

Aus der Medizinischen Klinik IV: Kardiologie / Elektrophysiologie / Molekulare Kardiologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A. M. Zeiher)

**Einfluss der Dauer der Ciclosporin A-Therapie und der Höhe des
Ciclosporin A-Spiegels auf die Entwicklung der akuten Transplantatabstoßung und
der Transplantatvaskulopathie am heterotopen Herztransplantationsmodell der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
David Schramm
aus Königstein im Taunus

Frankfurt am Main
2005

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter
Referent: PD Dr. med. H.-G. Olbrich
Koreferent: Prof. Dr. H.-G. Fieguth
Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2006

1. Einleitung	4
1.1 Hyperakute Abstoßung	7
1.2 Akute Abstoßung	8
1.3 Chronische Abstoßung	8
1.4 Ciclosporin A (CSA)	18
1.5 Lewis auf Fisher 344-Modell	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Studienbeschreibung	21
2.2 Transplantationsmodell	21
2.2.1 Narkose	22
2.2.2 Vorbereitung des Empfängers	22
2.2.3 Explantation	23
2.2.4 Implantation	23
2.3 Postoperatives Monitoring	25
2.3.1 Herzpalpation, Gewichtsverläufe und Trinkmengen	25
2.3.2 Medikamentenansatz und Applikation	26
2.4 Studiengruppen	26
2.5 CSA-Bestimmung	27
2.5.1 Nierenfunktionslabor	28
2.6 Organentnahme	28
2.7 Histologische Aufarbeitung der Präparate	29
2.8 Bestimmung der akuten Abstoßungsreaktion nach ISHLT	30
2.9 Morphometrie zur Bestimmung der neointimalen Proliferation	31
2.9.1 Inzidenzbestimmung	32
2.10 Statistische Analyse und Nullhypothesen	33
3. Ergebnisse	34
3.1 NFL-Labor	34
3.2 Palpationsscores	34
3.3 Gewichtsentwicklung unter CSA	36
3.4 CSA-Blutspiegel	38
3.5 Akute Abstoßung	39
3.6 Transplantatvaskulopathie (Neointimale Proliferation)	40

3.6.1 Transplantatvaskulopathie in intramyokardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen	41
3.6.1.1 3mg Ciclosporin A	41
3.6.1.2 12mg Ciclosporin A	43
3.6.2 Transplantatvaskulopathie in epikardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen	45
3.6.2.1 3mg Ciclosporin A	45
3.6.2.2 12mg Ciclosporin A	47
3.7 Inzidenzen	49
3.7.1 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie in intramyokardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen	49
3.7.1.1 3mg Ciclosporin A	49
3.7.1.2 12mg Ciclosporin A	51
3.7.2 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie in epikardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen	53
3.7.2.1 3mg Ciclosporin A	53
3.7.2.2 12mg Ciclosporin A	55
3.8 Korrelation der CSA-Blutspiegel und der mittleren luminalen Stenose	56
3.9 Korrelation der akuten Abstoßung und der Transplantatvaskulopathie	57
4. Diskussion	58
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	75
7. Danksagung	86
8. Lebenslauf	87

1. Einleitung

In den letzten 15 Jahren ist die Herztransplantation zu einem etablierten Verfahren in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz geworden. Die ersten experimentellen Grundlagen der technischen Aspekte der Herztransplantation wurden größtenteils von N. Shumway in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts geschaffen (Shumway 1966, Stinson 1969). Nachdem das erste menschliche Herz 1967 von Christian Barnard transplantiert wurde, wurden im darauf folgenden Jahr weltweit bereits 101 Herzen transplantiert (Barnard 1967). Am 1. Januar 1978 hatten sich weltweit 379 Patienten einer Herztransplantation unterzogen. Die Überlebensraten waren 56% bzw. 31 % nach 1 bzw. 5 Jahren. In der Stanford-Serie von 1968-1973 gab es 34 Todesfälle bei 52 Empfängern (Caves 1973). Diese hohe Mortalität war hauptsächlich das Resultat akuter Abstoßung (20%) und von Infektionen (56%). Zu dieser Zeit bestand das Stanford-Protokoll der Immunsuppression aus Antithymozyten-Immunglobulin (ATG) für 6 Wochen, Prednison und Azathioprin (AZA).

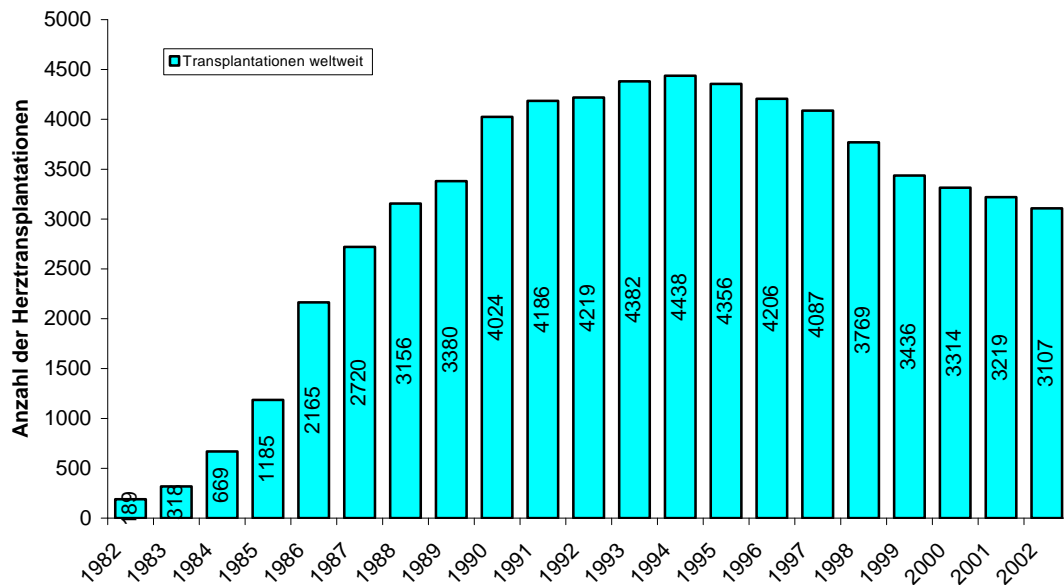
Akute Abstoßungsepisoden wurden mittels Hochdosismethylprednison und ATG behandelt. Inadäquate Immunsuppression und die verheerenden Nebenwirkungen der verfügbaren Immunsuppressiva verzögerten den Fortschritt der Herztransplantation.

