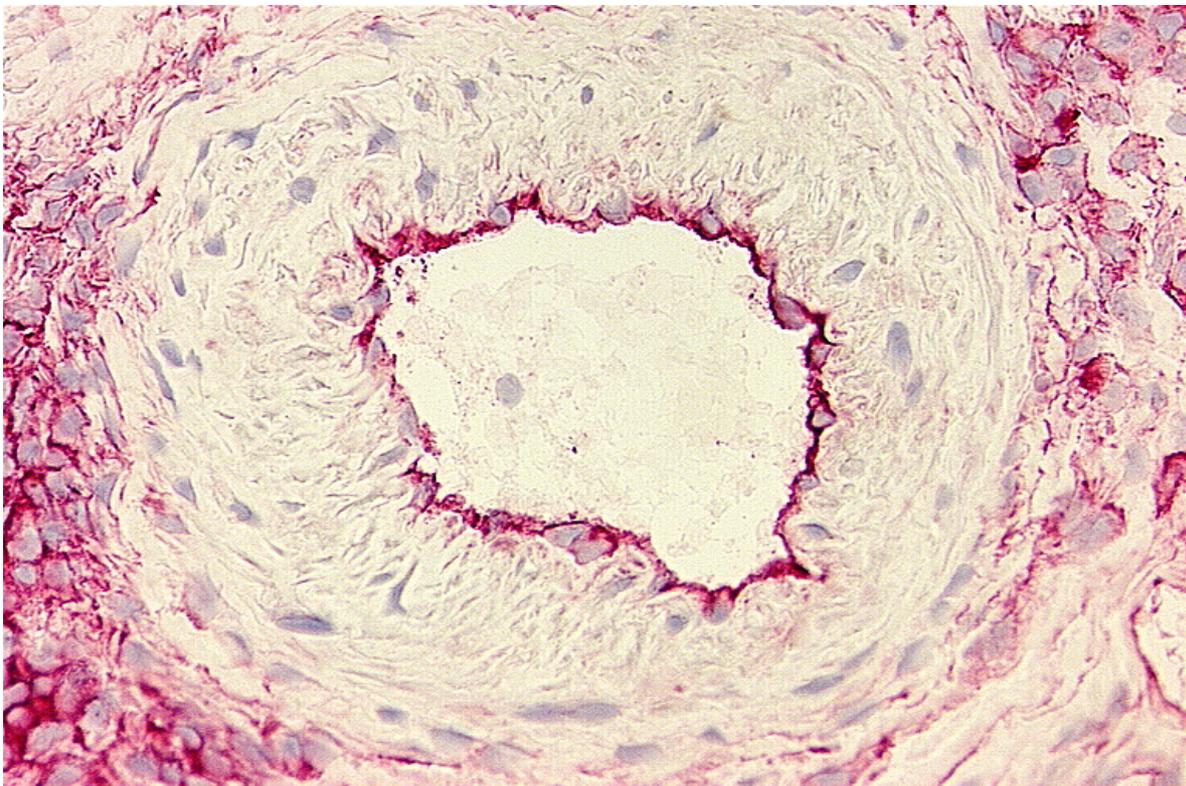


Abbildung 9: Kräftige intimale ICAM-1-Färbung (Grad 3) in einem nahezu vaskulopathiefreien Gefäß (APAAP-Färbung)

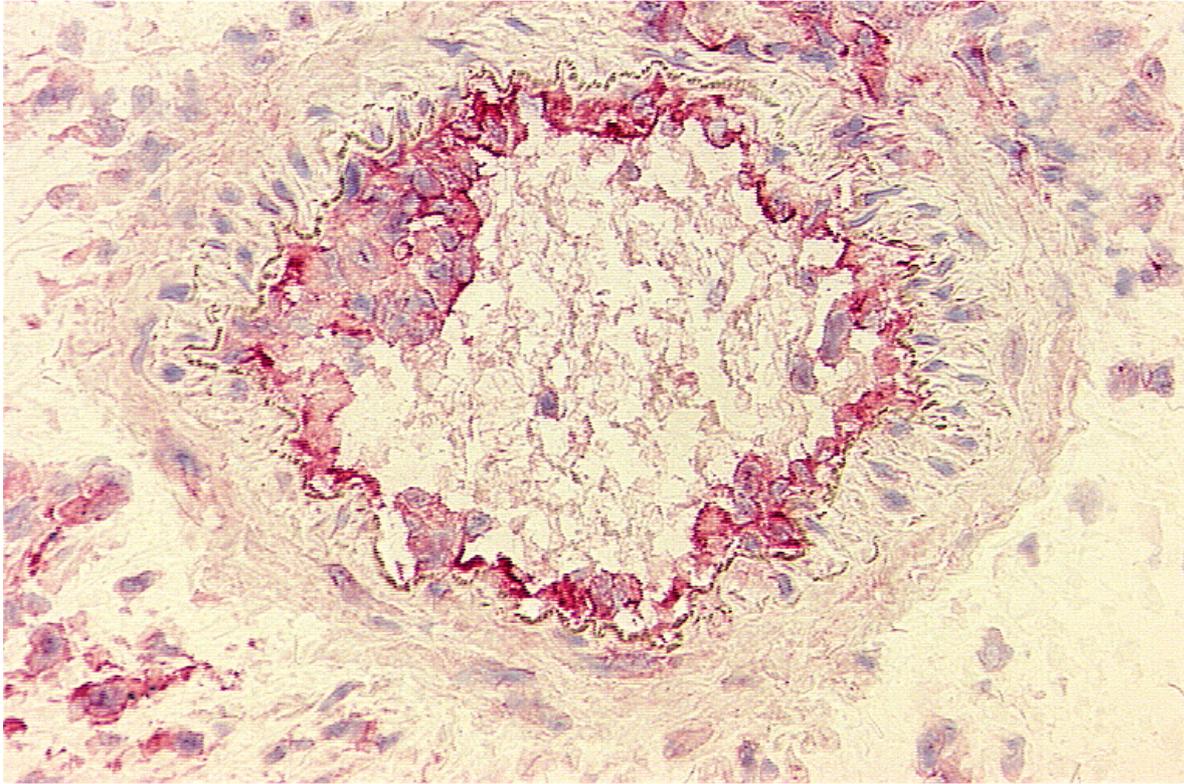


Abbildung 10: Kräftige intimale VCAM-1-Färbung (Grad 3) in einem Gefäß mit einer Einengung des Gefäßlumens um 10-50% (APAAP- Färbung)

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Informatik und Statistik der JLU Gießen. Alle Tests wurden auf statistisch signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ als Signifikanzschwelle geprüft. Lediglich der gewichtete Schweregrad der TVP (s. 2.9.4) und die durchschnittlichen Expressionsscores (s. 2.9.5) wurden großzügiger diskutiert. Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden Median und Standardabweichung verwendet.

2.9.1 Rattengewicht

Das Gewicht der Verum- und Kontrollgruppe am 120. OP-Tag wurde verglichen, um mögliche Unterschiede bezüglich des Wachstums der Ratten zum Zeitpunkt der Organasservation zu detektieren. Dabei kam der Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test (Rangsummentest) zum Einsatz.

2.9.2 Funktion des Transplantats

Um den gemittelten Palpationsscore (s. 2.8.2) von Verum- und Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde ebenfalls der Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test verwendet.

2.9.3 Abstoßungsreaktion

Im Bezug auf das Kriterium Abstoßungsreaktion wurden Verum- und Kontrollgruppe mittels Chi-Quadrat-Test verglichen.

2.9.4 Transplantatvaskulopathie

Um die Ausprägung der TVP von Verum- und Kontrollgruppe statistisch vergleichen zu können, wurden mehrere statistische Untersuchungen vorgenommen:

- 1) Die absoluten Zahlen (Vaskulopathie-Grad 0, 1, 2 und 3) wurden mittels Kontingenztabelle verknüpft und auf Signifikanz untersucht.
- 2) Um eine Verfälschung der Statistik durch extreme Werte ("Ausreißer") zu vermeiden, wurden insbesondere die relativen Anteile der Gefäße ohne Vaskulopathie (Grad 0) unter Verwendung des Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test verglichen.
- 3) Zusätzlich, um die durchschnittliche Schwere der Vaskulopathie pro Rattenherz diskutieren zu können, wurde eine Gewichtung der einzelnen Vaskulopathie-Grade vorgenommen. Unter Verwendung der folgenden Formel wurde einem höheren Vaskulopathie-Grad ein höherer Gewichtungsfaktor zugeteilt:

$$f = \frac{\{(Grad1 \times 1) + (Grad2 \times 2) + (Grad3 \times 3)\}}{\{\sum Grad1 + Grad2 + Grad3\}}$$

Verum- und Kontrollgruppe wurden dann mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test verglichen.

2.9.5 ICAM-1- und VCAM-1-Expression

Sowohl die erhobenen Daten der intimalen ICAM-1-, als auch der VCAM-1-Expression wurden einer statistischen Prüfung unterzogen:

- 1) Herztransplantate von Verum- und Kontrollgruppe wurden unter Verknüpfung der absoluten Gefäßzahlen (Grad 0, 1, 2 und 3) mittels Kontingenztafel verglichen.
- 2) Auch hier wurden, um eine Verfälschung der Statistik durch "Ausreißer" zu vermeiden insbesondere die relativen Anteile der Gefäße ohne intimale ICAM-1- und VCAM-1-Expression (Grad 0) der Herztransplantate in Verum- und Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test verglichen.
- 3) Analog zur Ermittlung eines durchschnittlichen Schweregrades der Vaskulopathie (s. 2.9.4) wurde ein durchschnittlicher „Expressionsscore“ für die intimale ICAM-1- und VCAM-1-Expression pro Transplantat ermittelt und diese durchschnittlichen Scores der Verum- und Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test auf Signifikanz überprüft.
- 4) Dieser durchschnittliche „Expressionsscore“ wurde auch für das Nativ-Herz bzgl. der ICAM-1- und VCAM-1-Expression erhoben, so dass Nativ-Herz und Transplantat unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit mittels Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test verglichen werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Während des gesamten Versuchszeitraumes (120 Tage) zeigten die beobachteten herztransplantierten Ratten keine Auffälligkeiten in Bezug auf ihre körperlichen Aktivitäten, ihr Fressverhalten oder ihre körperliche Entwicklung (s. 3.1.1). Unter der Langzeittherapie mit 30 mg /kg Rattengewicht α -Liponsäure pro Tag (i. p.) zeigten sich keine Nebenwirkungen. In beiden Gruppen wurden weder peri- noch postoperativ hämorrhagische Komplikationen, Infektionen oder gastrointestinale Nebenwirkungen beobachtet.

3.1.1 Körpergewicht

Am Tag der Organasservation (120 Tage nach der Transplantation) wurde das Körpergewicht abschließend gemessen. Ein negativer Einfluss auf das Rattengewicht 120 Tagen nach der Transplantation war mit der längerfristigen i. p. Verabreichung von α -Liponsäure nicht verbunden, vielmehr waren die Ratten in der Verum-Gruppe im Median sogar schwerer. Ein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Kontrollgruppe konnte jedoch statistisch nicht gezeigt werden (**Median \pm Standardabweichung, 345 g \pm 20,66 g Verum- vs. 327,5 g \pm 20,93 g Kontroll-Gruppe; $p=0,12$). In der Kontroll-Gruppe ohne vorherige Operation ($n=4$) wogen die Tiere im Median 402,50 g (\pm 26,26 g) und damit deutlich mehr.**

3.1.2 Transplantatfunktion

Unter täglicher i.p. Immunsuppression mit Ciclosporin A (s. 2.5.1) in beiden Gruppen schlugen alle transplantierten Herzen während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Es wurde auch nach Reduktion von Ciclosporin A auf 0,5 mg/kg Körpergewicht ab dem 80. Tag keine akute Abstoßungsreaktion beobachtet. Tendenziell zeigte die Gruppe, der mit α -Liponsäure behandelten Ratten, gemittelt über 120 Tage eine bessere Transplantatfunktion. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich jedoch nicht (**2,5 \pm 0,5 Verum- vs. 3,0 \pm 0,98 Kontroll-Gruppe; $p=0,3$).**

3.1.3 Abstoßungsreaktion

Auf die Abstoßungsreaktion scheint die Gabe von α -Liponsäure keinen Effekt zu haben. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf dieses Kriterium zeigt sich auch statistisch nicht ($2,0 \pm 0,5$ Verum- vs. $2,0 \pm 0,47$ Kontroll-Gruppe; $p=0,7$) (s. Abbildung 11). Bei beiden Gruppen wurden überwiegend leichtgradige Abstoßungsreaktionen mit nur mäßigem mononukleärem Infiltrat beobachtet (s. Abbildung 12).

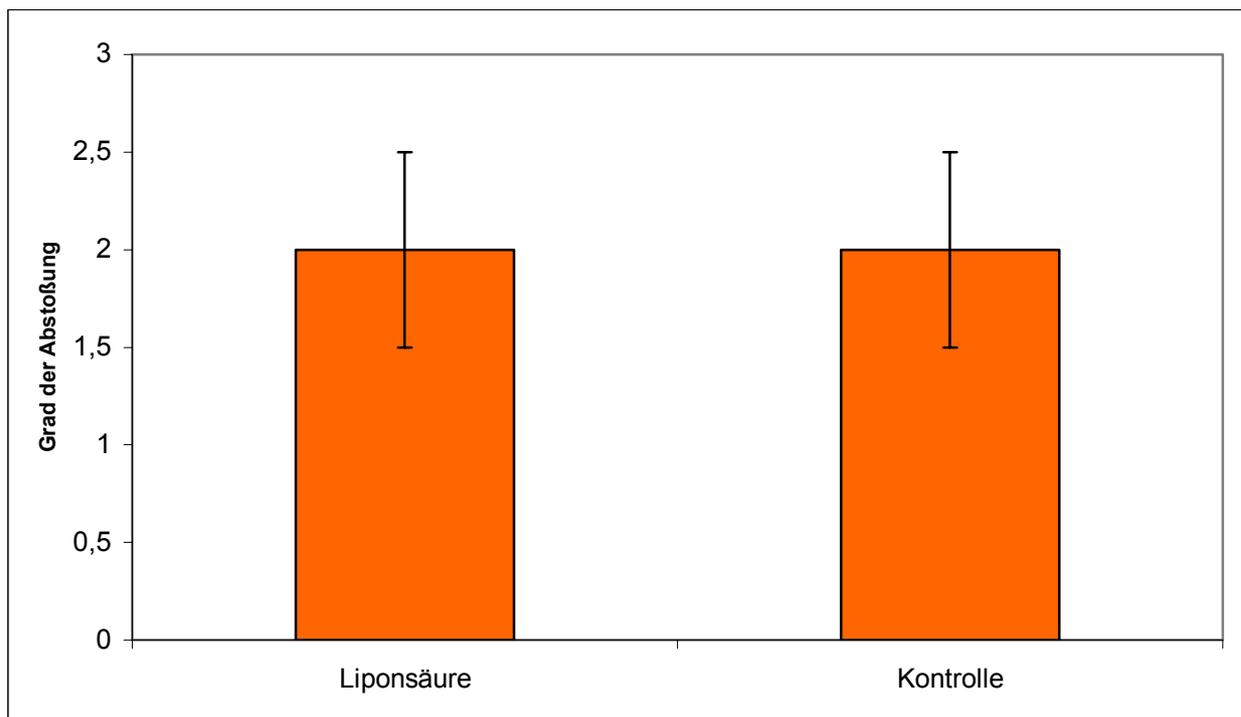


Abbildung 11: Abstoßungsreaktion (α -Liponsäure vs. Kontrolle)

