

Immunhistologische Untersuchungen nach Rattenherzallotransplantation  
und kontinuierlicher intravenöser Infusion von Lipidemulsionen  
mit unterschiedlichem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäure-Verhältnis

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
aus

Jürgen Schott  
Limburg an der Lahn

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie  
Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie  
Leiter: Prof. Dr. K. Schwemmler  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Grimm  
Gutachter: Prof. Dr. Voss

Tag der Disputation: 11.06.2002

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> <span style="float: right;">1</span>
1.1	Historische Entwicklung der Herztransplantationschirurgie <span style="float: right;">1</span>
1.2	Fettsäuren und ihre Abkömmlinge <span style="float: right;">2</span>
1.2.1	Chemie der Fettsäuren und ihrer Abkömmlinge <span style="float: right;">2</span>
1.2.2	Immunologische Wirkungsweisen von Fetten <span style="float: right;">3</span>
1.2.3	Lipidmediatoren <span style="float: right;">4</span>
1.2.4	Einfluß der Eikosanoide auf Immunmechanismen <span style="float: right;">4</span>
1.3	Transplantationsimmunologie <span style="float: right;">5</span>
1.3.1	Wichtige Antigenstrukturen <span style="float: right;">5</span>
1.3.2	MHC-Interaktion mit T-Lymphozyten <span style="float: right;">6</span>
1.3.3	Abstoßungsmechanismen <span style="float: right;">6</span>
1.3.4	Abstoßungsreaktionen <span style="float: right;">7</span>
1.3.4.1	Hyperakute Abstoßungsreaktion <span style="float: right;">7</span>
1.3.4.2	Akute Abstoßungsreaktion <span style="float: right;">7</span>
1.3.4.3	Chronische Abstoßungsreaktion <span style="float: right;">7</span>
1.4	Aufgabenstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit <span style="float: right;">8</span>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> <span style="float: right;">9</span>
2.1	Material <span style="float: right;">9</span>
2.1.1	Versuchstiere <span style="float: right;">9</span>
2.1.2	Fettemulsionen <span style="float: right;">10</span>
2.1.3	Untersuchungsgruppen <span style="float: right;">10</span>
2.1.4	Antikörper <span style="float: right;">13</span>
2.1.4.1	Primärantikörper <span style="float: right;">13</span>
2.1.4.2	Brückenantikörper <span style="float: right;">13</span>
2.1.5	APAAP-Komplex <span style="float: right;">14</span>
2.1.6	Reagenzien <span style="float: right;">14</span>
2.1.7	Auswertungshilfsmittel <span style="float: right;">15</span>
2.2	Methoden <span style="float: right;">16</span>
2.2.1	Transplantation <span style="float: right;">16</span>
2.2.1.1	Chirurgische Technik <span style="float: right;">16</span>

2.2.1.2	Zentralvenöser Katheter	19
2.2.2	Entnahme und Aufbewahrung der Organe	19
2.2.3	Herstellung der Gefrierschnitte	19
2.2.4	Fixierung der Präparate	19
2.2.5	APAAP-Methode	20
2.2.5.1	Herstellung der Lösungen	22
2.2.5.2	Blockade	23
2.2.5.3	Primärantikörperapplikation	23
2.2.5.4	Brückenantikörperapplikation	24
2.2.5.5	APAAP-Komplex Zugabe	25
2.2.5.6	Entwicklung	26
2.2.6	Kernfärbung	27
2.2.7	Eindecken	27
2.2.8	Histologische Auswertung	28
2.2.8.1	Auswertungsmethoden	28
2.2.8.1.1	Quantitative Auswertung infiltrierender Abwehrzellen	28
2.2.8.1.2	Kriterien zur Auswahl eines Zählareales	28
2.2.8.1.3	Auszählung	28
2.2.9	Für die Auszählungsmethode ungeeignete Präparate	29
2.2.10	Statistische Auswertung	30
2.2.10.1	Testauswahl	30
2.2.10.2	Testzielsetzung	31
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
<i>A.</i>	<i>Zellinfiltrationsmuster im Transplantat nach finaler Abstoßung</i>	<i>32</i>
3.1	Transplantatüberlebenszeiten	32
3.2	Mittlere Transplantatüberlebenszeit in Korrelation zu den zellulären Infiltraten	34
3.2.1	Antikörper W3/13	34
3.2.2	Antikörper W3/25	35
3.2.3	Antikörper Ox 19	36
3.2.4	Antikörper Ox 8	37
3.2.5	Antikörper Ox 1	38
3.2.6	Antikörper Ox 33	39
3.3	Lipidemulsionen in Form von Triglyzerylestern	40

3.3.1	Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis	40
3.3.2	Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zur Kochsalzkontrolle	41
3.4	Lipidemulsionen in Form von Fettsäureäthylestern	42
3.4.1	Äthylester mit unterschiedlichem $\omega$ -3-Fettsäureanteil	42
3.4.2	Äthylester im Vergleich zur Kochsalzkontrolle	43
3.5	Lipidemulsionen mit unterschiedlicher Fettsäureveresterung	44
3.5.1	Fischöle mit unterschiedlicher Veresterung	44
<b><i>B. Zellinfiltrationsmuster im Transplantat am vierten postoperativen Tag</i></b>		45
3.6	Lipidemulsionen in Form von Triglyzerylestern	45
3.6.1	Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis	45
3.6.2	Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zum balanzierten Mischöl	46
3.6.3	Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zur Kochsalzkontrolle	47
3.6.4	Triglyzeride mit ausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zur Kochsalzkontrolle	48
3.7	Lipidemulsionen in Form von Fettsäureäthylestern	49
3.7.1	Äthylester mit unterschiedlichem $\omega$ -3-Fettsäureanteil	49
3.7.2	Äthylester im Vergleich zur Kochsalzkontrolle	50
3.8	Lipidemulsionen mit unterschiedlicher Fettsäureveresterung im Vergleich	51
3.8.1	Fischöle mit unterschiedlicher Veresterungsform	51
3.8.2	Triglyzeride mit ausgewogenem (Mischöl) im Vergleich zu Äthylestern mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis	52
<b><i>C. Vergleich der Ergebnisse am vierten postoperativen Tag mit denen nach finaler Abstoßung</i></b>		53
3.9	Infiltrationskinetik	53

3.9.1	T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub> -Verhältnis: Vergleich der Transplantate am 4. postoperativen Tag gegenüber den vollständig abgestoßenen Organen	53
3.9.2	Gesamtinfiltration	54
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>81</b>
7.1	Statistik	81
7.1.1	Testergebnis der Auswertung der vollständig abgestoßenen Organe	81
7.1.2	Testergebnis der Auswertung der nach vier Tagen entnommenen Organe	84
7.2	Abbildungen	87
7.2.1	W3/13	87
7.2.2	W3/25	88
7.2.3	Ox 19	89
7.2.4	Ox 8	90
7.2.5	Ox 1	91
7.2.6	Ox 33	92
7.2.7	Mischöl nach erfolgter Abstoßung	93
7.2.8	Fischöl nach erfolgter Abstoßung	96
7.3	Abkürzungsverzeichnis	98
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>101</b>



**Abb.1:** Fernando Rincon de Figueroa (Erläuterung siehe Einleitung)

## **1. Einleitung**

### **1.1 Historische Entwicklung der Herztransplantationschirurgie**

Defekte Organe durch Organe eines Mitmenschen zu ersetzen beschäftigt seit langem die Phantasie der Menschheit. Fernando Rincon de Figueroa malte im 15. Jahrhundert eine „Transplantationsszene“, in der die beiden Märtyrer Cosmas und Damian das verwundete Bein des heiligen Jakobus von Voragine durch das eines gesunden Mohren ersetzen (Abb. 1). Die mystische Vorstellung, das Herz charakterisiere das Individuum, behinderte zunächst die gedankliche Entwicklung der Herztransplantation. Trotz der Vorbehalte beschäftigten sich viele Wissenschaftler mit dem Thema und am 2. Dezember 1967 gelang Christian Barnard die erste erfolgreiche Herztransplantation am Menschen.

Die Voraussetzungen dafür mußten zunächst in zahlreichen Tierversuchen geschaffen werden. 1905 und 1933 versuchten Carrel [24] und dann Mann [82] als erste die heterotope Herztransplantation am Tier. Demichov [33] gelang in den 40er Jahren die erste experimentelle Herzverpflanzung mit voller Pumpfunktion. Wichtige Vorarbeit für eine klinische Herztransplantation leisteten Lower, Dong und Shumway [76,77] in den 50er Jahren. Sie erarbeiteten die operationstechnischen Grundlagen der orthotopen Transplantation am Tier und etablierten die Myokardprotektion durch kalte Ischämie.

Dem Transplantationsboom nach Barnards erfolgreicher Herztransplantation am Menschen folgte Ernüchterung aufgrund der überwiegend schlechten Ergebnisse. Nur Lower, Dong und Shumway aus Stanford führten weiter regelmäßig Herztransplantationen durch, systematisierten die Technik und lösten in den 70er Jahren eine Renaissance der Herztransplantation aus [63]. Ein strenges Indikationsspektrum [62], Organbiopsien nach der Transplantation [13,25], die Einführung immunsuppressiver Therapieformen verleiteten viele Arbeitsgruppen, ihre Herztransplantationstätigkeit wieder aufzunehmen oder neu damit zu beginnen.

Die Entdeckung des immunsuppressiven Effektes von Cyclosporin A im Jahre 1976 eröffnete neue Perspektiven in der Transplantationschirurgie [15,127].

Cyclosporin A [97] und Anti-Human-Thymozytenglobulin [10] wurden zu Standardpräparaten der Transplantationschirurgie. Seither werden neue, schonende und selektive Immunsuppressionsprotokolle entwickelt.

Auch die diätetische Einflußnahme von Fetten auf das Immunsystem als adjuvante Therapieform wird von einigen Wissenschaftlern ausgetestet [16,96]. Vielfach ungesättigte Fettsäuren beeinflussen das Immunsystem als Vorläufer der immunmodulierenden Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane. Der Einsatz von Fetten wird sowohl diätetisch, als auch neuerdings parenteral erprobt [48,49].

## **1.2 Fettsäuren und ihre Abkömmlinge**

### **1.2.1 Chemie der Fettsäuren und ihrer Abkömmlinge**

Fettsäuren sind offenkettige Monocarbonsäuren.

Biologisch wichtig sind dank ihres Reaktionspotentials mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Ihre Doppelbindungen werden durch Einfachbindungen voneinander getrennt. Stereochemisch liegen die Doppelbindungen der natürlichen, ungesättigten Fettsäuren meist in der cis-Konfiguration vor.

Der Kohlenstoff der Methylgruppe wird  $\omega$ -Kohlenstoff genannt. Die Stellung einer Doppelbindung wird vom  $\omega$ (n)-Kohlenstoffatom aus berechnet. Die Linolsäure ist eine  $\omega$ -6 Fettsäure, weil die erste Doppelbindung zwischen dem sechsten und siebten Kohlenstoffatom, vom Methylenende aus gezählt, liegt. In einer anderen Nomenklatur würde man die Linolsäure als cis, cis  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ -Octadecadienat bezeichnen. Hier gibt man die Position einer Doppelbindung durch das Symbol  $\Delta$  mit hochgestellter Indexziffer an. Die  $\omega$ -3-Linolensäure heißt dann all-cis  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ ,  $\Delta^{15}$ -Octadecatrienat.

Im Organismus kommen Fettsäuren nur zu einem verschwindend geringen Teil in freier Form, überwiegend aber als Fettsäureester vor. Aufgrund ihrer starken Oberflächenaktivität („Seifenwirkung“) würden freie Fettsäuren in hoher Konzentration biologische Strukturen zerstören.

Fettsäuren werden aus Nahrungsfett resorbiert oder aus Acetyl-CoA des Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsels synthetisiert.

Der Organismus kann nicht sämtliche Fettsäuren herstellen. Linolsäure (18:2,  $\omega$ -6) und  $\alpha$ -Linolensäure (18:3,  $\omega$ -3) werden von Säugetieren nicht synthetisiert [1]. Sie müssen mit der Nahrung zugeführt werden und heißen daher essentielle Fettsäuren. Durch Hinzufügen einer Methylgruppe werden sie zu Arachidonsäure (20:4,  $\omega$ -6) bzw. Eikosapentaensäure (20:5,  $\omega$ -3) aufgebaut, den Schlüsselsubstraten für die Synthese von Eikosanoiden. Unter diesem Sammelbegriff werden Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene zusammengefaßt.

Die  $\omega$ -3-Derivate enthalten eine Doppelbindung mehr als die entsprechenden  $\omega$ -6-Verbindungen. Aus diesem Grund unterscheiden sich die physikochemischen und funktionellen Eigenschaften der Eikosanoide, je nachdem ob sie aus der  $\omega$ -6-Arachidonsäure oder dem  $\omega$ -3-Analog Eikosapentaensäure hergestellt wurden.

### **1.2.2 Immunologische Wirkungsweisen von Fetten**

Fettsäuren können nach Synthese zu Eikosanoiden aber auch eikosanoidunabhängig auf das Immunsystem einwirken. In vitro hemmen langkettige Fettsäuren die PHA-induzierte Stoffwechselreaktion von Lymphozyten [131]. Allogene Hauttransplantate überleben im Tierversuch länger, wenn die Empfänger mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren gefüttert werden [89,103].

Neuerdings weiß man, daß Fettsäuren die Proliferation von Concanavalin-A stimulierten Lymphozyten bei simultaner Eikosanoid-Synthese-Inhibition hemmen. Immer häufiger wird deshalb die Hypothese geäußert, daß Fettsäuren auch eikosanoidunabhängig in das immunologische Geschehen eingreifen [20].

Polyene Fettsäuren beeinflussen als Strukturbaustein der Zellmembranen deren Fluidität [12,36,116,122] und andere physikochemische und physiologische Funktionen: Unter anderem werden die Expression von Antigenen und Rezeptoren, enzymale Funktionen [14,37,87,104,113], die zelluläre Adhäsion [21,128] und der transmembranäre Signalstoffwechsel [128] mit Konsequenzen für die Funktion immunkompetenter [4,83,126] und deren Zielzellen [89,90] beeinflußt.

### 1.2.3 Lipidmediatoren

Lipidmediatoren oder Eikosanoide entstehen durch Oxygenation der  $\omega$ -6-Fettsäure Arachidonsäure (20:4,  $\omega$ -6) sowie des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF). Unter Katalyse entweder der Lipoxygenase oder der Zyklooxygenase entstehen biologisch aktive Mediatoren (Thromboxan, Prostaglandin, Leukotrien, Hydroxyeikosatetraensäuren) [32,95]. Das  $\omega$ -3 Analogon der Arachidonsäure ist die Eikosapentaensäure (20:5,  $\omega$ -3). Auch sie wird entweder über den Lipoxygenase- oder Zyklooxygenaseweg verstoffwechselt, wobei sie gegenüber der Arachidonsäure das bevorzugte Substrat der Lipoxygenase darstellt. Die  $\omega$ -3-Zyklooxygenaseprodukte haben jedoch gegenüber den  $\omega$ -6-Derivaten ein verändertes Wirkprofil [38,94,130].

Ebenso entstehen auf dem Lipoxygenasepfad aus Eikosapentaensäure Leukotriene der 5er Reihe mit teilweise antagonistischer Wirkung [39] gegenüber den Arachidonsäurederivaten der 4er Reihe.

### 1.2.4 Einfluß der Eikosanoide auf Immunmechanismen

Bestimmte Prostaglandine, insbesondere PGE<sub>1</sub> und PGE<sub>2</sub> scheinen sowohl in vitro als auch in vivo immunsuppressiv zu wirken [44,133]. Durch das Prostaglandinanalogen 16,16-Dimethylprostaglandin E<sub>2</sub> ließ sich beispielsweise die Transplantatüberlebenszeit allogenen transplantierten Rattenherzen verlängern [119].

In vitro hemmen schon geringe Konzentrationen von PGE<sub>1/2</sub> die Stimulierbarkeit menschlicher Lymphozyten durch PHA [44].

Prostaglandin E<sub>2</sub> reduziert auch die lymphozytäre Syntheseleistung von Interleukin 2, dem Proliferationsmarker der T-Lymphozyten [26]. Aber auch andere Prostaglandine, wie beispielsweise das Prostazyklin, verlängern den Abstoßungsprozeß [111].

Nicht nur der Einfluß der Prostaglandine auf die Interleukin 1- und 2-Sekretion [26,71], sondern auch auf die Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird beschrieben [71].

In vitro fand sich unter Einsatz der Zyklooxygenaseinhibitoren Azetyl- und Natriumsalizylsäure eine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten von heterotop transplantierten Rattenherzen [110]. Andere Zyklooxygenaseinhibitoren wiederum, wie z.B. Timeganine, verkürzten sogar den Abstoßungsprozeß [112].

Berechtigterweise kann man nach diesen unterschiedlichen Ergebnissen spekulieren, daß die immunmodulierende Wirkung dieser Enzyminhibitoren unabhängig von Änderungen im Prostaglandinstoffwechsel sind.

Unbestritten bleibt, daß Prostaglandine sowohl über die Veränderung der Konzentrationen verschiedener Mediatoren, als auch der zellulären „second messenger“ Einfluß auf die Immunantwort nehmen.

Leukotriene sind wie Prostaglandine potente Modifikatoren der Immunabwehr. So supprimieren T-Lymphozyten unter der Wirkung von Leukotrien B<sub>4</sub> die Immunglobulinproduktion von PWM (pokeweed mitogen)-stimulierten peripheren mononukleären Zellen wahrscheinlich durch Steigerung der Suppressoreigenschaften [5]. Leukotrien B<sub>4</sub> und in geringerem Maße auch D<sub>4</sub> stimulieren eine bestimmte Population humaner Lymphozyten zur Ausbildung von Suppressoreigenschaften [106]. Leukotriene steuern auch Adhäsion und Chemotaxis der polymorphkernigen Neutrophilen [100,108].

### **1.3 Transplantationsimmunologie**

#### **1.3.1 Wichtige Antigenstrukturen**

Der Abstoßungsprozeß beruht im wesentlichen auf Unterschieden in zwei Antigenensystemen: dem MHC (major-histocompatibility-complex)-System und dem Non-MHC-System. Zum Non-MHC-System gehören die Blutgruppenantigene oder endothelspezifische und endothelialmonozytäre Antigenstrukturen, die bei Unterschieden zwischen Spender und Empfänger hyperakute Abstoßungsreaktionen auslösen können. Andere Non-MHC-Antigene verursachen bei Inkompatibilität ausschließlich zelluläre Immunreaktionen und werden im Gegensatz zum MHC-System als schwache Transplantationsantigene oder „minor-histocompatibility-antigens“ bezeichnet.

Die „major-histocompatibility-complex antigens“ sind innerhalb der Transplantationschirurgie ungleich wichtiger. Sie liegen in drei Klassen, dem MHC-Typ I, der in der Regel von allen kernhaltigen Zellen des Säugetier-organismus ausgebildet wird, und dem Typ II, der nur auf B-Lymphozyten und Zellen der Monozyten-Makrophagenreihe exprimiert wird, aber unter Zytokineinfluß auch auf anderen Zelloberflächen erscheint [105].

Neuerdings faßt man Bestandteile des Komplementsystems (C2, Faktor B) sowie die Tumornekrosefaktoren (TNF)  $\alpha$  und  $\beta$  als MHC-Typ III-Komponenten zusammen [105].

### **1.3.2 MHC-Interaktion mit T-Lymphozyten**

Die im Thymus ablaufende Konditionierung der unreifen T-Zellen ist darauf ausgerichtet, körpereigenes Gewebe als „Selbst“ zu erkennen, und vor autoaggressiven immunologischen Reaktionen zu schützen. So erkennen reife Thymozyten körpereigene Strukturen anhand des individuellen MHC-Musters.

Gelangen körperfremde Proteine oder Gewebe (Transplantation) in den Organismus, so werden diese in Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) aufgearbeitet und über das MHC-Molekül den immunologisch aktiven Zellen präsentiert. Die T-Lymphozyten interagieren mit diesen APC über einen trivalenten Komplex bestehend aus MHC-Molekül inklusive dem zu präsentierenden Antigen und dem T-Zellrezeptor. Ist das präsentierte Antigen ein körperfremdes Peptid, so registriert die T-Zelle dies und stößt über Ausschüttung von Lymphokinen eine Immunreaktion an, in die B-Lymphozyten, Makrophagen und nicht sensibilisierte T-Zellen involviert sind. Des weiteren kann später nach B-Zellstimulation eine humorale Reaktion mit Aktivierung des Komplementsystems folgen.

### **1.3.3 Abstoßungsmechanismen**

Mit der Übertragung des Transplantates werden nicht nur Organparenchym, sondern auch Blutbestandteile und gewebsständige APC übertragen. Diese Spender-APC können für einen gewissen Zeitraum Antigene direkt präsentieren und so Immunreaktionen auslösen. Dauerhaft immunogen wirksam sind die Empfänger-APC, die Non-MHC-Antigene und MHC-Fragmente des Spenders präsentieren und T-Zellen gegen Spender-MHC-Antigene und Non-MHC-Strukturen sensibilisieren.

### **1.3.4 Abstoßungsreaktionen**

#### **1.3.4.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion**

Die hyperakute Abstoßungsreaktion gehört zu der Typ III-Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell [42]. Sie tritt nur dann auf, wenn schon vor der Transplantation Antikörper gegen das Gewebe oder Bestandteile im Gewebe vorhanden sind. Die Reaktion der Antikörper richtet sich im wesentlichen auf Strukturen der Transplantatgefäße. Nach Minuten bis Stunden kommt es zu einer Arteriitis bzw. Arteriolitis mit begleitender Thrombosierung der Gefäße, so daß die Zerstörung des Transplantates aufgrund der rasch auftretenden Ischämie zu erklären ist.

#### **1.3.4.2 Akute Abstoßungsreaktion**

Nach der Einteilung von Coombs und Gell [42] zählt man die akute Abstoßung zu der Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion. Hier bestimmen zelluläre Mechanismen das Abstoßungsgeschehen. Sensibilisierte T-Lymphozyten triggern die Transplantatabstoßung über Ausschüttung von Lymphokinen, die die eigene Proliferation und die von Makrophagen und Leukozyten stimulieren und entzündliche Infiltrate verursachen. Im Vordergrund dieser Reaktion steht das lymphozytäre Infiltrat, das sowohl im Transplantatparenchym, als auch vor allem innerhalb der Intima der Gefäße des Transplantates zu finden ist. Es verursacht Arteritiden, die wiederum mit Gefäßthrombosierungen einhergehen können.

Die akute Abstoßungsreaktion benötigt etwa 8 Tage, um ein Transplantat außer Kraft zu setzen. Dank definierter Histoinkompatibilität von Spender und Empfänger läuft die akute Abstoßung im Tiermodell in einem definierten und reproduzierbaren Zeitintervall ab. Das Ausmaß der Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit gilt als Maßstab der immunsuppressiven Potenz einer Testsubstanz.

#### **1.3.5 Chronische Abstoßungsreaktion**

Dieser Vorgang ist ein sich über mehrere Monate hinweg erstreckender, schleichender, kontinuierlicher Abstoßungsprozeß, der zu zunehmender Obliteration von Arteriolen aufgrund einer sich entwickelnden ausgeprägten

Intimafibrose führt. Vor allem die unentwegte Schädigung von Gefäßwandzellen durch Entzündungsreaktionen, verursacht durch zirkulierende Antigenkomplexe, ruft diese Schäden am Transplantat hervor.

#### **1.4 Aufgabenstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit**

Am Modell der heterotopen Herztransplantation der Ratte wirken intravenöse Lipidemulsionen in Abhängigkeit vom  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von abgestuft immunsuppressiv bis immunneutral.

In der vorliegenden Arbeit sollte die palpatorisch ermittelte Transplantatüberlebenszeit mit immunhistologischen Variablen korreliert und objektiviert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Sämtliche Präparate wurden freundlicherweise von H. Grimm [48,49] zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche waren gemäß § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt und entsprechend den Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e. V. durchgeführt worden.

#### 2.1.1 Versuchstiere

Männliche Inzucht-PVG- (RT 1<sup>c</sup>, Møllegaard Breeding Center, Skensved, Dänemark) und Wistar/Kyoto-Ratten (RT 1<sup>1</sup>, Møllegaard Breeding Center, Skensved, Dänemark) wurden als Spender (150-200 g) bzw. Empfänger (200 – 250 g) verwendet. Die Ratten wurden in Kunststoffkäfigen mit rostfreien Stahlgitterböden bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Die Tiere wurden eine Woche vor der Transplantation in der oben beschriebenen Umgebung eingewöhnt. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Wasser und R3-EWOS-ALAB-Zuchtfutter (ALAB, Sollentuna, Schweden).

Die Fettsäurezusammensetzung des Futters ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Fettzusammensetzung des R3-EWOS-ALAB-Zuchtfutters

Rohölanteil in Prozent	5
Fettsäuren in % des totalen Fettsäuregehaltes	
Fettsäure	prozentualer Anteil
Palmitinsäure (16:0)	21
Palmitoleinsäure (16:1)	2
Steransäure (18:0)	4
Ölsäure (18:1)	22
Linolsäure (18:2)	42
Linolensäure (18:3)	7
Andere	2

### **2.1.2 Fettemulsionen**

20 %ige Emulsionen aus Distelöl, Fischöl, Fischöläthylestern, angereicherten Fischöläthylestern, Sojaöl und einer 1:1 Mischung aus Fisch- und Distelöl wurden zur intravenösen Infusion verwendet.

Zur Herstellung der Emulsion wurde eine isotonische Wasserphase benutzt, die sich aus gereinigten Hühnerei-Phospholipiden und aus Glycerol zusammensetzte. Diese Lösung ist auf 60 bis 70 °C erwärmt und nach und nach die Fettphase unter Rühren mit hoher Umdrehungszahl hinzugegeben worden.

Mit Hilfe eines Homogenisators wurde unter hohem Druck eine feine Emulsion hergestellt, in Glasfläschchen abgefüllt und hitzesterilisiert.

### **2.1.3 Untersuchungsgruppen**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren heterotop transplantierte Rattenherzen, die entweder bis zum vollständigen Sistieren der Herzaktion implantiert waren oder nach vier Tagen, bei erhaltener Organfunktion, entnommen wurden.

Sieben verschiedene Behandlungsgruppen, sowie eine Kochsalzkontrolle wurden bei den bis zum vollständigen Erliegen der Herzaktion implantierten Organen unterschieden:

Die Kontrollgruppe erhielt in gleicher Weise wie die Behandlungsgruppen eine intravenöse Infusion physiologischer Kochsalzlösung, die im Volumen den Fettsäureinfusionen der Behandlungsgruppen entsprach.

Den sieben Behandlungsgruppen wurden verschiedene Fettinfusionen, deren genaue Fettsäureverteilung in Tabelle 2 angegeben ist, infundiert.

Gruppe 1, die Kontrollgruppe, bekam physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lsg.), Gruppe 2 eine 20 %ige Distelölemulsion (9,0 g Fett pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag), Gruppe 3 eine 20 %ige Fischölemulsion (9,0 g Fett pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag) und Gruppe 4 und 5 eine 20 %ige Fischöläthylesteremulsion (9,0 g Fett pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag) mit niedrigem bzw. hohem Anteil an  $\omega$ -3-Fettsäuren.

Gruppe 6 erhielt eine 20 %ige Sojaölemulsion (9,0 g Fett pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag) und Gruppe 7 eine 1:1 Mischung aus Fischöl- und Distelöl-Emulsionen zu je 4,5 g Fett pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag.

Die nach vier Tagen entnommenen Organe entstammen Tieren, die in gleicher

Weise wie die Tiere, deren Organe bis zum vollständigen Erliegen der Organfunktion implantierten waren, behandelt wurden. Die Gruppennumerierung weicht von der bei den bis zum Erliegen der Herzaktion transplantierten Organen ab, da beide Untersuchungen völlig getrennt voneinander durchgeführt wurden. Gruppe 1 war die Kochsalzkontrolle, Gruppe 2 die Sojaölbehandlungsgruppe, Gruppe 3 die Mischgruppe, Gruppe 4 die Fischöl-, 5 die Distelöl-, 6 und 7 die Fischöläthylester- bzw. angereicherte Fischöläthylesterbehandlungsgruppe.