Seit der Einführung von Ciclosporin A (CSA) in den frühen achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts erhöhte sich die Zahl der Herztransplantationen und der Transplantationszentren erheblich. Seitdem ist Ciclosporin A ein fester Bestandteil immunsuppressiver Protokolle, laut ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) ist es im ersten Jahr nach Herztransplantation bei 60% und nach fünf Jahren bei 74% aller Patienten fester Bestandteil der Medikation (Trulock 2004).

Der Zusammenhang zwischen Einführung von Ciclosporin A und der Zunahme der weltweit durchgeführten Herztransplantationen lässt sich anhand der folgenden Grafik sehr gut nachvollziehen.

Grafik 1.1 zeigt die Anzahl der Herztransplantationen, die der ISHLT bis 2002 gemeldet wurden (Trulock 2004).

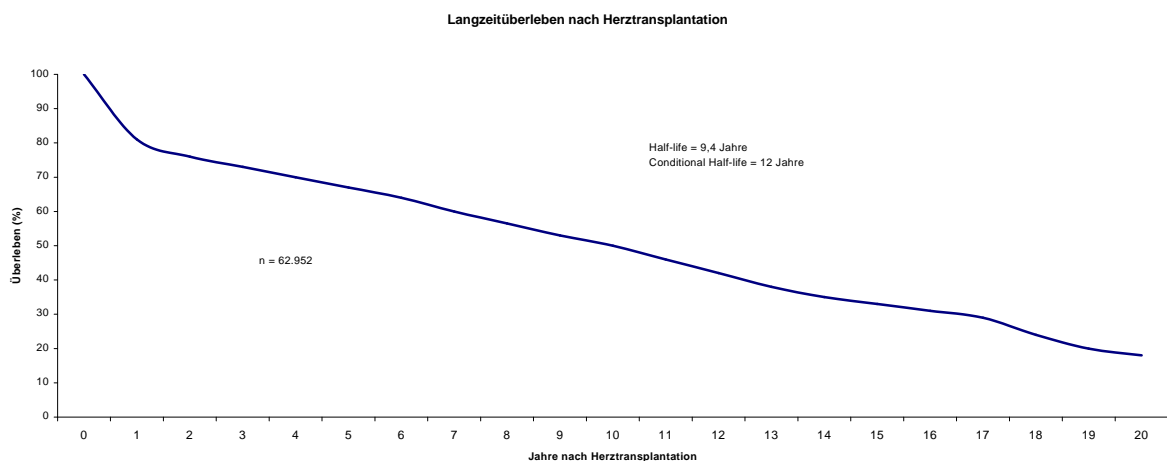
Jährliche Herztransplantationen zwischen 1982 und 2002



Grafik 1.1

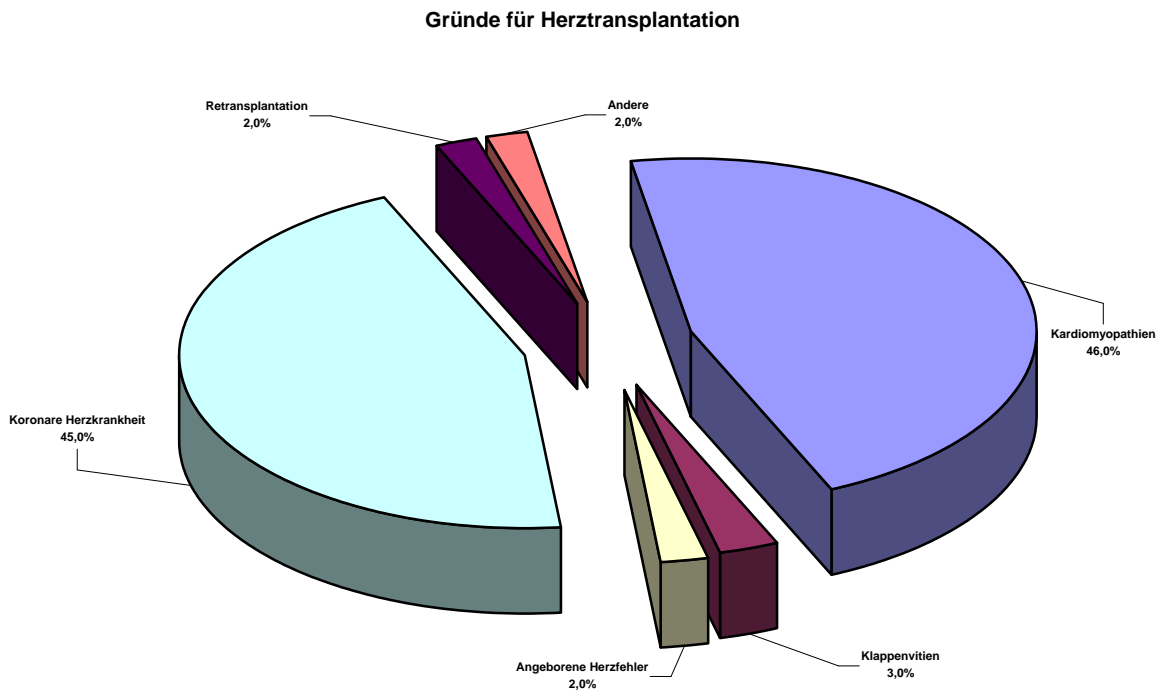
Man erkennt einen starken Anstieg der Herztransplantationen bis in die frühen neunziger Jahre, dann eine Plateauphase und einen Abfall Ende der neunziger Jahre. Dies lässt sich durch die limitierte Anzahl an Spenderherzen erklären.