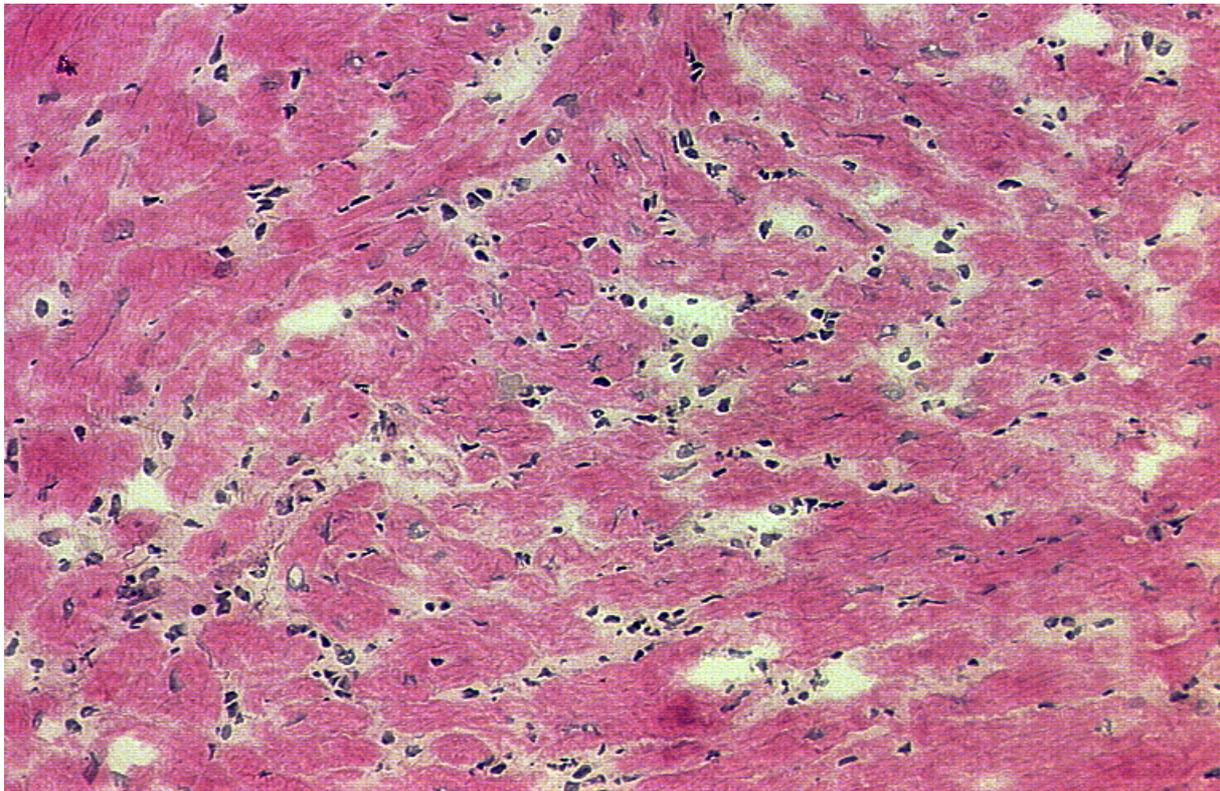


Abbildung 12: Abstoßungsreaktion Grad 2 (HE-Färbung)

3.1.4 Transplantatvaskulopathie

Nach erfolgreicher Transplantation (s. 2.3) kam es im transplantierten Herzen zu mehr oder weniger ausgeprägten Veränderungen des Endothels in den untersuchten Gefäßen. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht transplantierten Nativ-Herzen histologisch keine pathologischen Veränderungen des Endothels und waren morphologisch vergleichbar mit in-situ Herzen der Kontrollgruppe ohne Transplantation (Abbildung 4).

Im Rahmen der morphologischen Untersuchung wurden insgesamt 304 Gefäßanschnitte transplantierten Herzen sowie 398 Gefäßanschnitte nativer Herzen lichtmikroskopisch untersucht. Darunter waren auch 70 Gefäßanschnitte nativer Herzen aus Ratten, die keine Transplantation erhalten hatten. Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigen die Daten für die Ausprägung der TVP in den transplantierten Herzen (Verum- und Kontrollgruppe).

In den transplantierten Herzen zeigten sich beginnende Läsionen des Endothels durch leichtgradige Schwellungen der Intima mit fokalem Aufreißen der Lamina elastica interna sowie fokale mononukleäre Entzündungszellen entlang der Intima (Grad 1, s. Abbildung 5). Fortgeschrittene Veränderungen wiesen häufig eine

Verdickung der Intima, im Bereich der gesamten Zirkumferenz auf, wobei das Lumen um weniger als 50% stenosierte wurde. Es kam zur vermehrten Immigration von mononuklearen Entzündungszellen, wodurch ein intimales Entzündungsinfiltrat entstand. Die Lamina elastica interna war jetzt auf längerer Strecke aufgespaltet (Grad 2, s. Abbildung 6).

Im Endstadium der Erkrankung fand sich das Lumen stark durch verdickte Intima und entzündliches Infiltrat stenosierte (> 50%); die Intima erscheint maximal zellulär expandiert (Grad 3, s. Abbildung 7).

Tabelle 10: Ausprägung der TVP in der Kontrollgruppe unterteilt nach prozentualer Gefäßverengung

Tier - Nr. Kontrolle	Vaskulopathie-Grad				Gesamtzahl der Gefäße
	0 %	<10 %	10-50%	>50%	
1	1	6	2	5	14
2	2	20	1	0	23
3	0	10	6	5	21
4	0	9	12	3	24
5	0	2	8	2	12
6	1	19	4	0	24
Summe (%)	4 (3%)	66 (56%)	33 (28%)	15 (13%)	118

Tabelle 11: Ausprägung der TVP in der α -Liponsäuregruppe unterteilt nach prozentualer Gefäßverengung

Tier - Nr. α -Liponsäure	Vaskulopathie-Grad				Gesamtzahl der Gefäße
	0 %	<10 %	10-50%	>50%	
7	4	13	6	4	27
8	1	20	3	3	27
9	2	11	1	0	14
10	6	11	4	3	24
11	1	17	2	0	20
12	3	9	0	1	13
13	2	12	3	0	17
14	2	3	0	0	5
15	9	26	3	1	39
Summe (%)	30 (16%)	122 (66%)	22 (12%)	12 (6%)	186

3.1.5 ICAM-1-Expression und Transplantatvaskulopathie

Nach erfolgreicher Transplantation kam es im Rahmen der TVP insgesamt zu einer deutlichen Vermehrung der intimalen ICAM-1-Expression in den Gefäßen der transplantierten Herzen (s. Abbildung 13). Aber auch in den Gefäßen der Nativ-

Herzen fanden sich z.T. intimale Anfärbungen (s. Abbildung 14). Dieser Befund bestätigt Angaben aus der Literatur [5, 78]. Im Vergleich zu den transplantierten Herzen, lagen die durchschnittlichen "Expressionsscores" (s. 2.9.5) bei den Nativ- Herzen jedoch deutlich günstiger (**1,00 ± 0,12 Funktionsherzen vs. 1,42 ± 0,38 transplantierte Herzen; p=0,001**). In Gefäßanschnitten aus Rattenherzen ohne vorherige Transplantation fanden sich wenige, bis gar keine intimalen Anfärbungen (41 Gefäßanschnitte Grad 0 und 18 Gefäßanschnitte Grad 1). Es wurden insgesamt 236 Gefäßanschnitte des transplantierten Herzens (s. Tabelle 12 und Tabelle 13), 279 Gefäßanschnitte des Nativ-Herzens (s. Tabelle 14 und Tabelle 15) sowie 59 Gefäßanschnitte von nicht transplantierten Rattenherzen (s. Tabelle 16) untersucht.

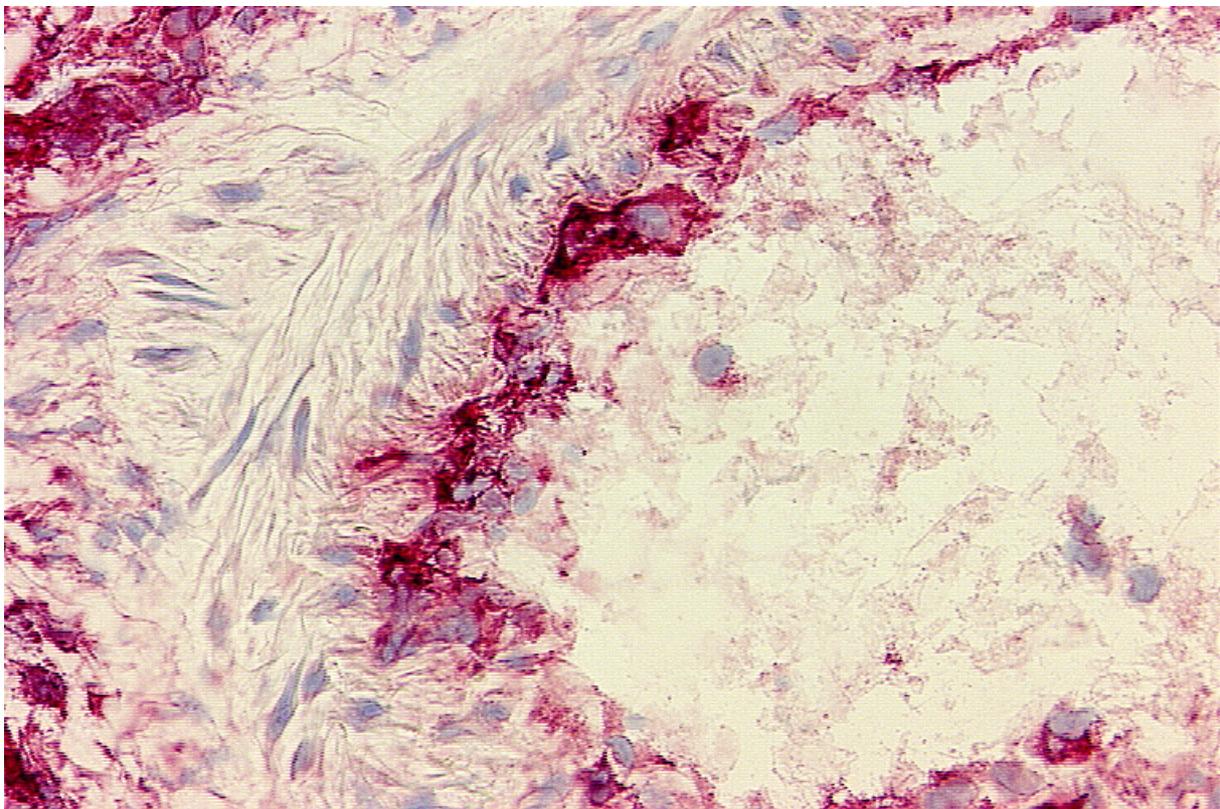


Abbildung 13: Intimale ICAM-1-Expression und beginnende Transplantatvaskulopathie (APAAP-Färbung)

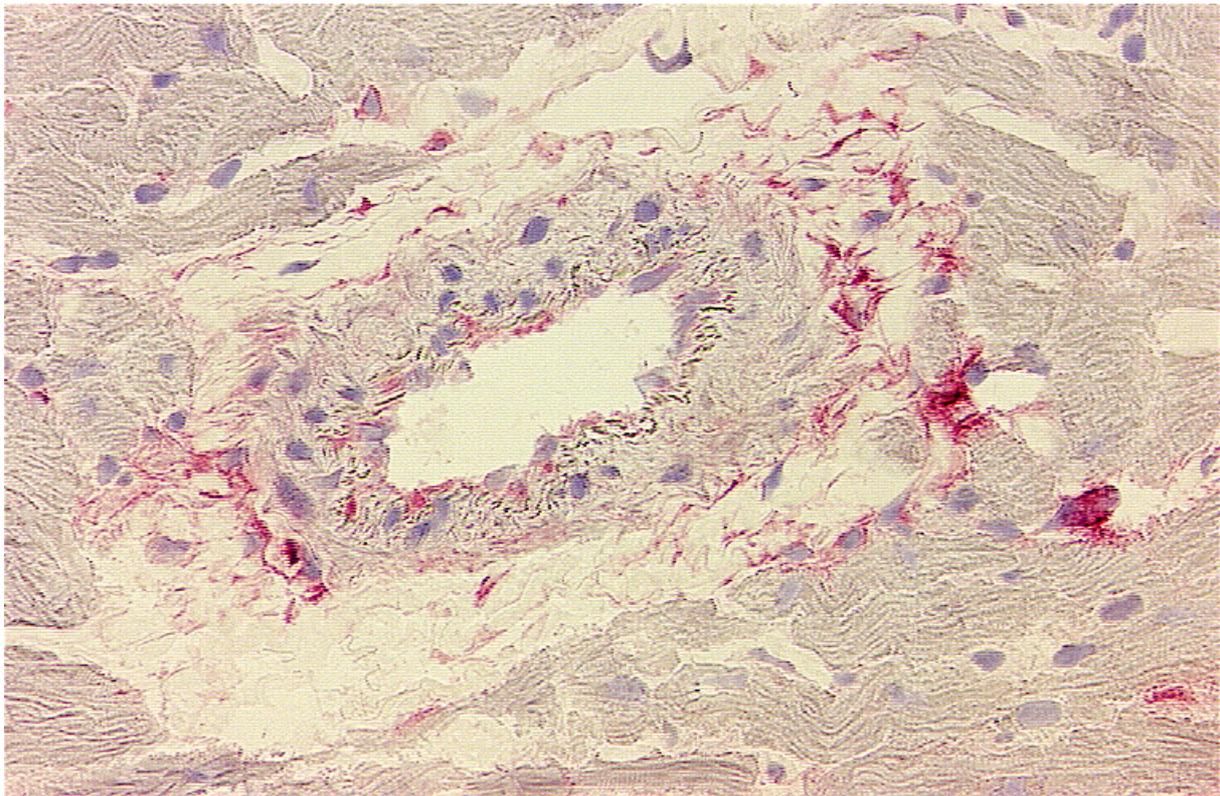


Abbildung 14: Leichtgradige intimale ICAM-1-Färbung (Grad 1) im Nativ-Herzen (APAAP-Färbung)

Tabelle 12: ICAM-1-Expression in den Herztransplantaten der Kontroll-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Kontrolle (Transplantat)	Färbescore (ICAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
1	3	4	2	2	11
2	13	7	3	0	23
3	3	4	2	0	9
4	0	0	8	3	11
5	2	0	6	4	12
6	7	5	0	1	13
Summe (%)	28 (35%)	20 (25%)	21 (27%)	10 (13%)	79

Tabelle 13: ICAM-1-Expression in den Herztransplantaten der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. α -Liponsäure (Transplantat)	Färbescore (ICAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
7	7	10	3	5	25
8	17	8	1	1	27
9	5	6	0	0	11
10	13	3	1	1	18
11	4	9	3	0	16
12	3	7	1	0	11
13	6	3	3	0	12
14	0	2	0	0	2
15	27	6	1	1	35
Summe (%)	82 (52%)	54 (34%)	13 (8%)	8 (5%)	157

Tabelle 14: ICAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der Kontrollgruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Kontrolle (Nativ-Herz)	Färbescore (ICAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
1	21	5	0	0	26
2	10	9	1	0	20
3	8	5	1	0	14
4	6	7	1	0	14
5	18	6	2	0	26
6	9	3	0	0	12
Summe (%)	72 (64%)	35 (31%)	5 (4%)	0 (0%)	112

Tabelle 15: ICAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. α -Liponsäure (Nativ-Herz)	Färbescore (ICAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
7	6	5	4	0	15
8	10	11	0	0	21
9	19	7	1	0	27
10	14	3	0	0	17
11	13	11	0	0	24
12	5	2	0	0	7
13	13	1	0	0	14
14	19	4	0	0	23
15	9	10	0	0	19
Summe (%)	72 (61%)	35 (30%)	5 (4%)	0 (0%)	167

Tabelle 16: ICAM-1-Expression in den Herzen der Gruppe ohne Transplantation unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. ohne Transplantation (Nativ-Herz)	Färbescore (ICAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
16	17	7	0	0	24
17	15	6	0	0	21
18	4	5	0	0	9
19	5	0	0	0	5
Summe (%)	41 (69%)	18 (31%)	0 (0%)	0 (0%)	59

3.1.6 VCAM-1-Expression und Transplantatvaskulopathie

Das Bild der intimalen VCAM-1-Expression im Transplantat änderte sich postoperativ, so dass eine deutlich stärkere intimale Anfärbung in den Gefäßen der transplantierten Herzen mit Auftreten der TVP detektiert werden konnte (s. Abbildung 15). Auch in den Gefäßen der Nativ-Herzen wurde eine intimale Anfärbung beobachtet (s. Abbildung 16), welche allerdings gemittelt (durchschnittliche Expressionsscores, s. 2.9.5) deutlich geringer ausfiel als in den transplantierten Herzen (**1,15 ± 0,14 Funktionsherz vs. 1,60 ± 0,35 transplantierte Herzen; p=0,005**). Diese Befunde werden auch von anderen Autoren in der Literatur bestätigt [5]. Eine noch geringere intimale Anfärbung, bzw. Expression von VCAM-1 zeigte sich orientierend in den Herzen der nicht transplantierten Ratten (15 Gefäßanschnitte Grad 0 und 44 Grad 1). Insgesamt wurden 243 Gefäßanschnitte von transplantierten Herzen (s. Tabelle 17 und Tabelle 18), 299 Gefäßanschnitte von Nativ-Herzen (s. Tabelle 19 und Tabelle 20) sowie 59 Gefäßanschnitte von nicht transplantierten Rattenherzen (s. Tabelle 21) untersucht.