Die infundierten Fettkonzentrationen entsprachen stets physiologischen Dosen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Fettemulsionen

Fettsäuren	Fettsäureanteil in Prozent					1:1 Mischung Distel- + Fischöl
	Distelöl	Fischöl	Sojaöl	Fischöl- äthylester	ang. Fischöl- äthylester	
12:0		0,20		0,10		0,10
14:0	0,10	5,50	0,10	4,90		2,80
16:0	7,60	14,20	11,00	14,10	2,20	10,90
16:1( $\omega$ -7)	0,10	6,50	0,10	6,30	0,30	3,30
17:0			0,10			
18:0	2,90	3,20	4,40	3,60	1,10	3,05
18:1( $\omega$ -9)	13,60	10,10	23,30	10,60	2,30	11,85
18:1( $\omega$ -7)		3,10		3,10	0,20	1,55
18:2( $\omega$ -6)	73,60	2,60	51,60	2,20	1,40	38,10
18:3( $\omega$ -6)		0,20		0,30	0,20	0,10
18:3( $\omega$ -3)	0,20	0,70	6,60	0,70	0,40	0,45
18:4( $\omega$ -3)		2,50		2,40	3,90	1,25
20:0	0,30	0,20	0,30	0,20		0,25
20:1( $\omega$ -9)	0,30	1,50	0,30	1,50		0,90
20:1( $\omega$ -7)		1,80		1,80		0,90
20:1( $\omega$ -5)		0,20		0,20		0,10
20:2( $\omega$ -6)			0,50			
20:3( $\omega$ -6)			0,04			
20:4( $\omega$ -6)	0,10	1,60	0,10	1,70	2,00	0,85
20:5( $\omega$ -3)		18,10		17,70	43,00	9,05
22:0			0,40			
22:1( $\omega$ -11)		2,00		2,30	0,70	1,00
22:1( $\omega$ -9)		0,50		0,50		0,25
22:1( $\omega$ -7)		0,10		0,10		0,05
22:5( $\omega$ -3)		2,70		2,70	4,20	1,35
22:6( $\omega$ -3)		12,90		13,50	30,60	6,45
22:6( $\omega$ -6)			0,30			
Gesamtanteil $\omega$ -3	0,20	36,90	6,60	37,00	82,10	18,55
Gesamtanteil $\omega$ -6	73,70	4,40	52,54	4,20	3,60	39,05
Verhältnis $\omega$ -3: $\omega$ -6	1:368,5	8,4:1	1:7,96	8,8:1	22,8:1	1:2,1

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primärantikörper

Verwendet wurden monoklonale Maus-anti-Ratte-Antikörper gegen die Zellklone W3/13, W3/25, Ox 19, Ox 8, Ox 1, Ox 33. (Firma Camon, Wiesbaden, Deutschland):

**W3/13:** Markiert Thymozyten, T-Lymphozyten, Plasmazellen und Polymorphkernige Zellen [6,19,23,34,99,132].

**W3/25:** Bindet an ein Zelloberflächenepitop der meisten Thymozyten und einer Untergruppe von peripheren T-Lymphozyten und Makrophagen. Der Antikörper markiert T-Helferzellen (T<sub>4</sub>), die von dem Antikörper MRC Ox 8 nicht erfaßt werden. Das Oberflächenglykoprotein ist homolog zu dem humanen CD4-Antigen [6,18,22,28,86,132].

**MRC Ox 19:** Reagiert mit einem Oberflächenglykoprotein von Thymozyten und peripheren T-Zellen. Das Protein ist mit dem humanen CD5-Antigen vergleichbar [6,30,31].

**MRC Ox 8:** Markiert den größten Teil der Thymozyten und NK („Natural-Killer“)-Zellen. Die Oberflächenglykoproteine sind vergleichbar dem Mausantigen Ly-2 und dem humanen CD8-Antigen [6,18,23,30,64,78].

**MRC Ox 1:** Bindet an die monomorphe Determinante des „leukocyte common antigen“ (LCA) [6,7,121,134].

**MRC Ox 33:** Interagiert mit B-Lymphozyten-spezifischem Leukozytenantigen [6,7,134].

(Unterstrichene Zelltypen stellen Hauptziele der Antikörper dar.)

### 2.1.4.2 Brückenantikörper

Als Brückenantikörper wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin angewendet, das von der Firma Dakopatts Diagnostika GmbH, Hamburg, hergestellt wird.

### **2.1.5 APAAP-Komplex**

Dieser Immunkomplex ist aus zwei Komponenten, der intestinalen alkalischen Phosphatase (vom Kalb stammend) und einem gegen dieses Enzym gerichteten monoklonalen Maus-Antikörper, aufgebaut.

Der Komplex ist bei der Firma Dakopatts Diagnostika GmbH Hamburg (Deutschland) erhältlich.

### **2.1.6 Reagenzien**

Reagenzien der Firma Dakopatts Diagnostika GmbH, Hamburg (Deutschland):

Glycergel

Rattenserum

Reagenzien der Firma GIBGO/BRL-Bethesda Research Laboratories GmbH, Eggenstein (Deutschland):

Rinderserum (inaktiviert)

Reagenzien der Firma E. MERCK, Darmstadt (Deutschland):

Aceton

N,N-Dimethylformamid

Hämalaun

Hydrochlorid (HCl)

Natriumacid

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumnitrit

Neufuchsin

Propandiol

Reagenzien der Firma SEROMED Biochrom KG, Berlin (Deutschland):

RPMI-Medium 1640

Reagenzien der Firma SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen (Deutschland):

Levamisol

Naphthol-As-Bi-Phosphat

Tris-Base (Trizma<sup>®</sup>-Base)

Tris-HCl (Trizma<sup>®</sup>-Hydrochlorid)

**2.1.7 Auswertungshilfsmittel**

- A) Mikroskop der Firma Leitz Wetzlar (Deutschland), Modell Laborlux D mit Okularen 10-fach und Objektiven 10-fach, 25-fach, 40-fach und 100-fach .
- B) Strichplatte (Leica, Bensheim, Deutschland) mit einem Netz, bestehend aus 10 x 10, 1 x 1 mm großen Quadraten.
- C) Immersionsöl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, Brechungsindex: 1,515 bis 1,517)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Transplantation**

#### **2.2.1.1 Chirurgische Technik**

Die Empfänger wurden mit 0,315 mg Fentanyl pro Kilogramm Körpergewicht i.m. (Hypnorm<sup>®</sup>, Janssen, Beersee, Belgien) anästhesiert. Nach Eröffnen des Abdomens über eine mediane Laparotomie, temporärem Abklemmen der Arteria und Vena renalis, wurde die linke Empfänger-Niere entfernt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Nierengefäße mit der Cuff-Technik [60] für die Anastomosierung.

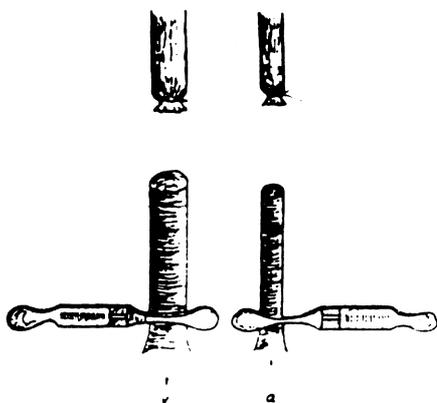
Die Spender erhielten eine Narkose mit 60 mg Pentobarbital pro Kilogramm Körpergewicht i. p. (Mebumal vet.<sup>®</sup>, Nord Vacc, Schweden). Zur Freilegung des Herzens wurde die ventrale Brustkorbwand hochgeklappt und vor der eigentlichen Organentnahme 300 IE Heparin intravenös injiziert. Dann erfolgte die Ligatur der Vena cava superior und inferior unmittelbar vor der Mündung in den rechten Vorhof. Anschließend wurden die Arteria pulmonalis und Aorta ascendens durchtrennt und das Herz über den Aortenstumpf mit kalter, heparinierter Kochsalzlösung (4 °C, 50 IE Heparin/ml 0,9 % NaCl) durchspült. Die Venae pulmonales wurden kurz vor Eintritt in den linken Vorhof über eine Sammelligatur unterbunden und das Spender-Herz entnommen.

Zur Anastomosierung des Herzens an die Nierengefäße des Empfängers wurden die Aorta ascendens über den arteriellen Cuff des Empfängers, die A. pulmonalis über den venösen Cuff gezogen und mit einer Ligatur fixiert (Abb. 2). Während der Transplantation wurde die „kalte Ischämiezeit“ von fünf Minuten nicht überschritten.

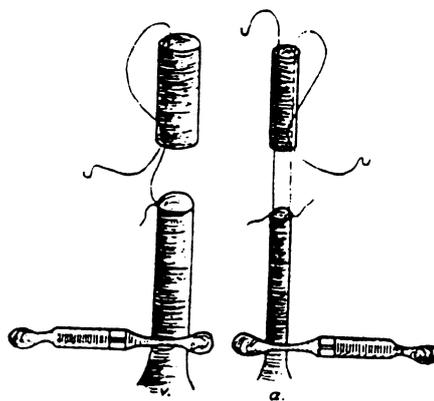
Das so transplantierte Organ begann etwa 30 Sekunden nach Freigabe der Zirkulation zu schlagen, ohne eine hämodynamische Funktion zu erlangen. Bei dieser Transplantationstechnik sistiert der Blutfluß im linken Herzen. Die Durchblutung der Koronargefäße erfolgt retrograd über die Aorta ascendens. Zum Verschuß des Empfänger-Abdomens wurde eine fortlaufende, einschichtige Naht verwendet.

Durch zweimalige tägliche Palpation wurde die Transplantatfunktion überprüft. Die Abstoßung galt als abgeschlossen, sobald keine myokardiale Kontraktion zu tasten war.

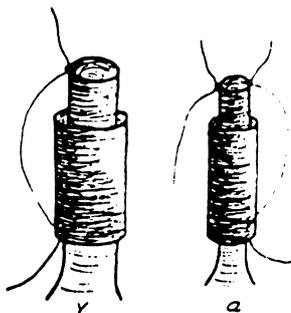
**Abb. 2:** Gefäßanastomose in der „Cuff-Technik“ nach Heron [60]



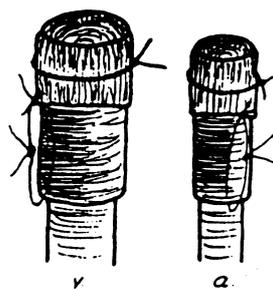
**Abb. 2.1:** Abgeklemmte und durchtrennte Arterie und Vene vor der Cuff-Befestigung



**Abb. 2.2:** Vorbereitung der Cuffs



**Abb. 2.3:** Überstülpen der Cuffs



**Abb. 2.4:** Cuff-Befestigung



**Abb. 2.5:** Transplantat nach Gefäßanschluss

### **2.2.1.2 Zentralvenöser Katheter**

Die Katheter bestanden aus einem Silikonspiralschlauch (Silastic<sup>®</sup>, 0,012 inch x 0,025 inch, No. 602-105 HH 061999, Dow Corning Corp., Midland, MI, U.S.A.), der mit einem 5 cm langen Polyethylenkatheter (PE 10, Clay Adams, Parasippany, NJ, U.S.A.) verbunden war. Dieser PE-10-Katheter wurde mit einem 30 cm langen PE 20-Katheter (Clay Adams, Parasippany, NJ, U.S.A.) verschmolzen. Der Silikonteil des Katheters wurde in die linke Vena jugularis interna eingebracht. Das Kathetersystem wurde am Empfängertier über ein Mieder [107] gesichert. Über eine SAGE-Perfusionspumpe wurden die Fettemulsionen kontinuierlich über 24 Stunden infundiert.

### **2.2.2 Entnahme und Aufbewahrung der Organe**

Nach Sistieren der Herzaktion bzw. vier Tage nach der Transplantation wurden die Organe entnommen und eine 2–3 mm dicke Scheibe aus dem mittleren Anteil des ventrikulären Abschnittes mit O.C.T. Compound-Gel (Tissue-Tek<sup>®</sup>, Miles, U.S.A.) auf einem Korkplättchen in flüssigem Stickstoff angefroren. Bis zur Herstellung der Gefrierschnitte wurden die Präparate bei -80° C aufbewahrt.

### **2.2.3 Herstellung der Gefrierschnitte**

Nach Einbettung der Gewebestücke in O.C.T. Compound-Gel (Tissue-Tek<sup>®</sup>, Miles, U.S.A.) auf Spezialträgern folgte die Herstellung von ca. 7 µm dicken Gewebsschnitten mit dem Kryostat 2800 Frigocut E (Fa. Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) bei einer Arbeitstemperatur zwischen -25 und -30 °C.

Die auf handelsübliche Objektträger aufgenommenen Schnitte mußten anschließend zwischen 2 und 24 Stunden luftgetrocknet werden.

### **2.2.4 Fixierung der Präparate**

Zur Erhaltung der Morphologie des Gewebes und zur Stabilisierung von zellulären Bestandteilen wurden die zuvor 2–24 Stunden luftgetrockneten Kryostatschnitte zunächst 10 Minuten in Aceton fixiert.

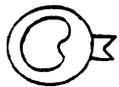
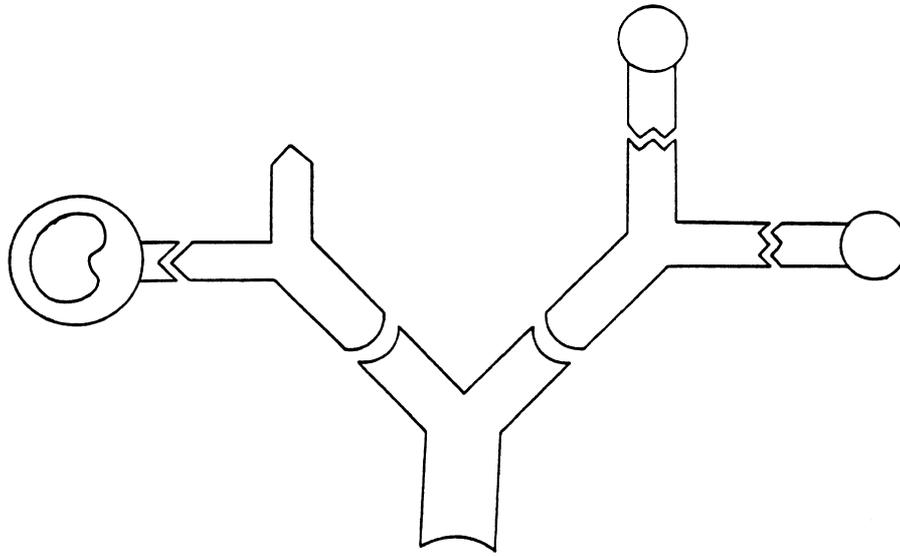
### 2.2.5 APAAP-Methode

Die APAAP-Färbung ist eine enzymatische Färbetechnik. Der APAAP-Komplex wird dazu benutzt, die Antikörperbindung an bestimmte Epitope (in dieser Arbeit leukozytäre und lymphozytäre Oberflächenstrukturen) im Präparat farblich sichtbar zu machen.

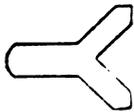
Zunächst inkubiert man das Präparat mit dem primären Antikörper, der an das nachzuweisende Epitop anbindet. In dieser Untersuchung wurden monoklonale Maus-anti-Ratten-Antikörper verwendet. Danach folgt eine weitere Inkubation mit einem sogenannten Brückenantikörper, auch sekundärer Antikörper genannt, der in der Lage ist, an den primären Antikörper anzubinden. Dieser muß gegen Mausimmunglobulin gerichtet sein, da hier der primäre Antikörper ein Mausimmunglobulin darstellt. Hier wurden Kaninchenantikörper benutzt, die diese Voraussetzungen erfüllen. Zuletzt wird der APAAP-Komplex dazugegeben, der an den Brückenantikörper bindet. Der APAAP-Komplex besteht aus der intestinalen Alkalischen-Phosphatase (Herkunft: Kalb), an die ein gegen dieses Enzym gerichteter Antikörper, hier aus der Maus, gebunden hat. Beides zusammen wird als Alkalische-Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex bezeichnet.

Durch Zugabe von Neufuchsin in einer speziellen Entwicklerlösung kommt es zu einer Rotfärbung der Präparateanteile, an die der APAAP-Komplex gebunden hat. Zuvor gibt man Levamisol auf die Präparate, um die gewebständige alkalische Phosphatase zu inhibieren, und damit eine diffuse Hintergrundfärbung zu vermeiden. Der Enzymkomplex, die intestinale alkalische Phosphatase, ist unempfindlich gegenüber dem Levamisol und bleibt so für die gewünschte Farbreaktion aktiv.

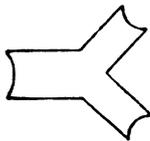
**Abb. 3:** APAAP-Methode



Lymphatische Zelle



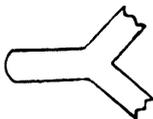
Antikörper Maus-anti-Ratte



Antikörper Kaninchen-anti-Maus



intestinale Alkalische Phosphatase



Antikörper Maus-anti-intestinale Alkalische Phosphatase

### 2.2.5.1 Herstellung der Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden aus den unter 2.1.6 aufgelisteten Substanzen auf Vorrat angesetzt:

Ansatz A: RPMI-Lösung

50 ml	RPMI-Medium
450 ml	Aqua destillata
50 ml	inaktiviertes Rinderserum
0,5 g	Natriumacid

Die RPMI-Lösung muß auf pH 7,4–7,6 eingestellt werden. Hierzu verwendet man Tris-Base bzw. Tris-HCl. Vor jeder Verwendung ist der pH-Wert neu einzustellen. Die Lösung sollte im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Ansatz B: Spüllösung

4,5 g	Tris-Base
34,25 g	Tris-HCl
43,9 g	NaCl (Natriumchlorid)
5000 ml	Aqua destillata

Die o. g. Stoffe werden in Aqua destillata gelöst und mit Tris-Base bzw. Tris-HCl auf pH 7,4–7,6 eingestellt.

Ansatz C: Entwicklungspuffer

8,7 g	NaCl (Natriumchlorid)
1,5 g	Tris-HCl
4,9 g	Tris-Base
175 ml	Aqua destillata

Zur Herstellung des Entwicklungspuffers werden die o.g. Stoffe in Aqua destillata gelöst.

**Ansatz D:**            Propandiolpuffer

21 g    Propandiol  
1000 ml    Aqua destillata

Propandiol wird in Aqua destillata aufgelöst und im Kühlschrank gelagert.

**Ansatz E:**            Neufuchsinlösung

5 g    Neufuchsin  
100 ml    2n HCl

Neufuchsin wird in Aqua destillata gelöst und in einer dunklen Flasche bei ca. 4 °C aufbewahrt.

**2.2.5.2 Blockade**

Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen der Brückenantikörper mit Gewebsstrukturen der Ratte und der damit verbundenen Entstehung von Hintergrundanfärbungsphänomenen wurden die fixierten Präparate nach dreimaliger Spülung mit Spüllösung (siehe unter 2.2.5.1) mit Hilfe von inaktiviertem Rattenserum 1:10 verdünnt mit RPMI-Lösung (siehe unter 2.2.5.1) blockiert. Nach gleichmäßigem Aufpipettieren von etwa 100 µl Serum auf die Schnitte wurden diese 20 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.

**2.2.5.3 Primärantikörperapplikation**

Zuerst wurden die Primärantikörper mit RPMI-Lösung in einem zuvor austitrierten Verhältnis verdünnt (siehe Tabelle 3) und dann mittels einer Eppendorfpipette pro Schnitt 100 µl so auf die Präparate aufgebracht, daß das Gewebe gleichmäßig mit der verdünnten Primärantikörperlösung bedeckt war.

**Tabelle 3:** Verdünnungen der Primärantikörper

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG MIT RPMI-LÖSUNG
W3/13	1:100
W3/25	1:100
MRC O <sub>x</sub> 19	1:500
MRC O <sub>x</sub> 8	1:500
MRC O <sub>x</sub> 1	1:100
MRC O <sub>x</sub> 33	1:50

Die so behandelten Schnitte wurden dann bei Raumtemperatur 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit der Spüllösung (siehe Ansatz B, 2.2.5.1) drei Mal gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Dieser Spülvorgang wiederholte sich nach allen nun folgenden, jeweils in der feuchten Kammer durchgeführten Inkubationsschritten.

#### 2.2.5.4 Brückenantikörperapplikation

**Tabelle 4:** Verdünnung des Brückenantikörpers

PRIMÄRANTIKÖRPER	BRÜCKENANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG MIT RATTENSERUM/RPMI (1:8)
W3/13	Kaninchen-anti-Maus	1:20
W3/25	Kaninchen-anti-Maus	1:20
MRC O <sub>x</sub> 19	Kaninchen-anti-Maus	1:20
MRC O <sub>x</sub> 8	Kaninchen-anti-Maus	1:20
MRC O <sub>x</sub> 1	Kaninchen-anti-Maus	1:20
MRC O <sub>x</sub> 33	Kaninchen-anti-Maus	1:20

Die Verdünnung des Brückenantikörpers erfolgte mit RPMI-Lösung, der zuvor hitzeinaktiviertes Rattenserum zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung im Verhältnis 1:8, Rattenserum zu RPMI, zugesetzt wurde.

Von der so hergestellten Brückenantikörperverdünnung wurden wiederum pro Präparat 100 µl auf die Schnitte pipettiert, so daß das Gewebe gleichmäßig benetzt war. Auch der Brückenantikörper wurde 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert, bevor nach Spülung der APAAP-Komplex aufgetragen werden konnte.

#### **2.2.5.5 APAAP-Komplex Zugabe**

Bevor der APAAP-Komplex auf die Schnitte aufgebracht werden konnte, mußte dieser zunächst mit der RPMI-Lösung im Verhältnis 1:50 verdünnt werden. Danach wurden ca. 100 µl auf die Gewebsschnitte aufpipettiert und 30 Minuten inkubiert.

Zur Steigerung der Farbintensität wurde sowohl die Zugabe des jeweiligen Brückenantikörpers als auch die des APAAP-Komplexes nochmals mit einer auf 10 Minuten verkürzten Inkubationszeit durchgeführt.

Pro gebundenem Primärantikörper können mehrere Substratmoleküle (Brückenantikörper/APAAP-Komplex) umgesetzt werden, so daß die Wiederholung der Inkubationsschritte mit dem Brückenantikörper und APAAP-Komplex zu einer Zunahme der Anfärbung der für den Primärantikörper spezifischen Strukturen führt (amplifizierte APAAP-Technik).

### 2.2.5.6 Entwicklung

Der gebundene APAAP-Komplex alleine reicht noch nicht dazu aus, die gesuchten Epitope sichtbar zu machen.

Erst die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin und Naphthol-As-Bi-Phosphat führt zu einer leuchtend roten Anfärbung der jeweiligen Epitope.

Zur oben beschriebenen Visualisierung der für den Primärantikörper spezifischen Strukturen wurde unmittelbar vor ihrer Verwendung eine Entwicklungslösung hergestellt, die u.a. Naphthol-As-Bi-Phosphat und Neufuchsin enthielt.

Die Herstellung der Lösung aus den unter 2.1.6 erwähnten Reagenzien und unter 2.2.5.1 beschriebene Lösungen wurde folgendermaßen durchgeführt:

Lösung 1:

175 ml	Entwicklungspuffer (Ansatz C)
62,5 ml	Propandiolpuffer (Ansatz D)
100 mg	Levamisol

Entwicklungs-, Propandiolpuffer und Levamisol werden zusammengegeben und die entstandene Lösung mit Tris-Base bzw. Tris-HCl auf pH 9,75 eingestellt.

Lösung 2:

50 mg	Natriumnitrit
1250 ml	Aqua destillata
500 ml	Neufuchsin (Ansatz E)

Natriumnitrit wird in Aqua destillata aufgelöst, die Neufuchsinlösung dazugegeben und das Gemisch nach genau einer Minute Reaktionszeit, wie unten beschrieben, weiterverarbeitet.

Lösung 3:

125 mg	Naphthol-As-Bi-Phosphat
1500 ml	N,N-Dimethylformamid (DMF)

Naphthol-As-Bi-Phosphat in DMF lösen.

Lösung 2 und 3 in Lösung 1 geben und nachfolgend mit Tris-Base bzw. Tris-HCl auf pH 8,8 einstellen.

Die so hergestellte Entwicklungslösung wurde sofort filtriert und auf Küvetten verteilt. Nach Zugabe der Präparate wurden die Küvetten 30 Minuten unter ständigem Schütteln in raumtemperiertem Wasser belassen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit mußten die Präparate zunächst fünfmal gewaschen werden, bevor sie im nächsten Schritt weiterverarbeitet werden konnten.

### **2.2.6 Kernfärbung**

Zur besseren morphologischen Differenzierung der Präparate wurde im Anschluß an die APAAP-Färbung eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Sie diente hauptsächlich dazu, die Zellkerne der Gewebe und infiltrierenden Zellen darzustellen.

Zur Gegenfärbung wurden die Präparate 30 Sekunden in Hämalaunlösung gegeben und danach innerhalb einer Spülreihe mit 6 Gefäßen, gefüllt mit Spüllösung, gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte 10–20 Minuten in Puffer- bzw. Spüllösung gebläut.

### **2.2.7 Eindecken**

Durch Auftragen eines Tropfens erwärmten (56 °C) Glycergels<sup>®</sup> auf die fertig gefärbten Präparate und nachfolgendes Eindecken mit handelsüblichen Deckgläsern war die Herstellung der nach der APAAP-Methode gefärbten Präparate abgeschlossen.

## **2.2.8 Histologische Auswertung**

### **2.2.8.1 Auswertungsmethoden**

#### **2.2.8.1.1 Quantitative Auswertung infiltrierender Abwehrzellen**

Es wurden repräsentative Gewebsschnitte der Transplantate ausgewählt und die infiltrierenden Zellen mittels eines Zählrasters (sogenannte Strichplatte wie unter 2.1.7 beschrieben) und einem standardisierten Zählverfahren quantifiziert. Während der Auszählung war die Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Präparates nicht bekannt.

#### **2.2.8.1.2 Kriterien zur Auswahl eines Zählareals**

Bei der Auswahl der Zählareale wurden Nekrosezonen aussortiert, da zwischen operationsbedingten und immunologisch verursachten Nekrosen nicht zu differenzieren, und insbesondere das Alter der Nekrosen nicht bestimmbar war.

In die Auswertung gingen möglichst noch intakte Herzmuskelareale ein, weil dort die Durchblutung des Transplantates bis zuletzt gewährleistet war, und die zirkulierenden immunkompetenten Zellen des Empfängers während der gesamten Implantationszeit mit dem Fremdgewebe in Kontakt treten konnten.

Querstreifung der Muskelzellen und erhaltene Zellkerne definierten die intakte Herzmuskulatur.

Außerdem sollten die Untersuchungsareale möglichst wenig ödematös verändert sein.

Weiter wurde darauf geachtet, daß die Zählareale möglichst weit von epikardialen Bereichen entfernt waren. Epikardial ist das Transplantationstrauma besonders ausgeprägt, so daß unspezifische Entzündungszeichen nachgewiesen werden, die mit der Abstoßung nichts zu tun haben.

Nach Möglichkeit wurde jeweils ein Auswertungsareal in den linken bzw. rechten Kammeranteil gelegt.

#### **2.2.8.1.3 Auszählung**

Jeweils 20 Rasterfelder eines gefärbten Präparates wurden ausgewertet. Zellhaufen innerhalb bzw. in der Umgebung größerer Gefäße wurden nicht in die

Auswertung miteinbezogen. Alle antikörpermarkierten mononukleären Zellen wurden innerhalb eines Zählrasters ausgezählt. Die Zählung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung (Okular 10-fach, Objektiv 100-fach) unter Verwendung von Immersionsöl.

### 2.2.9 Für die Auszählungsmethode ungeeignete Präparate

Von den 70 zur Verfügung stehenden Präparaten, die bis zum Sistieren der Transplantatfunktion implantiert waren, konnten 25 nicht nach der beschriebenen Methode ausgezählt werden.

Aufgrund des zu geringen Anteils an intakter Herzmuskulatur, die die Grundvoraussetzung für die Auszählung darstellte, fielen 14 Präparate aus der Zählwertung heraus. Die verbleibenden 11 Präparate gehörten der Mischölgruppe (Gruppe 7) an. Hier stellte sich das Problem, daß bis auf einen Demarkationssaum aus dicht gepackten polymorphkernigen Zellen, die man aufgrund der engen Zusammenlagerung nicht zahlenmäßig erfassen konnte, keine mononukleären Zellen nachweisbar waren (Anhang, Abb. 15-18)

**Tabelle 5:** Anzahl der ausgewerteten bzw. aussortierten Präparate der vollständig abgestoßenen Transplantate

<b>Gruppe:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
	KO	DÖ	FÖ	FÄ	AFÄ	SÖ	MÖ
<b>insgesamt nicht auswertbar</b>	2	2	3	2	2	3	11
<b>insgesamt ausgewertet</b>	7	8	8	7	7	8	0

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelölgruppe, FÖ = Fischölgruppe, FÄ = Fischöläthylestergruppe, AFÄ = angereicherte Fischöläthylestergruppe, SÖ = Sojaölgruppe, MÖ = Mischölgruppe)

Die am vierten Tag nach der Transplantation entnommenen Organe entwickelten erwartungsgemäß weniger Nekrosen. Nach den festgelegten Kriterien waren von den 40 Organen der verschiedenen Untersuchungsgruppen sechs Organe wegen ausgeprägter Nekrosen nicht auswertbar.