Grafik 1.2 zeigt die Überlebenskurve nach Herztransplantation über einen Zeitraum von 20 Jahren. Die 1-Jahres Überlebenszeit liegt derzeit bei 80 %. Der Zeitpunkt, an dem noch 50% der Patienten leben (Half-life) liegt bei 9,4 Jahren. Für Patienten, die das erste Jahr überleben (Conditional Half-life), liegt er bei 12 Jahren. Nach einem steilen Abfall der Überlebenskurve während der ersten sechs Monate, verringert sich die Zahl der Überlebenden relativ konstant. Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 4% pro Jahr (Trulock 2004).



Grafik 1.2

Grafik 1.3 zeigt die derzeit häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation beim Menschen. Die häufigsten Gründe, die zu einer Herztransplantation führen sind neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) die Kardiomyopathien unterschiedlichster Genese (Trulock 2004).



Grafik 1.3

Betrachtet man nur den Zeitraum zwischen 1996 und 2000, so leben nach 1 Jahr noch 85% der Patienten. Dies bedeutet eine Verbesserung um ca. 10%, wenn man den Zeitraum von 1980-1986 zum Vergleich heranzieht. Insgesamt gesehen überleben 80% der Patienten das erste Jahr nach Herztransplantation. Dies liegt nicht zuletzt an den großen Fortschritten im Bereich der Herztransplantation in den letzten Jahren. Diese Fortschritte betreffen die verbesserte Organkonservierung, die modifizierten und verbesserten Operationstechniken und vor allem verbesserte Immunprotokolle. Dies führte zu einer Reduktion der akuten Abstoßungsepisoden und auch zu einem Abfall der Inzidenz von Infektionen, es trat jedoch trotz dieser Erfolge keine signifikante Reduktion der chronischen Abstoßung im Vergleich zur Kortikoid-Mono-Therapie ein.

Bei der chronischen Abstoßung oder Transplantatvaskulopathie handelt es sich um eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die aus der Tunica muscularis in den subintimalen Raum migrieren und dort proliferieren und so das histologische Bild einer obliterativen

Arteriopathie charakterisieren. Diese Art der Arteriopathie verläuft rascher als die Arteriosklerose und befällt am Herzen sowohl intramyokardiale als auch epikardiale Arterien des Transplantats. Da sie im Gegensatz zur Arteriosklerose im Verlauf fulminanter ist, wird sie am Herzen auch Accelerated Coronary Artery Disease (ACAD) genannt.

Die Ausbildung der TVP ist der limitierende Faktor des Langzeitsüberlebens (Schmid 1997, Taylor 2003). Sie wurde erstmals 1955 von Hume und Kollegen für eine menschliche Spenderniere beschrieben (Hume et al. 1955), später auch für langzeitüberlebende Organempfänger an der Niere (Busch et al. 1971), an der Lunge (Burke et al. 1984) sowie an der Leber (Demetris 1985). Klinische Studien beschreiben die Inzidenz der TVP oder ACAD nach 5 Jahren mit 25 – 80 % bei Herztransplantationspatienten (Foegh 1992, Barnhart 1987, Pascoe 1987, Uretsky et al 1987, Gao et al. 1988), die jährliche Inzidenz wird auf 15 – 20 % geschätzt (Gravanis 1994). Die Erkrankung manifestiert sich durch Arrhythmie, Herzinfarkte und plötzlichen Herztod. Aufgrund der kardialen Denervation können die typischen pektanginösen Beschwerden nicht wahrgenommen werden (Gravanis 1994).

Die Entwicklung der ACAD beim Menschen wurde erstmals durch Bieber 1970 beschrieben (Bieber 1970). Schon zwei Jahre zuvor beschrieben Kosek und Mitarbeiter ihre Erkenntnisse aus einem Herztransplantationsmodell am Hund und berichteten hier über diffuse fibrozelluläre Verdickungen der Intima in mindestens 3 Monate überlebenden Herzen (Kosek 1968). Die ACAD trat laut Barnhart schon 1968 beim weltweit zweiten Empfänger eines Herztransplantats innerhalb weniger Monate nach Transplantation auf und bewirkte seinen Tod 19 Monate später. Bei der Autopsie wurde ein massiver Befall der Koronarien mit ACAD festgestellt, obwohl der Spender erst 24 Jahre alt gewesen war (Barnhart 1987).

1.1 Hyperakute Abstoßung

Hyperakute Abstoßungsreaktionen treten selten auf, doch wenn sie entstehen ist in der Regel nur noch die sofortige Retransplantation zur Rettung des Patienten erfolgsversprechend.