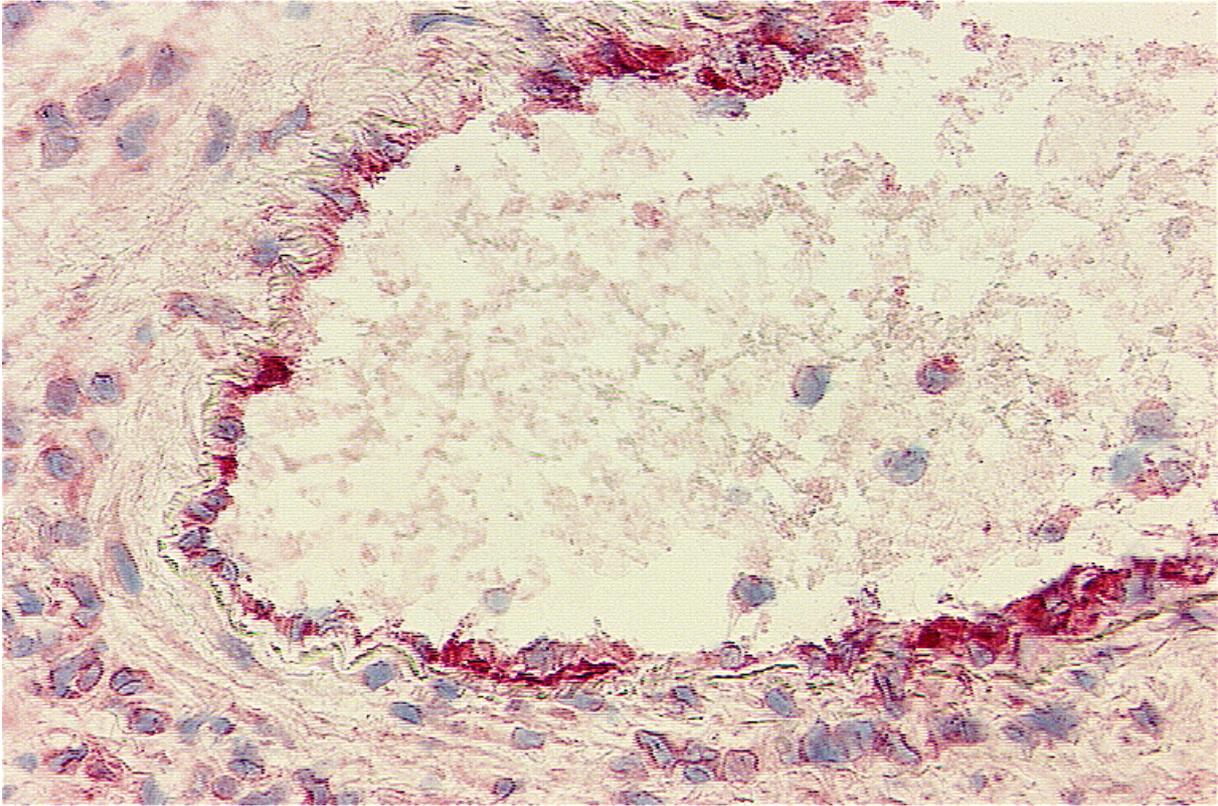


Abbildung 15: Intimale VCAM-1-Expression und beginnende Transplantatvaskulopathie (APAAP-Färbung)

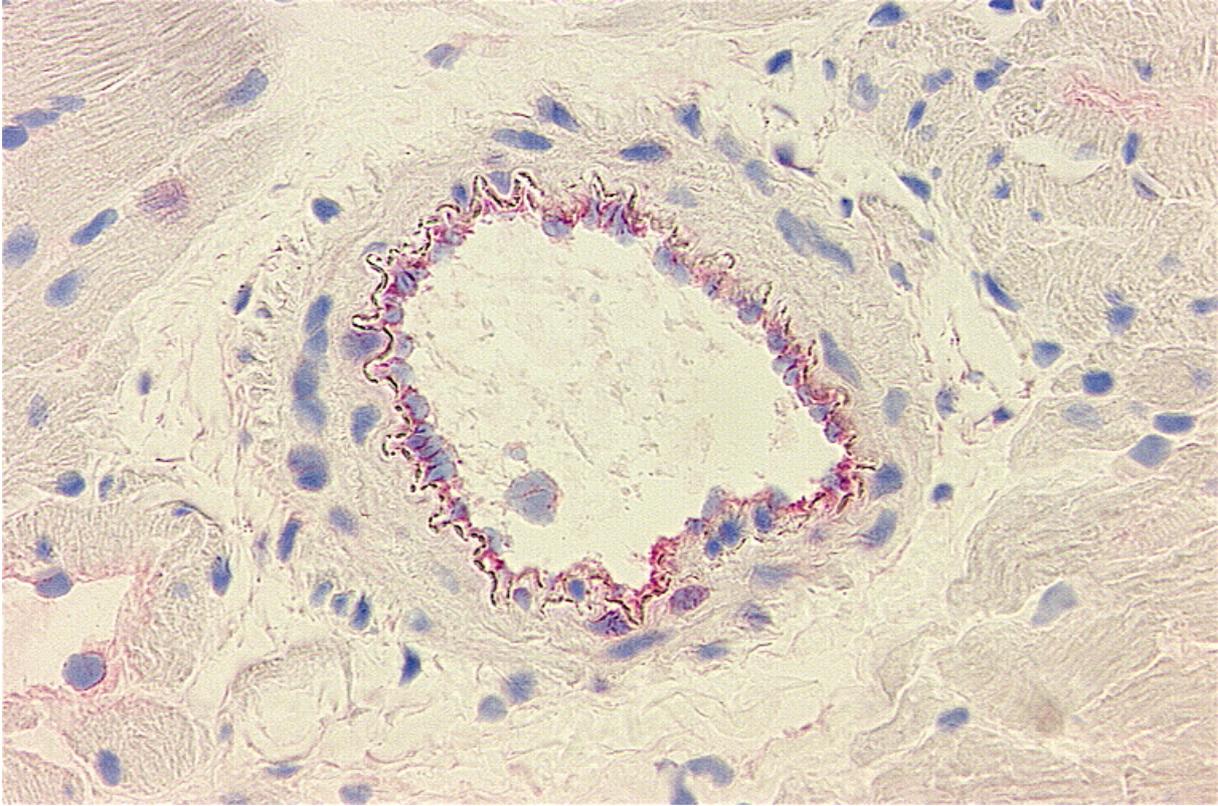


Abbildung 16: Leichtgradige intimale VCAM-1-Färbung (Grad 1) in einem Nativ-Herzen (APAAP-Färbung)

Tabelle 17: VCAM-1-Expression in den Herztransplantaten der Kontroll-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Kontrollgruppe (Transplantat)	Färbescore (VCAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
1	1	2	3	0	6
2	2	9	6	0	17
3	2	8	4	6	20
4	0	3	7	9	19
5	2	0	4	6	12
6	0	8	7	4	19
Summe (%)	7 (8%)	30 (32%)	31 (33%)	25 (27%)	93

Tabelle 18: VCAM-1-Expression in den Herztransplantaten der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Liponsäure (Transplantat)	Färbescore (VCAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
7	8	7	1	2	18
8	11	10	4	2	27
9	4	7	0	0	11
10	5	12	2	1	20
11	4	7	4	1	16
12	2	7	4	0	13
13	2	4	4	3	13
14	0	2	1	0	3
15	8	16	4	1	29
Summe (%)	44 (29%)	72 (48%)	24 (16%)	10 (7%)	150

Tabelle 19: VCAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der Kontrollgruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Kontrollgruppe (Nativ-Herz)	Färbescore (VCAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
1	2	16	4	0	22
2	4	13	1	0	18
3	3	12	4	0	19
4	1	15	5	0	21
5	5	14	7	0	26
6	2	5	3	0	10
Summe (%)	17 (15%)	75 (65%)	24 (21%)	0 (0%)	116

Tabelle 20: VCAM-1-Expression in den Nativ-Herzen der α -Liponsäure-Gruppe unterteilt nach Färbescores

Tier - Nr. Liponsäure (Nativ-Herz)	Färbescore (VCAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
7	3	8	3	0	14
8	2	12	5	0	19
9	7	11	9	0	27
10	1	16	2	0	19
11	9	14	2	0	25
12	6	12	1	0	19
13	8	8	1	0	17
14	10	18	0	0	28
15	8	7	0	0	15
Summe (%)	54 (30%)	106 (58%)	23 (13%)	0 (0%)	183

Tabelle 21: Färbescores der VCAM-1-Färbung der Herzen aus der Gruppe ohne Transplantation

Tier - Nr. Gruppe ohne Transplantation (Nativ-Herz)	Färbescore (VCAM-1-Färbung)				Gesamtzahl der Gefäße
	0	1	2	3	
16	5	20	0	0	25
17	1	13	0	0	14
18	1	8	0	0	9
19	8	3	0	0	11
Summe (%)	15 (25%)	44 (74%)	0 (0%)	0 (0%)	59

3.2 Einfluss von α -Liponsäure auf die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie

Bei der Auswertung der TVP an insgesamt 15 transplantierten Herzen (Verum-Gruppe n=9, Kontroll-Gruppe n=6) wurden 186 arterielle Gefäßanschnitte der Verum-Gruppe (s. Tabelle 11) und 118 arterielle Gefäßanschnitte der Kontroll-Gruppe (s. Tabelle 10) ausgewertet. Prozentual wiesen in der Kontroll-Gruppe nach 120 Tagen bereits ca. 97% der Gefäßanschnitte eine TVP auf, wohingegen unter Gabe von α -Liponsäure nur ca. 74% aller Gefäße pathologische Veränderungen in diesem Sinne zeigten. In der Gruppe der Tiere, die α -Liponsäure erhalten hatten (Verum-Gruppe), findet sich eine deutlich höher Anzahl an Gefäßen ohne pathologische Veränderung der Intima (30 vs. 4). Stellt man die Gesamtverteilung der Vaskulopathiescores (absolute Zahlen) gegenüber (s. Abbildung 17) so zeigt sich unter der Gabe von α -

Liponsäure eine signifikante Verlagerung hin zu weniger geschädigten Koronararterien (**Verum- vs. Kontrollgruppe, Kontingenztafel-Analyse, $p < 0,0001$**).

Um eine Verfälschung der Statistik durch extreme Werte ("Ausreißer") zu vermeiden, wurden auch die relativen Werte der Gefäße ohne Vaskulopathie (0% Lumeneinengung, s. Abbildung 18) betrachtet. Auch hier schneiden die Tiere in der α -Liponsäure-Gruppe deutlich günstiger ab (**$14,8\% \pm 11,3\%$ Verum- vs. $2,1\% \pm 3,9\%$ Kontroll-Gruppe, $p=0,009$**).

Um das gesamte Ausmaß der TVP vergleichen zu können, wurde ein durchschnittlicher Schweregrad ermittelt (s. 2.9.4), der eine Gewichtung der einzelnen Vaskulopathie-Grade zulässt. Hier liegen die Scores bei den Tieren ohne α -Liponsäure ungünstiger, obwohl das Signifikanzniveau nicht erreicht wird. Tendenziell leiden die Ratten der Kontroll-Gruppe an einer stärker ausgeprägten TVP (**$1,2 \pm 0,21$ Verum- vs. $1,75 \pm 0,4$ Kontrollgruppe; $p=0,1$**) (s. Abbildung 19).

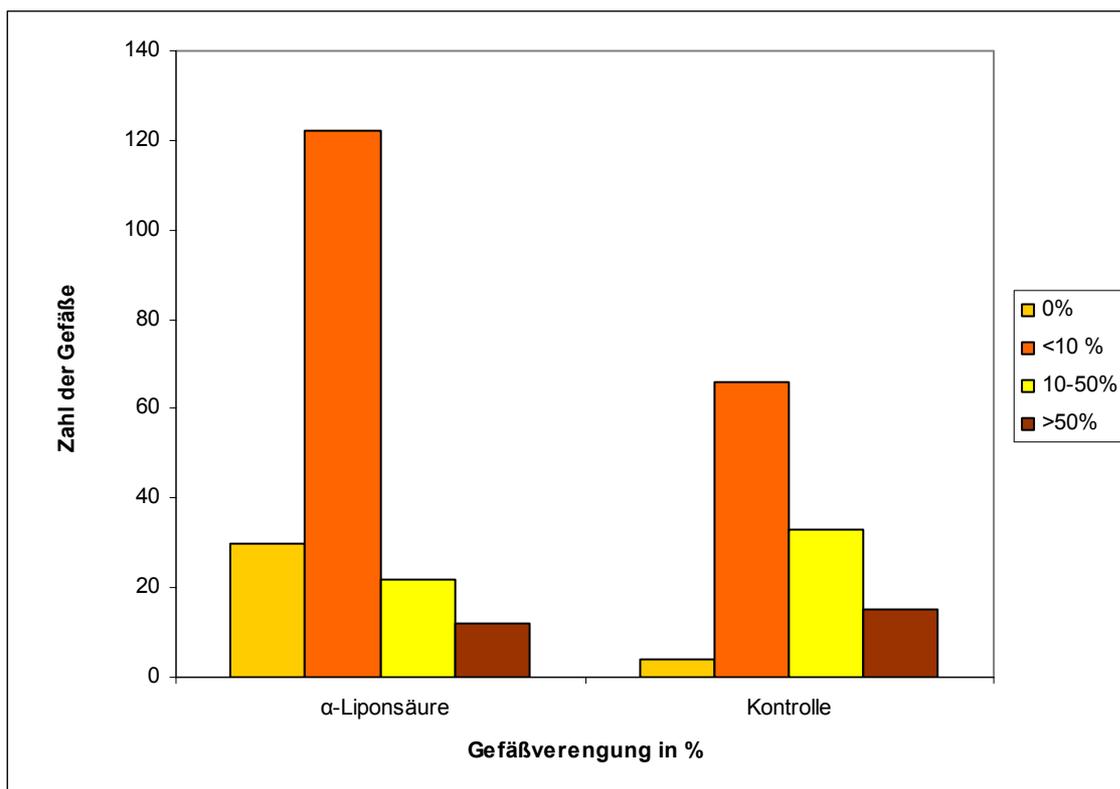


Abbildung 17: Ausprägung der Transplantatvaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Zahl der Gefäße und Unterteilung nach prozentualer Gefäßverengung