**Tabelle 6:** Anzahl der ausgewerteten bzw. aussortierten Präparate innerhalb der am Tag 4 entnommenen Transplantate

<b>Gruppe:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
	KO	SÖ	MÖ	FÖ	DÖ	FÄ	AFÄ
<b>insgesamt nicht auswertbar</b>	2	1	0	0	1	0	2
<b>insgesamt ausgewertet</b>	6	5	4	6	5	5	3

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelölgruppe, FÖ = Fischölgruppe, FÄ = Fischöläthylestergruppe, AFÄ = angereicherte Fischöläthylestergruppe, SÖ = Sojaölgruppe, MÖ = Mischölgruppe)

## 2.2.10 Statistische Auswertung

### 2.2.10.1 Testauswahl

Grundvoraussetzung für parametrische und nichtparametrische Tests ist die zufällige Zuteilung der Versuchstiere zu den einzelnen Behandlungsgruppen. In dieser Untersuchung wurden die Ratten numeriert und dann per Zufallsprinzip den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes wurde festgestellt, daß einige Auszählungsergebnisse nicht einer Normalverteilung entsprachen. Der Box-Bartlett-Test innerhalb der SPSS-Prozedur Manova ergab, daß zwischen den einzelnen Gruppen keine Varianzhomogenität bestand, und daß mit Hilfe der gängigen Transformationen keine Homogenität herstellbar war. Die Verletzung der Normalverteilung, wie auch das Fehlen der Varianzhomogenität ließen die

Anwendung einer der gängigen parametrischen Teste, wie z.B. des Student's t-Test oder des Scheffé-Testes, nicht zu.

Nichtparametrische Teste benötigen keine normalverteilten Daten mit homogenen Varianzen, so daß hier der nichtparametrische U-Test nach Mann-Whitney und Wilcoxon verwendet wurde. Um Ungenauigkeiten aufgrund der hohen Anzahl von Einzeltesten und den daraus ergebenden eventuell gegenseitig bedingenden Ergebnissen, wurden die Testergebnisse nach der Bonferroni-Methode angeglichen [93,102]. Manche der nichtparametrischen Teste haben den Nachteil, daß sie viel schwächer in ihrer Fähigkeit sind, signifikante Unterschiede herauszuarbeiten. Bei einem schwachen Testverfahren muß immer damit gerechnet werden, daß signifikante Unterschiede nicht herausgearbeitet und damit unentdeckt bleiben. Umgekehrt kann davon ausgegangen werden, daß im Test signifikant ausgefallene Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit auch tatsächlich bestehen.

#### **2.2.10.2 Testzielsetzung**

Ziel der Testung war, die Nullhypothese  $H_0$  zu verifizieren oder abzulehnen. Die Nullhypothese besagt, daß sich die verschiedenen Untersuchungsgruppen innerhalb einer bestimmten Antikörperauszählung nicht unterscheiden oder, anders gesagt, daß die jeweilige Verteilung der Zellzahlen gleich ist. Im Falle unterschiedlicher Verteilungen kann man die Alternativhypothese  $H_1$  annehmen und mit einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit sagen, daß Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen.

Die im Anhang aufgeführten Tabellen zeigen, in welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen.

### 3. Ergebnisse

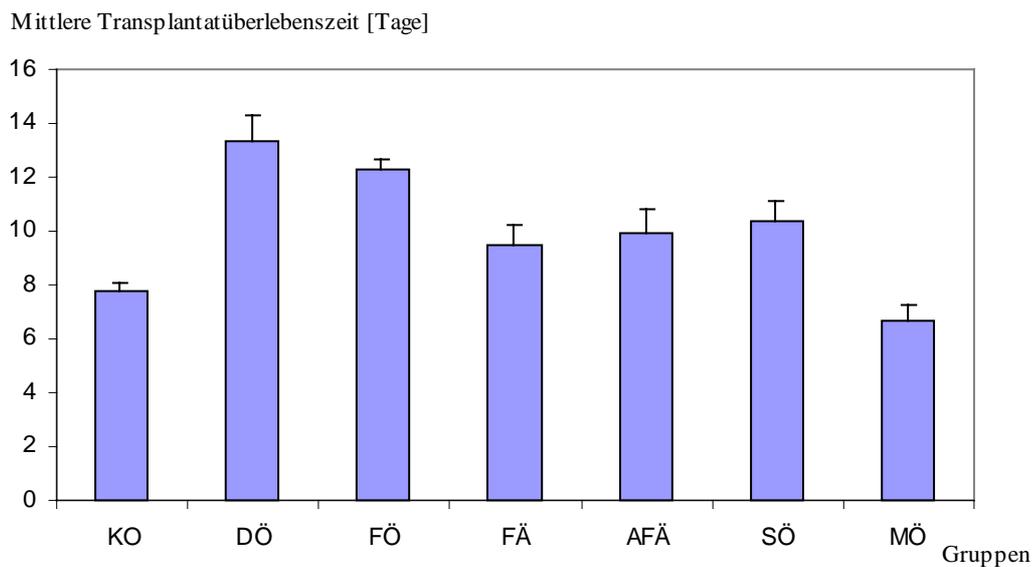
#### A. Zellinfiltrationsmuster im Transplantat nach finaler Abstoßung

##### 3.1 Transplantatüberlebenszeiten

Die Transplantatüberlebenszeiten, biologische Parameter der Immunregulation, variierten in Abhängigkeit von der infundierten Fettemulsion [49]:

**Tabelle 7:** Transplantatüberlebenszeiten in Abhängigkeit von der infundierten Fettemulsion

Gruppe	Infusionsbehandlung	Mittlere Transplantatüberlebenszeit [d]	Standardabweichung +/- (SEM)
1	physiologische Kochsalzlösung, (KO)	7,8	0,3
2	20 % Distelölemulsion (DÖ)	13,3	1,0
3	20 % Fischölemulsion (FÖ)	12,3	0,4
4	20 % Fischöläthylesteremulsion (FÄ)	9,5	0,7
5	20 % angereicherte Fischöläthylesteremulsion (AFÄ)	9,9	0,9
6	20 % Sojaölemulsion (SÖ)	10,4	0,7
7	1:1 Mischung aus 20 % Fischöl- und Distelöl-Emulsion (MÖ)	6,7	0,56



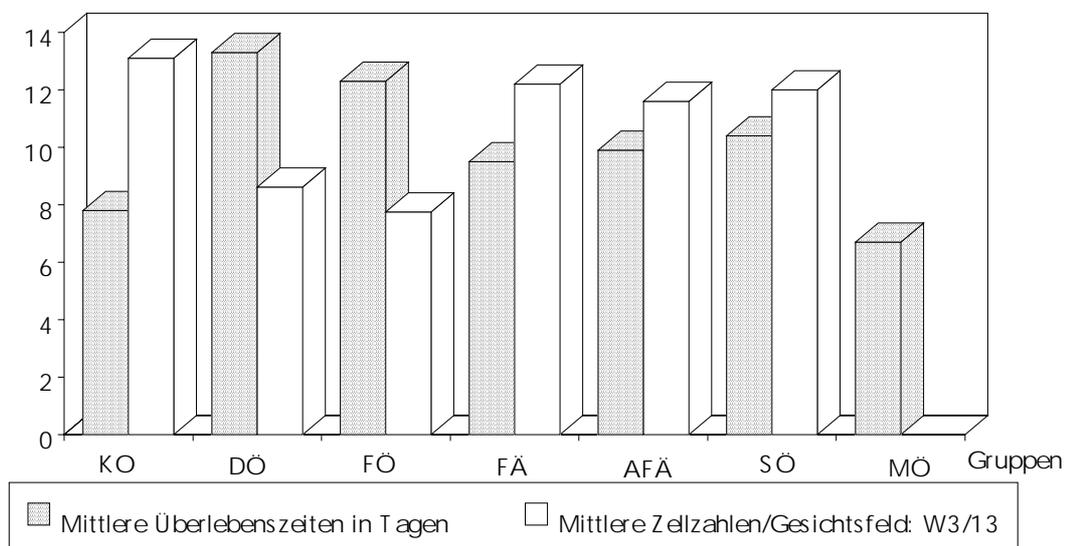
**Abb. 3:** Graphische Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten in Abhängigkeit von der infundierten Fettemulsion

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Es lag nahe, die ermittelten Überlebenszeiten in bezug zu den immunhistologisch bestimmten zellulären Ergebnissen innerhalb der einzelnen Antikörperauswertung der verschiedenen Gruppen zu setzen:

## 3.2 Mittlere Transplantatüberlebenszeit in Korrelation zu den zellulären Infiltraten

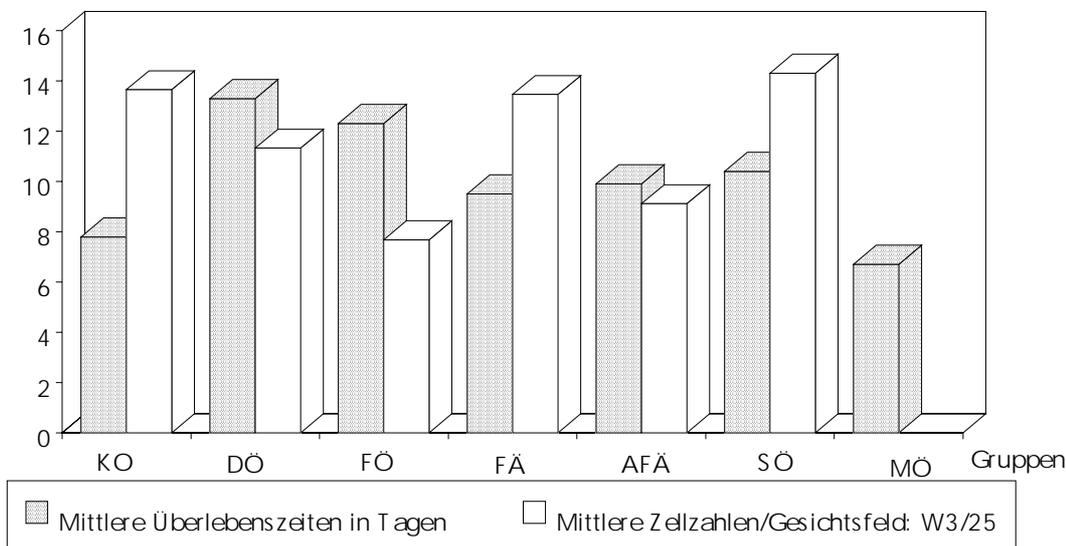
### 3.2.1 Antikörper W3/13



**Abb. 4:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der W3/13<sup>+</sup> Zellen  
(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Der Antikörper W3/13 reagiert mit bestimmten Oberflächenglykoproteinen der T-Lymphozyten und Polymorphkernigen Zellen. Im Mittel waren die höchsten Zellzahlen in der Kochsalzkontrolle zu finden gefolgt von der Fischöläthylester-, Sojaöl-, angereicherten Fischöläthylester-, Distelöl- und Fischölgruppe. Die Gruppen mit den längsten Überlebenszeiten, also die Distelöl- und die Fischölgruppe, wiesen auch die niedrigsten W3/13<sup>+</sup>-Zellinfiltrate auf.

### 3.2.2 Antikörper W3/25



**Abb. 5:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der W3/25<sup>+</sup> Zellen

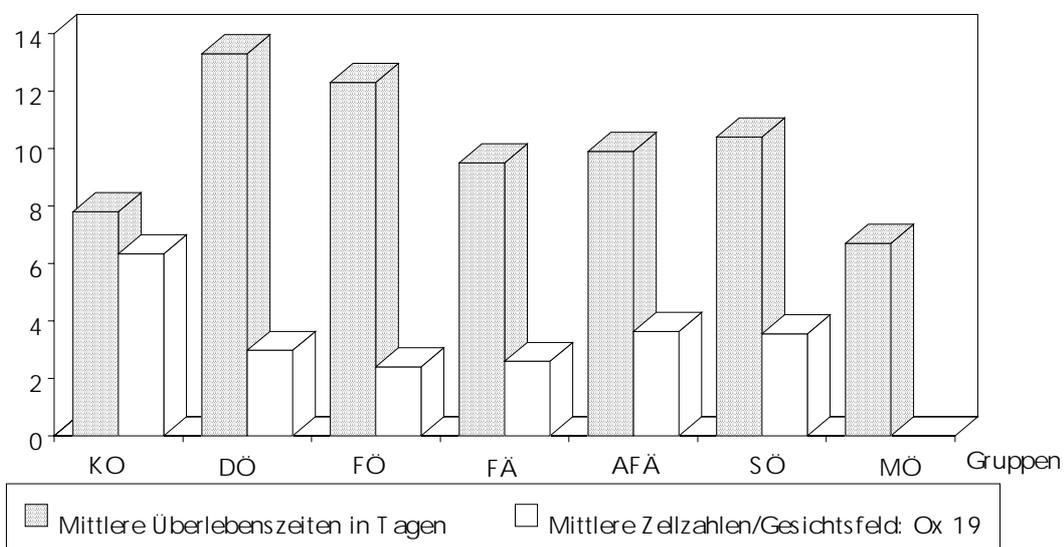
(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Der Antikörper W3/25 markiert Zellen, die CD 4-Oberflächenstrukturen exprimieren, also T<sub>4</sub>-Lymphozyten und Makrophagen.

Sojaölbehandelte Tiere, Tiere der Kochsalzkontrolle und der Fischöläthylestergruppe entwickelten die höchsten W3/25<sup>+</sup>-Infiltrate. Bei diesen Gruppen handelt es sich um Kollektive mit niedriger Transplantatüberlebenszeit.

Die Infusion von Distel- und Fischöl verursachte die längsten Transplantatüberlebenszeiten und geringe W3/25<sup>+</sup>-Zellinfiltrate. Die mit angereicherten Fischöläthylestern behandelte Gruppe fiel aus dem Rahmen, da sie bei recht kurzer Abstoßungszeit die niedrigsten mittleren Zellzahlen nach der Fischölgruppe zeigte.

### 3.2.3 Antikörper Ox 19



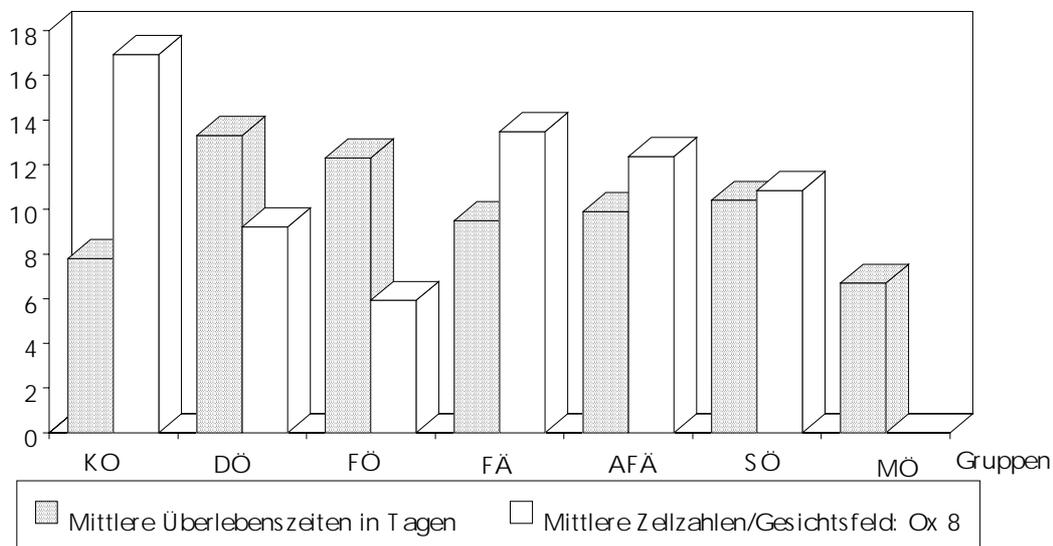
**Abb. 6:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der Ox 19<sup>+</sup> Zellen

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Der Ox 19 Antikörper reagiert mit dem CD 5-Oberflächenglykoprotein das periphere T-Lymphozyten und Thymozyten tragen.

Analog den Transplantatüberlebenszeiten fand sich in der Kochsalzkontrolle das höchste Infiltrat mit im Mittel 6,3 Zellen pro Gesichtsfeld. Unter Behandlung mit Fischöl entwickelten die Tiere die geringste Infiltration mit im Mittel 2,7 Zellen pro Gesichtsfeld. Aber auch die anderen Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur Fischölgruppe nur unwesentlich höhere mittlere Zellzahlen (2,9 bis 3,6).

### 3.2.4 Antikörper Ox 8



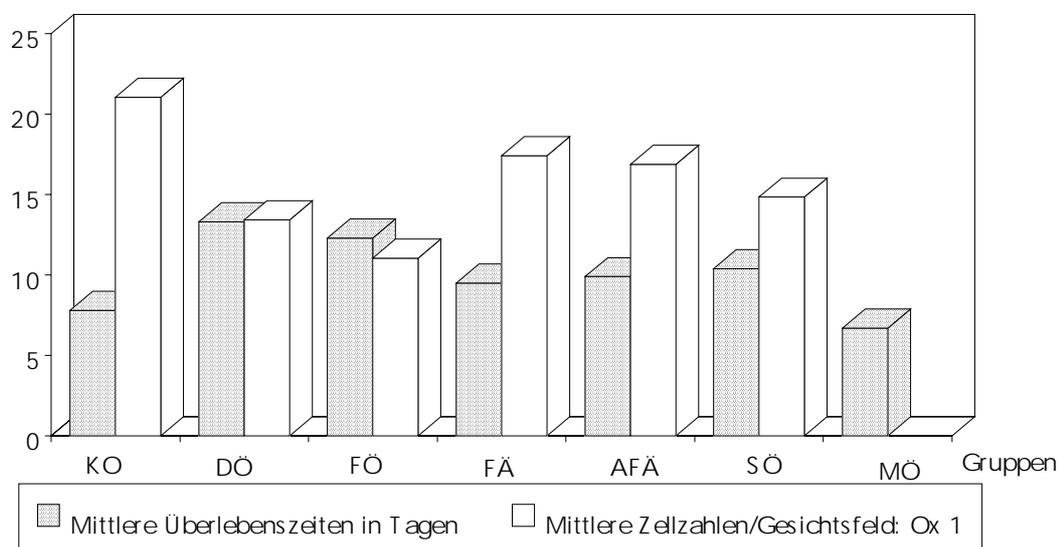
**Abb. 7:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der Ox 8<sup>+</sup> Zellen

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Dieser Antikörper markiert Tg-Lymphozyten und NK-Zellen, also Zellen der CD 8-Klassifikation.

Wiederum entwickelten die distel- und fischölbehandelten Gruppen das geringste zelluläre Infiltrat in enger Korrelation mit den dazugehörigen längsten Transplantatüberlebenszeiten. Alle anderen Behandlungsgruppen verhielten sich hinsichtlich der Ausprägung der Infiltration umgekehrt zu den Überlebenszeiten: je geringer die mittlere Überlebenszeit der Transplantate war, desto höher war die zelluläre Infiltration.

### 3.2.5 Antikörper Ox 1



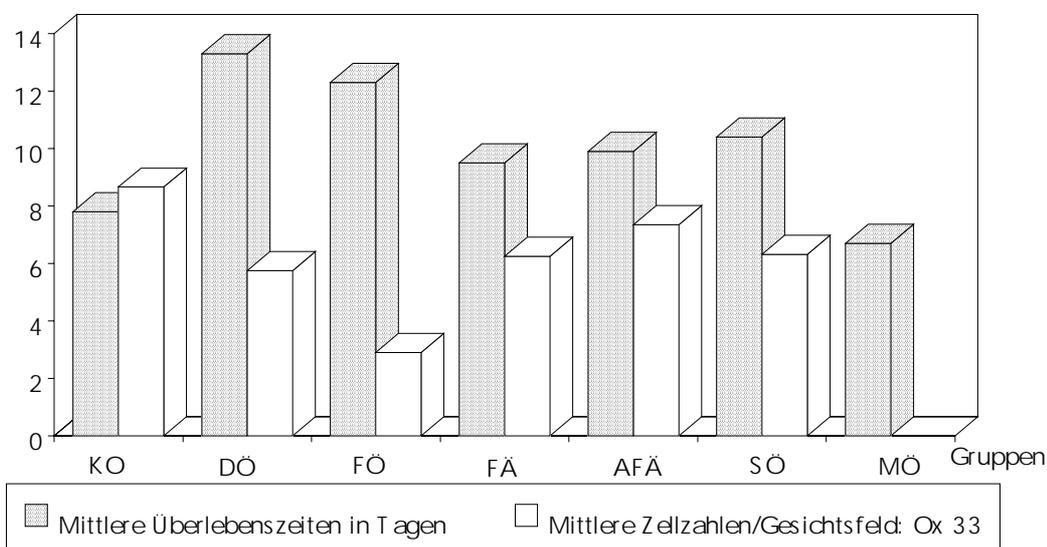
**Abb. 8:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der Ox 1<sup>+</sup> Zellen

(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Ox 1 markiert alle Leukozyten. Er bindet an das „leukocyte common antigen“ (LCA) und gibt einen gewissen Überblick über die Gesamtinfiltration der Organe der einzelnen Gruppen.

Bei dieser Auswertung waren in allen Gruppen die mit Abstand höchsten Zellzahlen zu ermitteln. Auch hier zeigten die Distelöl- und Fischölgruppe die geringsten zellulären Infiltrate. Die Fischöläthylestergruppe, die nach der Mischgruppe und Kochsalzkontrollgruppe die kürzeste Transplantatüberlebenszeit zeigte, reihte sich nach der Kochsalzkontrolle mit der zweithöchsten Zellzahl ein. Darauf folgten die mit angereicherten Fischöläthylestern behandelte Gruppe und die Sojaölgruppe mit ähnlicher Transplantatüberlebenszeit.

### 3.2.6 Antikörper Ox 33



**Abb. 9:** Mittlere Überlebenszeiten im Vergleich zum mittleren Zellaufkommen der Ox 33<sup>+</sup> Zellen

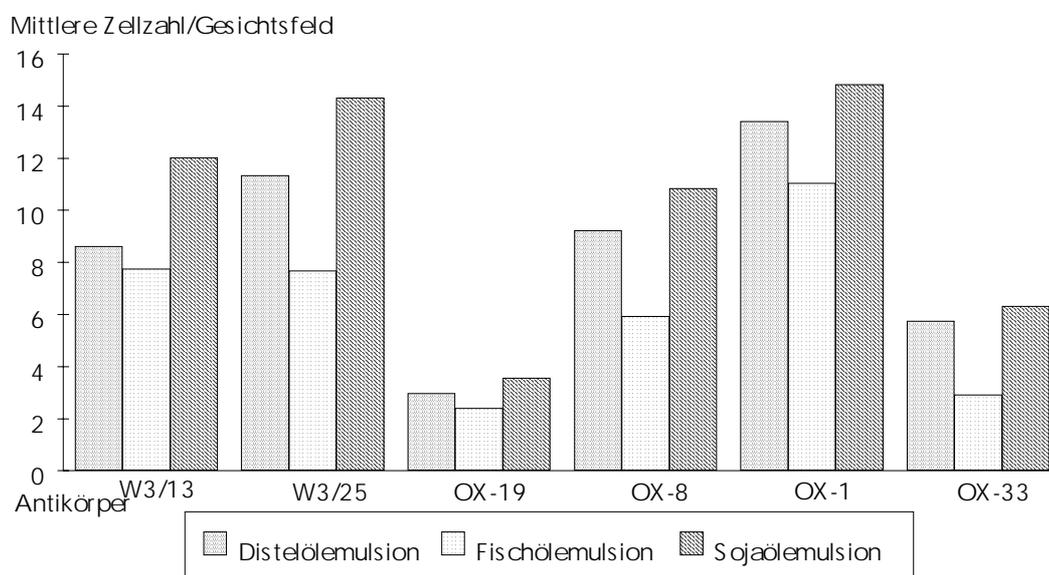
(KO = Kochsalzkontrolle, DÖ = Distelöl, FÖ = Fischöl, FÄ = Fischöläthylester, AFÄ = angereicherte Fischöläthylester, SÖ = Sojaöl, MÖ = Mischöl)

Dieser Antikörper bindet an das B-Lymphozyten-spezifische Antigen.

Wie bei den anderen Zellmarkern zeigte auch hier die Fischölgruppe die niedrigste mittlere Zellzahl gefolgt von der Distelölbehandlungsgruppe. Die mit Äthylestern oder Sojaöl behandelten Tiere wiesen deutlich höhere Zellzahlen auf. Die höchste mittlere Zahl Ox 33<sup>+</sup>-Zellen fand sich in der Kochsalzkontrolle. Somit besteht auch hier eine enge Verknüpfung der Transplantatüberlebenszeit mit der Intensität des zellulären Infiltrates.

### 3.3 Lipidemulsionen in Form von Triglyzerylestern

#### 3.3.1 Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis

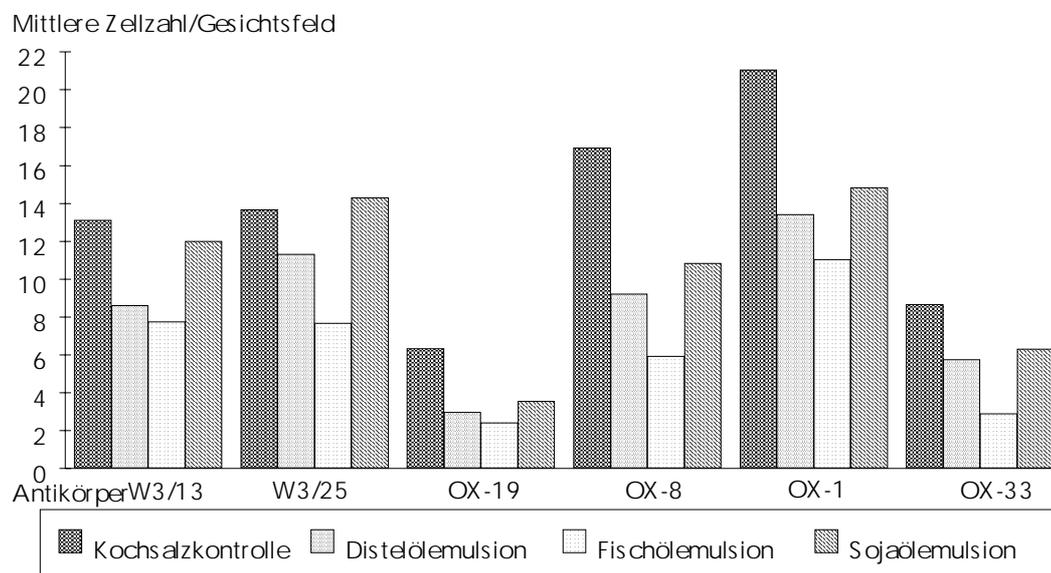


**Abb. 10:** Distelöl- (DÖ), Fischöl- (FÖ) und Sojaölemulsion (SÖ) im direkten Vergleich (SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Distelöl-, Fischöl- und Sojaölemulsionen wurden in Triglyzeridform ausgetestet. Die zellulären Reaktionen der mit Fischöl behandelten Tiere waren sowohl im Vergleich zur Distelöl-, als auch zur Sojaöl-Gruppe hochsignifikant niedriger. Die Unterschiede der Zellinfiltration waren im Vergleich Fischöl zu Sojaöl tendentiell größer als im Vergleich Fischöl zu Distelöl. In allen Zellsubpopulationen konnten diese Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,0014$  festgestellt werden.

Es zeigte sich die Tendenz, daß die zelluläre Reaktion im Vergleich Fischöl- zu Sojaöl mehr differierte. Die Verteilung der verschiedenen Zelltypen, d.h., das mittlere Zellaufkommen innerhalb der einzelnen Antikörperauswertungen war innerhalb der Distelöl-, Fischöl- und der Sojaöl-Gruppe ähnlich gewichtet. Somit wurde die Gesamtheit der infiltrierenden Zellen und nicht ein bestimmter Klon gehemmt.