Hyperakute oder perakute Abstoßungsreaktionen beruhen in der Regel auf antikörpervermittelter Zytotoxizität nach vorausgegangener Sensibilisierung gegen AB0- oder MHC-I-Antigene durch frühere Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften. Sie treten innerhalb von Minuten bis Stunden auf. Feingeweblich sieht man Anhäufungen von segmentkernigen Granulozyten, Gefäßwandnekrosen und Thrombosen (Thomas 1994).

1.2 Akute Abstoßung

Mit der Einführung von CSA konnte das Problem der akuten Abstoßung nach Organtransplantation reduziert werden. CSA wird nicht nur mit dem Rückgang der Mortalität durch akute Abstoßung in Verbindung gebracht, sondern auch mit einem signifikanten Rückgang der Inzidenz der manifesten Herzinsuffizienz und des Schweregrades akuter Abstoßung (Grattan 1990, Kobashigawa 1993). Kobashigawa berichtet, dass ca. 45% aller von ihm beobachteten Herztransplantationspatienten zwischen 1990 und 1993 keinerlei Abstoßungsreaktionen innerhalb eines Jahres nach der Transplantation aufwiesen, weitere 30% hatten lediglich eine einzige Abstoßungsreaktion. Insgesamt konnte in diesem Beobachtungszeitraum ein Durchschnitt von $1,4 \pm 0,7$ Abstoßungsreaktionen pro Patient nach einem Jahr festgestellt werden (Kobashigawa 1993). Momentan sind nur ca. 10 % aller Abstoßungsreaktionen mit hämodynamischen Auswirkungen assoziiert und mehr als 85 % aller Abstoßungsreaktionen sprechen auf eine iv-Gabe von Corticosteroiden an (Miller 1990). Daten einiger Kliniken implizieren, dass 75 % bis 85 % der leichten Abstoßungsreaktionen (Stadium 1B und 2 nach Billingham 1990) spontan rückläufig sind, und so behandeln die meisten Kliniken Abstoßungsreaktionen nur noch im Falle der Anwesenheit von diffusen Myonekrosen (ISHLT Stadium 3A). Das Problem der Stadieneinteilung der akuten Abstoßung wurde 1990 auf einem internationalen Symposium in Stanford gelöst (Billingham 1990). Es wurden Richtlinien für die exaktere Abschätzung des Schweregrads akuter Abstoßung sowie zur verbesserten Reproduzierbarkeit festgelegt. Demnach erfordert eine exakte Bestimmung des Stadiums akuter Abstoßung mindestens vier bis sechs Biopsien aus dem Myokard, die aus mindestens 50 % verwertbarem Myokard bestehen, nicht aus Narben- oder anderem Gewebe. Diese Biopsien sollen in 10 %igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet werden. Anschließend werden die Biopsate zur weiteren Auswertung H.E gefärbt.

1.3 Chronische Abstoßung

Ein weiteres Phänomen, welches an transplantierten Organen beobachtet werden kann ist die chronische Abstoßung, auch als Transplantatvaskulopathie (TVP) bezeichnet. Der Prozess der TVP ist beschränkt auf das Allograft und bezieht auch die großen Arterien ein.

Die TVP am Herzen betrifft die großen epikardialen Gefäße entlang ihrer gesamten Länge von der Basis des Herzens bis zu seiner Spitze (Billingham 1992). Im Gegensatz zur natürlichen Arteriosklerose werden neben den epikardialen Ästen auch die intramyokardialen Äste betroffen (Billingham 1992). Aus diesem Grund ist eine Bypassoperation oder PTCA

nicht erfolgsversprechend, da die intramyokardialen Äste der Koronararterien zumeist bereits verschlossen sind, bevor die Erkrankung die großen epikardialen Gefäße erfasst. Hieraus resultieren multiple Infarzierungen des Myokards, die zur allmählichen Transplantatdysfunktion führen. Die vaskulären Strukturen werden bis zu den Nahtlinien, nicht aber darüber hinaus in den Prozess der TVP einbezogen (Billingham 1992).

Histologie

Histopathologisch unterscheidet sich diese Art der Sklerose von der typischen Koronarsklerose. Die TVP ist gekennzeichnet durch eine konzentrische myointimale Proliferation, bei intakter Lamina elastica interna, und betrifft die gesamte Länge der Gefäße (Billingham 1992, Hosenpud 1992).

Die Media der Gefäße ist nicht verdickt. Das Ausmaß der Intimaläsion variiert mit der Zeit nach Transplantation und der Schwere der TVP.

Tabelle 1.1 stellt die Unterschiede zwischen ACAD und natürlicher Koronarsklerose (Coronary Artery Disease/CAD) dar.

Tab.1.1

Histologischer Vergleich zwischen Accelerated Coronary Artery Disease (ACAD) und Coronary Artery Disease (CAD)

Histologie	ACAD	CAD
Angiographische Lokalisation	diffus, distal	fokal, proximal
Intima Proliferation	konzentrisch	gewöhnlich exzentrisch
Calcium Depots	fehlen/rar	gehäuft nachweisbar
Lamina elastica interna	intakt	unterbrochen
Entzündung/Vaskulitis	vereinzelt	niemals
Intramyokardiale Äste	betroffen	ausgenommen
Epikardiale Äste	betroffen (später)	betroffen
Ausdehnung	gesamte Länge	fokale Läsion
Entwicklungsgeschwindigkeit	Monate	Jahre

Hosenpud 1992, Billingham 1992

Frühe Läsionen zeigen fast immer ein morphologisch intaktes Endothel. Thromben werden in dieser Phase fast nie gesehen. Die mikroskopische Morphologie zeigt ein unverletztes Endothel, aber das plumpe und pyroninophile Zytoplasma lässt auf eine Aktivierung der Endothelzellen schließen (Gravanis 1994). In der Frühphase der Intimaproliferation können Anhäufungen von Lymphozyten im subendothelialen Raum nachgewiesen werden.