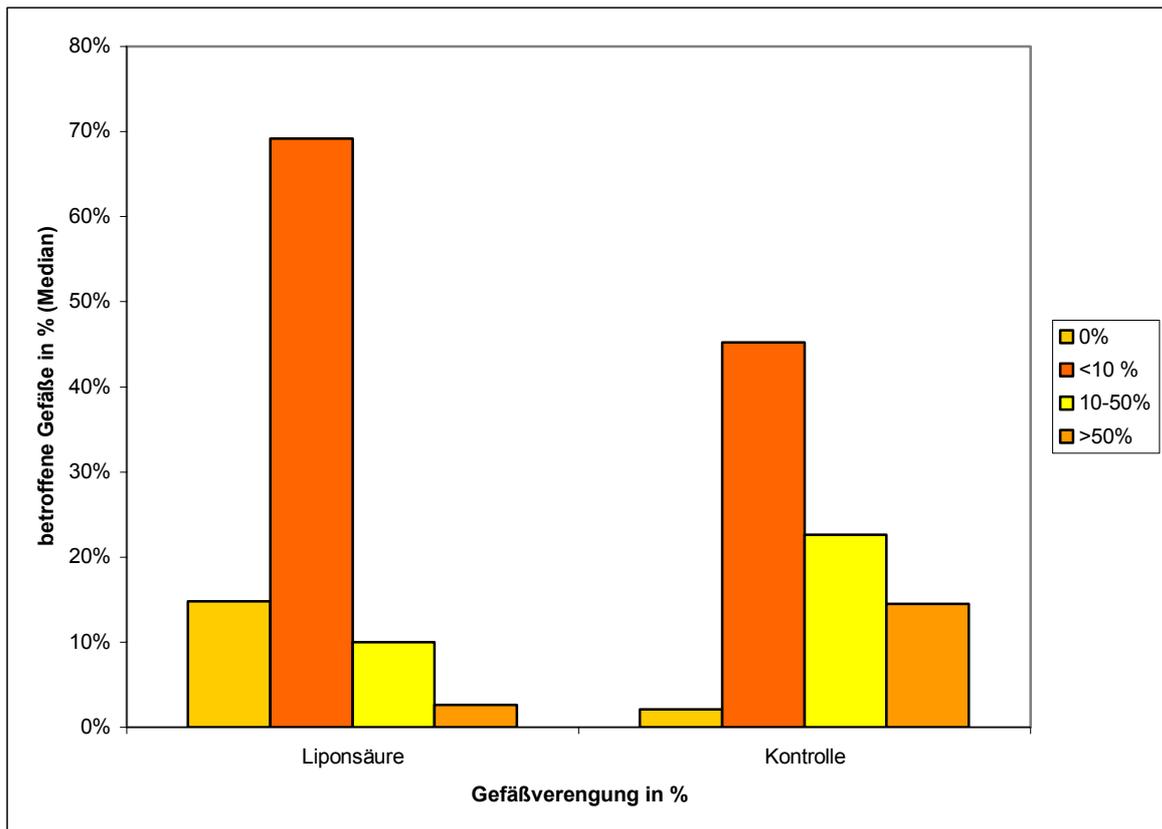


Abbildung 18: Ausprägung der Transplantatvaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahl der Gefäße (Median) und Unterteilung nach prozentualer Gefäßverengung

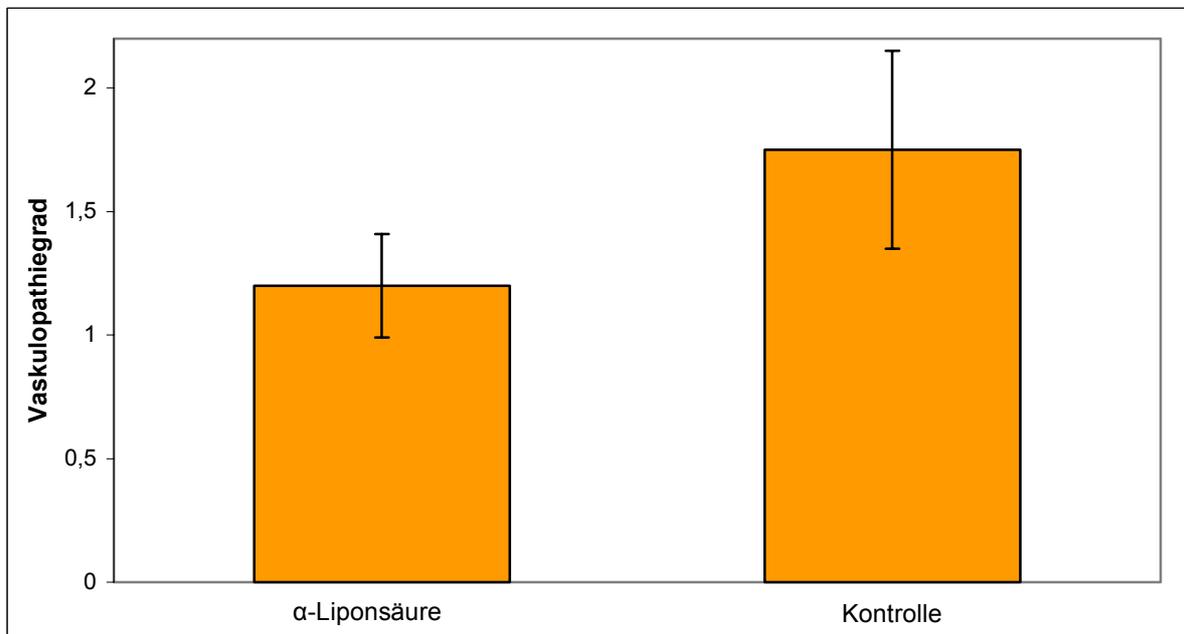


Abbildung 19: Durchschnittlicher Schweregrad der Vaskulopathie (α -Liponsäure vs. Kontrolle)

3.3 Hemmung der intimalen Expression von Adhäsionsmolekülen unter Einfluss von α -Liponsäure

Unter Verwendung von primären Antikörpern gegen ICAM-1 und VCAM-1 (s. 2.7.4) wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen in Gefäßanschnitten von Koronararterien transplantiert Herzen unter dem Einfluss von α -Liponsäure erfasst. Dabei wurde eine gesteigerte Expression hauptsächlich in der Intima, aber auch – in abgeschwächter Form - im Interstitium und in der Adventitia von Gefäßanschnitten in transplantierten Herzen detektiert (s. Abbildung 20). Diese Erkenntnisse decken sich auch mit Befunden anderer Autoren [83]. Bei der Untersuchung der intimalen Färbescores im transplantierten Herzen 120 Tage nach Transplantation fiel primär eine deutlich stärkere Expression von ICAM-1 und VCAM-1 als im nicht transplantierten Herzen auf (s. 3.1.5 und 3.1.6). Daraufhin wurden koronare Gefäßanschnitte von 15 asservierten Transplantatherzen (Verum-Gruppe n=9, Kontroll-Gruppe n=6) hinsichtlich ihrer intimalen Anfärbung nach ICAM-1- und VCAM-1-Färbung untersucht (s. 2.7.4 und 2.8.5).

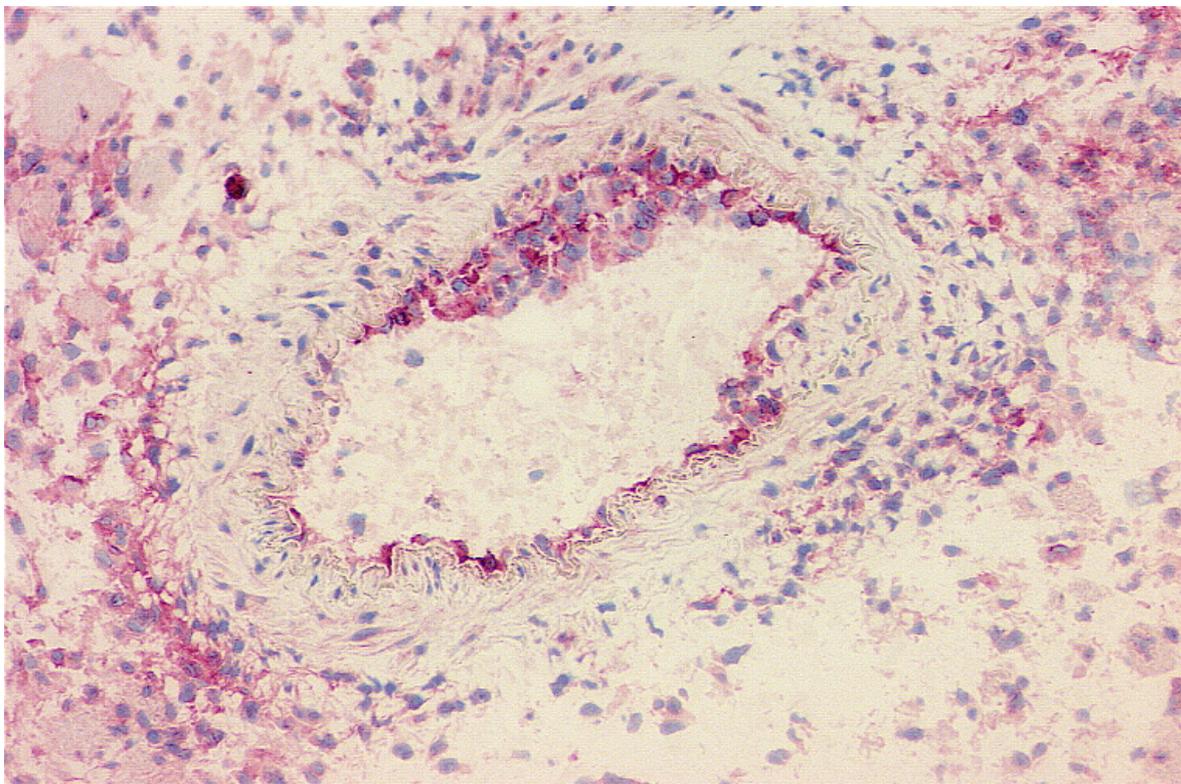


Abbildung 20: VCAM-1-Expression im Bereich von Intima, Adventitia sowie Interstitium im durch Transplantatvaskulopathie geschädigten Herzen (Gefäßverengung 10-50%, APAAP-Färbung)

3.3.1 Hemmung der ICAM-1-Expression in transplantierten Herzen

Insgesamt wurden 157 arterielle Gefäßanschnitte der α -Liponsäure-Gruppe und 79 Gefäßanschnitte der Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer intimalen ICAM-1-Färbung beurteilt. In der Verum-Gruppe wiesen lediglich ca. 47 % eine positive Anfärbung auf, wohingegen ohne Medikament ca. 65 % der Gefäßanschnitte eine intimale ICAM-1-Färbung zeigten (s. Tabelle 12 und Tabelle 13). Unter Betrachtung der absoluten Zahlen mittels Kontingenztafel-Analyse zeigt sich eine signifikante Verlagerung hin zu einer geringeren ICAM-1-Expression im transplantierten Herzen nach Gabe von α -Liponsäure (**Verum- vs. Kontroll-Gruppe, Kontingenztafelanalyse, $p=0,0001$**) (s. Abbildung 21). Betrachtet man allerdings die relativen Zahlen, so schneiden die Tiere in der α -Liponsäure-Gruppe in Hinblick auf den Anteil der Gefäße ohne ICAM-1-Expression nur tendenziell besser ab (**$45,5 \% \pm 25,3 \%$ Verum vs. $30,3\% \pm 21,7 \%$ Kontrolle, $p=0,4$**) (s. Abbildung 22).

Auch die gewichteten, durchschnittlichen Expressionsscores (s. 2.9.5) liegen ohne Verabreichung von α -Liponsäure tendenziell ungünstiger (**$1,3 \pm 0,26$ Verum- vs. $1,54 \pm 0,5$ Kontrollgruppe, $p=0,09$**) und unterstützen die Annahme einer Hemmung der ICAM-1-Expression unter Gabe von α -Liponsäure im transplantierten Herzen (s. Abbildung 23).

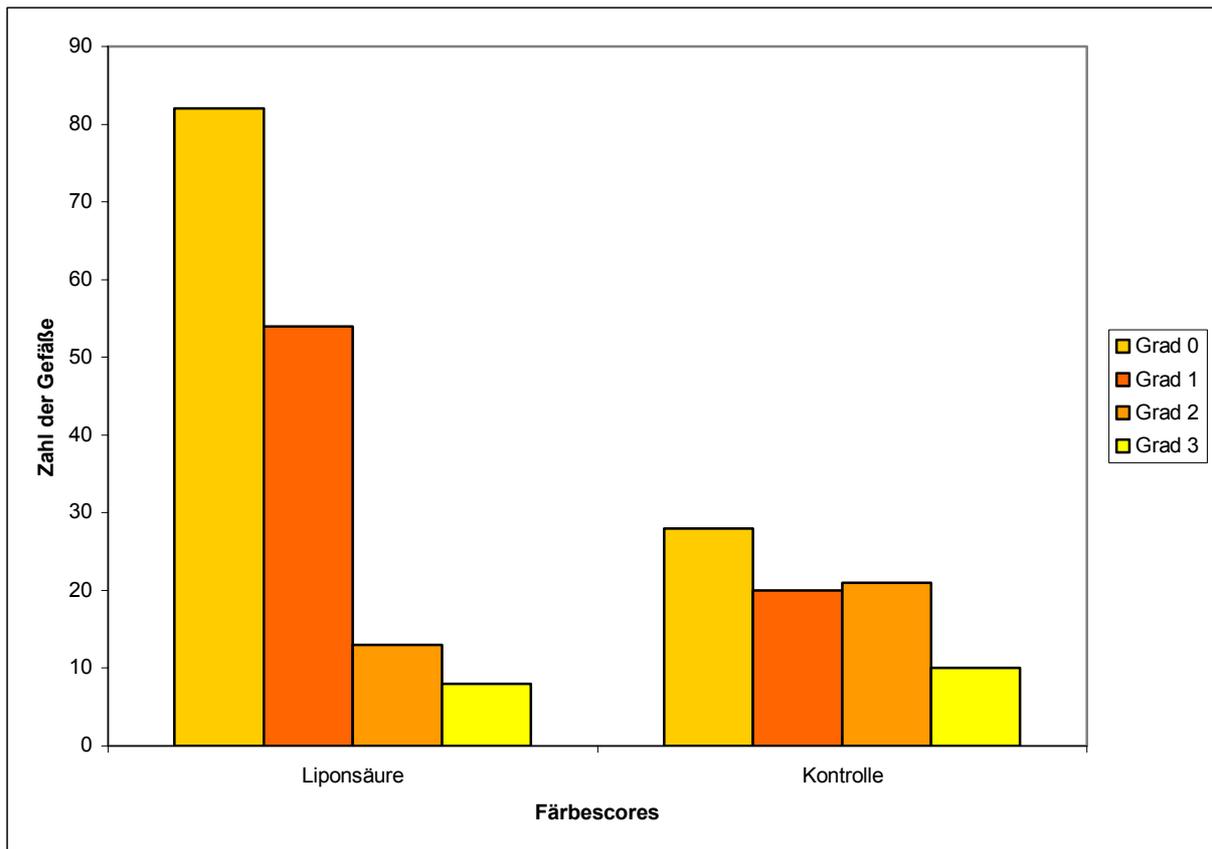


Abbildung 21: Intimale ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Gefäßzahlen und Unterteilung nach Färbescores (Grad 0-3)