### 3.3.2 Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zur Kochsalzkontrolle



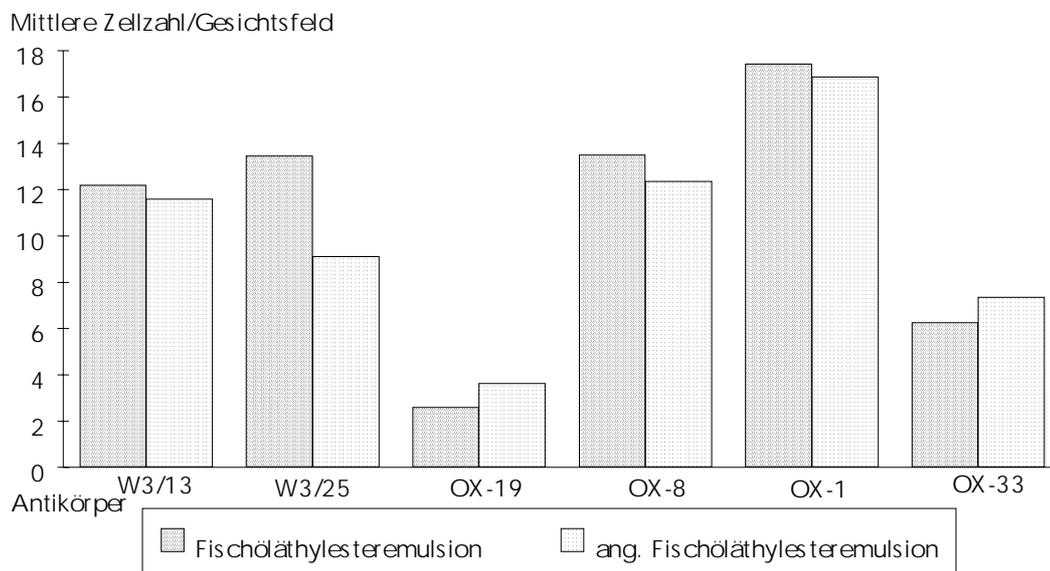
**Abb. 11:** Distelöl- (DÖ), Fischöl- (FÖ) und Sojaölemulsion (SÖ) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle (KO)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Die mit Distelöl behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur Kochsalzkontrolle bis auf die W3/25<sup>+</sup> Zellen in allen anderen Zellpopulationen ein hochsignifikant geringeres Zellaufkommen als in den Kontrollpräparaten. Fischöl erzeugte in allen Antikörperauswertungen hochsignifikant ( $p < 0,0014$ ) geringere Zell-infiltrationen als bei den Kontrolltieren.

Sojaöl bewirkte im Vergleich zur Kochsalzkontrolle bis auf das mittlere Zellaufkommen der T<sub>4</sub>-Lymphozyten und Makrophagen (W3/25<sup>+</sup>) eine im Mittel geringere zelluläre Infiltration. Statistisch signifikant waren hier die Unterschiede innerhalb der Ox 19<sup>+/-</sup>, Ox 8<sup>+/-</sup>, Ox 1<sup>+/-</sup> und Ox 33<sup>+/-</sup>-Auswertung. Innerhalb der T-Zellen und Polymorphkernigen-Neutrophilen (W3/13<sup>+</sup>) und der T<sub>4</sub>-Lymphozyten und Makrophagen (W3/25<sup>+</sup>) stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar.

### 3.4 Lipidemulsionen in Form von Fettsäureäthylestern

#### 3.4.1 Äthylester mit unterschiedlichem $\omega$ -3-Fettsäurenanteil

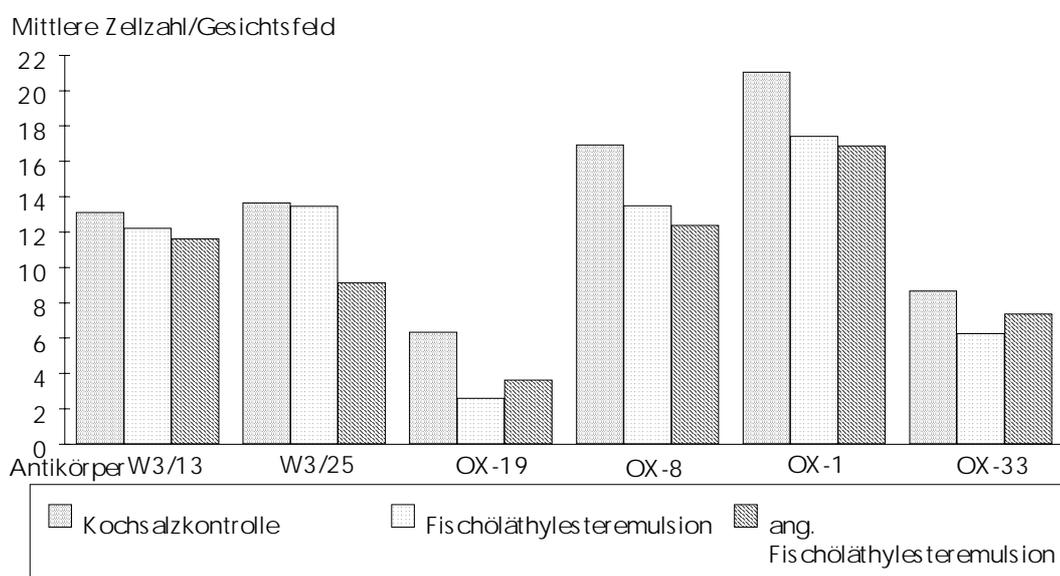


**Abb. 12:** Fischöläthylester- (FÄ) im Vergleich zu angereicherter Fischöläthylesteremulsion (AFÄ)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

In unseren Untersuchungen wurden zwei Äthylestergruppen ausgewertet. Beide Gruppen erhielten Fischöläthylester in einer Konzentration 9,0 g Fett/kgKG/Tag.

Die Zusammensetzung unterschied sich im Anteil an  $\omega$ -3-Fettsäuren. Statistische Unterschiede fanden sich nur bei der Infiltration von W3/25<sup>+</sup>-Zellen. Tendenziell bestanden aber geringere zelluläre Infiltrate in der Gruppe, die mit angereicherten Fischöläthylestern behandelt wurden.

### 3.4.2 Äthylester im Vergleich zur Kochsalzkontrolle

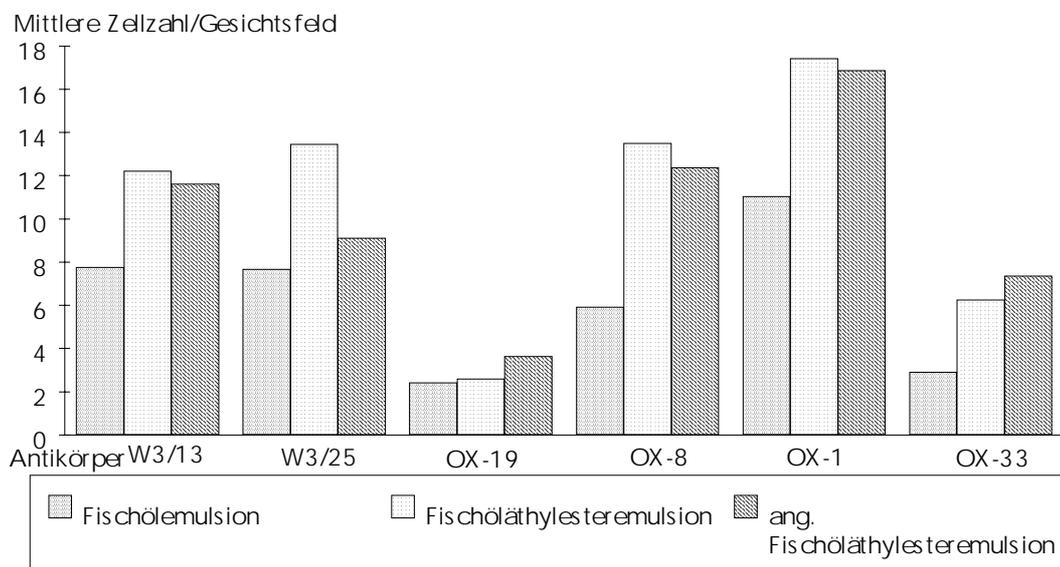


**Abb. 13:** Fischöläthylester- (FÄ) und angereicherte Fischöläthylesteremulsion (AFÄ) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle (KO)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Transplantate der beiden Fischöläthylestergruppen enthielten weniger Zellinfiltrate als die Kontrollgruppe: Die Unterschiede waren signifikant bei den Ox 19<sup>+</sup>-, Ox 8<sup>+</sup>- und Ox 33<sup>+</sup>- Zelluntergruppen im Vergleich Kochsalzkontrolle zu Fischöläthylester und bei den Ox 19<sup>+</sup>-, Ox 8<sup>+</sup>- und W3/25<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich Kochsalzkontrolle zu angereicherten Fischöläthylestern.

### 3.5 Lipidemulsionen mit unterschiedlicher Fettsäureveresterung

#### 3.5.1 Fischöle mit unterschiedlicher Veresterung



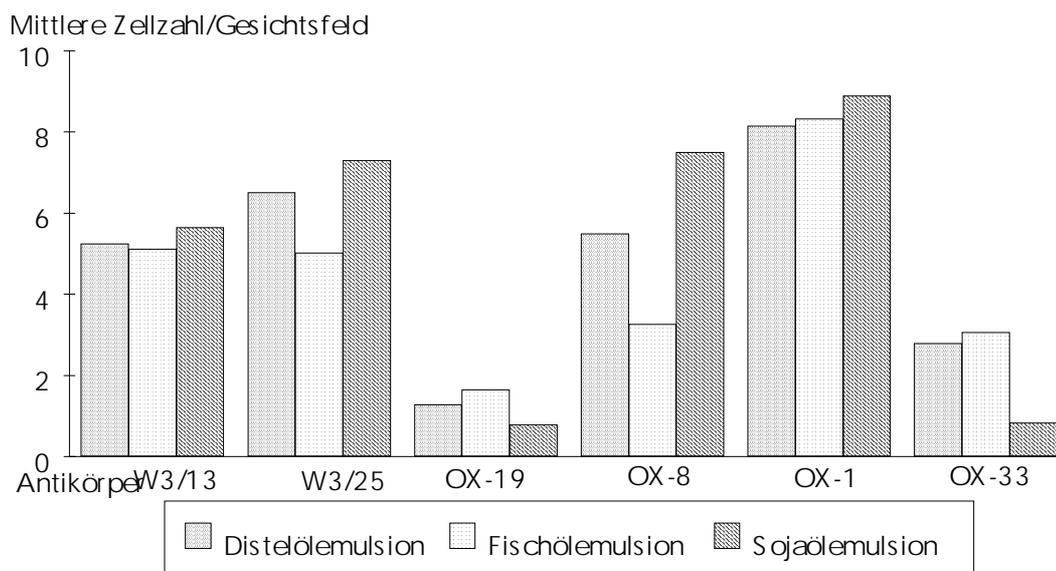
**Abb. 14:** Fischöl- (FÖ), Fischöläthylester- (FÄ) und angereicherte Fischöläthylesteremulsion (AFÄ) im direkten Vergleich  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Die Fischöl-Triglyzerylestergruppe wies im Vergleich zu den beiden Äthylestergruppen niedrigere zelluläre Infiltrate auf. Die Unterschiede waren für alle Zelluntergruppen hochsignifikant.

## B. Zellinfiltrationsmuster im Transplantat am vierten postoperativen Tag

### 3.6 Lipidemulsionen in Form von Triglyzerylestern

#### 3.6.1 Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis



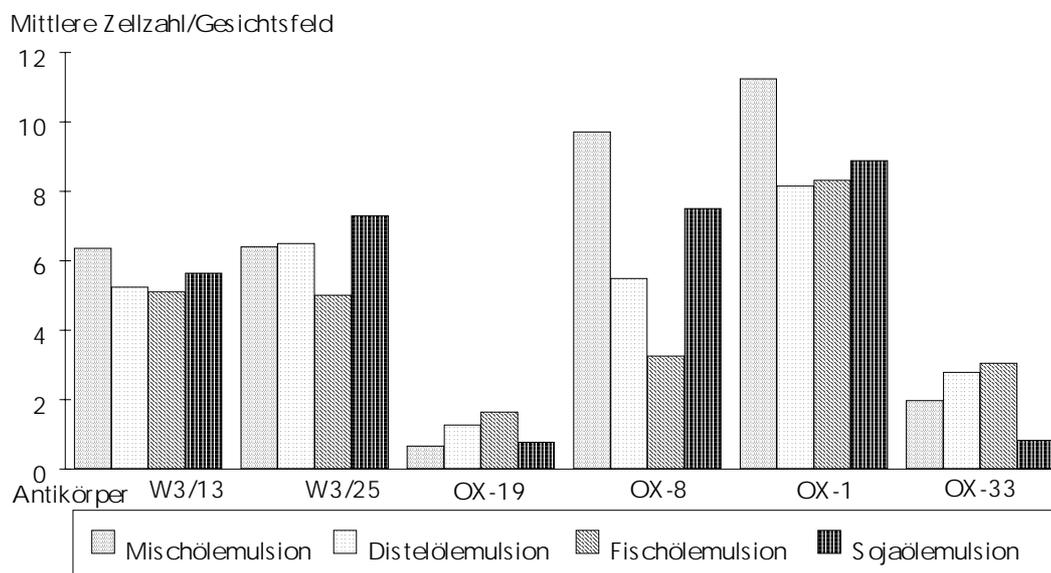
**Abb. 15:** Distelöl- (DÖ), Fischöl- (FÖ) und Sojaölemulsion (SÖ) im Vergleich (SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Die zellulären Infiltrate der Transplantate der Distelöl-, Fischöl- und Sojaöl-Gruppen zeigten hinsichtlich der mittleren Zellzahlen innerhalb der verwendeten sechs Antikörper nur bei den Antikörpern Ox 19, Ox 8 und Ox 33 signifikante Unterschiede. Die T<sub>8</sub>-Einwanderung war in der Fischölgruppe signifikant niedriger als bei den distelöl- und sojaölbehandelten Tieren.

Sojaölinfundierte Tiere zeigten signifikant niedrigere B-Zelleinwanderung (Ox 33<sup>+</sup>) als Präparate aus den Distelöl- und Fischöl-Behandlungsgruppen.

Außerdem waren die Ox 19<sup>+</sup> Infiltrate, also die Thymozyten in der Sojaölgruppe, signifikant niedriger als in der Fischölgruppe. In der Fischölgruppe fand sich das geringste Infiltrat an T-Zellen und Polymorphkernigen Neutrophilen (W3/13<sup>+</sup>), T<sub>4</sub>-Zellen und Makrophagen (W3/25<sup>+</sup>) und T<sub>8</sub>-Zellen (Ox 8<sup>+</sup>).

### 3.6.2 Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zum balanzierten Mischöl



**Abb. 16:** Distelöl- (DÖ), Fischöl- (FÖ) und Sojaöl- (SÖ) im Vergleich zur Mischölemulsion (MÖ)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

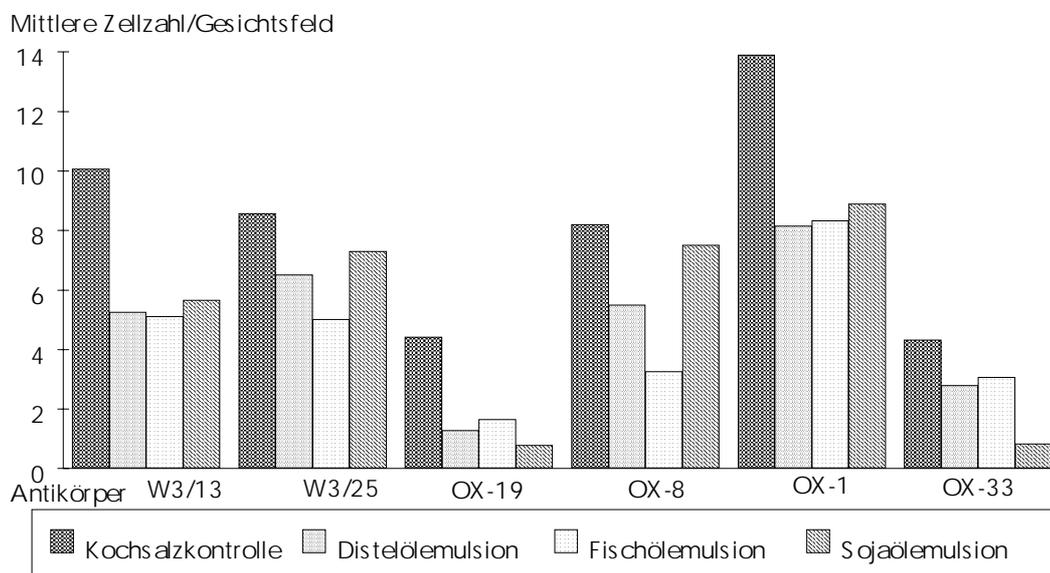
Innerhalb der nach vier Tagen entnommenen Herzen gelang im Gegensatz zu den vollständig abgestoßenen Herzen eine Auswertung der zellulären Infiltration der Mischölgruppe mittels der in dieser Arbeit verwendeten quantitativen Bestimmung von Zellzahlen.

Es bot sich daher an, neben der Kochsalzkontrolle die Mischölgruppe als isokalorische Kontrolle zu verwenden und mit den jeweiligen anderen Gruppen zu vergleichen.

Sojaölbehandelte Tiere zeigten nur in der B-Zellpopulation (Ox 33<sup>+</sup>) signifikant niedrigere Zellzahlen als die Mischölgruppe. Der Fischöl-Mischöl-Vergleich ergab bei den Ox 19<sup>+</sup>-, Ox 8<sup>+</sup>- und Ox 1<sup>+</sup>-Zellpopulationen signifikante Unterschiede, wobei Fischöl außer bei den Ox 19<sup>+</sup>-Zellen eine signifikant geringere Infiltration zeigte.

In der Distelölgruppe fanden sich nur bei den Ox 8<sup>+</sup>- und Ox 1<sup>+</sup>-Zellen signifikant niedrigere Zellzahlen als bei der Mischölgruppe.

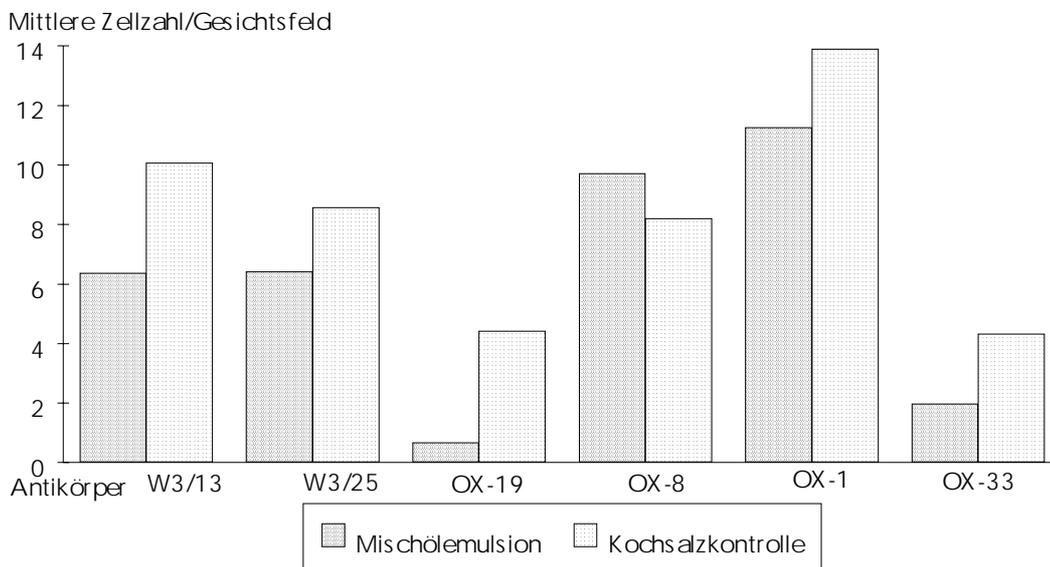
### 3.6.3 Triglyzeride mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis im Vergleich zur Kochsalzkontrolle



**Abb. 17:** Distelöl- (DÖ), Fischöl- (FÖ) und Sojaölemulsion (SÖ) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle (KO)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Die zelluläre Infiltration war in der Kontrollgruppe bei allen Antikörpern in der Regel höher als bei den triglyzerylesterbehandelten Tieren. Nicht signifikant höher waren die T<sub>4</sub>-Zellen und Makrophagen-Zellzahlen der Kontrolle im Vergleich mit der Distelöl- und Sojaöl-Gruppe und die B-Zellzahlen im Vergleich mit der Distelöl- und Fischölgruppe.

### 3.6.4 Triglyzeride mit ausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis (Mischöl) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle

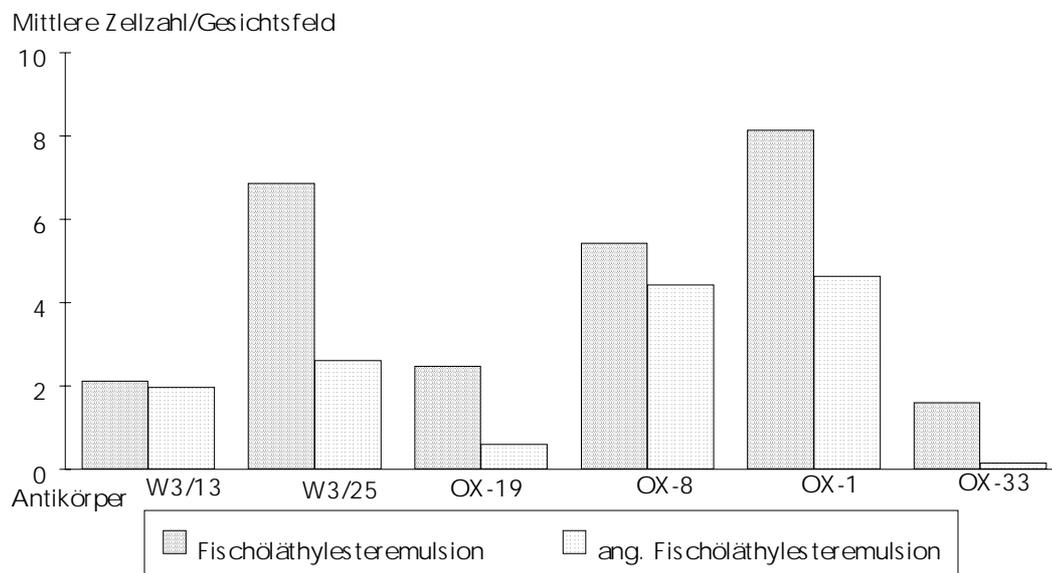


**Abb. 18:** Mischölemulsion (MÖ) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle (KO)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Mischölbehandelte Tiere entwickelten nach vier Tagen im Vergleich zur Kochsalzkontrolle im Mittel niedrigere Zellinfiltrationen, wobei dies statistisch signifikant nur für die W3/13<sup>+</sup>-, Ox 19<sup>+</sup>- und Ox 33<sup>+</sup>-Zellen galt. Trotz dieser zunächst niedriger ausfallenden Infiltration werden die Transplantate etwa zum gleichen Zeitpunkt abgestoßen wie die Organe der Kochsalzkontrolle.

### 3.7 Lipidemulsionen in Form von Fettsäureäthylestern

#### 3.7.1 Äthylester mit unterschiedlichem $\omega$ -3-Fettsäureanteil

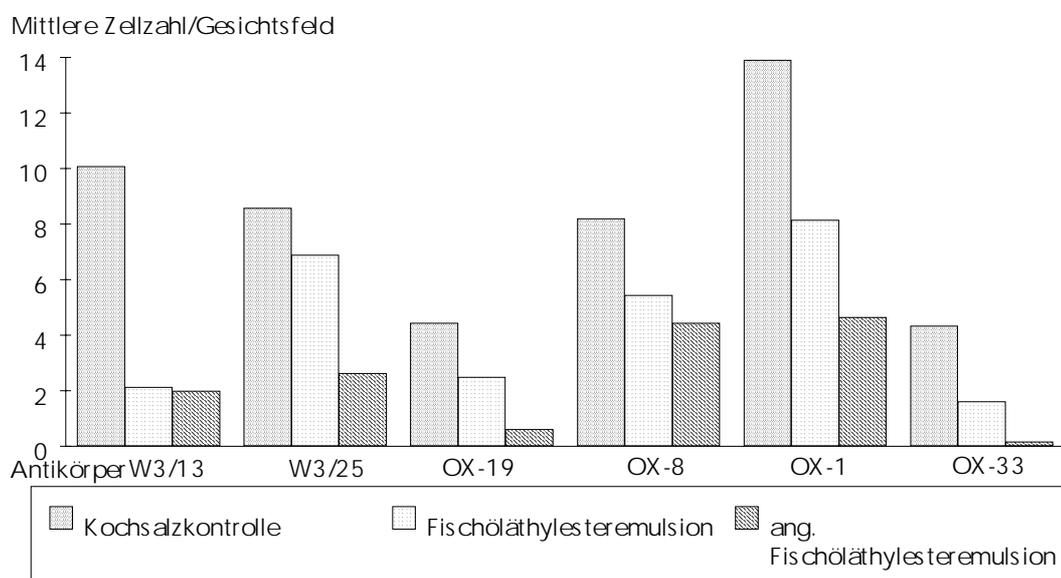


**Abb. 19:** Fischöläthylester- (FÄ) im Vergleich zur angereicherten Fischöläthylesteremulsion (AFÄ)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Die mit Omega-3-Fettsäuren angereicherten Fischöläthylester bewirkten bei allen Antikörperdarstellungen niedrigere mittlere Zellzahlen als unmodifizierte Fischöläthylester.

Deutlich und statistisch signifikant niedriger waren die Zahlen der W3/25<sup>+</sup>-, OX 19<sup>+</sup>-, OX 1<sup>+</sup>- und der OX 33<sup>+</sup>-Zellen.

### 3.7.2 Äthylester im Vergleich zur Kochsalzkontrolle

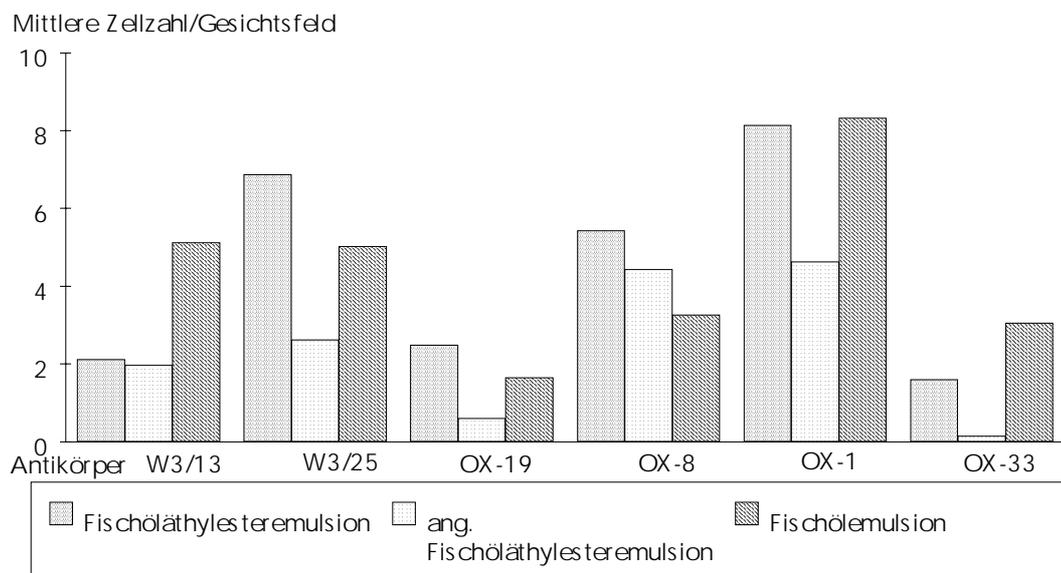


**Abb. 20:** Fischöläthylester- (FÄ) und angereicherte Fischöläthylesteremulsion (AFÄ) im Vergleich zur Kochsalzkontrolle (KO)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Bis auf den Vergleich der W3/25<sup>+</sup>-Zellzahlen der Kochsalzkontrolle mit denen der Fischöläthylestergruppe waren alle anderen Antikörperauswertungen signifikant unterschiedlich, d.h. im Durchschnitt waren die Zellzahlen in der Kochsalzkontrolle signifikant höher als bei den äthylesterbehandelten Tieren.

### 3.8 Lipidemulsionen mit unterschiedlicher Fettsäureveresterung im Vergleich

#### 3.8.1 Fischöle mit unterschiedlicher Veresterungsform

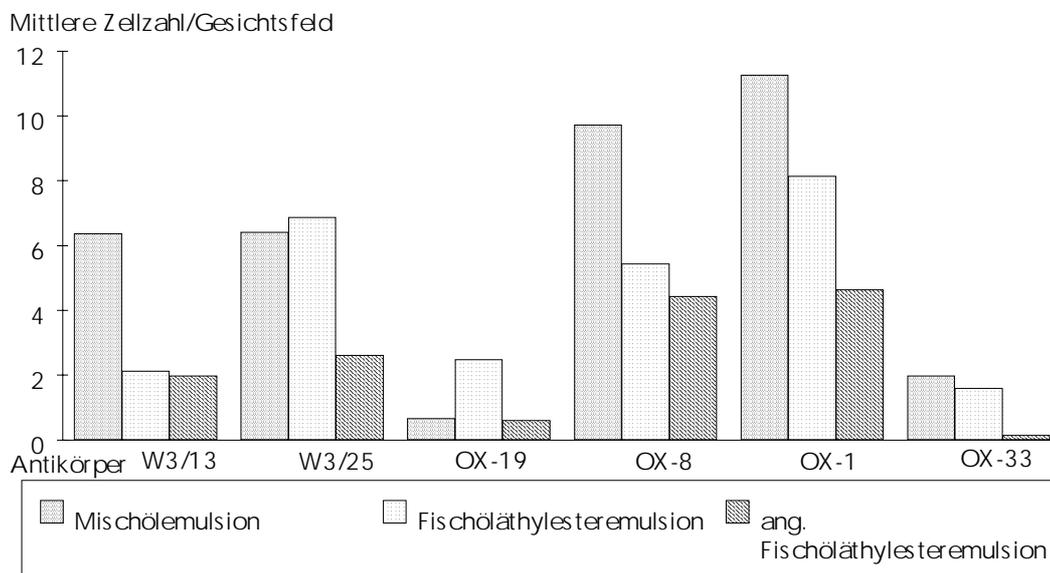


**Abb. 21:** Fischöläthylester- (FÄ), angereicherte Fischöläthylester- (AFÄ) und Fischölemulsion (FÖ) im Vergleich  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Bei der Fischölgruppe sah man im Vergleich zu den Fischöläthylestern signifikante Unterschiede innerhalb der Antikörperauswertung des W3/13-, Ox 19- und Ox 33-Antikörpers, wobei fischöläthylesterbehandelte Tiere die niedrigeren Zellzahlen aufwiesen.