Die verdickte Intima besteht aus modifizierten glatten Muskelzellen (α -Actin positiven Zellen), die durch die Lücken der Lamina elastica interna wandern können. Zwischen den modifizierten Muskelzellen können lipidbeladene Makrophagen (Schaumzellen) nachgewiesen werden. In der Frühphase der TVP lagern sich diese Schaumzellen entlang der Lamina elastica zusammen. Später wandern sie durch die gesamte Dicke der Intima. Schreitet die Läsion fort, so enthält die intimale Proliferation auch Cholesterolkristalle.

Die intimale Verdickung nach Transplantation verläuft in zwei Phasen. In der frühen Phase kommt es zu einer Infiltration von mononukleären Entzündungszellen (hauptsächlich Monozyten/Makrophagen). Der dominierende Zelltyp in dieser Phase ist der Makrophage mit einer geringeren Anzahl von T-Lymphozyten. Die spätere Phase besteht aus der Proliferation glatter Muskelzellen mit der Bildung einer extensiven extrazellulären Matrix (Gravanis 1994). Tabelle 1.2 fasst die histologischen Charakteristika der TVP nach Herztransplantation tabellarisch zusammen.

Schicht	Veränderung
Lamina elastica interna	intakt, glatte Muskelzellen
Intima	Makrophagen/Monozyten T-Lymphozyten, Dentritische Plasmazellen, Eosinophile
Media	unverändert
Adventitia	Makrophagen/Monozyten Lymphozyten

Tab.1.2 Charakteristika der Gefäßveränderungen am transplantierten Herzen (Foegh 1990)

Hruban (1990) und Salomon (1991) zeigten, dass das transplantierte Herz die T-Zellen und Makrophagen des Empfängers aktiviert. Dieses führt zu einer vermehrten Expression von HLA-DR Antigenen (MHC-Antigene) auf der Oberfläche von Vaskularendothelien und zu einer vermehrten Freisetzung von Cytokinen. Dieser Prozess stimuliert die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima.

Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei der TVP des transplantierten Herzens um eine T-Lymphozyten-vermittelte Endothelialitis handelt (Hruban 1990). Die dominierenden Zellen im subendothelialen Raum der betroffenen Gefäße sind T-Lymphozyten. Diese Infiltrate sind mit der Anhäufung von Makrophagen und der Proliferation von glatten Muskelzellen vergesellschaftet.

Die eigentlichen Ursachen in der Entstehung der TVP nach Herztransplantation, sowie die genauen Abläufe und Wachstumsfaktoreninteraktionen sind noch unbekannt. Von einer Therapie der TVP ist man daher noch weit entfernt. Die Entwicklung dieser Erkrankung des transplantierten Herzens wird auf eine chronische Abstoßungsreaktion zurückgeführt, da sie bei der homologen Transplantation nicht in Erscheinung tritt (Cramer 1989).

An der Pathogenese der TVP sind neben den Zellen des Immunsystems (Lymphozyten/Makrophagen) und den Thrombozyten auf Seiten des Empfängers die Endothelzellen und glatte Muskelzellen (SMC) des Transplantats beteiligt (Ross 1986).

Diese Zellen interagieren durch Mediatoren (Wachstumsfaktoren, Cytokine) miteinander, mit der Folge der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, die das morphologische Korrelat der TVP bildet.

1. Endothelzellen

Das Endothel scheint bei der Entwicklung der TVP eine Schlüsselrolle zu spielen. Um die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und deren Proliferation, die zur TVP führt, zu verhindern (Foegh 1990), bedarf es eines intakten und funktionierenden Endothels.

Die Endothelzellen bilden die allogene Barriere zwischen dem Immunsystem des Empfängers (zirkulierenden Lymphozyten/Makrophagen) und dem transplantierten Herzen (Hosenpud 1992). Das Gefäßendothel des Transplantates ist somit die erste fremde Zelle, auf die das Immunsystem des Empfängers trifft und reagiert. Endothelzellen präsentieren die für die Fremderkennung durch das Immunsystem des Empfängers erforderlichen HLA I und HLA II Antigene (HLA-Restriktion) in vivo und in vitro (Rabin 1985). Cytokine können die Exprimierung von HLA-Antigenen zusätzlich noch steigern (Bergese 1994). Bei diesem ersten Kontakt des Transplantats mit dem Empfängerimmunsystem kommt es zu einer Aktivierung der Endothelzellen, wahrscheinlich über einen T-Zellvermittelten Weg. Gleichzeitig werden aber auch die T-Zellen aktiviert, die daraufhin Botenstoffe, u.a. Gamma-Interferon, ausschütten. Das Gamma-Interferon führt auf den Endothelzellen des Spenderherzens zur vermehrten Antigenpräsentation und zu einer vermehrten HLA-

Expression auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Foegh 1990). Die vermehrte Antigenpräsentation führt zur vermehrten Aktivierung von Lymphozyten, wodurch ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt wird.