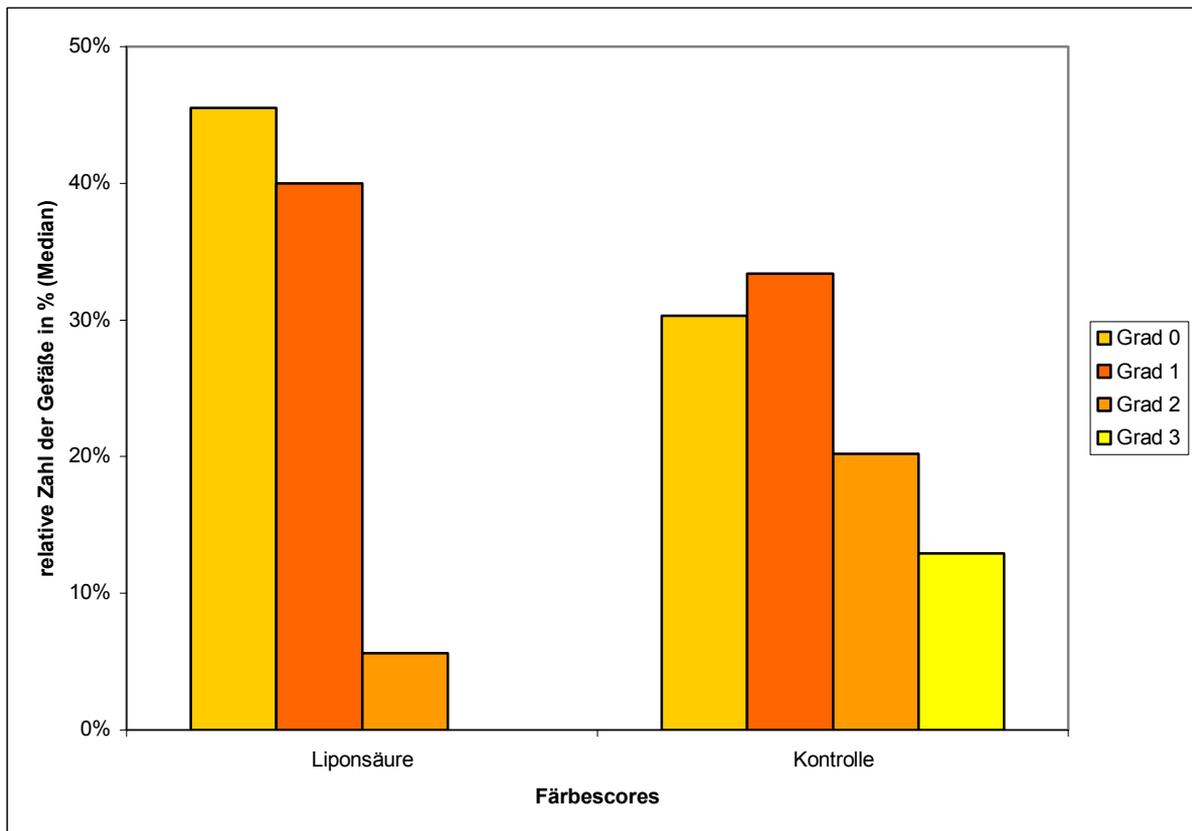


Abbildung 22: Intimale ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahl der Gefäße (Median) und Unterteilung nach Färbescores (Grad 0-3)

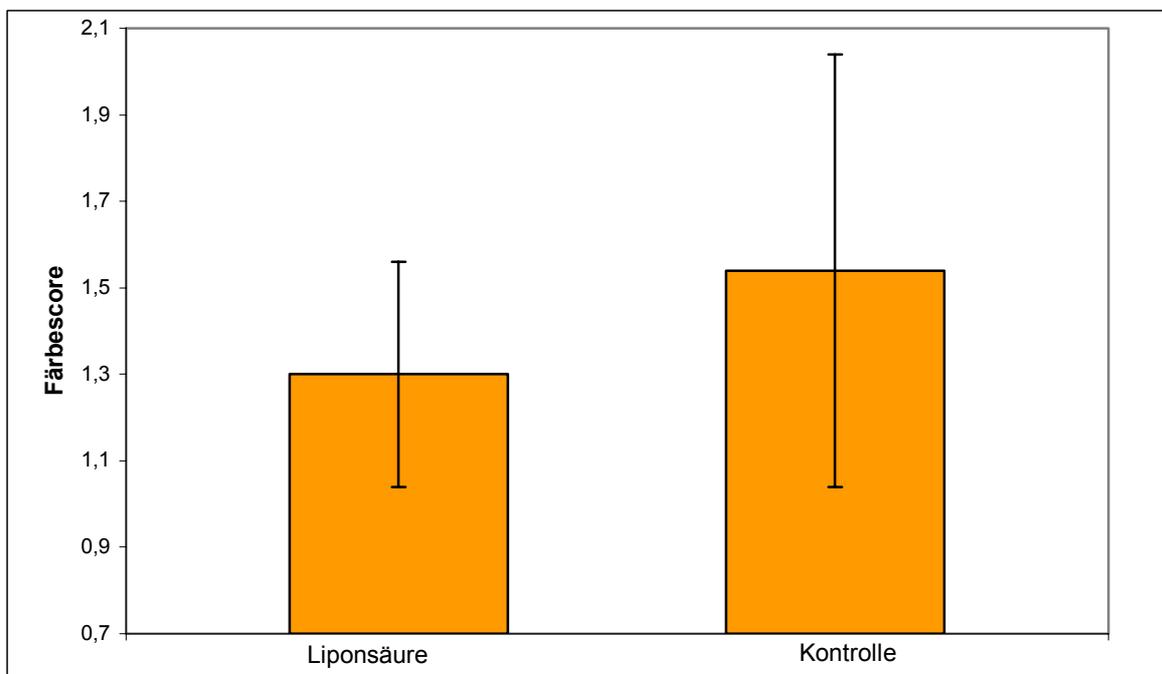


Abbildung 23: Durchschnittliche Scores der intimalen ICAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle)

3.3.2 Hemmung der VCAM-1-Expression in transplantierten Herzen

Analog zur ICAM-1-Auswertung in den Herztransplantaten (s. 3.3.1) wurden 150 arterielle Gefäßanschnitte mit und 93 arterielle Gefäßanschnitte ohne vorherige α -Liponsäure-Gabe untersucht (s. Tabelle 17 und Tabelle 18). Dabei war die geringere intimale Expression von VCAM-1 in der Verum-Gruppe deutlich. So wiesen in der Verum-Gruppe zwar ca. 71 % eine positive Anfärbung auf, wohingegen jedoch ohne Medikament ca. 82 % der Gefäßanschnitte eine intimale VCAM-1-Färbung zeigten (s. Tabelle 17 und Tabelle 18). Unter Betrachtung der absoluten Zahlen mittels Kontingenztafel-Analyse zeigt sich eine signifikante Verlagerung hin zu einer geringeren VCAM-1-Expression im transplantierten Herzen nach Gabe von α -Liponsäure (**Verum- vs. Kontroll-Gruppe, Kontingenztafelanalyse, $p < 0,0001$**) (s. Abbildung 24). Auch nach Betrachtung der relativen Zahlen schneiden die Tiere in der α -Liponsäure-Gruppe beim Anteil der Gefäße ohne VCAM-1-Expression deutlich günstiger ab (**$25\% \pm 14\%$ Verum- vs. $10,9\% \pm 7,6\%$ Kontroll-Gruppe; $p = 0,03$**) (s. Abbildung 25).

Ohne Verabreichung von α -Liponsäure liegen auch die gewichteten, durchschnittlichen Expressionsscores (s. 2.9.5) deutlich ungünstiger (**$1,36 \pm 0,25$ Verum- vs. $1,84 \pm 0,45$ Kontroll-Gruppe, $p = 0,018$**) und unterstützen die Annahme einer Hemmung der ICAM-1-Expression unter Gabe von α -Liponsäure im transplantierten Herzen (s. Abbildung 26).

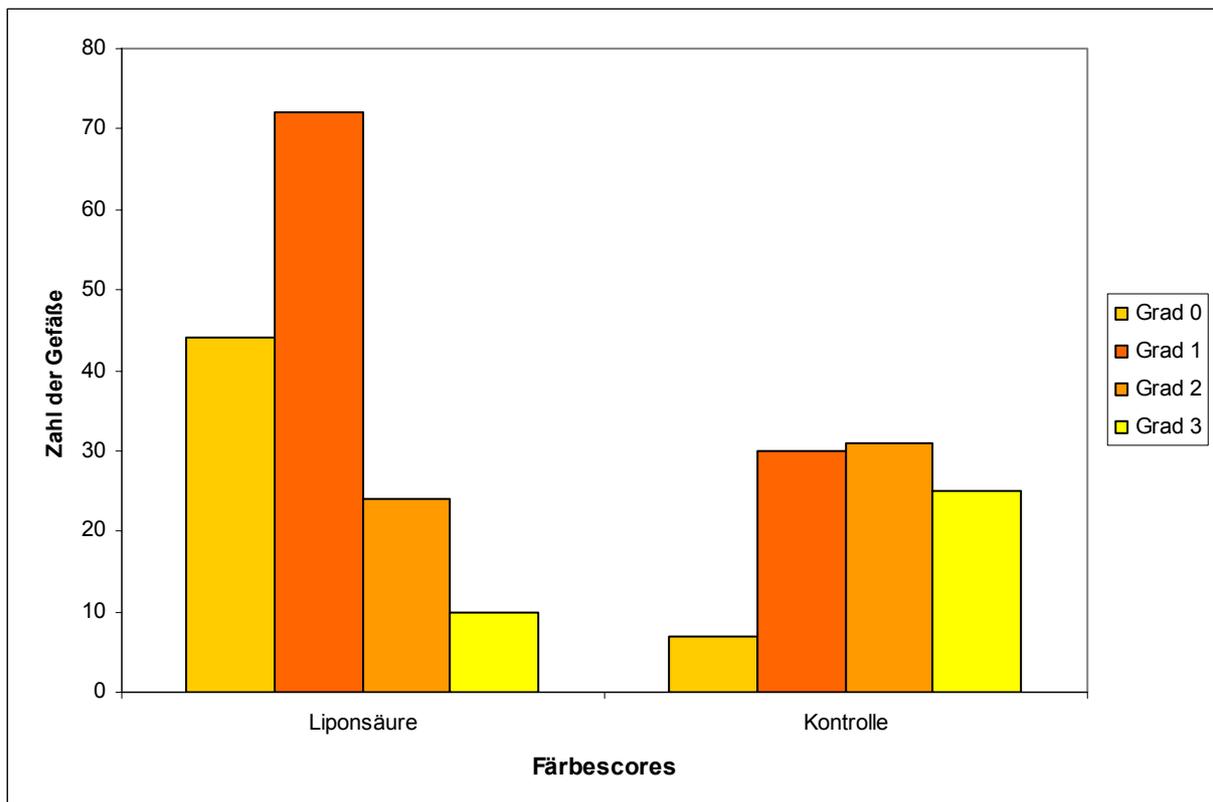


Abbildung 24: Intimale VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der absoluten Gefäßzahlen und Unterteilung nach Färbescoreres (Grad 0-3)

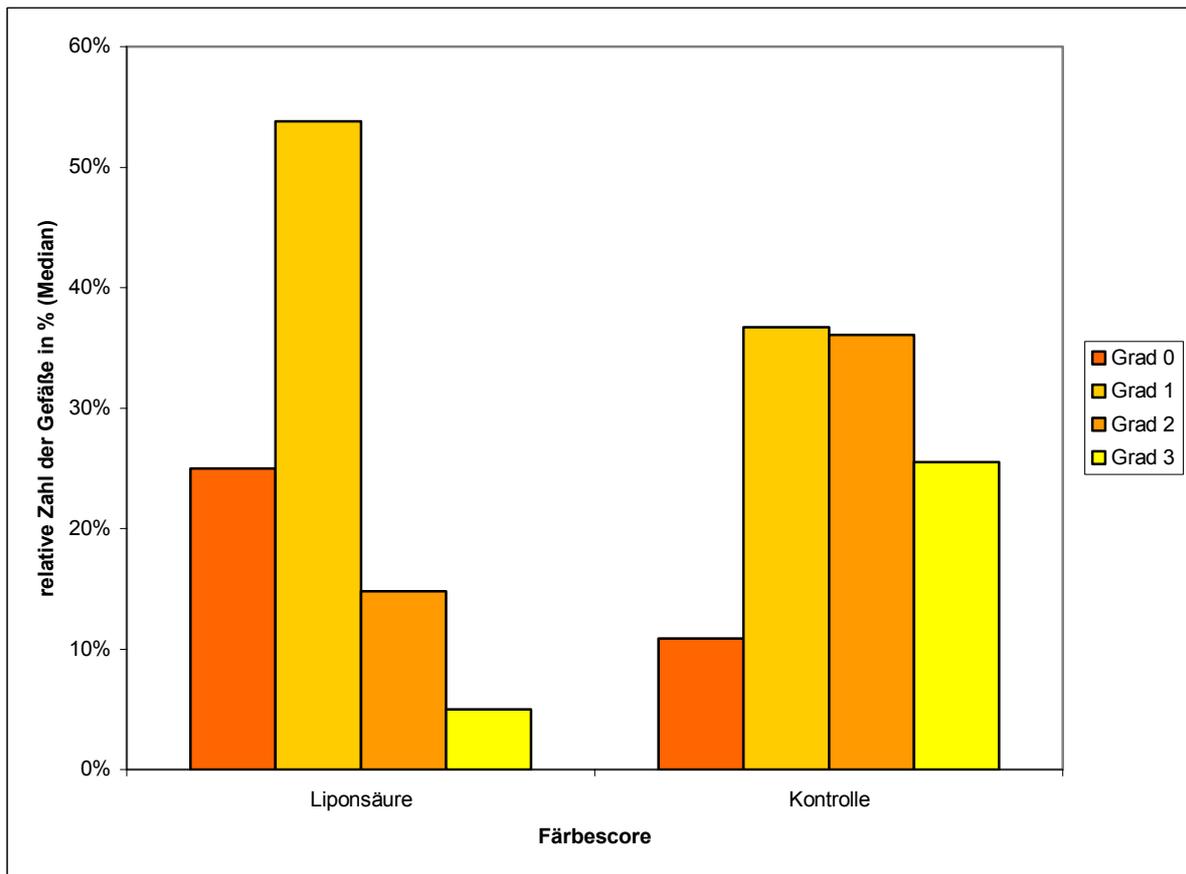


Abbildung 25: Intimale VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle) unter Betrachtung der relativen Zahlen der Gefäße (Median) und Unterteilung nach Färbescores (Grad 0-3)

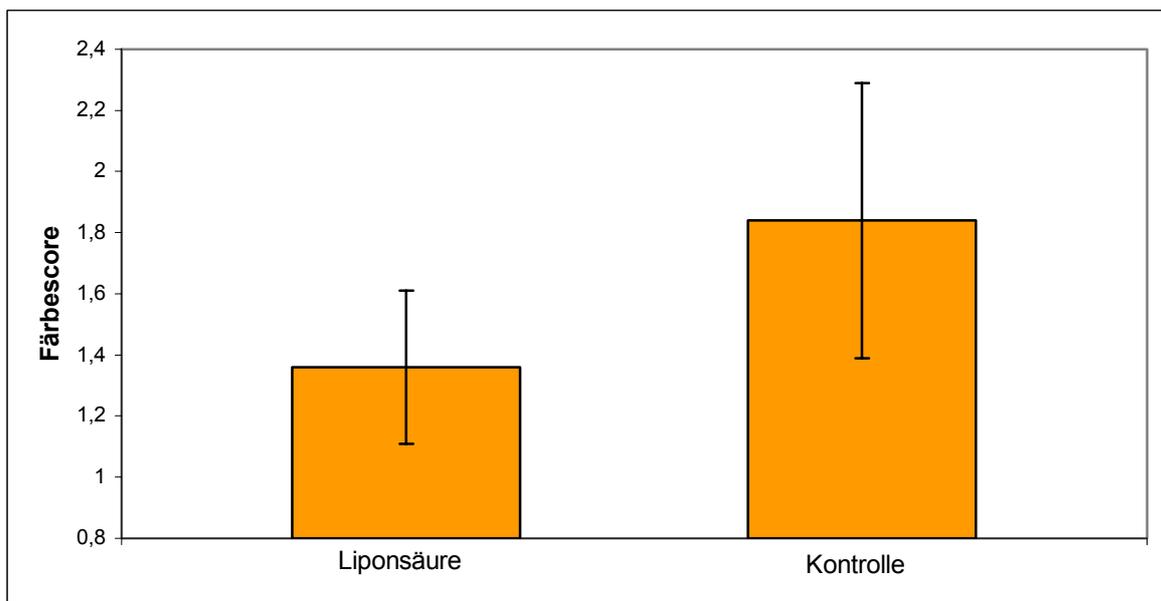


Abbildung 26: Durchschnittliche Scores der intimalen VCAM-1-Expression (α -Liponsäure vs. Kontrolle)

4 Diskussion

Am Modell einer allogenen, heterotopen Herztransplantation bei der Ratte wurde gezeigt, dass eine Langzeittherapie (120 Tage) mit α -Liponsäure, die einen Kofaktor im oxidativen Metabolismus sowie ein potentes Antioxidans und einen Chelatbildner darstellt, zu einer signifikanten Reduktion der TVP im transplantierten Herzen führt (s. 3.2). Zusätzlich zeigen immunhistologische Untersuchungen eine reduzierte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) im transplantierten Herzen (s. 3.3).