Die mit Omega-3-Fettsäuren angereicherten Äthylester zeigten im Vergleich zum Fischöl außer bei der Tg-Infiltration in allen fünf anderen Antikörperauszählungen signifikante Unterschiede. Im Mittel waren die Zellzahlen der Fischöläthylester-Gruppe niedriger als in der Fischöltriglyzerid-Gruppe.

### 3.8.2 Triglyzeride mit ausgewogenem (Mischöl) im Vergleich zu Äthylestern mit unausgewogenem $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis



**Abb. 22:** Fischöläthylester- (FÄ) und angereicherte Fischöläthylester- (AFÄ) im Vergleich zur Mischölemulsion (MÖ)  
(SEM-Angabe bei fehlender Normalverteilung nicht zulässig.)

Der Vergleich Mischöl gegenüber Fischöläthylestern zeigte bis auf die Infiltration mit W3/25<sup>+</sup>- und Ox 33<sup>+</sup>-Zellen insgesamt signifikante Unterschiede. Ox 19<sup>+</sup>-Zellen waren in der Mischölgruppe geringer vorhanden als in der Fischöläthylestergruppe. Sonst zeigten alle Antikörperauswertungen in der Fischöläthylestergruppe niedrigere Zellinfiltrationen. Die angereicherten Fischöläthylester bewirken bis auf die Ox 19<sup>+</sup>-Zellpopulation bei allen anderen verwendeten Antikörpermarkern signifikant niedrigere Ergebnisse.

### ***C. Vergleich der Ergebnisse vier Tage nach Transplantation mit denen nach finaler Abstoßung***

#### **3.9 Infiltrationskinetik**

##### **3.9.1 T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub>-Verhältnis: Vergleich der Transplantate am 4. postoperativen Tag gegenüber den vollständig abgestoßenen Organen**

**Tabelle 8:** T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub>-Verhältnis der Transplantate 4 Tage nach Implantation und nach finaler Abstoßung

Gruppe	T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub> -Verhältnis 4 Tage nach Transplantation	T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub> -Verhältnis nach finaler Abstoßung
NaCl	1,046	0,806
Distelöl 9,0	1,186	1,228
Fischöl 9,0	1,54	1,295
Fischöläthylester	1,265	0,998
ang. Fischöläthylester	0,59	0,737
Intralipid (Sojaöl)	0,973	1,319
Mischöl	0,66	/

Distelöl- und fischölbehandelte Tiere zeigen konstant, sowohl nach vier Tagen als auch nach vollständiger Abstoßung, T<sub>4</sub>-betonte Infiltrationen.

Die Fischöläthylester-Gruppen zeigen eher eine T<sub>8</sub>-Dominanz, die Sojaöl-Gruppe nach vier Tagen zunächst ein Überwiegen der T<sub>8</sub>- später der T<sub>4</sub>-Zellen.

Die Kochsalzkontrolle zeigte nach vier Tagen zunächst ein ausgeglichenes T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub>-Verhältnis, das sich nach vollständiger Abstoßung zugunsten der T<sub>8</sub>-Zellen verschoben hat.

### 3.9.2 Gesamtinfiltration

Den Ausprägungsgrad der Gesamtinfiltration kann man am besten an den ermittelten mittleren Zellzahlen der Ox 1<sup>+</sup>-Zellen beurteilen. Der Ox 1-Marker macht das „leukocyte common antigen“ (LCA) sichtbar, das auf den reifen T- und B-Lymphozyten und Makrophagen zu finden ist.

**Tabelle 9:** Mittlere Zellzahlen der LCA-tragenden Zellen im Vergleich

Gruppe	Zellzahl (Ox 1) 4 Tage nach Transplantation	Zellzahl (Ox 1) nach finaler Abstoßung
NaCl (KO)	13,8	21,0
Distelöl (DÖ)	8,1	13,4
Fischöl (FÖ)	8,3	11,0
Fischöläthylester (FÄ)	8,1	17,4
ang. Fischöläthylester (AFÄ)	4,6	16,8
Sojaöl (SÖ)	8,8	14,8
Mischöl (MÖ)	11,2	/

In Tabelle 9 wird die Infiltration Ox 1<sup>+</sup>-Zellen am vierten postoperativen Tag und nach vollendeter Abstoßung verglichen. Die mit angereichertem Fischöläthylester behandelten Tiere wiesen am vierten postoperativen Tag die geringsten Infiltrate auf, obwohl sie nach vollendeter Abstoßung zu den stark infiltrierten Gruppen zählten. Ansonsten fanden sich bei der Kochsalzkontrolle und der Mischölgruppe bereits nach vier Tagen eine massive Infiltration mit Ox 1<sup>+</sup>-Zellen, während die anderen Gruppen noch ähnliche mittlere Zellzahlen aufwiesen und der Behandlungseffekt erst nach Vollendung der Abstoßung deutlich wurde.

## 4. Diskussion

Fette beeinflussen das Immunsystem. Stuart und Biozzi [120] wiesen schon 1960 nach, daß die intravenöse Gabe von Fettsäureäthylestern das Phagozytosepotential des retikuloendothelialen Systems reduziert. Schon damals zeichnete sich ab, daß nicht alle Lipide in gleicher Weise die Phagozytenfunktion beeinträchtigen.

Zwischenzeitlich wurden zahlreiche in vitro- und ex vivo- Untersuchungen zum Einfluß intravenöser Lipidemulsionen auf das Immunsystem [8,88,91,92] durchgeführt. Es fehlten aber standardisierte Studien über deren Nettoeffekt in vivo.

In einem standardisierten Tiermodell der heterotopen Herztransplantation zwischen histoinkompatiblen Rattenstämmen konnte Grimm [47] zeigen, daß Fettsäuretriglyzeride in Abhängigkeit vom  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis unterschiedlich, von immunsuppressiv bis immunneutral, wirken.

Für diese Untersuchungen wurden histoinkompatible Rattenherzen, die sich im MHC-Antigen RT<sub>1</sub> unterschieden [66,67], heterotop transplantiert. Die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit im Vergleich zu einer Kontrollgruppe definierte die immunsuppressive Potenz der jeweiligen Lipidemulsion. Die Transplantatfunktion war durch Palpation der Herzmuskelkontraktion sicher und einfach zu kontrollieren.

Die Auswahl der infundierten Fettsäuretriglyzeridemulsionen beinhaltete klinisch verwendete (Sojaöl = Intralipid<sup>®</sup>) und andere Öle mit davon abweichendem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis. Fischöl wurde auch in alternativer Veresterungsform (Äthylester) getestet.

In einigen Studien zeichnete sich bereits ab, daß die vielfach ungesättigten Fettsäuren und besonders das Verhältnis ihrer  $\omega$ -3- bzw.  $\omega$ -6-Varianten erheblichen Einfluß auf die Immunantwort haben.

Otto [96] zeigte, daß diätetisch eingesetzte  $\omega$ -3-Fettsäuren die akute Abstoßung allogener Rattenherztransplantate abschwächt.

Fette mit einem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von über eins verlängerten die Transplantatüberlebenszeit maximal. In Übereinstimmung dazu fand Boudreau [16], daß nicht die absolute Menge der  $\omega$ -3-Fettsäuren, sondern das  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-

Fettsäureverhältnis der zugeführten Nahrung die Eikosanoidbiosynthese aus Arachidonsäure hemmt.

Neu an unseren Untersuchungen [47,49] war die Kombination eines in vivo Immunstimulationsmodelles mit dem Konzept der intravenösen Fettapplikation. Bisher existierten ausschließlich diätetische Studien zum Einfluß von Lipiden auf das Immunsystem. Die parenterale Gabe bietet den Vorteil einer standardisierten, körperrgewichtszugehörigen und kontinuierlichen Lipidgabe.

Die Lipidemulsionen unserer Untersuchungsreihe hatten ein  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von 1/370 (Distelöl), von 8,4/1 (Fischöl), von 1/8 (Sojaöl) und von 1/2 (Mischöl). Fischöläthylester wurden mit einem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von 8,8/1 und 22,8/1 ausgetestet.

Biologischer Parameter für die Immunsuppressivität der Öle war die Transplantatüberlebenszeit. Die längsten Transplantatüberlebenszeiten fanden sich bei Infusion von Distel- bzw. Fischöl, also Präparaten mit unausgewogenem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis. Hier waren die Transplantatabstoßungszeiten im Vergleich zu den Kontrollen um fast das Doppelte verlängert [49].

Kinsella [68] postulierte, daß das  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Verhältnis zwischen 1/2 und 1/3 keinen Einfluß auf die Immunantwort hat, was sich bei unserer Mischölgruppe ( $\omega$ -3/ $\omega$ -6=1/2) mit Abstoßungszeiten ähnlich der Kochsalzkontrolle bestätigte.

Entsprechend dem annähernd, aber suboptimal ausgeglichenen  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis war die Abstoßungszeit in der Sojaölgruppe kürzer als in der Fischöl- oder Distelölgruppe, aber länger als in den Kontrollgruppen.

Der biologische Parameter „Transplantatüberlebenszeit“ sprach für ein unterschiedliches immunmodulatorisches Potential der getesteten Ölemulsionen in Abhängigkeit von ihrem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Verhältnis.

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die unterschiedlichen Transplantatüberlebenszeiten anhand des Spektrums der transplantatinfiltrierenden Zellen zu objektivieren.

Voraussetzung für die Transplantatabstoßung ist die Identifizierung als Fremdgewebe.

Dies geschieht über eine unterschiedliche „major-histocompatibility“-Antigenkomplexausstattung zwischen Spender und Empfänger. Antigene der Klasse II reagieren mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Klasse I-Antigene (in der Ratte RT 1 A, C und E genannt) mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, Antigene der Klasse III sind in die Komplementaktivierung involviert. Die Abstoßung von als fremd erkanntem Gewebe verläuft dann über einen mehr oder weniger aus humoralen und zellulären Reaktionen zusammengesetzten Vorgang [58,101,109]. Angriffspunkt der humoralen Reaktionen sind vornehmlich das Gefäßendothel, weshalb auch von der vaskulären Abstoßung gesprochen wird [58]. Hier finden sich vom interstitiellen Gefäßwandödem bis hin zur Intimafibrose vaskuläre, humoral ausgelöste Gefäßwandveränderungen [41,114], wobei auch antikörper-unabhängige, direkt zellulär verursachte Gefäßläsionen diskutiert werden [98]. Die Entdeckung des MHC-Antigenkomplexes durch Gorer [45] brachte großen Aufschluß über die zelluläre Komponente der Transplantatabstoßung. T-Lymphozyten reagieren auf fremde MHC-Antigene mit der Sekretion einer ganzen Reihe von Zytokinen. Diese Stimuli fördern neben der Antikörperproduktion von B-Zellen besonders die T-Zellproliferation und die Aktivierung von Makrophagen. Im Transplantat sind als Folge besonders T-Zellen, CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Varianten, PMN und Makrophagen zu erwarten. Infiltrierende B-Zellen werden weniger zahlreich vorgefunden [29,56].

Die Wahl der Antikörper zur Identifikation der zellulären Infiltrate orientiert sich am zu erwarteten Zellaufkommen. Mit dem Antikörper W3/25 werden CD4<sup>+</sup>-Zellen, z.B. T-Helferzellen und Makrophagen erfaßt. Der Antikörper Ox 8 bindet CD8<sup>+</sup> Zellen, besonders T-Suppressor/zytotoxische Zellen (Ts/c) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Antikörper W3/13 und Ox 19 identifizieren PMN (W3/13<sup>+</sup>) und CD5<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Ox 19<sup>+</sup>). Ox 33 bindet B-Lymphozyten. Der Antikörper Ox 1 ist gegen das „leucocyte common antigen“ (LCA) gerichtet und bindet sich an alle weißen Blutkörperchen.

Da verschiedene Zellsorten identische Oberflächenepitope tragen können, identifizieren einzelne Antikörper leider nicht selektiv einen spezifischen Zelltyp. Insbesondere PMN konnten nicht isoliert angefärbt werden. Auch die Verwendung des vermeintlich spezifischen Antikörpers MOM/3F12/F2 (Serotec, USA) [11] schlug fehl, da dieser morphologisch eindeutige PMN nicht markierte (Anhang, Abb. 20–21).

Unser Verfahren zur quantitativen Bestimmung transplantatinfiltrierender Zellen war standardisiert. Lediglich intakte Herzmuskelareale wurden ausgewertet

angesichts des doch teilweise erheblich zerstörten Gewebes final abgestoßener Transplantate. Eine Auswertung von Nekrosearealen war nicht sinnvoll, da abstoßungsbedingte von operationstechnisch verursachten Nekrosen nicht zu unterscheiden waren.

Nicht alle vollständig abgestoßenen Transplantate waren nach unseren Kriterien auswertbar. So mußten in den Gruppen 1–6 von 55 Organen 14 wegen großer interstitieller Ödeme oder fehlender intakter Herzmuskelareale ausgeschlossen werden.

Die Mischölgruppe innerhalb der final abgestoßenen Organe (Gruppe 7) war insgesamt nicht evaluierbar, da hier ein nicht verwertbares histologisches Bild vorlag. In der Mitte des Myokards lag ein Demarkationssaum aus PMN. Zellzahlen konnten in dem eng gepackten Zellsaum nicht bestimmt werden. Lediglich zum Rand, d.h. zum Epikard hin, war noch einigermaßen intakte Muskulatur zu finden (Anhang, Abb. 16–21).

Für die Ursache dieses histologischen Bildes fehlt uns bisher jeglicher Hinweis. Auf der anderen Seite reihen sich die vor der finalen Abstoßung entnommenen Organe dieser Gruppe in die ermittelten Transplantatabstoßungszeiten ein. Die Zahl der infiltrierenden LCA-positiven Zellen entsprechen denen der Kochsalzkontrolle und objektivieren die identische Transplantatüberlebenszeit. Am vierten Tag nach der Transplantation findet sich jedenfalls kein Hinweis für die Entwicklung des o.g. PMN-Demarkationssaumes.

Die phänomenologische Dynamik des Abstoßungsprozesses histoinkompatibler Transplantate wird schon seit geraumer Zeit erforscht.

Schon Abbott [2] hatte 1965 erste histomorphologische Ergebnisse im allogenen Rattenmodell beschrieben. MacSween fand 1971 [79], daß schon 24 bis 48 Stunden nach der Transplantation eines allogenen, histoinkompatiblen Rattenherzens beginnende subepi- und subendokardiale Zellinfiltrate zu erkennen sind. Diese Veränderungen werden allgemein als Entzündungsreaktionen auf operationstechnische Traumen verstanden [41,61,79].

In den ersten beiden Tagen sind kaum morphologische Abstoßungsvorgänge vorzufinden [124]. MacSween beobachtete 4 bis 6 Tage nach der Transplantation rechtsventrikulär betonte subendokardiale Infiltrate mononukleärer Zellen, die sich ab Tag 5 auf das gesamte Myokard ausbreiteten. In diesem Zeitraum steigt die zelluläre Infiltration stark an [60,61,72,79]. Deshalb wählten wir den vierten Tag nach der Transplantation als Explantationszeitpunkt in unserer ersten Untersuchungsreihe.

Betrachtet man zunächst unsere Kochsalzkontrollgruppe mit unbeeinflusster Abstoßung des allogenen Rattenherzentransplantates, so fanden sich bei der durchschnittlichen Transplantatüberlebenszeit und der initialen Infiltration von W3/25<sup>+</sup>- und Ox 8<sup>+</sup>- Zellen im Vergleich zu anderen Studien übereinstimmende Ergebnisse. Die mittlere Transplantatüberlebenszeit betrug  $7,8 \pm 0,3$  Tage. Dies korreliert mit Angaben von Tilney und Christmas mit  $7,3 \pm 0,8$  bzw.  $7,3 \pm 0,48$  Tagen in Rattentransplantationsmodellen mit ähnlicher Histoinkompatibilität [27,124].

Das Infiltrat von W3/25<sup>+</sup>- und Ox 8<sup>+</sup>-Zellen stieg in unserer Kochsalzkontrolle vom vierten Tag nach der Transplantation bis zur vollständigen Abstoßung stetig an. Am vierten Tag fanden sich im Mittel 8,5 W3/25<sup>+</sup>-Zellen pro ausgewertetem Areal während nach vollständiger Abstoßung durchschnittlich etwa 13,5 positive Zellen zu finden waren. Die Ox 8<sup>+</sup>-Zellen stiegen im gleichen Zeitraum von etwa 8,2 Zellen am vierten Tag auf das Doppelte, d.h. knapp 17 Zellen nach Abstoßung, an. Dies spricht für eine, wenn auch nicht deutliche, so doch tendenziell stärkere Zunahme der Ox 8<sup>+</sup>-Zellen bis zur Vollendung der Abstoßung. Häufig wird auch von einer Dominanz der Ox 8<sup>+</sup>-Zellen mit steigender Transplantationszeit gesprochen [40,57,58,72,101].

Ox 8<sup>+</sup>-Zellen sind im wesentlichen NK-Zellen sowie Ts/c-Zellen. Hayashi kam in seiner Untersuchung zu dem Ergebnis, daß zunächst NK-Zellen wesentlich am Abstoßungsgeschehen beteiligt, während später zunehmend die Ts/c Zellen und Makrophagen für die Abstoßungsvorgänge von Bedeutung sind [57]. Die Differenzierung zwischen NK-Zellen und Ts/c-Zellen wurde in unserer Untersuchung nicht vorgenommen. Einige Autoren gehen davon aus, daß die W3/25<sup>+</sup>-Zellen alleine den Abstoßungsprozeß vollenden können [27,55,118]. Dazu zählen neben T-Helferzellen auch Makrophagen.

Hall [55] zeigte, daß bei subletal bestrahlten allogenen transplantierten Ratten allein durch die Infusion von Ox 8<sup>+</sup>-Zellen keine Abstoßung zu erzielen war, während die W3/25<sup>+</sup>-Zellen in der Lage waren, den Abstoßungsprozeß ohne gleichzeitige Anwesenheit von Ox 8<sup>+</sup>-Zellen zu induzieren. Entstammten die Ox 8<sup>+</sup>-Zellen von durch Spenderhaut oder Milztransplantation sensibilisierten Tieren fand die Abstoßung statt [118].

W3/13<sup>+</sup>-Zellen, also T-Lymphozyten und PMN, stiegen von 10 Zellen am vierten Tag auf 13 Zellen nach vollendeter Abstoßung an. Die Ox 19<sup>+</sup>-Zellen waren sowohl nach vier Tagen, als auch nach terminaler Abstoßung kaum vertreten. Die höchste Infiltrationsdichte wurde mit dem Ox 1-Marker ermittelt.

Ox 1<sup>+</sup>-Zellen stiegen innerhalb der beiden Beobachtungszeitpunkte von 14 auf 21 Zellen im Mittel an.

Die B-Lymphozyten hatten sich pro Gesichtsfeld im Durchschnitt von 4 auf 8 Zellen verdoppelt.

Mit den Überlebenszeiten und den zellulären Infiltraten der Transplantate der Kochsalzkontrollgruppe war ein Standard definiert, mit dem die verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen werden konnten. Insgesamt korrelierte das Ausmaß des zellulären Infiltrates gut mit den Überlebenszeiten der Transplantate. In allen Behandlungsgruppen stieg die Zahl der W3/13<sup>+</sup>-Zellen vom vierten Tag bis zur vollständigen Abstoßung an. Eine direkte Aussage über die Entwicklung der PMN war aufgrund des nicht selektiven monoklonalen Antikörpers W3/13 nicht zu treffen. Der Marker W3/13 erfaßt T-Zellen und PMN. Nach Betrachtung der Zellzahlentwicklung der Ox 8<sup>+</sup>- und W3/25<sup>+</sup>-Zellen muß man jedoch davon ausgehen, daß der überwiegende Anteil der angefärbten Zellen zur T-Zellreihe gehören mußte. Morphologisch ließen sich sicherlich auch einige PMN differenzieren.

Prinzipiell scheinen die Neutrophilen jedoch eine untergeordnete Rolle im akuten Geschehen zu spielen [27]. Tilney [124] fand PMN ab dem 7. Abstoßungstag, d.h. kurz vor Vollendung der Abstoßung. Hier beschreibt er auch ein dann auftretendes hohes Aufkommen an Makrophagen, die sich hauptsächlich um Nekroseareale ansammeln. Die Makrophagen wurden in unserer Untersuchung nicht selektiv markiert. Der Antikörper W3/25 markierte sowohl T4-Lymphozyten als auch Makrophagen, die das CD4-Epitop ebenfalls tragen. In der Regel siedeln sich die Makrophagen jedoch in Nähe der Zellnekrosen an [124], also in Regionen, die von uns bewußt gemieden wurden. Somit wurden in unserer Untersuchung mit dem Marker W3/25 hauptsächlich T-Lymphozyten nachgewiesen.

B-Lymphozyten, erfaßt durch den Marker Ox 33, sind im Transplantatinfiltat unserer Präparate nur spärlich vertreten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich in den vollständig abgestoßenen Organen der Distel-, Fischöl- und Sojaölgruppe reduzierte Zellzahlen. Selbst in Modellen zur hyperakuten und chronischen Abstoßung, in denen B-Zellen eine herausragende pathogenetische Rolle spielen, finden sich nur mäßige B-Zellinfiltrate im Transplantat.

Hancock [56] untersuchte im Modell der hyperakuten Abstoßung von Rattenherztransplantaten u.a. die Transplantatinfiltation durch B-Zellen mit dem Ox 33 Marker. Er fand bei unbehandelten Tieren zum einen die zu erwartenden

deutlichen Zeichen der humoralen Abstoßung mit IgG- und C3-Ablagerungen am Gefäßendothel, zum anderen jedoch eine nur unwesentliche B-Lymphozyteninfiltration der Transplantate. Cramer [29] fand im Modell zur chronischen Abstoßung ebenfalls nur eine geringe Migration von B-Lymphozyten in den Transplantaten.

Bei der akuten Abstoßung spielen T-Zellen die dominierende Rolle. Das T4/T8-Verhältnis ist beim ungestört einsetzenden Abstoßungsprozeß kleiner als eins und nimmt im weiteren Verlauf zunehmend ab [40,125].

Am vierten Tag fanden wir in unserer Kochsalzkontrolle ein T4/T8-Verhältnis von im Mittel 1,05 vor. Nach vollständiger Abstoßung verminderte sich das Verhältnis auf durchschnittlich 0,8. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beobachtete Hayashi [57] bis zum dritten Tag ein T4/T8-Verhältnis von größer 2, welches bis zum siebten Tag auf unter 1 abfiel. Andere bestätigten diese Beobachtung [40,73,125].

Die Kinetik des T4/T8-Verhältnisses im Verlauf der Abstoßung spricht wieder für eine wichtige Rolle der  $Ox 8^+$  Zellen. Vielleicht hat Strepkowski [118] recht, wenn er spekuliert, daß über die IL-2 Sekretion der  $W3/25^+$ -Zellen Vorläuferzellen der T-zytotoxischen Zellen zu Ts/c-Zellen [117] ausreifen, die beispielsweise in thymuslosen Nacktmäusen und auch in subletal bestrahlten Tieren vorhanden sind [54,85,117]. Hierfür würde auch sprechen, daß  $Ox 8^+$ -Zellen allein, ohne  $W3/25^+$ -Zellen und damit ohne IL-2 in subletal bestrahlten Ratten keine Abstoßung erzielen können.

Sicherlich spielen die zellulären Mediatoren (Zytokine) eine zentrale Rolle in der Steuerung der immunologischen Vorgänge bei der allogenen Transplantat-abstoßung. Die Behandlungsgruppen mit den längsten Transplantatüberlebenszeiten, die fischöl- und distelölbehandelten Tiere, zeigten ein T4/T8-Verhältnis von konstant größer 1 sowohl nach 4 Tagen, als auch nach vollendeter Abstoßung. Dies entspricht den Werten unter geläufiger immunsuppressiver Therapie von größer 1 für das T4/T8-Verhältnis [17,123].

Die Sojaölbehandlungsgruppe lag nach vollendeter Abstoßung deutlich über 1, obwohl die Überlebenszeit dieser Gruppe mit durchschnittlich 10,4 Tagen zwar gegenüber der Kochsalz- und Mischölkontrolle signifikant verlängert war, aber nicht so ausgeprägt, wie die der Fischöl- und Distelölbehandlungsgruppen.

Die Fischöläthylesterbehandlungsgruppen zeigten am Ende der Transplantat-abstoßung T4/T8-Verhältnisse von kleiner 1, bei doch deutlich kürzeren Überlebenszeiten im Vergleich zu den triglyzerylesterbehandelten Tieren.

Die Wirkung von Fetten auf das Immunsystem scheint vom Verhältnis der  $\omega$ -3- zu  $\omega$ -6-Fettsäuren abhängig zu sein. Fette wirken umso immunsuppressiver, je unausgewogener ihr  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis ist, egal ob  $\omega$ -3- oder  $\omega$ -6-Fettsäuren im Überfluß vorliegen.

Kinsella [68] behauptete bereits 1990, ohne allerdings einen Nachweis dafür zu erbringen, daß das Verhältnis  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäuren zwischen 1/2 und 1/3 nicht immunologisch wirksam sei. Tatsächlich erwies sich unsere Mischölinfusion mit einem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von 1/2 als immunneutral. Die Infusion von Distel- oder Fischöl verlängerte die Abstoßungszeit maximal. Im einen Fall war das  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Verhältnis mit 1/370 überschießend auf die Seite der  $\omega$ -6-Fettsäuren, im anderen Fall mit 8,4/1 deutlich auf die Seite der  $\omega$ -3-Fettsäuren verschoben. Sojaöl mit einem suboptimal ausgewogenen  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Verhältnis (1:8) bewirkte eine im Vergleich zur Kochsalzkontrollgruppe verlängerte, aber gegenüber Distel- oder Fischöl verringerte Transplantatüberlebenszeit. Der Überschuß an  $\omega$ -3-Fettsäuren kann also niedriger sein, als der an  $\omega$ -6-Fettsäuren, um den gleichen immunsuppressiven Effekt zu erzielen.

Das zelluläre Infiltrat objektiviert diese Ergebnisse. Alle immunhistologisch dargestellten Zelltypen waren in den Transplantaten der Sojaölgruppe zahlenmäßig stärker vertreten, als in der Distel- oder Fischölgruppe. Die Untersuchung der schon vor dem abgeschlossenen Abstoßungsprozeß entnommenen Transplantate ergab eine reduzierte Anzahl der B-Lymphozyten (Ox 33<sup>+</sup>) und Thymozyten (Ox 19<sup>+</sup>) in der Sojaölgruppe im Vergleich zu der Distel- und Fischölgruppe. Möglicherweise kommt es bei den o.g. Zelltypen erst später zum Anstieg des zellulären Infiltrates in der Sojaölgruppe.

Fischöl, dasjenige Öl mit dem höchsten  $\omega$ -3-Fettsäureanteil, wurde zusätzlich als Äthylester eingesetzt, um den Einfluß der Veresterungsform auf die Immunsuppression durch  $\omega$ -3-betonte Lipidemulsionen zu bestimmen. Es wurden Fischöläthylester mit einem Fettsäurespektrum angewendet, das entweder dem von Fischöl entsprach, oder aber 2,2 mal so viel  $\omega$ -3-Fettsäuren enthielt.

Auffällig war, daß die Organe der Äthylesterbehandlungsgruppen vier Tage nach Transplantation mit Ausnahme der Ox 8<sup>+</sup> Zellen niedrigere Zellzahlen als die der Fischöltriglyzerylestergruppe aufwiesen, obwohl die Transplantate dieser beiden Gruppen früher als in der Triglyzeridgruppe abgestoßen wurden. Nach vollendeter Abstoßung aber enthielten Transplantate der Äthylestergruppen nach der Kochsalzkontrolle das höchste Infiltrat mit LCA tragenden Zellen (Ox 1<sup>+</sup>). Diese Ergebnisse sprechen für eine initial stärkere, aber letztendlich schwächere

immunsuppressive Wirkung der Fischöläthylester im Vergleich mit Fischöltriglyzeriden.