Neben den HLA-Antigenen können auf Endotheloberflächen weitere Antigene differenziert werden, die als Endothelzell-(EZ)/ endotheliale Monozyten (EM)-Antigene beschrieben werden. Diese Antigene wurden entdeckt durch ihre Stimulation von spezifischen Allo-Antikörpern bei nierentransplantierten Empfängern. Die EM-Antigene werden auf Monozyten und frisch isolierten oder subkultivierten Endothelzellen exprimiert (Hosenpud 1992), daneben in nicht signifikanter Menge auch auf Lymphozyten, Erythrozyten oder polymorphnukleären Zellen. Mit der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen in Verbindung mit fremden MHC-Molekülen verwandelt sich die Endothelzelle in eine antigenpräsentierende Zelle. Weitere Antigene, die so genannten Adhäsionsantigene ICAM-I, ELAM-I und VCAM-I, wurden ebenfalls auf Endothelzellen nachgewiesen. Sie vermitteln in der Phase der Fremderkennung die eventuelle Anheftung von Lymphozyten an Endothelzellen. Sie können bereits einen Tag nach Transplantation vermehrt auf den Oberflächen von Endothelien nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen am Menschen haben eine Induktion der Klasse II der MHC Antigene in der TVP gezeigt. Darüber hinaus konnte eine Vermehrung der Expression von 2G7 und 7A9 Molekülen - Antigene, die mit der Endothel-Zell-Aktivierung einhergehen- auf den Endothelien festgestellt werden. Eine mögliche Aktivierung von Endothelzellen durch Antikörper (z.B. komplementvermittelt oder Autoantikörper) gegen eben beschriebene Antigene wäre durchaus denkbar, da sie in Seren von Nierentransplantierten (Cerilli 1985, Claas 1980) und Herztransplantierten (Cerilli 1985 und 1987) nachgewiesen wurden. Die Endothelzellen bilden eine Vielzahl von Substanzen, die für die Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität wichtig sind. Sie können die Thrombozytenadhäsion an ihrer Oberfläche normalerweise durch ihren nichtthrombotischen Charakter oder durch die Produktion von antithrombotischen Substanzen wie Prostacycline oder Heparin verhindern (Ross 1986). Für die schnelle intimale Proliferation wird die synergistische Wirkung vieler Wachstumsfaktoren benötigt. Endothelzellen können in der Zellkultur verschiedene Wachstumsfaktoren bilden, u. a. FGF, IL-1, IL-6 sowie PDGF, die allesamt die Proliferation von glatten Muskelzellen fördern (Ross 1986, Foegh 1990).

Nachfolgend werden einzelne Faktoren kurz in ihrer Wirkung beschrieben.

Die auftretende Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen ist eine beschriebene Antwort der Blutgefäße nach z.B. traumatischen Verletzungen mit einem Ballonkatheter. Die Endothelverletzung ist bei der TVP jedoch in der Regel morphologisch nicht fassbar. Dies deckt sich mit Befunden von Billingham 1992, nach denen Frühläsionen der TVP ein morphologisch intaktes Endothel aufweisen (Billingham 1992).

Wie oben beschrieben, zeigen die histologischen Befunde auch, dass es sich bei der TVP nicht um eine aggressive, destruierende Vaskulitis handelt (intaktes Endothel, intakte Lamina elastica interna), sondern die Erkrankung subakut bis chronisch verläuft. (Hosenpud 1992). Diese Beobachtungen unterstützen daher die Annahme eines Prozesses, der die subletale Verletzung und die anschließende Aktivierung des Endothels annimmt. Die initial einsetzende Endotheldysfunktion und die Endothelverletzung können verursacht werden durch:

- HLA-Inkompatibilitäten, die über die Aktivierung von T-Lymphozyten eine Cytokinkaskade (PDGF aa/bb, TGF β 1, EGF, bFGF, TNF, Angiotensin II etc.) auslösen (Cramer 1989, Libby 1989).
- die Verletzung von Oberflächenendothelien durch zytotoxische Antikörper und komplementvermittelte Immunzytolyse (Foegh 1990).
- Antikörper, die gegen die o.g. Endothelzellenantigene gebildet werden.
- Faktoren, die während des Transplantationsvorgangs auf das Herz wirken, z.B. Kälte, Ischämie oder Faktoren wie Leukotriene, Thromboxan A2 oder Radikale (Roza 1994), die durch die Reperfusion des Transplantates freigesetzt werden (Foegh 1990). Bei der isogenetischen Transplantation unterliegt das Transplantat jedoch den gleichen Faktoren wie bei der allogenen Transplantation. Dennoch entwickelt sich keine TVP. Eine Beobachtung, die die TVP als Folge der Transplantationsprozedur eher unwahrscheinlich macht.

Dass verletztes Endothel in der Lage ist, Cytokine zu produzieren und sezernieren, konnte gezeigt werden. Nach einer Verletzung des Gefäßes und des Endothels durch einen Ballonkatheter kam es zu einer Vermehrung der m-RNA für Insulin-like growth Faktor, TNF, TGF- β 1 auf glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Casscells 1992). Diese Faktoren unterstützen ebenfalls das Wachstum von glatten Muskelzellen.

Glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen stellen die eigentlichen Zielzellen der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in der Entstehung der TVP dar.

Die Intimahyperplasie als morphologisches Erscheinungsbild der TVP besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und Makrophagen, Lymphozyten und teilweise eosinophilen Granulozyten (Foegh 1990).

Durch eine Verletzung oder im Zustand der Regeneration proliferieren glatte Muskelzellen (SMC) und wandern von der Media in die Intima, um Läsionen zu bilden, die eine luminale Stenose und oder Thrombose verursachen.