Die Beobachtung, dass die Reduktion der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen mit einer Verminderung der Intimaproliferation einhergeht, legt die Vermutung nahe, dass hier ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte. Diese Vermutung ist gut mit der zuvor postulierten Annahme, dass der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen (insbesondere ICAM-1 und VCAM-1) induzierend oder stimulierend auf den Prozess der TVP wirken, vereinbar [5, 78]. Zusammengefasst muss der beobachtete präventive Effekt von α -Liponsäure, d.h. die signifikante Reduktion der TVP im transplantierten Herzen im kausalen Zusammenhang mit einer Suppression der Synthese von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) über eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung diskutiert werden (s. Abbildung 27).

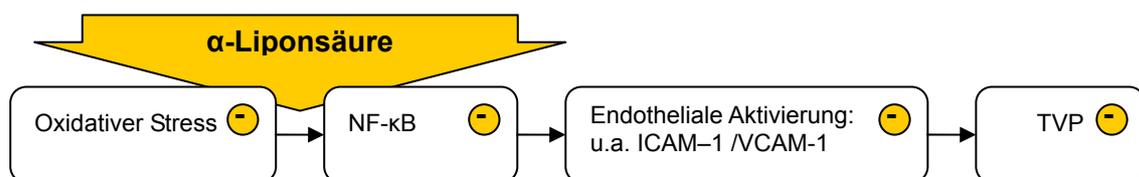


Abbildung 27: Vereinfachtes Wirkungsmodell der α -Liponsäure im Endothel des transplantierten Herzen

Die TVP, die auch als besonders aggressive, diffuse Sonderform der koronaren Herzerkrankung im transplantierten Herzen beschrieben wird [8, 69], ist nach Ablauf des 1. Jahres nach Transplantation die häufigste Todesursache nach erfolgreicher Herztransplantation beim Menschen [11, 23, 38, 92]. Im Rahmen der multifaktoriellen Pathogenese spielen wahrscheinlich durch nicht-immunologische Faktoren modifizierte immunologische Prozesse eine Rolle [54]. Die auslösenden Initiatoren der Kaskade der Aktivierung, Dysfunktion und irreversibler Schädigung des

Endothels bis hin zur kompletten Stenosierung des Gefäßes durch Migration glatter Muskelzellen sind nach wie vor nicht bekannt.

Bekannt ist, dass die pathologische Aktivierung des Endothels ein entscheidender Schritt auf dem Weg zur TVP ist. Dabei wird ein zunächst lockerer Verbund von Entzündungszellen mit dem Endothel („Rolling“) unter Vermittlung von Adhäsionsmolekülen zu einem stabileren Kontakt („Adherence“) ausgebaut. Zusätzlich wird auch der Kontakt mit Komponenten der extrazellulären Matrix ermöglicht und die Migration der Entzündungszellen in die Gefäßwand durch Adhäsionsmoleküle initiiert, so dass Adhäsionsmoleküle eine Schlüsselrolle im Prozess der endothelialen Aktivierung besetzen [3, 41, 48]. So wiesen ICAM-1 defiziente Mäuse neben der Reduktion des leukozytären Infiltrates und der T-Zell Antwort nach Arteria carotis-Allotransplantation auch eine um bis zu 52 % reduzierte Intimaproliferation auf [78, 95].

Wie aber kommt es im Zusammenhang mit der beginnenden TVP zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und damit zur notwendigen Adhäsion von Entzündungszellen an das Endothel? Dieser Vorgang ist leider nach wie vor nicht komplett geklärt. Nicht nur diverse Zytokine, sondern auch die vermehrte Produktion von freien Sauerstoff-Radikalen (auch: reactive oxygen species (ROS)) können im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen und mit Ischämie-Reperfusion-Traumata über eine Aktivierung des Endothels zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen führen [20, 26, 58]. Insbesondere frühe Ischämie-Reperfusion-Traumata werden als primär nicht-immunologische Einflussfaktoren der TVP genannt und könnten neben anderen Einflussfaktoren (s. 1.1.2) am Anfang der TVP stehen [39]. Ein Beispiel dafür ist das Cytomegalie-Virus: Infektionen mit diesem Virus gehen mit einer schwerwiegenderen TVP beim Menschen einher. Diese Beobachtung wird auf eine deutliche Zunahme des oxidativen Stresses unter dieser Infektion zurückgeführt [93].

Dabei ist anzunehmen, dass der entstehende oxidative Stress u. a. über eine direkte oder indirekte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und AP-1 zur gesteigerten Gen-Transkription bzw. Expression von Adhäsionsmolekülen führt [40, 58, 76]. Insbesondere NF- κ B ist in der Literatur in Bezug auf seine Antioxidans-Sensibilität häufig untersucht worden. So wurde in humanen T-Zellen gezeigt, dass das potente Antioxidans NAC in der Lage ist, den durch H₂O₂ aktivierten NF- κ B zu hemmen [76].

Nach Initiierung der endothelialen Aktivierung kommt es dann zur Progression mit einer z.T. irreversiblen Dysfunktion des Endothels, die in der Stenosierung des Gefäßlumens durch einwandernde glatte Muskelzellen ihren Höhepunkt erreicht (s. 1.1.3) [53].

Vor diesem Hintergrund wurde die Arbeitshypothese entwickelt, dass der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen (insbesondere ICAM-1 und VCAM-1) induzierend oder stimulierend auf den Prozess der TVP wirken.

Um diesen möglichen therapeutischen Angriffspunkt in der Pathogenese der TVP auf seine klinische Relevanz zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der Effekt des Antioxidans α -Liponsäure im beschriebenen Tiermodell an der Ratte untersucht (s. 2.1). Dabei wurde nach 120tägiger Behandlung mit α -Liponsäure zunächst die Ausprägung der TVP mit einer Kontrollgruppe verglichen. Als reproduzierbares Modell diente eine allogene heterotope Herztransplantation bei der Ratte (s. 2.3) [74].

α -Liponsäure ist ein Kofaktor im oxidativen Metabolismus, ein potentes Antioxidans und in der Lage Metall-Chelate zu bilden. Dieses Pharmakon wird bereits seit Jahrzehnten in Deutschland zur Behandlung diabetischer Komplikationen angewendet (diabetische Polyneuropathie) [30]. Von den Endothelzellen aufgenommen, wird α -Liponsäure in den Mitochondrien zum potenten Antioxidans DHLA reduziert [10]. Sowohl das Derivat DHLA, als auch die α -Liponsäure selbst fungieren als Inhibitoren der redox-sensitiven NF- κ B-Aktivierung (s. 1.1.4) [71, 97].

Um eine ausreichende und sichere Resorption zu gewährleisten, wurde α -Liponsäure über das gut durchblutete Peritoneum in Form einer intraperitonealen Injektion appliziert. An der Ratte konnte eine Reduzierung des oxidativen Stresses durch 20-100 mg/ kg Körpergewicht i.p. (5x/ Woche) sowie 350 mg/ kg Körpergewicht p.o. (täglich) beobachtet werden [21, 61]. Dabei wurde ein dosisabhängiger Effekt in Ratten eines Neuropathie-Modells bei Diabetes mellitus gezeigt [61]. Pharmakologische Studien beim Menschen haben bereits bei einer per oralen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht α -Liponsäure eine Plasmakonzentration von bis zu 60-70 μ mol/l gezeigt, wobei eine effektive Konzentration zur Hemmung der NF- κ B-Aktivierung sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen bei ≥ 50 μ mol/l beschrieben wurde [97]. In der hier vorliegenden Studie wurde eine Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht gewählt. Die angewendete Dosis erwies sich im Tierversuch als

sicher; es wurden insbesondere keine gastrointestinalen (z.B. Diarrhöen) oder hämorrhagischen Komplikationen beobachtet. Im beschriebenen Versuchsaufbau entwickelten sich die Ratten in beiden Gruppen vergleichbar. Das durchschnittliche Körpergewicht war zum Zeitpunkt der Organasservation in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (s. 3.1.1). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen pharmakologischer Untersuchungen von α -Liponsäure an der Ratte [21, 61].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen deutlichen Rückgang der TVP unter der Therapie mit α -Liponsäure. Diese Substanz führt im beschriebenen Rattenmodell sowohl zu einer Verringerung der intimalen Proliferation, als auch zu einer Reduzierung der Inzidenz der TVP. Eine signifikante Verlagerung weg von ausgeprägten, z.T. stenosierenden Erscheinungsbildern, hin zu weniger geschädigten Koronararterien konnte beobachtet werden (3.2).

Eine orientierende Betrachtung des histologischen Bildes der Abstoßungsreaktion in den transplantierten Rattenherzen zeigte unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit (α -Liponsäure vs. Kontrollgruppe) eine nur mäßige Abstoßungsreaktion (2.8.3). Bei beiden Gruppen konnten nach 120 Tagen leichtgradige Abstoßungsreaktionen mit nur geringem mononuklearem Infiltrat unter der einheitlichen Immunsuppression mit Ciclosporin (i.p.) beobachtet werden (s. Abbildung 12).

α -Liponsäure scheint also keinen Einfluss auf die zelluläre Abstoßungsreaktion zu haben, die von einigen Autoren zu den Einflussfaktoren der TVP gezählt wird [19, 64, 80].

Die in beiden Gruppen durch tägliche Palpation kontrollierte Transplantatfunktion war am Tag der Organasservation gut (3.1.2). Obwohl die Herzen der mit α -Liponsäure behandelten Tiere etwas besser schlugen, ist diese Beobachtung statistisch nicht signifikant.

Um der Beantwortung der Frage, wie α -Liponsäure zu einer Verbesserung der TVP führt, näher zu kommen, wurde die intimale ICAM-1- und VCAM-1-Expression mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Die Immunhistologie (s. 2.7.4) erlaubte dabei eine präzise Charakterisierung der Intensität und Lokalisierung der Ziel-Adhäsionsmoleküle im Endothel. Insbesondere die APAAP-Technik, ein sehr sensitives und in der regulären Lichtmikroskopie einsetzbares Detektionssystem, ermöglicht bereits den Nachweis von geringen Antigenmengen sowie eine exakte

morphologische Zuordnung. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Krankheitsbild der TVP mit einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 im Endothel des transplantierten Herzen einhergeht. Dieser Befund ist vereinbar mit Beobachtungen in anderen TVP-Modellen im Tier [5, 78] und bestätigt die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen im Pathomechanismus dieser Erkrankung.

Dabei verursacht α -Liponsäure in der vorliegenden Studie nicht nur einen morbestatischen Effekt auf die TVP, sondern parallel auch eine reduzierte endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 im transplantierten Herzen.

Betrachtet man die intimale Expression beider Adhäsionsmoleküle separat, so zeigen sowohl ICAM-1, als auch VCAM-1 eine Verringerung der intimalen Expression nach Therapie mit α -Liponsäure, wobei der hemmende Effekt für die VCAM-1-Expression statistisch deutlicher ausfällt (s. 3.3). Eventuell spiegelt dieser Befund die größere Bedeutung des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in der initialen Pathogenese der TVP wieder. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass VCAM-1 besonders in aktivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen sowie insbesondere durch NF- κ B-Aktivierung exprimiert wird und so auch eine stärkere Hemmung durch die medikamentöse Therapie erfahren konnte [40]. Diese Erklärung wird auch von der Beobachtung unterstützt, dass erhöhte Werte für zirkulierende, lösliche VCAM-1 beim Menschen signifikant häufiger bei der TVP gefunden wurden, wohingegen lösliche ICAM-1 offensichtlich mit dem Auftreten der TVP nicht korrelieren [60, 94].

Auch in den nativen Herzen der transplantierten Tiere konnte eine geringe intimale Expression von Adhäsionsmolekülen detektiert werden. Gleichzeitig kam es allerdings zu keiner nennenswerten intimalen Proliferation im Sinne einer TVP (s. 3.1.4). Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen in einem murinen Herztransplantationsmodell und könnte durch eine vermehrte Zirkulation von systemischen Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-1 und CRP zu erklären sein, die wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen modulieren können [5, 32, 56]. Inwieweit bei der Vermittlung dieser Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auch im Endothel des nicht-transplantierten Herzens lösliche Adhäsionsmoleküle (sCAM) eine Rolle spielen, ist nicht bekannt [60, 94]. Jedoch werden erhöhte Werte des löslichen VCAM-1 auch im peripheren, venösen Blut häufiger bei Patienten mit TVP gefunden, so dass das lösliche VCAM-1 als zusätzlicher Marker dienen könnte [94]. Die untersuchten Gefäßanschnitte der Ratten ohne vorherige Transplantation wiesen

ebenfalls vereinzelt eine diskrete intimale Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf, die aber orientierend deutlich geringer als die Expression in den nativen Herzen der transplantierten Ratten ausfiel. Adhäsionsmoleküle werden also im Rahmen einer Transplantation auch in Endothelien außerhalb des transplantierten Herzens vermehrt exprimiert.

α -Liponsäure vermindert die Entstehung der TVP über eine ICAM-1- und VCAM-1-Suppression. Im Umkehrschluss ist diese Beobachtung gut mit unserer Arbeitshypothese sowie mit Untersuchungen an ICAM-1 defizienten Mäusen vereinbar [95]: Die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 scheint eine induzierende oder stimulierende Wirkung auf den Prozess der TVP zu haben.