Otto [96] zeigte 1990, daß Fischöläthylester peroral die Überlebenszeit allogener Rattenherztransplantate verlängerten. In anderen Untersuchungen führte die Infusion von Eikosapentaen- und Dokosahexaensäure in Form von Äthylestern [135,136] zu einer raschen Inkorporation dieser Fettsäuren in den Phospholipidpool einiger Organe, woraus eine Änderung der Membranfluidität und der Signaltransduktion postuliert werden könnte.

Grimm [48] sah nur im Blut der mit Triglyzerylester behandelten Tiere eine drastisch reduzierte Anzahl aktivierter T-Zellen (IL2R<sup>+</sup>-T-Lymphozyten). Außerdem war die IL-6-Ausschüttung stimulierter peripherer mononukleärer Zellen ausschließlich in der Fischöltriglyzerylestergruppe, nicht aber in den beiden Äthylestergruppen vermindert. Man kann also davon ausgehen, daß  $\omega$ -3-Fettsäuren ihre immunsuppressive Wirkung bei intravenöser Applikation in Abhängigkeit von ihrer Veresterungsform entfalten. Sie wirken als Triglyzeride stärker immunsuppressiv als Äthylester.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, daß durch die intravenöse Gabe von Lipiden die Transplantatinfiltation mit immunkompetenten Zellen modifiziert wurde.

Es stellt sich die Frage, über welche Wirkmechanismen die Lipide Einfluß auf das immunologische Geschehen nehmen.

Fettsäureester der Nahrung werden im Magen und Dünndarm hydrolysiert. Nach Aufnahme der Fettsäuren in die Mukosazelle des Darmes erfolgt dann die Resynthese von Triglyzeriden, die zusammen mit Phospholipiden, Cholesterin und Cholesterinestern als Chylomikronen über die Lymphbahnen ins Blut gelangen. Oral verabreichte Fette erscheinen also unabhängig von der ursprünglichen Veresterung als Triglyzeride im Blut. Bei der intravenösen Applikation bleibt die Veresterungsform erhalten. Statt Chylomikronen gelangen artifizielle Lipidaggregate in die Blutbahn, die über die Aktivierung der endothelständigen Lipoproteinlipase zu freien Fettsäuren gespalten werden [75,84,99,136].

In vitro hemmen freie Fettsäuren in Kulturmedien konzentrationsabhängig die lymphozytäre Proliferation. Insbesondere Linol-, Arachidon- und Eikosapentaensäuren können über einen eikosanoidunabhängigen Mechanismus die Proliferation von T-Lymphozyten in vitro inhibieren [20,68].

Grimminger [51] fand lediglich nach Infusion  $\omega$ -3-betonter nicht aber nach Gabe von  $\omega$ -6 betonten Lipidemulsionen einen Anstieg der Gesamtkonzentration freier

Fettsäuren im Plasma der behandelten Tiere. Dies betraf vor allem die Tiere der Fischöl- und Mischöl-Gruppe. Allerdings lagen die in vivo erreichten freien Fettsäurekonzentrationen deutlich unter der in vitro effektiven Dosis, so daß von einer in vivo relevanten T-Zellproliferationshemmung nicht auszugehen war.

Andere Einflußmöglichkeiten auf das Immunsystem stehen den Fetten aufgrund der Membranstruktur eukaryoter Zellen offen [65,69].

Membranen eukaryoter Zellen, also auch der immunkompetenten Zellen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die Proteine, teils als Rezeptoren und teils als Enzyme integriert sind [115]. Durch Aktivierung der Rezeptoren kann eine kaskadenartige Reaktion ausgelöst werden, die im Zellinneren die unterschiedlichsten Mechanismen in Gang setzt. Die Veränderung des Fettsäuremusters z.B. durch unterschiedliche Acylierung der Phospholipide beeinflußt die Viskosität und Fluidität der Membran [36,116] und kann damit die gesamte Reaktionsbereitschaft der Zelle beeinflussen. Zellmembranen haben somit nicht nur Barrierefunktion, sondern auch Signalübermittlungsaufgaben.

Die Signaltransduktion wird von extrazellulären Liganden, die an Membranrezeptoren binden, eingeleitet. G-Proteine an der Membraninnenseite aktivieren dann die Adenylatcyclase, Phospholipase C und A2. Phospholipase C setzt dann die „second messengers“ 1,2-Diacylglycerol, Arachidonsäure und Inositol-1,4,5-trisphosphat frei.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fließen in die Zelle, Proteinkinasen werden aktiviert und die Zellreaktion wird eingeleitet [3,9,81]. Zum Repertoire der Zellreaktionen gehört auch die Sekretion von Mediatoren, die die Zellproliferation interzellulär stimulieren. Die Sekretion von Mediatoren wird nachweislich von Lipiden variiert [35]. Auf der anderen Seite entstehen aus Arachidonsäure und Eikosapentaensäure Lipidmediatoren. Leukotrien B<sub>4</sub> wird aus Arachidonsäure via Cyclooxygenase synthetisiert. LTB<sub>5</sub>, ebenfalls Produkt des Cyclooxygenasepfades wird aus Eikosapentaensäure hergestellt. Bekannt ist, daß unter Fischölinfusion die freie Eikosapentaensäure auf mehr als das Doppelte der freien Arachidonsäure ansteigt und somit eine vermehrte Sekretion von LTB<sub>5</sub> durch PMN zu erwarten ist [50,53,80]. Tatsächlich konnte dies in ex vivo-Versuchen an PMN der Fischölgruppe bestätigt werden [51]. Das über zehnfach verminderte chemotaktische und granulozytenaktivierende Potential von LTB<sub>5</sub> im Vergleich zu LTB<sub>4</sub> [43,59,74] erklärt die verminderte PMN-Transplantatinfiltration der Fischölgruppe. Auch die Tatsache, daß in der Fischölgruppe die thrombozytäre Thromboxansekretion vom potenten Vasokonstriktor und Plättchenaggregator Thromboxan A<sub>2</sub> zum inaktiven Thromboxan A<sub>3</sub> verschoben ist, zeigt, daß durch  $\omega$ -3-betonte Lipidemulsionen auch unspezifische Begleitreaktionen der Abstoßung minimiert werden [46].

Während auf Seiten der  $\omega$ -6-betonten Lipidemulsionen die abgeschwächte Transplantatabstoßung alleine durch die reduzierte Aktivierung der spezifischen immunkompetenten Zellen durch eine verminderte Sekretion von Proteinmediatoren erklärt ist, werden im Fall der  $\omega$ -3-betonten Lipidemulsionen durch Variation des Lipidmediatorspektrums zusätzlich das Reaktionsspektrum unspezifischer Entzündungszellen und abstoßungsassoziierter Reaktionen minimiert.

Diese Arbeit unterstützt die Beobachtung, daß Lipidemulsionen in Abhängigkeit ihres Verhältnisses der ungesättigten  $\omega$ -3- bzw.  $\omega$ -6-Fettsäuren unterschiedlich immunmodulierend – von abgestuft immunsuppressiv bis immunneutral – wirken. Es gelang in einem Tiermodell der heterotopen Herztransplantation zwischen histoinkompatiblen Rattenstämmen die Abstoßungszeitvariation, die sich bei Infusion verschiedener Lipidemulsionen einstellte, mit immunhistologischen Parametern zu korrelieren. Als klinische Konsequenz ergibt sich der bedarfsadaptierte Einsatz intravenöser Lipidemulsionen durch gezielte Variation der ungesättigten Fettsäuren. Während  $\omega$ -3-betonte Lipidemulsionen aufgrund ihrer entzündungshemmenden Potenz bei der Behandlung der Psoriasis erste Erfolge erzielten [52], sind für die hochkalorische Ernährung schwerstkranker Patienten, deren Immunsystem bis an die Kompensationsgrenzen belastet ist, Lipidemulsionen mit ausgewogenem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis zu empfehlen.

## 5. Zusammenfassung

Die Beeinflussung des Immunsystems durch exogene Lipide ist seit längerer Zeit Gegenstand vieler Untersuchungen.

Unter anderem hat sich gezeigt, daß intravenös applizierte Triglyzeride mit unausgewogenem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis die Transplantatüberlebenszeit allogenen transplantierten histoinkompatibler Rattenherzen signifikant verlängerte.

In unseren Untersuchungen wurden mittels einer standardisierten Methode die zellulären Infiltrate bestimmter Subtypen mononukleärer Zellen nach immunhistologischer Identifizierung quantifiziert. Hier wurde gezeigt, daß der biologische Parameter – Transplantatüberlebenszeit – eng mit dem Spektrum und der Intensität der zellulären Infiltration der immunhistologisch untersuchten final abgestoßenen Transplantate korrelierte. Eine Tatsache, die sich schon im Verlauf der Abstoßung vier Tage nach der Transplantation abzeichnete. Sowohl die Variation des Verhältnisses von  $\omega$ -3- zu  $\omega$ -6-Fettsäuren, als auch die Bindung der Fettsäuren, ob als Triglyzeryl- oder Äthylester war dabei von wesentlicher Bedeutung.

So fanden sich bei unausgewogenem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis mit Betonung der  $\omega$ -3- oder  $\omega$ -6-Fettsäuren maximale Transplantatüberlebenszeiten bei signifikant reduzierten zellulären Infiltraten für die Triglyzerylester. Äthylester, die, wie in unseren Untersuchungen, mit Betonung der  $\omega$ -3-Fettsäuren verwendet wurden, wiesen diesen Effekt nicht auf. Triglyzerylester als Mischöl angewendet mit nahezu ausgewogenem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von 1/2 zeigten massive Transplantatschäden, so daß sie nach finaler Abstoßung mit der hier angewendeten histologischen Zellquantifizierung nicht mehr ausgewertet werden konnten.

Die in gleicher Weise behandelte Gruppe, deren Transplantate vier Tage nach Transplantation entnommen wurden, zeigte bereits deutlich höhere zelluläre Infiltrate, als die mit Triglyzerylestern behandelten Gruppen mit unausgewogenem Fettsäureverhältnis.

Sojaöl, ein kommerziell erhältliches Lipid (Intralipid®) mit einem  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis von 1/8 zeigte sowohl bei der Überlebenszeit, als auch bei den immunhistologischen Untersuchungen einen deutlich geringeren immunmodulatorischen Effekt.

Die Verschiebung zu den  $\omega$ -6-Fettsäuren mußte somit deutlich höher sein, als zu den  $\omega$ -3-Fettsäuren, um immunsuppressiv zu wirken, denn Distelöl mit einem

Verhältnis von 1/370 erreichte die längste Transplantatüberlebenszeit bei konstantem T4/T8-Verhältnis von größer eins. Fischöl erzielte im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine signifikant niedrigere Anzahl transplantat-infiltrierender Zellen. Auch hier lag das T4/T8-Verhältnis bei größer eins. Fischöl als Äthylester zeigte nach finaler Abstoßung eine hohe zelluläre Infiltration bei einem T4/T8-Verhältnis von unter eins.

Es gelang somit zu zeigen, daß nicht nur der biologische Parameter – Transplantatüberlebenszeit –, sondern auch die parallel dazu veränderte zelluläre Infiltration der Transplantate die abgestuft immunmodulierende Wirkung intravenös applizierter Lipide belegen. Dabei waren sowohl das  $\omega$ -3/ $\omega$ -6-Fettsäureverhältnis, als auch die Veresterungsform ausschlaggebend für den immunsuppressiven Effekt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aaes-Jorgensen E. (1961). Essential fatty acids. *Physiol Rev*, 41: 1-51
2. Abbott C. P., DeWitt C. W., Creech Jr. O. (1965). The transplanted rat heart: Histologic and electrocardiographic changes. *Transplantation*, 3: 432-445
3. Abdel-Latif A. A. (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev*, 38: 227-260
4. Anel A., Naval J., Gonzalez B., Uriel J., Pineiro A. (1990). Fatty acid metabolism in human lymphocytes. II. Activation of fatty acid desaturase-elongase systems during blastic transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1044: 332-339
5. Atluru D., Goodwin J. S. (1984). Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by leukotrienes; leukotriene B<sub>4</sub> induces an OKT8(+), radiosensitive suppressor cell from resting, human OKT8(-) T cells. *J Clin Invest*, 74: 1444-1450
6. Barclay A. N. (1981). The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunol*, 42: 593-600
7. Barclay A. N., Jackson D. I., Willis A. C., Williams A. F. (1987). Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH<sub>2</sub>-terminus. *The Embo Journal*, 6(5): 1259-1264
8. Berken A., Benacerraf B. (1968). Depression of reticuloendothelial system phagocytic function by ingested lipids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 128: 793-795
9. Berridge M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem*, 56: 159-193
10. Bieber C. P., Griep R. B., Oyer P. E., Wong J., Stinson E. B. (1976). Use of rabbit antithymocyte globulin in cardiac transplantation. *Transplantation*, 22: 478-488

11. Billett E. E., Gunn B., Mayer R. J. (1984). Characterization of two monoclonal antibodies obtained after immunization with human liver mitochondrial membrane preparations. *Biochem J*, 221: 765-776
12. Billiar T. R., Bankey P. E., Svingen B. A., Curran R. D., West M. A., Holman R. T., Simmons R. L., Cerra F. B. (1988). Fatty acid intake and Kupffer cell function: Fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery*, 104(2): 343-349
13. Billingham M. E. (1979). Some recent advances in cardiac pathology. *Hum Pathol*, 10: 367-386
14. Bloj B., Morero R. D., Farias R. N., Trucco R. E. (1973). Membrane lipid fatty acids and regulation of membrane-bound enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 311: 67-79
15. Borel J. F., Feurer C., Gubler H. U., Stähelin H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 6: 468-475
16. Boudreau M. D., Chanmugam P. S., Hart S. B., Lee S. H., Hwang D. H. (1991). Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. *Am J Clin Nutr*, 54: 111-117
17. Bradley J. A., Mason D. W., Morris P. J. (1985). Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T-cells and not by nonspecific effectors. *Transplantation*, 39: 169-175
18. Brideau R. J., Carter P. B., McMaster W. R., Mason D. W., Williams A. F. (1980). Two subsets of rat T-lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*, 10: 609-615
19. Brown W. R. A., Barclay A. N., Sunderland C. A., Williams A. F. (1981). Identification of a glycoprotein-like molecule at the cell surface of rat thymocytes. *Nature*, 289: 456-460
20. Calder P. C., Bevan S. J., Newsholme E. A. (1992). The inhibition of the T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunol*, 75: 108-115
21. Calder P. C., Bond J. A., Harvey D. J., Gordon S., Newsholme E. A. (1990). Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J*, 269: 807-814

22. Cantrell D. A., Robins R. A., Baldwin R. W. (1982). Rat lymphocyte subsets: Cellular requirements for the generation of T-cell growth factor. *Cell Immunol*, 70: 367-372
23. Cantrell D. A., Robins R. A., Brooks C. G., Baldwin R. W. (1982). Phenotype of rat natural killer cells defined by monoclonal antibodies marking rat lymphocyte subsets. *Immunol*, 45: 97-103
24. Carrel A., Guthrie C. C. (1905). The transplantation of veins and organs. *Am Med*, 10: 1101-1102
25. Caves P. K., Stinson E. B., Billingham M. E., Shumway N. E. (1973). Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy in human heart recipients (Experience with a new technique). *Ann Thorc Surg*, 16: 325-336
26. Chouaib S., Chatenoud L., Klatzmann D., Fradelizi D. (1984). The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE2 induction of suppressor T lymphocytes. *J Immunol*, 132(4): 1851-1857
27. Christmas S. E., MacPherson G. G. (1982). The role of mononuclear phagocytes in cardiac allograft rejection in the rat. I. Ultrastructural and cytochemical features. *Cell Immunol*, 69: 248-270
28. Clark S. J., Jefferies W. A., Barclay A. N., Gagnon J., Williams A. F. (1987). Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidences for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 1649-1653
29. Cramer D. V., Wu G.-D., Chapman F. A., Cajulis E., Wang H.-K., Makowka L. (1992). Lymphocytic subsets and histopathologic changes associated with the development of heart transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung*, 11(3): 458-466
30. Dallman M. J., Mason D. W., Webb M. (1982). The role of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cell-deprived rats injected with syngeneic T cells. *Eur J Immunol* 12: 511-518
31. Dallman M. J., Thomas M. L., Green J. R. (1984). MRC Ox-19: a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur J Immunol* 14: 260-267

32. Davis P., Bailey P. J., Goldenberg M. M., Ford-Hutchinson A. W. (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Ann Rev Immunol*, 2: 335-357
33. Demichov V. P. (1962). Experimental transplantation of vital organs. Consultants Bureau New York.
34. Dyer M. J. S., Hunt S. V. (1981). Committed T lymphocyte stem cells of rats. *J Exp Med*, 154: 1164-1177
35. Endres S., Ghorbani R., Kelley V. E., Georgilis K., Lonnemann G., van der Meer J. W. M., Cannon J. G., Rogers T. S., Klempner M. S., Weber P. C., Schaefer E. J., Wolff S. M., Dinarello C. A. (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, 320: 265-271
36. Finean J. B., Michell R. H. (1981). Membrane structure. Elsevier Biomedical Press, New York
37. Fischer S. (1989). Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. *Adv Lipid Res*, 23: 169-198
38. Fischer S., Weber P. C. (1984). Prostaglandin I<sub>3</sub> is formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature*, 307: 165-168
39. Foegh M. L. (1988). Eicosanoids and platelet activating factor mechanisms in organ rejection. *Transplant Proc*, 20: 1260-1263
40. Forbes R. D. C., Guttmann R. D., Gomersall M., Hibberd J. (1983). Leukocyte subsets in first-set rat cardiac allograft rejection. A serial immunohistologic study using monoclonal antibodies. *Transplantation*, 36: 681-686
41. Forbes R. D. C., Guttmann R. D., Gomersall M., Hibberd J. (1983). A controlled serial ultrastructural tracer study of first-set cardiac allograft rejection in the rat. *Am J Pathol*, 111: 184-196
42. Gell P. G. H., Coombs R. R. A., Lachmann P. J. (1963). Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
43. Goldmann D. W., Pickett W. C., Goetzl E. J. (1983). Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 117: 282-288

44. Goodwin J. S., Bankhurst A. D. & Messner R. P. (1977). Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. *J Exp Med*, 146: 1719-1734
45. Gorer P. A. (1937). The genetic and antigenetic basis of tumor transplantation. *J Pathol*, 44: 691-697
46. Grimm H., Schott J., Hörbelt R., Schück R., Schwemmle K. (1999). Fette und Immunsystem. *Akt Ernähr-Med*, 24: 230-237
47. Grimm H., Tibell A., Norrlind B., Blecher C., Wilker S., Schwemmle K. (1994). Immunoregulation by parenteral lipids: Impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *J Parent Ent Nutr*, 18: 417-421
48. Grimm H., Tibell A., Norrlind B., Fuhrmann J., Schott J., Langer C., Bohle R. M. (1996). Immunosuppression by n-3 fatty acids. Comparison of glycerol vs. ethyl esters. *Nutr Res*, 16: 999-1008
49. Grimm H., Tibell A., Norrlind B., Larsson-Backström C., Wretling A., Groth C. G. (1994). Lipid mediated modification of rat heart allograft survival. *Transpl Int*, 7: 247-252
50. Grimminger F., Dürr U., Seeger W. (1992). Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: Critical dependence on exogenous free fatty acid supply. *Mol Pharmacol*, 41: 757-766
51. Grimminger F., Grimm H., Führer D., Papavassilis C., Lindemann G., Blecher C., Mayer K., Tabesch F., Krämer H. J., Stevens J., Seeger W. (1996).  $\omega$ -3 Lipid infusion in a heart allotransplant model. Shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival. *Circulation*: 365-371
52. Grimminger F., Mayser P., Papavassilis C., Thomas M., Schlotzer E. (1993). A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 fatty acid based lipid infusion in acute, extended guttate psoriasis. *Clin Investig*, 71: 634-643
53. Grimminger F., Scholz C., Bhakdi S., Seeger W. (1991). Subhemolytic dose of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipooxygenase products in human neutrophils. *J Biol Chem*, 266: 14262-14269
54. Hale A. H. (1980). Elicitations of primary cytotoxic T-lymphocytes in nude mice. *Cell Immunol*, 55: 236-239

55. Hall B. M., de Saxe I., Dorsch S. E. (1983). The cellular basis of allograft rejection in vivo. *Transplantation*, 36: 700-705
56. Hancock W. W., DiStefano R., Braun P., Schweizer R. T., Tilney N. L., Kupiec-Weglinski J. W. (1990). Cyclosporine and anti-IL-2 receptor monoclonal antibody therapy suppress accelerated rejection of rat cardiac allografts through different effector mechanisms. *Transplantation*, 49: 416-421
57. Hayashi T., Nozawa M., Otsu I., Deguchi H., Kitaura Y., Kawamura K. (1991). Cell-mediated cytotoxicity in acute rat cardiac allograft rejection: an immunological and ultrastructural study. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 418: 41-50
58. Häyry P. (1984). Intragraft events in allograft destruction. *Transplantation*, 38: 1-6
59. Heidel J. R., Taylor S. M., Laegreid W. W., Silflow R. M., Liggitt H. D., Wes Leid R. (1989). In vivo chemotaxis of bovine neutrophils induced by 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic and eicosapentaenoic acid. *Am J Pathol*, 134: 671-676
60. Heron I. (1971). A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Pathol Microbiol Scand, A*, 79: 366-372
61. Heron I. (1972). The iso- and allotransplanted rat heart. *Acta Pathol Microbiol Scand, A*, 80: 9-16
62. Jamieson S. W., Oyer P. E., Reitz B. A., Baumgartner W. A., Bieber C. P., Stinson E. B., Shumway N. E. (1982). Cardiac transplantation at Stanford. *J Heart Transpl*, 1: 86-91
63. Jamieson S. W., Reitz B. A., Oyer P. E., Bieber C. P., Stinson E. B., Shumway N. E. (1979). Current management of cardiac transplant recipients. *Br Heart J*, 42: 703-708
64. Johnson P., Gagnon J., Barclay A. N., Williams A. F. (1985). Purification, chain separation and sequence of the MRC OX-8 antigen, a marker of rat cytotoxic T lymphocytes. *The Embo Journal*, 4: 2539-2545
65. Johnston P. V. (1988). Lipid modulation of immune responses. In: Chandra R., *Nutrition and Immunology*. Alan Liss, New York: 37-86

66. Katz S. M., Cramer D. V., Kunz H. W., Gill III T. J. (1983). Effect of major histocompatibility complex genetic disparities on cardiac and skin graft rejection in the rat. *Transplantation*, 36: 463-464
67. Katz S. M., Liebert M., Gill III T. J., Kunz H. W., Cramer D. V., Guttman R. D. (1983). The relative roles of MHC and non-MHC genes in heart and skin allograft survival. *Transplantation*, 36: 96-101
68. Kinsella J. E., Broughton K. S., Whelan J. W. (1990). Dietary unsaturated fatty acids: Interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *J Nutr Biochem*, 1: 123-141
69. Kinsella J. E., Lokesh B. (1990). Dietary lipids, eicosanoids, and immune system. *Crit Care Med*, 18: S94-S113
70. Kinsella J. E. (1990). Lipids, membrane receptors, and enzymes: Effects of dietary fatty acids. *J Parent Ent Nutr*, 14: 200S-217S
71. Knudsen P. J., Dinarello C. A., Strom T. B. (1986). Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol*, 137: 3189-3194
72. Kriby J. A., Reader J. A., Parfett G. J., Pepper J. R. (1988). Rat heterotopic heart transplantation: Quantification and analysis of cell mediated cytotoxicity. *Clin Exp Immunol*, 71: 113-119
73. Kupiec-Weglinski J. W., Araujo J. L., Towpik E., Araneda D., Tilney N. L. (1985). Host-graft relationship: The systemic nature of allograft rejection. *Surgery*, 98: 259-265
74. Lee T. H., Mencia-Huerta J.-M., Shih C., Corey E., Lewis R. A., Austen K. F. (1984). Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B<sub>5</sub> and the double lipoxygenase product. *J Biol Chem*, 259: 2383-2389
75. Lindholm M., Eklund J. O., Hamberger B., Järnberg P.-O. (1984). Plasma catecholamine and free fatty acid levels during infusion of lipid emulsion in critically ill patients. *Crit Care Med*, 12: 953-956

76. Lower R. R., Shumway N. E. (1960). Studies on orthotopic transplantation of the canine heart. *Surg Forum*, 11: 18-19
77. Lower R. R., Stofer R. C., Hurley E. J., Dong E. Jr., Cohn R. B., Shumway N. E. (1962). Successful homotransplantation of the canine heart after anoxic preservation for seven hours. *Am J Surg*, 104: 302-306
78. Lyscom N., Brueton M. J. (1982). Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin makers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunol*, 45: 775-783
79. MacSween R. N. M., Ono K., Thomason C. M. (1971). Immunological and histological studies of ectopic heart transplants in the rat. *J Pathol*, 105: 49-56
80. Mahadevappa V. G., Powell W. S. (1989). The metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in human neutrophils stimulated by A23187 and FMLP. *J Cell Biochem*, 40: 341-352
81. Majerus P. W., Connolly T. M., Deckmyn H., Ross T. S., Bross T. E., Ishii H., Bansal V. S., Wilson D. W. (1986). The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*, 234: 1519-1526
82. Mann F. C., Priestley J. T., Markowitz J., Yater W. M. (1933). Transplantation of the intact mammalian heart. *Arch Surg*, 26: 219-224
83. Marshall L. A., Johnston P. V. (1983). The effect of dietary  $\alpha$ -linolenic acid in the rat on fatty acid profiles of immunocompetent cell population. *Lipids*, 18: 737-742
84. Mascioli E. A., Lopez S., Randal S., Porter K. A., Kater G., Hirschberg Y., Babayan V. K., Bistrrian B. R., Blackburn G. L. (1989). Serum fatty acid profiles after intravenous medium chain triglyceride administration. *Lipids*, 24: 793-798
85. Mason D. W., Dallman M. J., Arthur R. P., Morris P. J. (1984). Mechanisms of allograft rejection: The roles of cytotoxic T-cells and delayed-type hypersensitivity. *Immunol Rev*, 77: 167-184
86. Mason D. W., Pugh C. W., Webb M. (1981). The rat mixed lymphocyte reaction: roles of a dendritic cell in intestinal lymph and T-cell subsets defined by monoclonal antibodies. *Immunol* 44: 75-87

87. McMurchie E. J., Raison J. K. (1979). Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 554: 364-374
88. Meade C. J., Mertin J. (1976). The mechanism of immunoinhibition by arachidonic and linoleic acid: effects on the lymphoid and reticulo-endothelial systems. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 51: 2-24
89. Mertin J. (1976). Effect of polyunsaturated fatty acids on skin allograft survival and primary and secondary cytotoxic response in mice. *Transplantation*, 21: 1-4
90. Mertin J. (1977). Der Einfluß essentieller Fettsäuren auf die zelluläre Immunantwort. *Med Klin*, 72: 677-683
91. Mertin J., Hughes D., Shenton B. K., Dickinson J. P. (1974). In-vitro inhibition by unsaturated fatty acids of the PPD- and PHA-induced lymphocyte response. *Klin Wschr*, 52: 248-250
92. Mertin J., Shenton B. K., Field E. J. (1973). Unsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Brit Med J*: 777-778
93. Miller R. G., Jr.. *Simultaneous Statistical Inference*. Springer NJ, Heidelberg, Berlin, 2. Auflage: 6ff
94. Needleman P., Raz A., Minkes M. S., Ferrendelli J. A., Sprecher H. (1979). Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 944-948
95. Needleman P., Turk J., Jaschick B. A., Morrison A. R., Lefkowitz J. B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem*, 55: 69-102
96. Otto D. A., Kahn D. R., Hamm M. W., Forrest D. E., Wooten J. T. (1990). Improved survival of heterotopic cardiac allografts in rats with dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Transplantation*, 50: 193-198
97. Oyer P. E., Stinson E. B., Jamieson S. W., Hunt S. A., Perloff M., Billingham M., Shumway N. E. (1983). Cyclosporine in cardiac transplantation: A 2½ year follow-up. *Transplant Proc* 15: 2546-2552
98. Parthenais E., Soots A., Häyry P. (1979). Sensitivity of rat heart endothelial and myocardial cells to alloimmune lymphocytes and to alloantibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cell Immunol*, 48: 375-382