Es können zwei unterschiedliche phänotypische Stadien von glatten Muskelzellen beschrieben werden, das kontraktile und das synthetische Stadium (Fritz 1970, Thyberg 1983, Chamley-Campbell 1981). Der synthetische Typ von Muskelzellen kann proliferieren, der kontraktile Typ wandert. Proliferierende glatte Muskelzellen exprimieren Urokinase-Plasminogen-Aktivator (u-PA). Wandernde glatte Muskelzellen exprimieren tissue-type-plasminogen-Aktivator (t-PA) (Clowes 1990, Casscells 1992). Der Funktionszustand der Muskelzellen kann somit immunhistochemisch festgehalten werden.

Eine weitere morphologische und funktionelle Unterscheidung von glatten Muskelzellen besteht in der Markierung von α -SM-Actin. α -SM-Actin wird nur von glatten Muskelzellen gebildet, wenn sich die glatten Muskelzellen im Ruhezustand befinden, nicht aber wenn sie proliferieren (Clowes 1989).

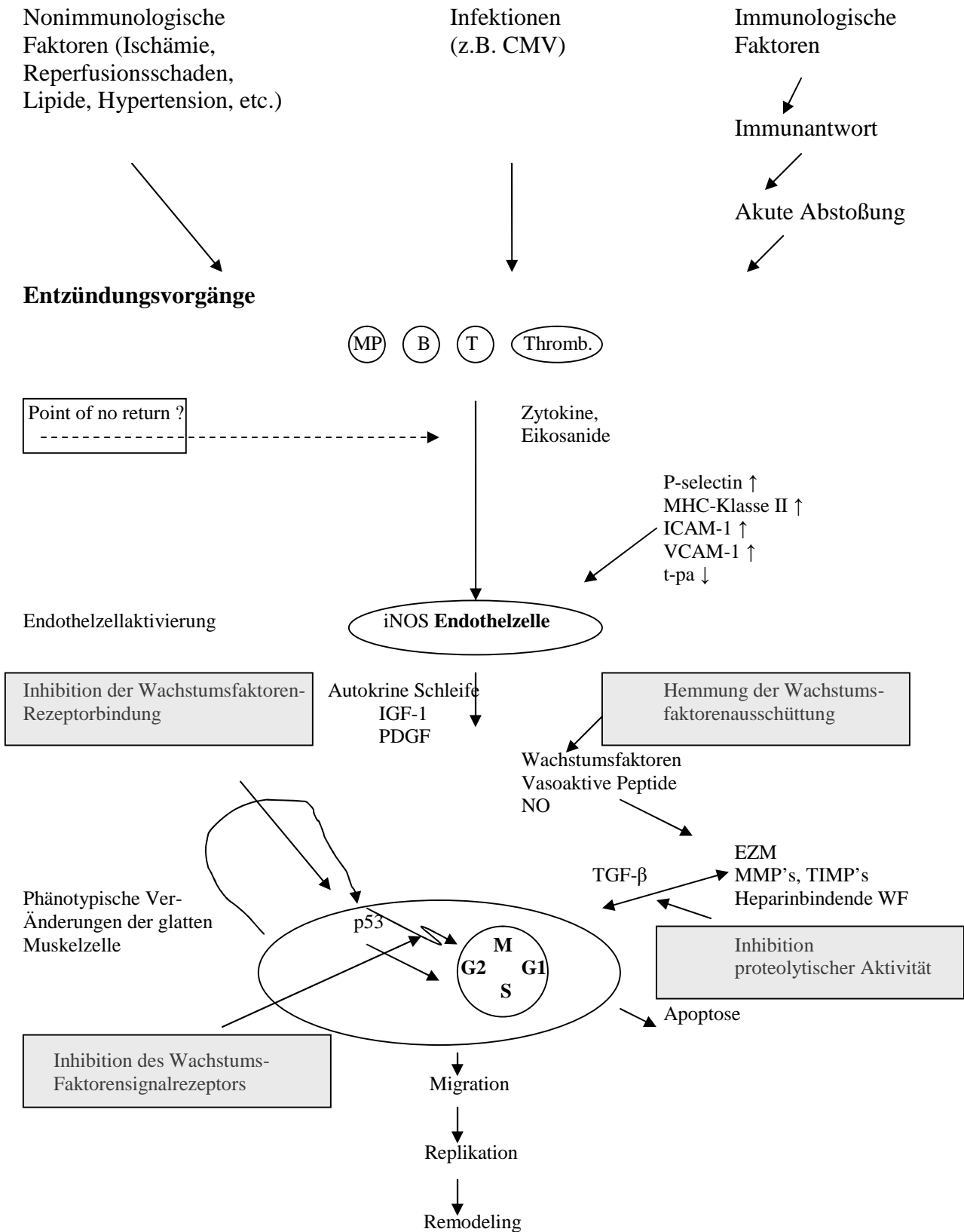
Im Verlauf der TVP kommt es zu einer zunehmenden Verdickung der Intima, die aus modifizierten glatten Muskelzellen besteht. (Billingham 1992). An den Tagen 30-90 nach Herztransplantation tauchen α -Actin positive glatte Muskelzellen in der Intima auf, die der dominierende Zelltyp in der Spätphase der TVP darstellt (Gravanis 1994). α -Actin ist aber charakteristisch für die G₀ Phase. Die Proliferation der glatten Muskelzellen muss somit in den ersten 30 Tagen stattfinden. Zeitpunkt und auslösende Faktoren sind aber zurzeit noch nicht bekannt.