Die erhobenen Daten legen zusätzlich, wie bereits beschrieben, den Zusammenhang zwischen antioxidativer Wirkung durch α -Liponsäure und verminderter Expression von Adhäsionsmolekülen nahe. Die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 wird wahrscheinlich hauptsächlich über einen Antioxidans-sensitiven Mechanismus reguliert [58]. α -Liponsäure, sowie sein aktiver Metabolit DHLA können dabei u. a. als Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung fungieren. Dem redox-sensitiven NF- κ B Transkriptions-Faktor [71, 97] wiederum kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Transkription von Adhäsionsmolekülen und anderen Genen der endothelialen Aktivierung zu (s.1.1.4) [9, 35]. Auch in durch TNF- α aktivierten humanen endothelialen Zellen der Aorta konnte mittlerweile eine Verminderung der Expression von ICAM-1 durch α -Liponsäure gezeigt werden. Dabei führten die Autoren auch in dieser Untersuchung die Inhibition der Adhäsionsmoleküle auf eine Hemmung der I κ B- α / NF- κ B-Signalkette zurück [97]. Nach dem Einsatz von anderen Antioxidantien (PDTC, NAC) konnte an, durch IL-1 β stimulierten, humanen Endothelzellen der Umbilikalvene eine Reduktion der Expression von VCAM-1 nachgewiesen werden [58].

Dennoch finden sich in der Literatur auch Zweifel daran, dass α -Liponsäure hauptsächlich in seiner Funktion als Antioxidans für eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung verantwortlich ist. Alternativ wird auch die Fähigkeit der α -Liponsäure zur Chelatbildung mit Eisen und Kupfer mit der Inhibition der NF- κ B-Aktivierung in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass z.B. PDTC NF- κ B in Endothelzellen trotz seiner antioxidativen Fähigkeiten hauptsächlich durch Chelatbildung inhibiert [15, 97]. Dazu passen auch bekannte Untersuchungen, in denen NF- κ B nicht durch ROS, wie z.B. H₂O₂ aktiviert werden konnte [15] oder in denen andere Antioxidanzien

(z.B. NAC, Ascorbinsäure) nicht zu einer Suppression von NF- κ B führten [97]. Wahrscheinlich fungieren ROS nicht als universeller Aktivator von NF- κ B. Ihre Wirkung scheint insbesondere von der Art und dem aktuellem Zustand der Zielzelle (z.B. Endothelzellen) abhängig zu sein [16]. Ein Beispiel für die Aktivierung von NF- κ B auch ohne Einfluss von ROS konnte mittels Interleukin-1 (IL-1) in Epithelzellen erbracht werden [14].

Dennoch unterstützt die Beobachtung eines protektiven Effektes auf das Endothel des transplantierten Herzens durch Reduktion von Adhäsionsmolekülen unter antioxidativer Therapie mit α -Liponsäure auch die Vermutung eines für oxidativen Stress sensiblen Pathomechanismus der TVP. Diese Sichtweise wird auch durch die von mehreren Autoren bevorzugte Theorie der Hauptaktivierung von NF- κ B durch ROS in Endothelzellen genährt [58, 59, 76, 97]. So könnte man postulieren, dass oxidativer Stress induzierend oder stimulierend auf den Prozess der TVP einwirkt. Die folgende Expression von Adhäsionsmolekülen könnte als Initiator oder Ausdruck der endothelialen Aktivierung fungieren. Für diese These sprechen folgende Punkte:

- 1) das Antioxidans α -Liponsäure hat, wie in diesem Tiermodell gezeigt, eine protektive Wirkung auf das koronare Endothel bzgl. der TVP durch Hemmung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression,
- 2) in humanen Endothelzellen kann mittels α -Liponsäure eine Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen über eine Inhibierung der Aktivierung des redox-sensitiven NF- κ B Transkriptions-Faktor erfolgen [97]
- 3) vermehrter oxidativer Stress (während einer CMV-Infektion) im Endothel humaner Herztransplantate führt zu einer schwerwiegenderen TVP [93], und
- 4) eine gesteigerte Produktion von ROS spielt in der Pathogenese vieler Einflussfaktoren der TVP wie z.B. bei Ischämie-Reperfusion-Traumata, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Nikotin-Abusus, Hypercholesterinämie, Hyperhomozysteinämie, Arteriosklerose und allgemein bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle [26, 40].

5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine Langzeittherapie mit α -Liponsäure, nicht nur eine Verbesserung der TVP erreicht werden konnte, sondern auch die irreguläre Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) in der Gefäßintima deutlich reduziert wird. Diese Erkenntnis führt zu folgenden pathophysiologischen und klinischen Schlussfolgerungen:

Die vermehrte intimale Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im transplantierten Herzen bestätigt am Tiermodell - die auch von anderen Autoren beschriebene Beobachtung - einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen im Rahmen der TVP [5, 78]. Dadurch wird die Schlüsselrolle der Adhäsionsmoleküle für die Pathogenese der TVP unterstrichen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass im Tiermodell der Herztransplantation auch Adhäsionsmoleküle in den Endothelien von nicht transplantierten Herzen gesteigert exprimiert werden.

Die Beobachtung, dass α -Liponsäure die TVP reduziert, während die intimale ICAM-1- und VCAM-1-Expression gehemmt wird, legt einen kausalen Zusammenhang nahe und impliziert, dass die Expression dieser Adhäsionsmoleküle die TVP induziert bzw. stimuliert. Dabei ist die Verminderung der VCAM-1-Expression deutlicher und spricht für eine besondere Bedeutung dieses Adhäsionsmoleküles. In seiner löslichen Form kommt er als Marker für die TVP in Betracht [94]. Insgesamt liegt jedoch der Schluss nahe, dass α -Liponsäure über eine Hemmung der Produktion von Adhäsionsmolekülen präventiv auf das Endothel von Rattenherzen nach heterotoper Transplantation wirkt.

Die Verwendung des Pharmakons α -Liponsäure konnte zur weiteren Klärung des Mechanismus, der zur Verringerung der Expression der Adhäsionsmoleküle und damit zur Verbesserung der TVP führt beitragen. Das zyklische Disulfid der Oktan-6,8-dithiolsäure ist als Antioxidans gut in der Literatur beschrieben. α -Liponsäure wirkt sowohl auf den redox-sensitiven NF- κ B Transkriptions-Faktor, als auch auf die Expression von Adhäsionsmolekülen inhibierend [10, 97]. Diese Beobachtungen sind gut mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten vereinbar. Im Umkehrschluss könnte man vermuten, dass oxidativer Stress durch eine Aktivierung von NF- κ B und eine vermehrte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen induzierend oder stimulierend auf den Prozess der TVP einwirkt. Die Bedeutung von ROS für die Pathogenese der TVP wird auch in der Literatur diskutiert.

Dringend gesucht wird ein potentes Pharmakon zur Vermeidung oder Verbesserung vaskulärer Läsionen, die bei Erkrankung mit der TVP entstehen. Trotz intensiver Forschung konnte bisher keine pharmakologische Substanz gefunden werden, die das Entstehen oder Fortschreiten der häufigen TVP vermeiden kann. Vielmehr ist bei meist diffuser Erkrankung der Gefäße nach wie vor die komplikationsreiche Re-Transplantation der einzige aussichtsreiche Ansatz. Natürlich ist eine Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich. Dies hat sich in der Vergangenheit insbesondere bei dem Versuch gezeigt, viel versprechende antioxidative Therapieansätze auf andere kardiovaskuläre Erkrankungen des Menschen anzuwenden [18]. Jedoch können die vorliegenden Daten Anstoß zu weiteren klinischen Studien sein, um die Effektivität von α -Liponsäure in Hinblick auf die Verminderung der intimalen Proliferation, ggf. auch unter Verwendung von abweichenden Dosierungen, zu untersuchen. Womöglich ist eine höhere präventive Wirkung durch eine bloße Erhöhung der Dosis möglich. Ein dosisabhängiger Effekt des Antioxidans konnte gezeigt werden und die in dieser Arbeit gewählte Dosis ist vergleichsweise niedrig angesetzt [61].

Die in unserer Studie bestätigte Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die Pathogenese der TVP eröffnet ggf. auch Möglichkeiten noch sensitivere Methoden der Diagnostik für den klinischen Alltag zu entwickeln. So könnte der Nachweis von löslichen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. lösliche VCAM-1 eine frühere und weniger invasive Diagnostik ermöglichen [60, 94].

Außerdem sind sicherlich noch weiterführende Untersuchungen zur Pathogenese der TVP notwendig. So bleibt der Mechanismus über den α -Liponsäure in der Lage ist die NF- κ B Aktivierung und somit die Expression von Adhäsionsmolekülen zu hemmen offen für weitere Forschungsprojekte.

6 Zusammenfassung

Die TVP ist nach Ablauf eines Jahres nach erfolgreicher Herztransplantation die häufigste Ursache der Patientenmortalität. Eine medikamentöse Behandlung zur Vermeidung bzw. Verringerung der TVP ist nicht bekannt. Die Untersuchung der medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten ist Gegenstand dieser Arbeit.

In der Literatur wird vermutet, dass die Entstehung der TVP durch das Anheften von Entzündungszellen (Adhäsion) mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen an das Endothel initiiert wird. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden in der Literatur oft in diesem Zusammenhang genannt.

Bei fortgeschrittener TVP wird durch die Adhäsion der Entzündungszellen ein Prozess beginnend mit Vasokonstriktion über Migration von glatten Muskelfaserzellen in das Endothel bis hin zur Thrombosierung des gesamten Gefäßes ausgelöst. Am Ende dieser Kaskade der endothelialen Aktivierung steht eine irreversible Schädigung des Endothels unterschiedlichen Ausmaßes bis hin zum kompletten Verschluss des Gefäßes.

Gegenstand dieser Arbeit ist der Versuch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 durch medikamentöse Behandlung über 120 Tage mit dem Antioxidans α -Liponsäure zu hemmen und somit indirekt die Auswirkungen dieser Medikation auf die TVP zu untersuchen.

Unter den Bedingungen einer Herztransplantation im Tiermodell (Ratte) konnten folgende Zusammenhänge beobachtet werden:

- Es kommt nach erfolgreicher Herztransplantation zur vermehrten intimalen Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im transplantierten Herzen.
- Bei den mit α -Liponsäure behandelten Tieren konnte sowohl eine deutliche Verringerung der intimalen Proliferation, als auch eine Reduzierung der Inzidenz der TVP gezeigt werden.
- Zusätzlich zu diesem morbestatischen Effekt auf die TVP konnte eine verminderte intimale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 im transplantierten Herz nachgewiesen werden.

Abschließend zeigt der in dieser Arbeit untersuchte Versuchsaufbau – unterstützt durch zahlreiche Publikationen – dass das Antioxidans α -Liponsäure indirekt oder direkt über eine Suppression von Adhäsionsmolekülen einen protektiven Effekt auf

das Endothel des transplantierten Herzens hat. Die Ergebnisse dieser Studie untermauern die Schlüsselstellung von Adhäsionsmolekülen in der Pathogenese der TVP. Damit eröffnen sich ggf. auch für den Menschen weitere, dringend gesuchte Therapieoptionen zur medikamentösen Behandlung der TVP.

7 Summary

Transplant vasculopathy (TVP) is the predominant cause of patient mortality following the first year after transplantation. A medicamentous treatment for avoiding and/or reducing TVP is not well known. The investigation and assessment of medicamentous treatment possibilities is the subject of this work.

In literature, it is assumed that the emergence of TVP is initiated by attachment of inflammatory cells to the endothelium (adhesion) with the help of adhesion molecules. In this context, the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 are often mentioned in the literature.

TVP advances as the adhesion of the inflammatory cells begin a process of endothelial activation starting with vasoconstriction, followed by migration of smooth muscle fiber cells into the endothelium and cumulating in thrombosis. Finally, this cascade of endothelial activation results in irreversible endothelium damage which can ultimately result in the complete occlusion of the vessel.

The objective of this study is to reduce the expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 with medicamentous treatment of α -lipoic acid for a period of 120 days. The hypothesis is that the cascade of events causing TVP should be interrupted, and the incidence of TVP reduced.

This assumption was tested using a model of cardiac transplantation in a rat, which led to the following key observations:

- Successful cardiac transplantations result in an increased intimal expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the cardiac transplants.
- Animals treated with α -lipoic acid showed an obvious reduction of both the intimal proliferation and the incidence of TVP.
- In addition to this decelerating effect on TVP in cardiac transplants, a decreased intimal expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 was also proven.

Finally the experimental setup shows - supported by numerous publications - that the antioxidant α -lipoic acid directly or indirectly suppresses the adhesion molecules, thus creating a protective effect on the endothelium of the transplanted heart. The results of this study support the widely discussed key role of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of TVP. This work opens up new

perspectives for urgently needed medicamentous therapy options in order to reduce the incidence of human TVP.

8 Literaturverzeichnis

1. Adams DH, Tilney NL, Collins JJ, Karnovsky MJ. Experimental graft arteriosclerosis. *Transplantation*. 1992; 53: S.1115-1119.
2. Akgur FM, Brown MF, Zibari GB, McDonald JC, Epstein CJ, Ross CR, Granger DN. Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: S.H791-H797.
3. Allen MD, McDonald TO, Carlos T, Himes V, Fishbein D, Aziz S, Gordon D. Endothelial adhesions molecules in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1992; 11: S.8-13.
4. Ardehali A, Drinkwater DC, Laks H, Drake TA. Cardiac allograft vasculopathy. *Am Heart J*. 1994; 127: S.1498-1502.
5. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell Adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 1995; 92: S.450-456.
6. Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, de Martin R, Hancock WW. Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol Rev*. 1994; 141: S.5-30.
7. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*. 1967; 41: S. 1271-1274.
8. Baron H, Plenz G, Deng MC. Mechanismen der Transplantatvaskulopathie. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004; 129: S.2193-2197.

9. Beuparlant P, Hiscott J. Biological and biochemical inhibitors of the NF-kB/Rel proteins and cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7 (2): S. 175-190.
10. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997; 29: S.315-331.
11. Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc.* 1987; 19 (4 suppl 5): S. 19-25.
12. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 3: S.38-44.
13. Blum A, Aravot D. Heart transplantation - an update. *Clin Cardiol.* 1996; 19: S.930-938.
14. Bonizzi G, Dejardin E, Piret B, Piette J, Merville MP, Bours V. Interleukin-1 beta induces nuclear factor kappa B in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates. *Eur J Biochem.* 1996; 242 (3): S.544-549.
15. Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in activation of NF-kB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF-kB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: S.25941-25950.
16. Brennan P, O'Neill LA. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal

hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1260 (2): S.167-175.

17. Briscoe DM, Schoenen FJ, Rice GE, Bevilacqua MP, Ganz P, Pober JS. Induced expression of endothelial-leukocyte adhesion molecules in human cardiac allografts. *Transplantation*. 1991; 51: S.537-547.
18. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease: review of large-scale randomised trials. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002; 16: S.411-415.
19. Constanzo-Nordin MR. Cardiac allograft vasculopathy: relationship with acute cellular rejection and histocompatibility. *J Heart Lung Transplant*. 1992; 11: S.S90-S103.
20. Cooper D, Stokes KY, Tailo A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol*. 2002; 2 (3): S.165-180.
21. Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes*. 2001; 50: S.1927-1937.
22. Cordel JL, Falini B, Erber WN, Gosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*. 1984; 32: S.219-229.

23. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac transplant research database. *J Heart Lung Transplant.* 1998; 17: S.744-753.
24. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac transplant research database. *J Heart Lung Transplant.* 1998; 17: S.744-753.
25. Damle NK, Aruffo A. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: S.6403-6407.
26. Day JD, Rayburn BK, Gaudin PB. Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury. *J Heart Lung Transplant.* 1995; 14: S.142-149.
27. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland. Hrsg.: Deutsche Stiftung Organtransplantation: Neu-Isenburg, 2005 S.1-44.
28. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986; 137: S.245-254.
29. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 1989; 341: S.619-624.
30. Fachinformation Thioctacid® 600 T. Hrsg.: Viatrix GmbH & Co. KG: 2005 S.1-2.

31. Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1993; 24: S.472-495.
32. Fanslow WB, Sims JE, Sassenfeld H, Morrissey PJ, Gillis S, Dower SK, Widmer MB. Regulation of alloreactivity in vivo by soluble form of the interleukin-1 receptor. *Science.* 1990; 248: S.739-742.
33. Feeley BT, Park AK, Alexopoulos S, Hoyt EG, Poston RS, Ennen M, Robbins RC. Pressure mediated delivery of AS-ICAM-1 ODN and LFA-1 mAb reduces reperfusion injury in cardiac allografts. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68 (1): S.119-124.
34. Feeley BT, Park AK, Hoyt EG, Robbins RC. Sulfasalazine inhibits reperfusion injury and prolongs allograft survival in rat cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant.* 1999; 18 (11): S.1088-1095.
35. Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H. Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214 (1): S.212-223.
36. Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M. Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol.* 1991; 139 (1): S.67-79.
37. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): S.373-376.

38. Gao SZ, Schroeder JS, Aldermann EL, Hunt SA, Silvermann JF, Wiederhold V, Stinson EB. Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac transplantation patient. *Circulation*. 1987; 76: S.56-61.
39. Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. 1995; 60: S.96-102.
40. Granger DN, Vowinkel T, Petnehazy T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension*. 2004; 43 (5): S.924-931.
41. Heemann UW, Tullius SG, Azuma H, Kupiec-Weglinsky J, Tilney NL. Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg*. 1994; 219 (1): S.4-12.
42. Heron I. A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1971; 79 (4): S.366-372.
43. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, Boucek MM, Mohacsi PJ, Edwards LB, Keck BM. The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report — 2002. *J Heart Lung Transplant*. 2002; 21 (9): S.950-970.
44. Hoang K, Chen YD, Reaven G, Zhang L, Ross H, Billingham M, Valentine H. Diabetes and dyslipidemia. A new model for transplant coronary artery disease. *Circulation*. 1998; 97 (21): S.2160-2168.
45. Hölschermann H, Bohle RM, Schmidt H, Zeller H, Fink L, Stahl U, Grimm H, Tillmanns H, Haberbosch W. Hirudin reduces tissue factor expression and attenuates graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts. *Circulation*. 2000; 18: S.357-363.

46. Hruban RH, Beschorner WE, Baumgartner WA, Augustine SM, Ren H, Reitz BA, Hutchins GM. Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis. *Am J Pathol.* 1990; *137* (4): S.871-882.
47. Ishikura H, Takahashi C, Kanagawa K, Hirata H, Imai K, Yoshiki T. Cytokine regulation of ICAM-1 expression on human renal tubular epithelial cells in vitro. *Transplantation.* 1991; *51*: S.1272-1275.
48. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994; *24* (7): S.1591-1601.
49. Johnson DE, Gao SZ, Schroeder JS, DeCampi WM, Billingham ME. The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant.* 1989; *8* (5): S.349-359.
50. Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; *85* (13): S.4700-4704.
51. Kemna MS, Valentine HA, Hunt SA, Schroeder JS, Chen YD, Reaven GM. Metabolic risk factors for atherosclerosis in heart transplant recipients. *Am Heart J.* 1994; *128* (1): S.68-72.
52. Kendall TJ, Wilson JE, Radio SJ, Kandolf R, Gulizia JM, Winters GL, Costanzo-Nordin MR, Malcom GT, Thieszen SL, Miller LW, McManus BM. Cytomegalovirus and other herpesviruses: do they have a role in the development of accelerated coronary arterial disease in human heart allografts? *J Heart Lung Transplant.* 1992; *11* (3): S.14-20.

53. Knieriem HJ. Transplantatvaskulopathie-Pathogenesekonzept Update 1996. Herz Thorax Gefäßchir. 1997; 11: S.37-43.
54. Kobashigawa JA. Coronary artery disease in the transplanted heart: why does it happen and what can we do about it? Cardiol Rev. 1996; 4: S.1-11.
55. Kosek JC, Hurley EJ, Lower RW. Histopathology of orthotopic canine cardiac homografts. Lab Invest. 1968; 19: S.97-112.
56. Labarrere CA, Lee JB, Nelson DR, Al-Hassani M, Miller SJ, Pitts DE. C-reactive protein, arterial endothelial activation, and development of transplant coronary artery disease: a prospective study. Lancet. 2002; 360: S.1436-1437.
57. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. Immunol Rev. 1994; 141: S.5-30.
58. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive Mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1993; 92: S.1866-1874.
59. Meyer R, Caselmann WH, Schluter V, Schreck R, Hofschneider PH, Baeuerle PA. Hepatitis B virus transactivator MHBst: Activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. EMBO J. 1992; 11: S.2992-3001.
60. Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. Eur Heart J. 2002; 23: S.1569-1574.

61. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Trischler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 1995; *18* (8): S.1160-1167.
62. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TC, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary arteriosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary arteriosclerosis. *J Clin Invest*. 1993; *92*: S.945-951.
63. Oni AA, Ray I, Hosenpud JD. Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allograft. *Transplantation*. 1992; *53*: S.1247-1251.
64. Opelz G. Critical evaluation of the association of acute with chronic graft rejection in kidney and heart transplant recipients. The Collaborative Transplant Study. *Transplant Proc*. 1997; *29*: S.73-76.
65. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cellular adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 1989; *59*: S.1203-1211.
66. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990; *70*: S.427-451.
67. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. 1990; *50*: S.537-544.

68. Prober JS, Gimbrone MA Jr, Lappiere LA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J Immunol.* 1986; *137*: S.1893-1896.
69. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HL. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg.* 2005; *48*, 4: S.319-327.
70. Roy S, Sen CK, Kobuchi H, Packer L. Antioxidant regulation of phorbol ester-induced adhesion of human Jurkat T-cells to endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1998; *25*: S.229-241.
71. Roy S, Sen CK, Packer L. Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enzymol.* 1999; *300*: S.395-401.
72. Salom RN, Maguire JA, Hancock WW. Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection. *Pathology.* 1998; *30*: S.24-29.
73. Sarris GE, Mitchell RS, Billingham ME, Glasson JR, Cahill PD, Miller DC. Inhibition of accelerated cardiac allograft arteriosclerosis by fish oil. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; *97*: S.841-855.
74. Schmidt H. Hirudin reduziert die intimale Tissue Faktor Expression und vermindert die Transplantatvaskulopathie in transplantierten Herzen der Ratte. *Giessen*, 2002; S.1-77.
75. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. NF- κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Rad Res Commun.* 1992; *17*: S.221-237.

76. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messenger in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; *10* (8): S.2247-2258.
77. Schwartz SM. Smooth muscle migration in vascular development and pathogenesis. *Transplant Immunol.* 1997; *5*: S.255-260.
78. Shi C, Feinberg MW, Zhang D, Patel A, Sim CU, Dong ZM, Chapman SM, Gutierrez-Ramos JC, Wagner DD, Sibinga NE, Haber E. Donor MHC and adhesion molecules in transplant arteriosclerosis. *J Clin. Invest.* 1999; *103*: S.469-474.
79. Smith CW, Entman ML, Lane CL, Beaudé AL, Ty TI, Youker K. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest.* 1991; *88*: S.1216-1223.
80. Stempfle HU, Mudra C, Strom CE, Angermann CE, Klauss V, Rieber J, Scholz S, Spes C, Überfuhr P, Theisen K. Influence of HLA Compatibility on the incidence of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Transpl Proc.* 1995; *27*: S.1977-1978.
81. Stepkowski SM. Application of antisense oligodeoxynucleotides for organ transplantation. *Transplant Proc.* 1998; *30*: S.2142-2145.
82. Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH, Pigott R. Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts. *Transplantation.* 1992; *54*: S.451-457.
83. Theuer J, Dechend R, Mueller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney

and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2002; 2: S.3.

84. Thomson JG. Production of severe athero in a transplanted human heart. *Lancet.* 1969; 2 (7630): S.1088-1092.
85. Treasure CB, Alexander RW. Relevance of vascular biology to the ischemic syndromes of coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1995; 9: S.13-19.
86. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, Ziada KM, Crowe TD, Feng J, Magyar WA, Hobbs RE, Starling RC, Young JB, McCarthy P, Nissen SE. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (9): S.1538-1542.
87. Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* 1991; 10 (7): S.1817-1825.
88. Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, Rabin B, Lee A, Griffith BP, Hardesty RL, Trento A, Bahnson HT. Development of coronary artery disease in cardiac transplantat patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisolone. *Circulation.* 1987; 76: S.827-834.
89. Van Seventer GA, Simizu Y, Horgan KJ, Ginther GE, Webb D, Shaw W. Remote T cell co-stimulation via LFA-1/ ICAM-1 and CD2/ LFA-3: demonstration with immobilized ligand/mAb and implication in monocyte-mediated co-stimulation. *Eur J Immunol.* 1991; 21: S.1711-1718.

90. Vassalli G, Gallino A, Weis M, von Scheidt W, Kappenberger L, von Segesser LK, Goy JJ. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal*. 2003; 24: S.1180-1188.
91. Vollmer E. Renale Transplantat Arteriopathie- Parallelen zur Artherosklerose. *medwelt*. 1994; 45: S.125-135.
92. Weis M, Scheidt von W. Cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 1997; 96: S.2069-2077.
93. Weis, M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, Mocarski ES, Cooke JP. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway role of asymmetric Dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: S.500-505.
94. Wu YW, Lee CM, Lee YT, Wang SS, Huang PJ. Value of circulating adhesion molecules in assessing cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22 (11): S.1284-1287.
95. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. Leucocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1994; 180: S.95-109.
96. Yeung AC, Davis SF, Hauptman PJ. Incidence and progression of transplant coronary artery disease over 1 year: results of a multicenter trial with use of intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplantat*. 1995; 14: S.5215-5220.
97. Zhang WJ, Frei B. α -Lipoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J*. 2001; 15: S.2423-2432.

Anleitungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung):

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (He-Färbung)- Färbung von Paraffinschnitten:	Dauer
Entparaffinisierung mittels Xylol	10 Minuten
Absteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen 100%, 96%, 70%, 50%, 30% Alkohol, Aqua destillata	je 3 Minuten
Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer	7 Minuten
Leitungswasser	10 Minuten
Eosin-Gegenfärbung: 1% Eosin, 0,2% Eisessig	4 Minuten
Aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen 30%, 50%, 70%, 96%, 100% Alkohol	je 3 Minuten
Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex	3 Minuten

Elastika-Färbung nach Weigert:

Elastika-Färbung nach Weigert	Dauer
Trocknen bei Zimmertemperatur Aceton (Fixierung) Lufttrocknung	10 Minuten
Resorcin-Fuchsin	20 Minuten
Aqua destillata	
80%-igen Alkohol zur Differenzierung	
Aqua destillata	
Eisenhämatoxylin nach Weigert	5 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen 30%, 50%, 70%, 96% Alkohol	je 3 Minuten
Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex	3 Minuten

APAAP-Färbung

APAAP-Färbung	Dauer
Fixierung: Schnitte auftauen lassen Aceton-Bad Lufttrocknung	10 Minuten
Inkubation mit Primärantikörper (ICAM-1 oder VCAM-1) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	30 Minuten
Inkubation mit 1. Brückenantikörper (nur bei VCAM-1-Färbung) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	30 Minuten

Inkubation mit 2. Brückenantikörper (Link) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	30 Minuten
Inkubation mit Detektionsantikörper (APAAP) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	30 Minuten
Inkubation mit 2. Brückenantikörper (Link) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	10 Minuten
Inkubation mit Detektionsantikörper (APAAP) Spülungen getrennt nach Antikörpern mit Tris-Waschpuffer	10 Minuten
Entwicklerlösung Spülen unter Leitungswasser	20 Minuten auf dem Rüttler
Gegenfärbung mit Hämalaun Spülen unter Leitungswasser	45 Sekunden
Eindecken mit Glycergel (60-80 °C)	

Ansätze

Tris- Waschpuffer (pH 7,4-7,6)

Stammlösung für 20 l:	Tris Base	18 g
	Tris-HCL	137 g
	NaCl	175,5 g
	Aqua demin.	2,5 l

Die Stammlösung wird in Kanister gefüllt und mit Aqua demin. Auf 20 l aufgefüllt.

RPMI (pH 7,4-7,6)

RPMI – Konzentrat	50 ml
Aqua demin.	450 ml
Inaktiviertes Rinderserum	50 ml
Natriumazid	0,5 g

Entwicklungspuffer

NaCl	87 g
Tris-HCl	15 g
Tris-Base	49 g
Aqua demin.	1750 ml

Propandiol

Propandiol	21 g
Aqua demin	1000 ml

Neufuchsin

Neufuchsin	5 g
2N HCl	100 ml

Reagenzien

Aceton (Roth, Karlsruhe)

Alkohol (Roth, Karlsruhe)

Aqua destillata (Roth, Karlsruhe)

Diatex (Ferdinand Hammer, Frankfurt a.M.)

Dimethylaminoethanol/ DMAE (Serva, Heidelberg)

Eosin-Lösung (Merck, Darmstadt)

Laevamisol (Sigma, Deisenhofen)

Mayer's Hämaunlösung (Merck, Darmstadt)

Naphtol-AS-BI-Phosphat (Sigma, Deisenhofen)

Natriumnitrit (Merck, Darmstadt)

Neufuchsin (Chroma, Köngen)

Rinderserum – inaktiviert (Seromed, Berlin)

RPMI (RPMI1640, Life Technologies, Faisley)

Tris-Base (Sigma, Deisenhofen)

Tris-HCl (USB, Amersham)

Weigerts Eisenhämatoxylin (Merck, Darmstadt)

Xylolersatzmittel Roti-Histol (R) /Xylol (Roth, Karlsruhe)

Eidesstattliche Erklärung

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

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

In erster Linie danke ich Herrn PD. Dr. Hans Hölschermann für die Überlassung des Themas. Insbesondere in der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit, hat er mich immer konstruktiv und kritisch unterstützt.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer-Maria Bohle für seine Unterstützung bei der Einarbeitung in histologische Untersuchungsmethoden und deren Auswertung sowie Dokumentation. Er stand mir insbesondere bei anfänglichen Problemen im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Großer Dank gilt auch meiner Kollegin Marion Kaiser, die trotz anfänglicher Schwierigkeiten die Herztransplantationen an den Ratten erfolgreich durchführte und damit diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Vor allem für die moralische Unterstützung, aber auch für die unermüdliche Hilfe bei der Durchsicht des Manuskriptes und des Layouts kann ich meiner Freundin Sandra Wünsche gar nicht genug danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meinen Eltern, Brüdern und Freunden, die durch ihre fortlaufenden Ermunterungen dafür gesorgt haben, das ich diese Arbeit zum Abschluss bringen konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stark
Vorname	Thorsten Alexander
Geburtsdatum	19.05.1974
Geburtsort	Düsseldorf
Anschrift	Kiefernweg 18 40723 Hilden
Familienstand	ledig

Schulbildung

1980-1984	Grundschule zur Verlach, Hilden
1984-1993	Helmholtz-Gymnasium, Hilden
06/1993	Abitur

Hochschulstudium

10/1994-05/2001	Studium der Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
01.06.2001	Abschluss mit dem 3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

Arzt im Praktikum

08/2001-05/2002	Dermatologie, Städtisches Klinikum (PD Dr. med. Rompel), Kassel
06/2001-01/2003	Dermatologie, Universitäts-Hautklinik (Prof. Dr. med. Dr. h.c. Krieg), Köln

Assistenzarzt

02/2003-11/2005

Dermatologie, Universitäts-Hautklinik (Prof. Dr. med. Dr. h.c. Krieg), Köln

24.08.2005

Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten,
Düsseldorf