99. Peterson J., Bihain B. E., Bengtsson-Olivecrona G., Deckelbaum R. J., Carpentier Y. A., Olivecrona T. (1990). Fatty acid control of lipoprotein lipase: A link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 909-913
100. Plamblad J., Malmsten C. L., Uden A.-M., Radmark O., Engstedt L., Samuelsson B. (1981). Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*, 58: 658-661
101. Platt J. L., LeBien T. W., Michael A. F. (1982). Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies. *J Exp Med*, 155: 17-30
102. Pruscha H. *Angewandte Methoden der Mathematischen Statistik*. In: Teubner Skripten zur Mathematischen Stochastik, B.G. Teubner Stuttgart: 120
103. Ring J., Seifert J., Mertin J., Brendel W. (1974). Prolongation of skin allografts in rats by treatment with linoleic acid. *Lancet*, 30: 1331
104. Robblee N. M., Clandinin M. T. (1984). Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. *J Nutr*, 114: 263-269
105. Roitt I. M. (1991). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 7<sup>th</sup> Edition.
106. Rola-Pleszczynski M., Borgeat P., Sirois P. (1982). Leukotriene B<sub>4</sub> induces human suppressor lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 108: 1531-1537
107. Roos K. A., Meurling S., Sandberg G. (1981). Growth and nitrogen utilisation in rats on continuous and intermittent parenteral nutrition with and without fat (Intralipid 20%). *Acta Chir Scand* 147: 459-464
108. Sandborg R. R., Smolen J. E. (1988). Biology of disease. Early biochemical events in leucocyte activation. *Lab Invest*, 59: 300-320
109. Schuurman H.-J., Jambroes G., Borleffs J. C. C., Slootweg P. J., Meyling F. H. J. G., de Gast G. C. (1989). Acute humoral rejection in a rat heart transplant recipient. *Transplant Proc*, 21: 2529-2530

110. Shaw J. F. L. (1983). Comparison of the effects of acetylsalicylic acid and sodium salicylate on prolongation of rat cardiac allograft survival and on inhibition of rat platelet aggregation. *Transplantation*, 36: 33-36
111. Shaw J. F. L. (1983). Prolongation of rat cardiac allograft survival by treatment with prostacyclin or aspirin during acute rejection. *Transplantation*, 35: 526-529
112. Shaw J. F. L., Grotz R. A. (1985). Drugs affecting the prostaglandin synthetic pathway and rat heart allograft survival. *Advances in Prostaglandin, Thromboxan and Leukotriene Research*, 13: 219-220
113. Simopoulos A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, 54: 438-463
114. Sinclair R. A., Andres G. A., Hsu K. C. (1972). Immunofluorescent studies of the arterial lesions in rat cardiac allografts. *Arch Pathol*, 94: 331-339
115. Singer S. J., Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731
116. Spector A. A., Yorek M. A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *Lipid Res*, 26: 1015-1035
117. Steinmuller D. (1985). Which T cells mediate allograft rejection? *Transplantation*, 40: 229-233
118. Stepkowski S. M., Duncan W. R. (1986). The role of T<sub>DTH</sub> and T<sub>C</sub> populations in organ graft rejection. *Transplantation*, 42: 406-412
119. Stone C. D., Rosengard B. R., Boorstein S. M., Robbins R. C., Hennein H. A., Clark R. E. (1990). Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits in vitro and in vivo lymphocyte responses in allogeneic transplantation. *Ann Thorac Surg*, 49: 927-931
120. Stuart A. E., Biozzi G., Stiffel C., Halpern B. N., Mouton D. (1960). The stimulation and depression of reticulo-endothelial phagocytic function by simple lipids. *Brit J Exp Pathol*, 41: 599-604
121. Sunderland C. A., McMaster W. R., Williams A. F. (1979). Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes. *Eur J Immunol*, 9: 155-159

122. Ten Hoor F., De Deckere E. A. M. (1981). Essential fatty acids, prostaglandins and heart function. *Progr Lipid Res*, 20: 423
123. Tilney N. L., Strom T. B., Macpherson S. G. (1975). Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation*, 20: 323-330
124. Tilney N. L., Strom T. B., Macpherson S. G., Carpenter C. B. (1974). Populations of infiltrating cells removed from rejecting rat cardiac allografts. *Surg Forum*, 25: 289-292
125. Tötterman T. H., Hanas E., Bergström R., Larsson E., Tufveson G. (1989). Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. *Transplantation*, 47: 817-823
126. Tsang W. M., Belin J., Smith A. D. (1980). Levels of polyunsaturated fatty acids in lymphocytes of rats fed on diets varying in polyunsaturated fatty acid content. *Br J Nutr*, 43: 367-373
127. Tuschka P. J. (1979). Cyclosporin A – A new outlook for immunosuppression in clinical transplantation. *Blut*, 39: 81-87
128. Urakaze M., Hamazaki T., Soda Y., Miyamoto A., Ibuki F., Yano S., Kumagai A. (1986). Infusion of emulsified triecosapentaenoyl-glycerol into rabbits – The effects on platelet aggregation, polymorphonuclear leukocyte adhaesion, and fatty acid composition in plasma and platelet phospholipids. *Thrombos Res*, 44: 673-682
129. Van der Waerden B. L.. *Mathematische Statistik*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage
130. Weber P. C., Fischer S., v. Schacky C., Lorenz R., Strasser T. (1986). The conversion of dietary eicosapentaenoic acid to prostanoids and leucotrienes in man. *Prog Lipid Res*, 25: 273-276
131. Weyman C., Belin J., Smith A. D., Thompson R. H. S. (1975). Linoleic acid as an immunosuppressive agent. *Lancet*, 5: 33
132. Williams A. F., Galfre G., Milstein C. (1977). Analysis of cell surfaces by xenogenic myelomahybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12: 663-673

133. Wolf M., Droege W. (1982). Inhibition of cytotoxic responses by prostaglandin E2 in the presence of interleukin 2. *Cell Immunol*, 72: 286-293
134. Woollett G. R., Barclay A. N., Puklavec M., Williams A. F. (1985). Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 15: 168-173
135. Yamazaki K., Hamazaki T. (1992). Changes in fatty acid composition in rat blood and organs after infusion of eicosapentaenoic acid ethyl ester. *Biochim Biophys Acta*, 1128: 35-43
136. Yamazaki K., Hamazaki T., Yano S., Funada T., Ibuki F. (1991). Changes in fatty acid composition in rat blood and organs after infusion of docosahexaenoic acid ethyl esters. *Am J Clin Nutr*, 53: 620-627

## 7. Anhang

### 7.1 Statistik

#### 7.1.1 Testergebnisse der Auswertung der vollständig abgestoßenen Organe

**Tabelle 7: Antikörper W3/13**

Gruppe	6	5	1	4	2	3
6					0,0014	0,0014
5					0,0014	0,0014
1					0,0014	0,0014
4					0,0056	0,0014
2						0,0014
3						

**Tabelle 8: Antikörper W3/25**

Gruppe	6	4	1	2	5	3
6				0,0168	0,0014	0,0014
4					0,0014	0,0014
1					0,0028	0,0014
2					0,0028	0,0014
5						0,0014
3						

**Tabelle 9: Antikörper Ox 19**

Gruppe	1	6	5	2	4	3
1		0,0308	0,0308	0,0014	0,0014	0,0014
6						0,0014
5						0,0014
2						0,0014
4						0,0014
3						

**Tabelle 10: Antikörper Ox 8**

Gruppe	1	4	5	6	2	3
1		0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
4					0,0014	0,0014
5					0,0056	0,0014
6						0,0014
2						0,0014
3						

**Tabelle 11: Antikörper Ox 1**

Gruppe	1	4	5	6	2	3
1			0,0028	0,0014	0,0014	0,0014
4					0,0014	0,0014
5						0,0014
6						0,0014
2						0,0014
3						

**Tabelle 12: Antikörper Ox 33**

Gruppe	1	5	2	6	4	3
1			0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
5						0,0014
2						0,0014
6						0,0014
4						0,0014
3						

### 7.1.2 Testergebnisse der Auswertung der nach vier Tagen entnommenen Organe

**Tabelle 13: Antikörper W3/13**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011
2			n.s.	n.s.	n.s.	0,0011	0,0011
3				n.s.	n.s.	0,0011	0,0011
4					n.s.	0,0011	0,0011
5						0,0011	0,0011
6							n.s.
7							

**Tabelle 14: Antikörper W3/25**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		n.s.	n.s.	0,0011	n.s.	n.s.	0,0011
2			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0011
3				n.s.	n.s.	n.s.	0,0011
4					n.s.	n.s.	0,0011
5						n.s.	0,0011
6							0,0011
7							

**Tabelle 15: Antikörper Ox 19**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011
2			n.s	0,0022	n.s	0,0011	n.s.
3				0,0011	n.s	0,0011	n.s.
4					n.s	0,0066	0,0044
5						0,0011	n.s.
6							0,0011
7							

**Tabelle 16: Antikörper Ox 8**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		n.s.	n.s.	0,0011	0,0022	0,0011	0,0011
2			n.s.	0,0011	n.s.	n.s.	0,0484
3				0,0011	0,0011	0,0011	0,0011
4					0,0066	n.s.	n.s.
5						n.s.	n.s.
6							n.s.
7							

**Tabelle 17: Antikörper Ox 1**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		0,0011	n.s.	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011
2			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0011
3				0,0066	0,0044	0,0022	0,0011
4					n.s.	n.s.	0,0011
5						n.s.	0,0011
6							0,0011
7							

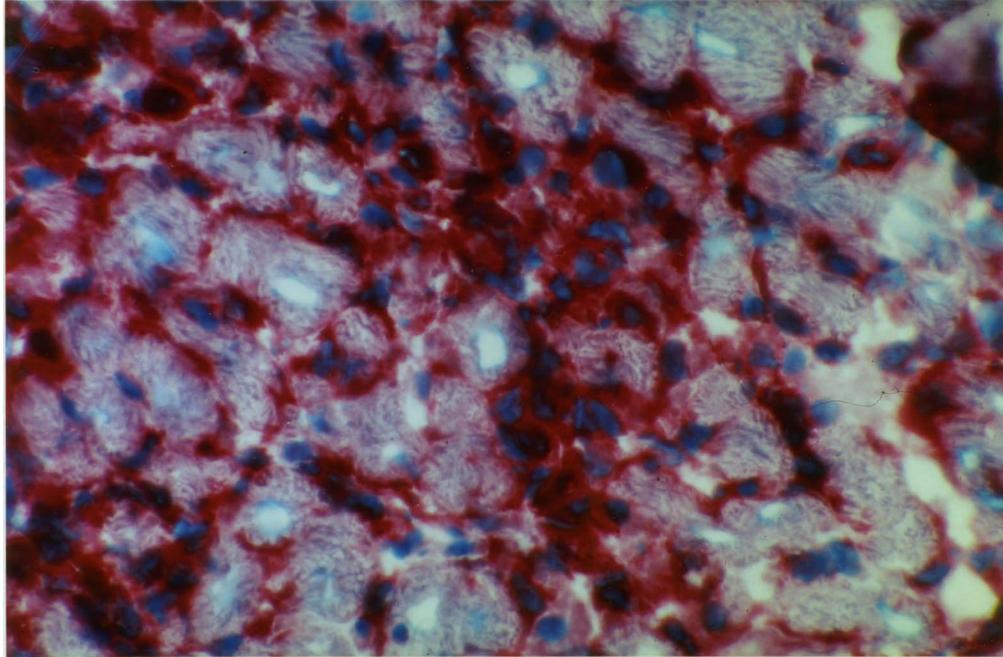
**Tabelle 18: Antikörper Ox 33**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
1		0,0011	0,0066	n.s.	n.s.	0,0011	0,0011
2			0,0011	0,0011	0,0011	0,038	0,0011
3				n.s.	n.s.	n.s.	0,0011
4					n.s.	0,0011	0,0011
5						n.s.	0,0011
6							0,0011
7							

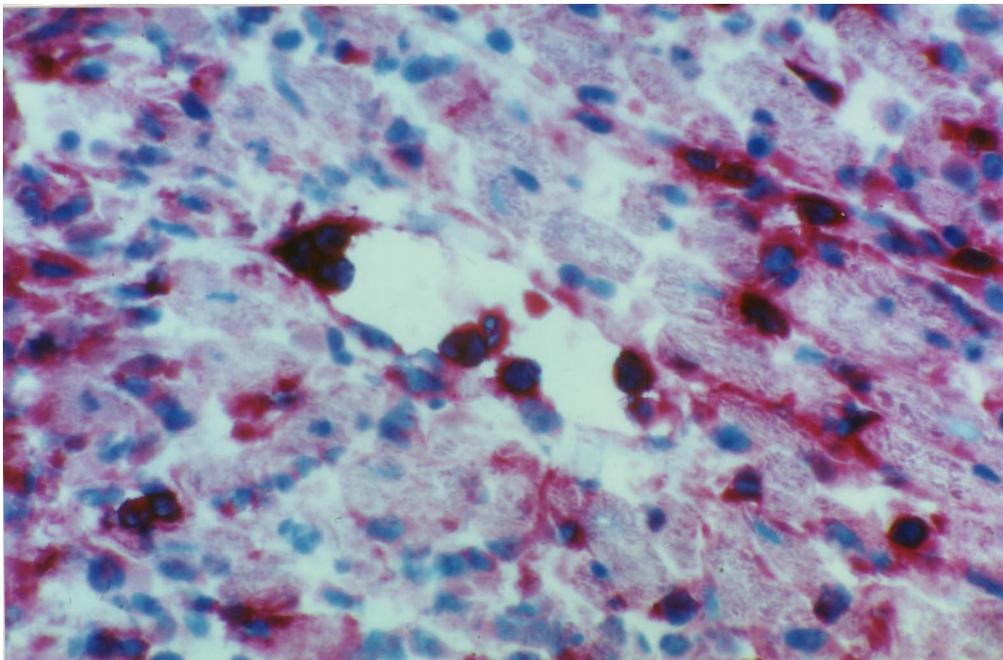
Falls ein signifikanter Unterschied zum Niveau alpha zwischen zwei Gruppen besteht, ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p an der entsprechenden Stelle eingetragen.

## 7.2 Abbildungen

### 7.2.1 W3/13

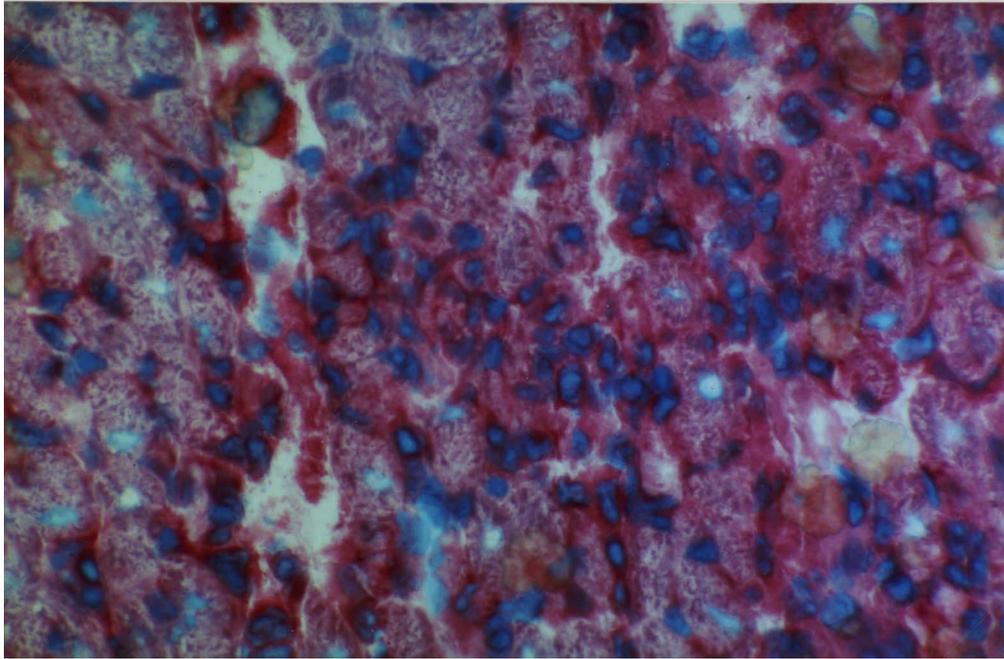


**Abb. 4:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

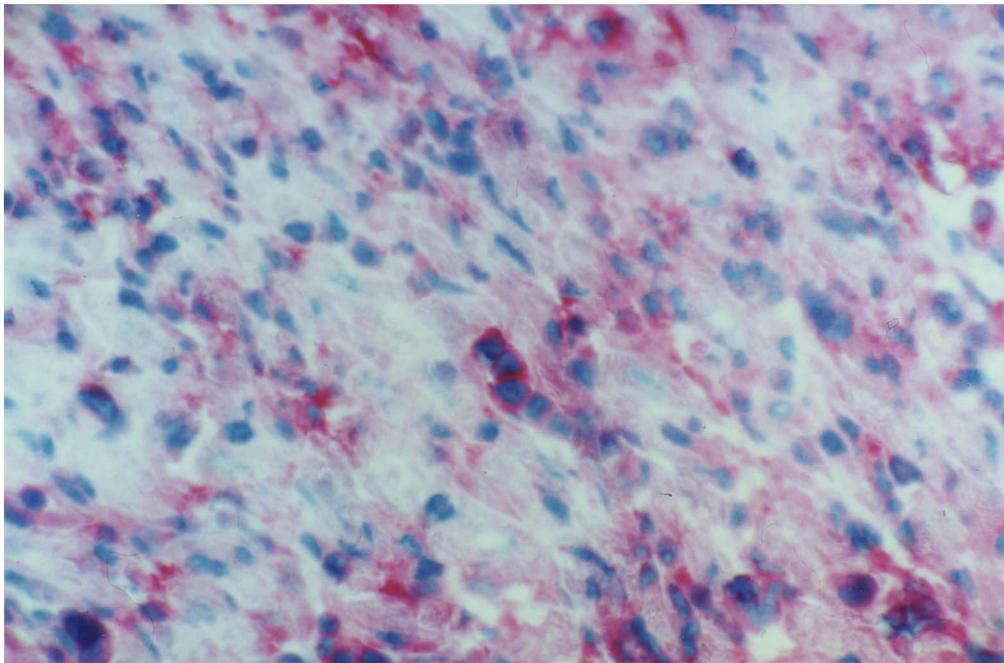


**Abb. 5:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

### 7.2.2 W3/25

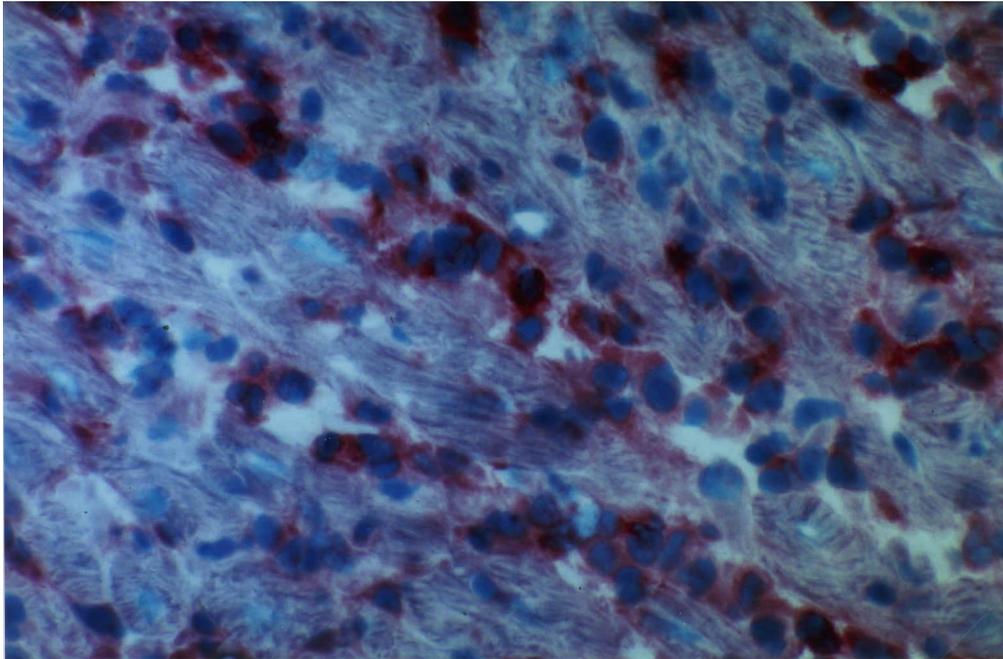


**Abb. 6:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

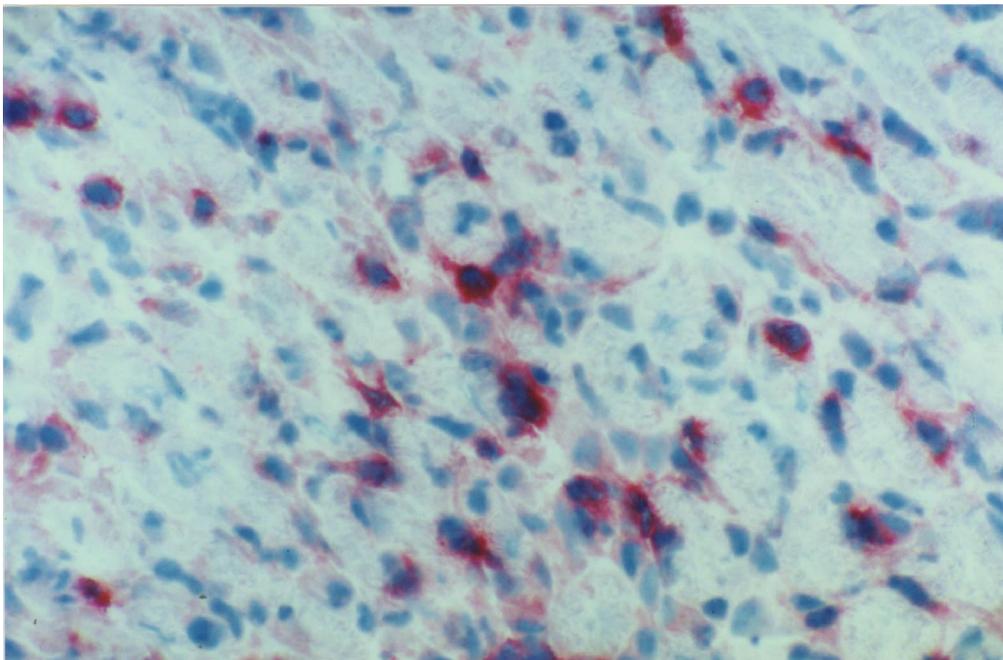


**Abb. 7:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

### 7.2.3 Ox 19

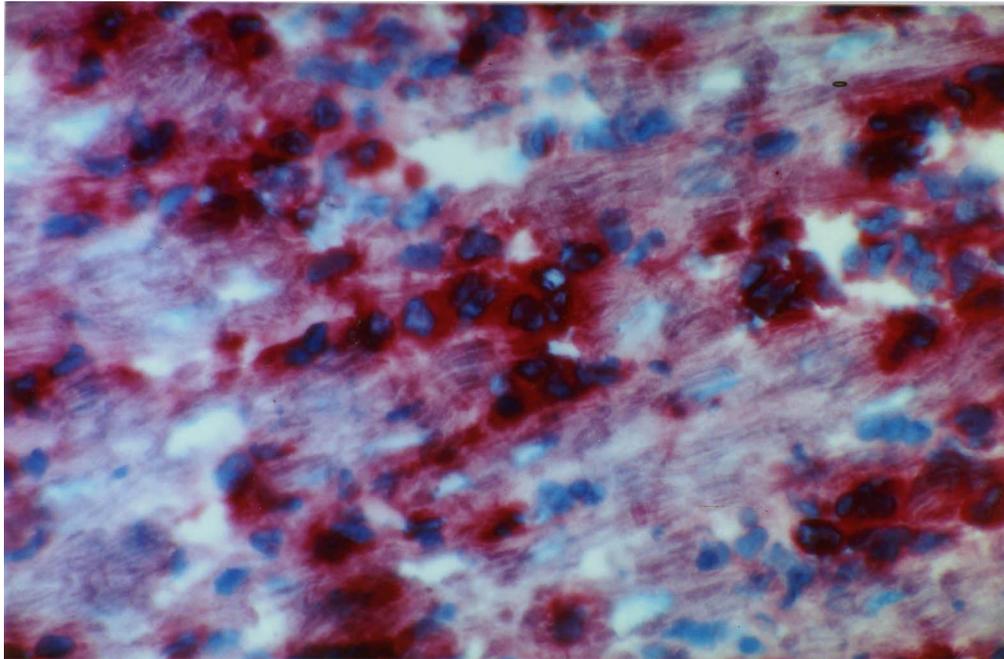


**Abb. 8:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

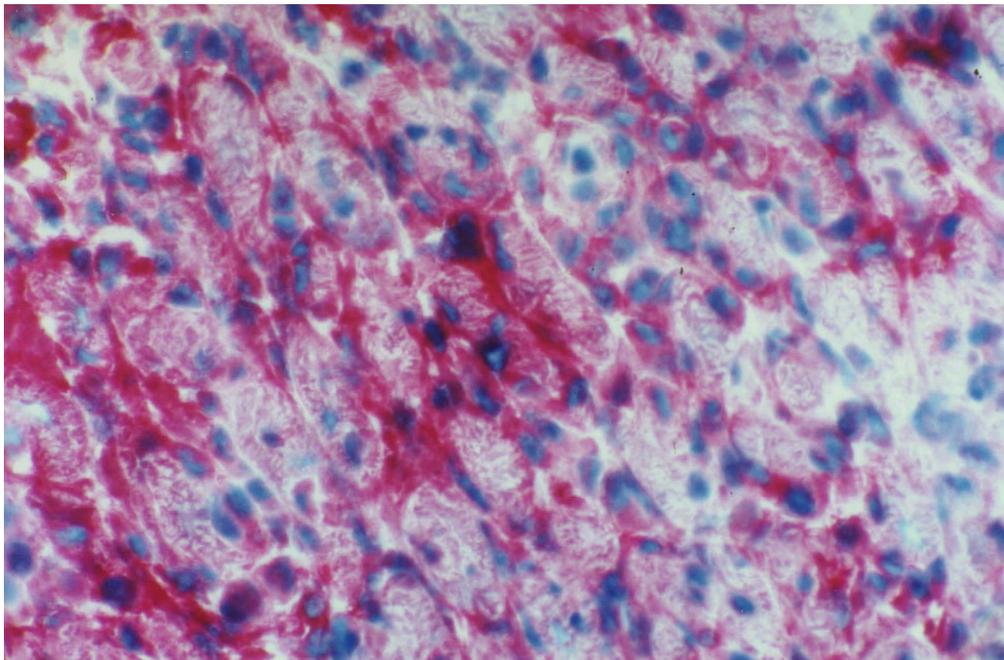


**Abb. 9:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

### 7.2.4 Ox 8

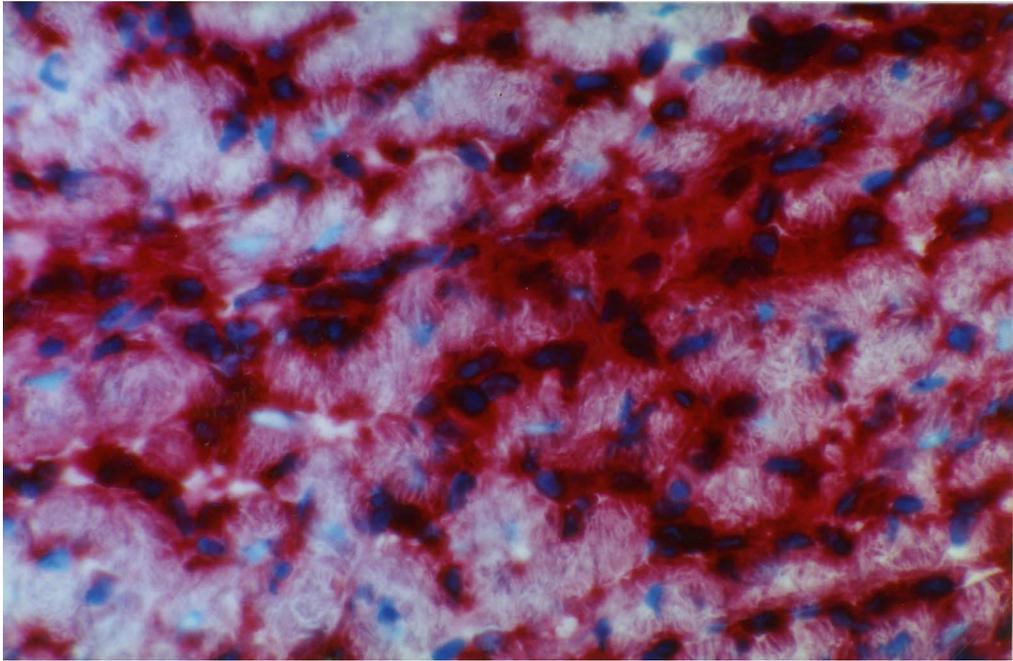


**Abb. 10:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

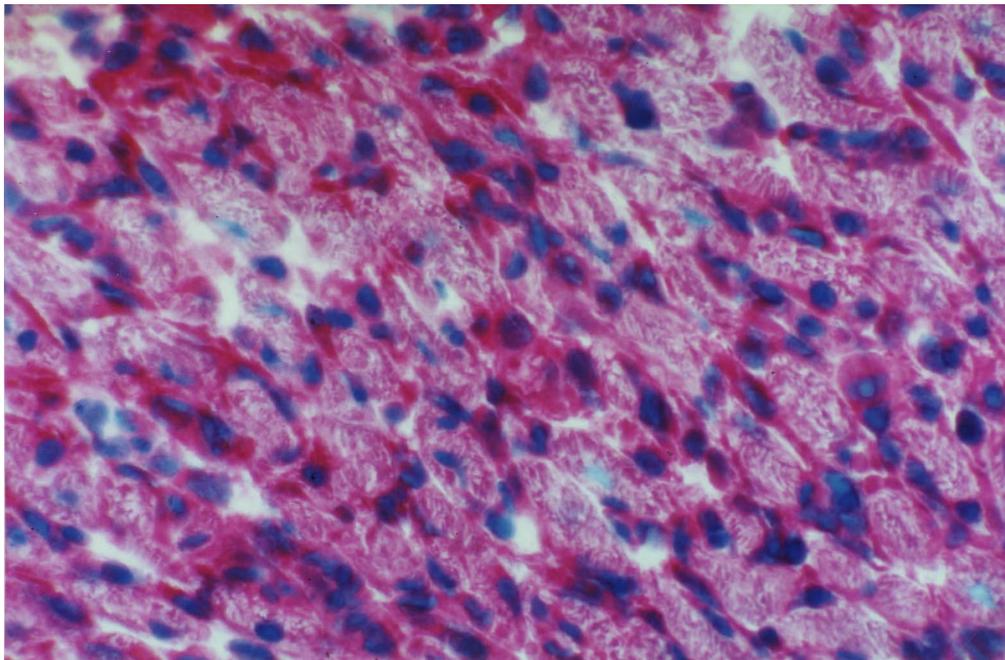


**Abb. 11:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

### 7.2.5 Ox-1

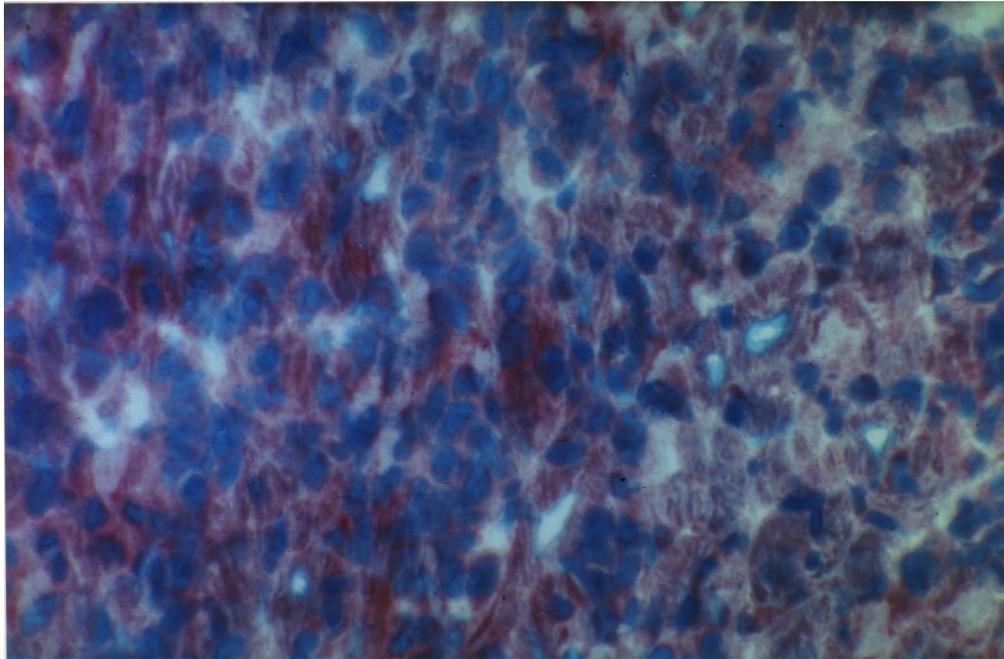


**Abb. 12:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

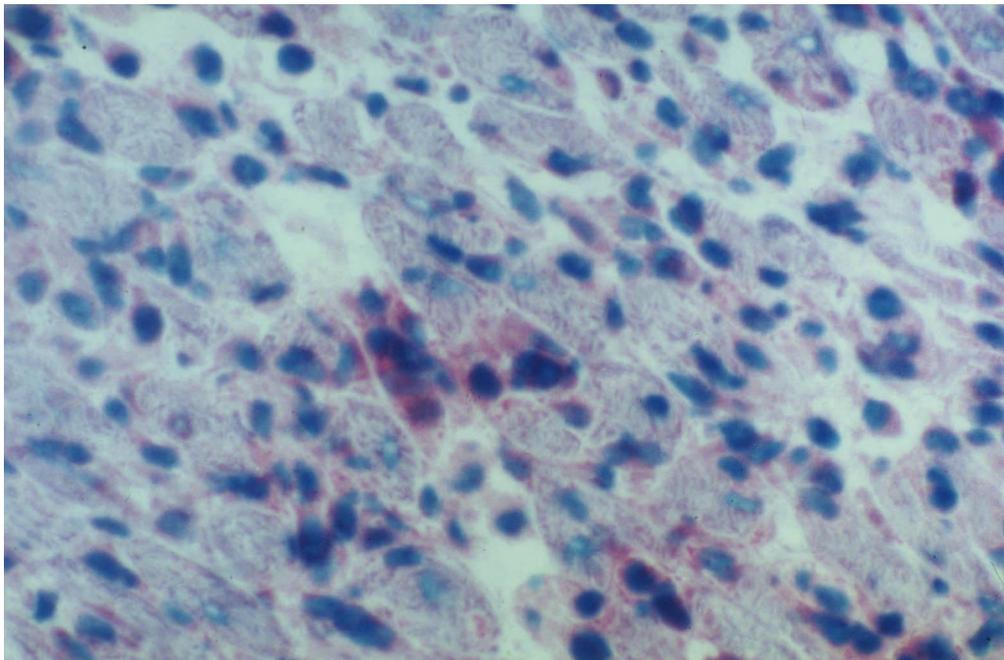


**Abb. 13:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

### 7.2.6 Ox 33

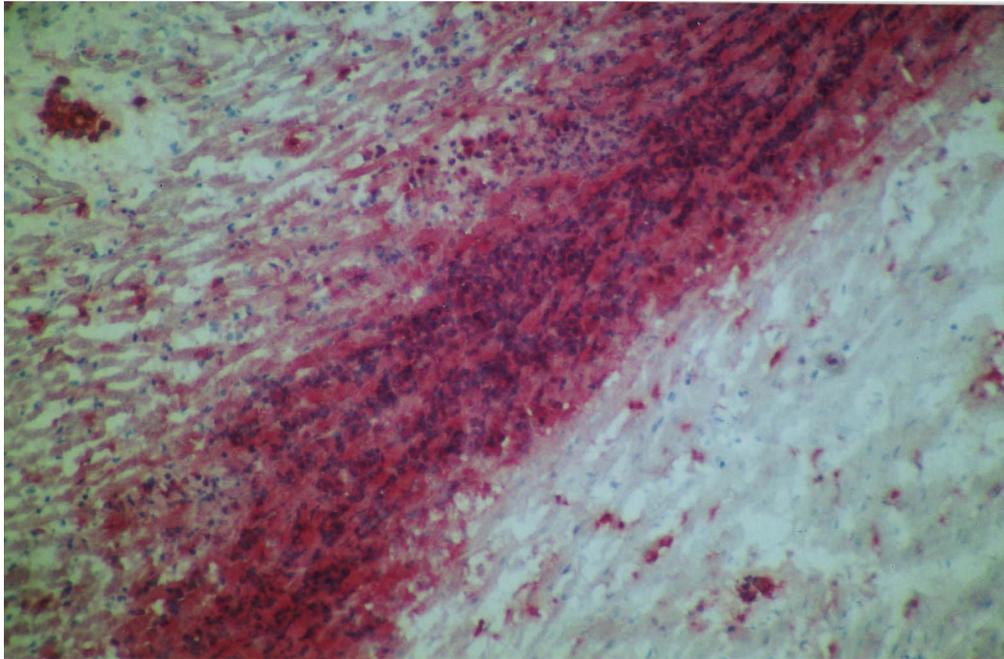


**Abb. 14:** Kochsalzkontrolle nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

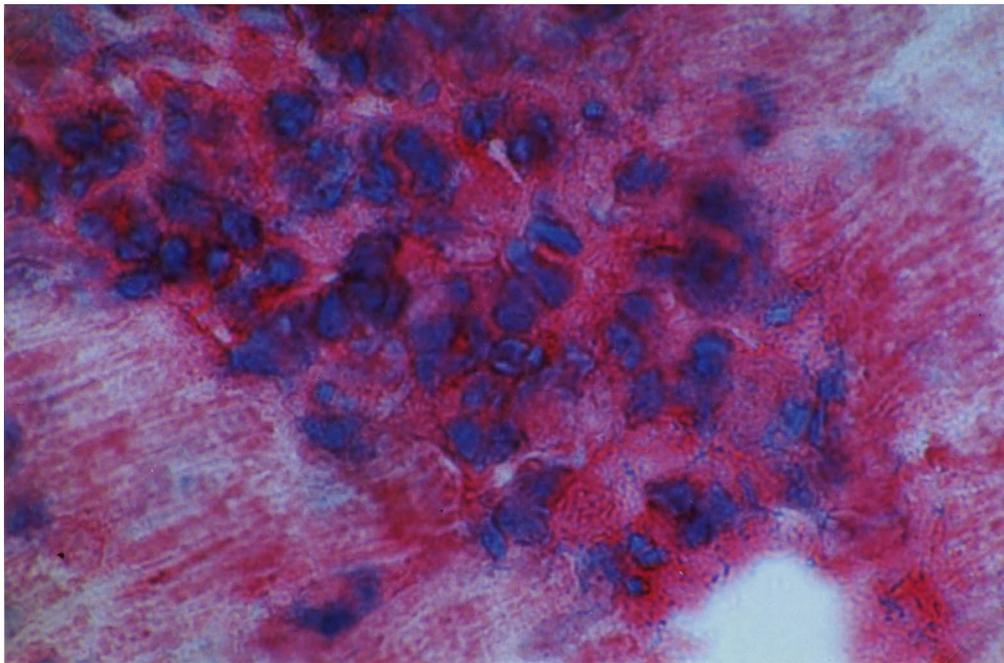


**Abb. 15:** Fischöl nach Abstoßung, (Originalvergrößerung 400x)

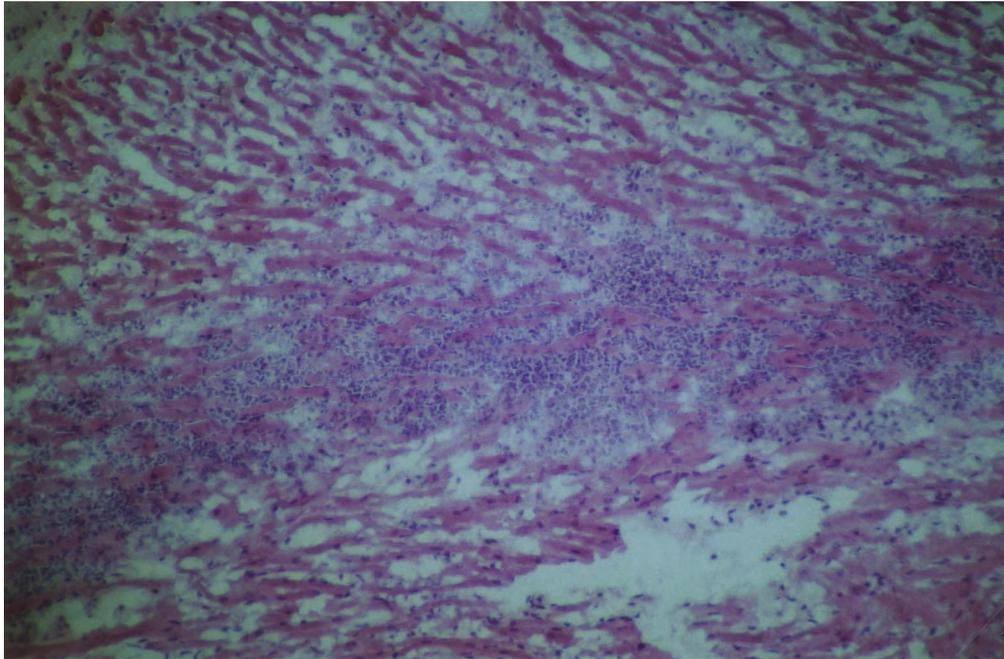
### 7.2.7 Mischöl nach erfolgter Abstoßung



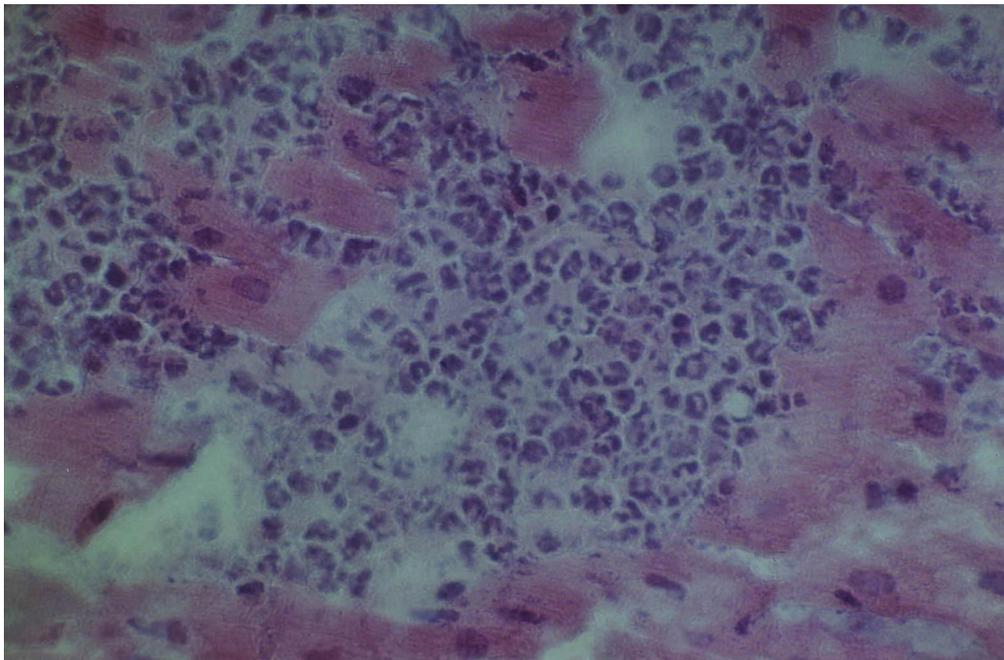
**Abb. 16:** W3/13, (Originalvergrößerung 100x)



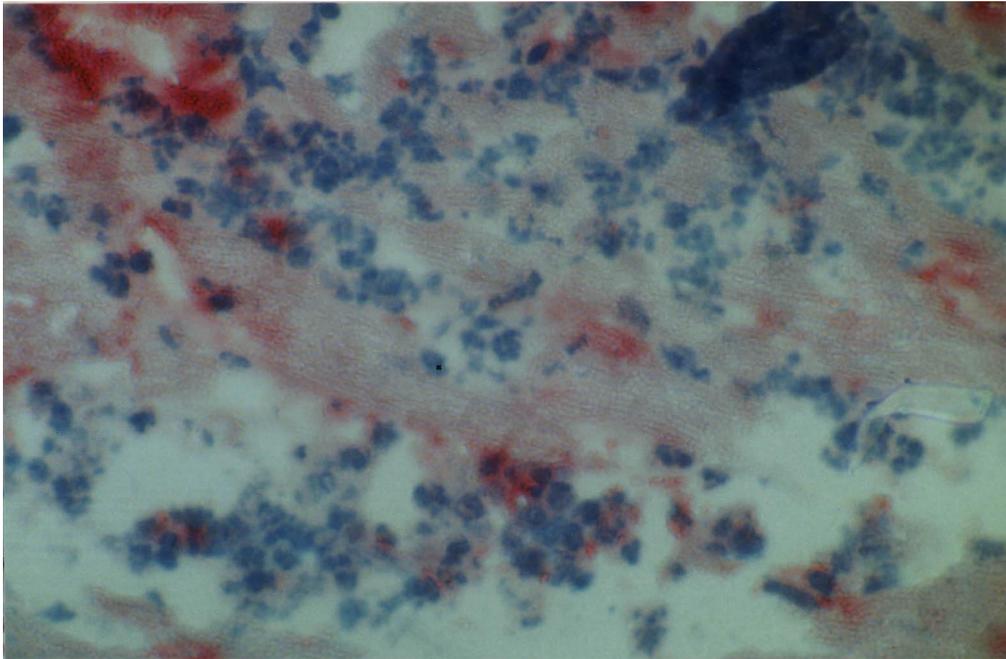
**Abb. 17:** W3/13, (Originalvergrößerung 1000x)



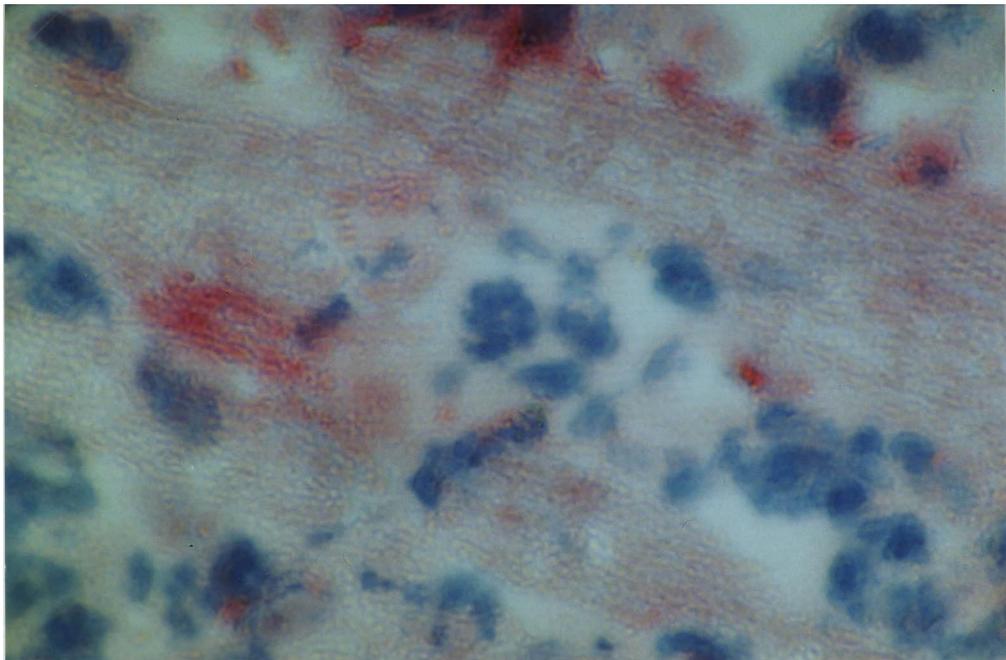
**Abb. 18:** HE, (Originalvergrößerung 100x)



**Abb. 19:** HE, (Originalvergrößerung 400x)

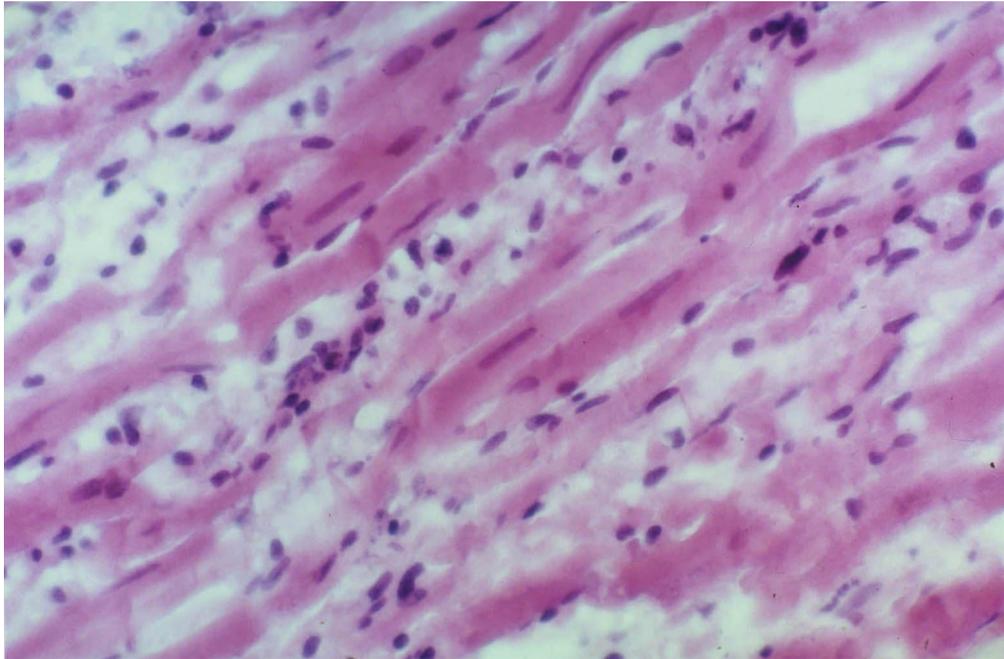


**Abb. 20:** Antikörper MOM/3 F 12/F 2, (Originalvergrößerung 400x)

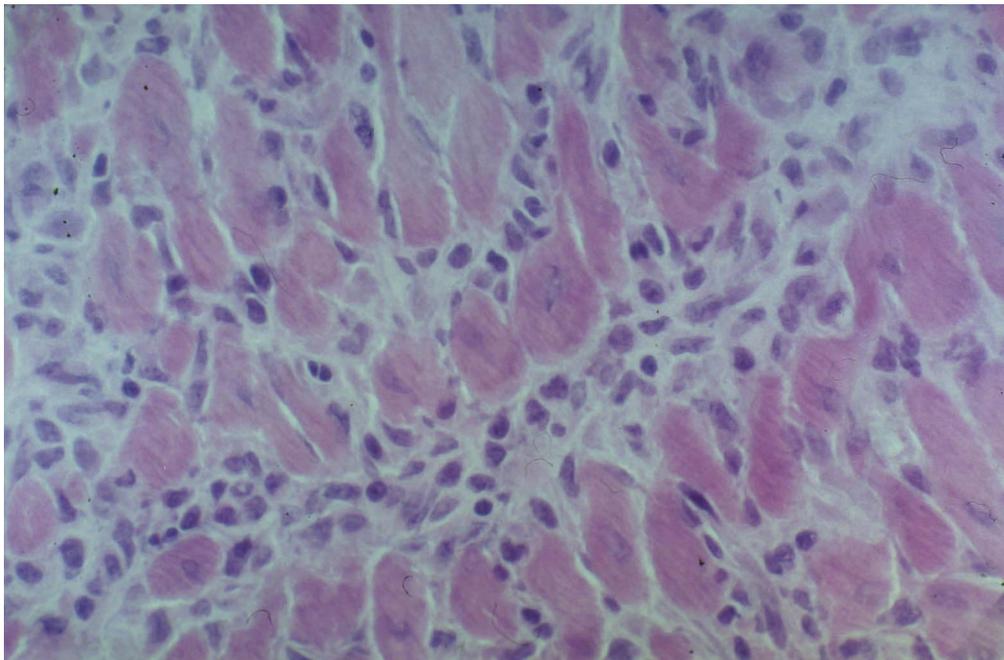


**Abb. 21:** Antikörper MOM/3 F 12/F 2, (Originalvergrößerung 1000x)

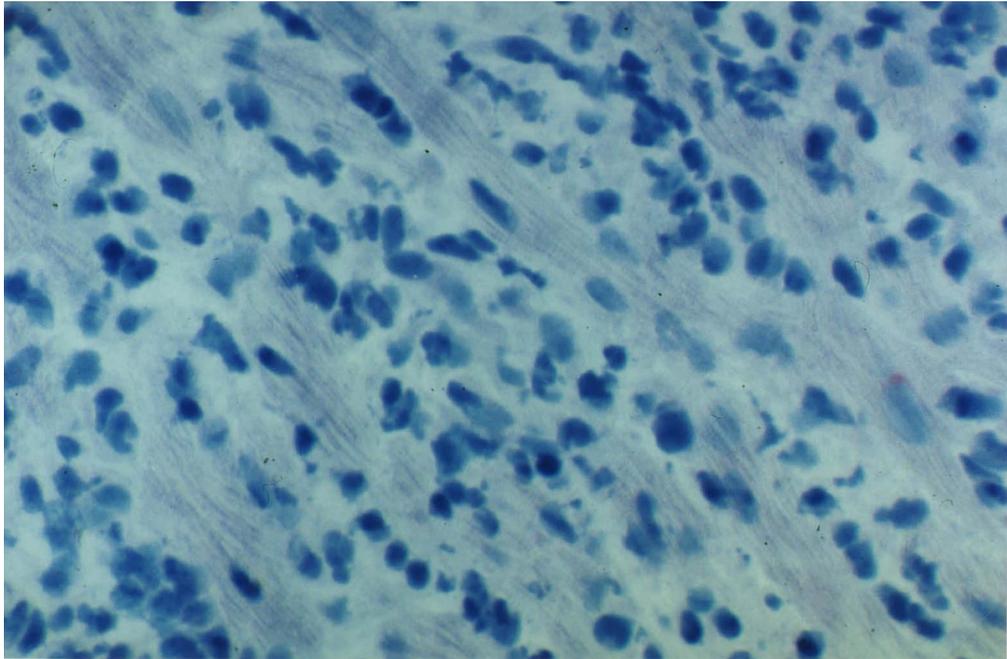
### 7.2.8 Fischöl nach erfolgter Abstoßung



**Abb. 22:** HE, Längsschnitt, (Originalvergrößerung 400x)



**Abb. 23:** HE, Querschnitt, (Originalvergrößerung 400x)



**Abb. 24:** Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper), (Originalvergrößerung 400x)

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ang.	angereichert
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
APC	antigen presenting cell
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LCA	leukocyte common antigen
Lsg.	Lösung
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	normal
NaCl	Natriumchlorid
NK	natural killer cells
o.g.	oben genannt
PGE	Prostaglandin E
pH	pondus hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PWM	pokeweed mitogen
SEM	standard error of the mean
T <sub>4</sub> /T <sub>8</sub>	T-Zellen (CD 4, CD 8)
Tab.	Tabelle
T <sub>c</sub>	T-zytotoxische
T <sub>s</sub>	T-Suppressor
ω-3	Omega-3
ω-6	Omega-6
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

## 8. Lebenslauf

Name: S c h o t t

Vorname: Jürgen

Geburtsdatum/-ort: 21. Juli 1967/Limburg an der Lahn

Familienstand: verheiratet mit Claudia Schott, geb. Tiroke, Ärztin,  
1 Kind

Anschrift: Am Lindenberg 11  
35463 Fernwald

Eltern: Norbert Schott, Hauptlehrer a. D.  
Hedwig Schott, Hausfrau

Schulbildung: 1973-1977 Grundschule Beselich-Obertiefenbach  
1977-1978 Realschule Hadamar  
1978-1987 Gymnasium Hadamar  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst 1987-1988 Veitshöchheim, Koblenz und Limburg

Hochschulbildung: 1988-1995 Studium der Humanmedizin an der Justus-  
Liebig-Universität Gießen

19.09.1990 Ärztliche Vorprüfung  
18.09.1991 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
21.04.1994 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
25.04.1995 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum: 15.06.1995 bis 14.12.1996 Arzt im Praktikum an der  
Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-  
Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. K.  
Schwemmler)

Approbation: 15.12.1996

Assistenzarzt

15.12.1996 bis 31.03.1997 Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. K. Schwemmler).

01.04.1997 bis 31.03.1999 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. Dr. R. Schnettler)

Seit 01.04.1999 Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen  
(Leiter: Prof. Dr. K. Schwemmler)

## **9. Danksagung**

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Schwemmler, Leiter der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, der es uns ermöglichte, die experimentellen Arbeiten an seiner Klinik durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Grimm, Leitender Oberarzt an der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Überlassung des Themas und die zur Verfügung gestellten Organe.

Seiner tatkräftigen Unterstützung in allen Fragen war ich jederzeit gewiß. Die immer neue Motivation und Anleitung zur Erarbeitung bestimmter Abschnitte der Arbeit verhalfen zum Gelingen und Vollenden dieser Untersuchung.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle, Leitender Oberarzt am Institut für Pathologie am Zentrum für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, der mir bei der Erarbeitung der immunhistologischen Ergebnisse stets beratend zur Seite stand.

Die fundierte statistische Beratung verdanke ich Herrn Dr. M. Hollenhorst, Hochschulrechenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen, Leiter Dr. J. Hammerschick.

Frau Wilker, Frau Fuchs-Moll, Frau Manapag und Frau Hahn-Kohlberger an der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie sowie dem Zentrum für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Anleitung und Unterstützung beim Anfertigen der Immunhistologie.

Frau Nau, Dokumentationsassistentin an der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die Hilfestellung beim Formatieren des Bildmaterials.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Ermunterung und Motivation weiterzuarbeiten.