Glatte Muskelzellen reagieren auf eine Vielzahl von chemotaktischen Stoffen (Ross 1986). Die Proliferation wird in vitro und in vivo durch zahlreiche Wachstumsfaktoren getriggert (TGF β ; TGF α , PDGF, ILGF, HBGF etc). Hauptmitogen für die glatten Muskelzellen im Serum ist der PDGF (Heldin 1985), für den auf glatten Muskelzellen ein Rezeptor nachgewiesen wurde (Bowen-Pope 1985). Daneben konnten auch Rezeptoren für LDL (Chait 1980, Witte 1980) und weitere Wachstumsfaktoren gefunden werden.

Ein Teil der chemotaktischen Substanzen, die auf glatte Muskelzellen wirken (PDGF, 12-HETE, LTB₄ und β -Thromboglobulin) werden von adhärennten Leukozyten und Thrombozyten, aber auch von Endothelzellen direkt freigesetzt.

Eine weitere Gruppe von glatten Muskelzellwachstumsfaktoren bilden die Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Heparin Binding Growth Factors (HBGF)). Sieben verschiedene Gene wurden identifiziert (Hoshi 1988): saurer und basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF), Int-2-Locus, kFGF/hst, FGF-5, FGF-6 und der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF). Auch für diese Faktoren existieren auf den glatten Muskelzellen Rezeptoren. Die exakten Wege, wie diese Faktoren mit den Rezeptoren interagieren, sind noch unklar (Thomas 1987).

Die Hauptregulationsvorgänge bei der Entstehung von TVP, wie sie nach neuesten Erkenntnissen postuliert werden, lassen sich anhand der nachfolgenden Grafik 1.5 verdeutlichen.



Grafik 1.5

CMV: Cytomegalievirus; T: T-Zellen; B: B-Zellen; MP: Makrophagen; Thromb: Thrombozyten; MHC: Majorhistokompatibilitätskomplex; ICAM: intercellular adhesion molecule; VCAM: vascular cell adhesion molecule; tPA: tissue plasminogen activator; IGF: insuline-like growth factor; PDGF: platelet-derived growth factor; EZM: Extrazellulärmatrix; MMP: Matrix-Metalloproteinase; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases

Die Pathogenese der chronischen Abstoßung ist am wahrscheinlichsten multifaktoriell bedingt. Verschiedene mechanische, nichtimmunologische, immunologische und infektiöse Faktoren generieren entzündliche Prozesse im Transplantat und induzieren einen persistierenden geringgradigen Schaden am vaskulären Endothel. Das Endothel wird aktiviert und die Endothelzellen exprimieren proinflammatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche und beginnen Wachstumsfaktoren zu sezernieren um den Schaden zu reparieren. Dies führt zu einer konzentrischen intimalen Läsion (Arteriosklerose) auf ganzer Länge der Transplantatarterien (und teilweise sogar in den Venen). Innerhalb der Arterienwand sind die glatten Muskelzellen eingebettet in und assoziiert mit einem komplexen Netzwerk von nichtzellularen strukturellen Elementen, die Extrazellulärmatrix genannt werden. Diese befindet sich in einem Gleichgewicht aus Produktion und Abbau. Der Abbau wird von einer Genfamilie aus proteolytischen Enzymen vermittelt, dazu gehören unter anderem die Matrix-Metalloproteinasen, welche als inaktive Zymogene sezerniert werden und die durch proteolytische Spaltungsreaktionen aktiviert werden. Die Aktivität der Metalloproteinasen wird außerdem durch eine Familie spezifischer Proteininhibitoren reguliert. Die finalen Ereignisse sind Remodeling und Okklusion der Arterien und ein daraus resultierender reduzierter Blutfluss, was zu einer relativen Anoxie, Schäden an den strukturellen Komponenten des Transplantats, Fibrose und schließlich zum Verlust des Transplantats führt (Hayry 1989,1999).

Replantationsstudien haben gezeigt, dass nach einem festgelegten Zeitpunkt (point of no return) auch die Aufhebung der Histoinkompatibilität nicht mehr ausreichte, das Fortschreiten der arteriosklerotischen Läsionen zu stoppen (Tullius 1994).

1.4 Ciclosporin A (CSA)

Seit der Einführung von Ciclosporin A hat die Zahl erfolgreicher Organtransplantationen erheblich zugenommen.

Ciclosporin ist ein zyklisches Undekapeptid, das ursprünglich aus *Tolypocladium inflatum* Gams, einem Pilz, isoliert wurde. Es wurde zwischen 1969 und 1970 erstmals im mikrobiologischen Department der Sandoz AG in Basel unter der Leitung von Jean F. Borel entdeckt (Borel 1976). Ciclosporin A ist ein immunmodulatorischer Wirkstoff.

Schon bevor der genaue Wirkmechanismus von Ciclosporin A geklärt war, wurde es bereits benutzt, um akuten Abstoßungsreaktionen vorzubeugen. Kronke et al. (1984) zeigten, dass CSA die Expression des IL-2-Gens in aktivierten T-Lymphozyten blockiert. Liu et al. (1991) fanden heraus, dass der Komplex aus CSA und Cyclophilin die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin hemmt. CSA hemmt die Translokation der NFAT-Gruppe von Transkriptionsfaktoren aus dem Zytoplasma in den Nukleus der aktivierten T-Zelle, indem es deren Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung verhindert. Die NFAT-Gruppe ist in die transkriptionelle Aktivierung der Gene involviert, die IL-2, IL-4 und CD40L kodieren.

Deshalb wird CSA mittlerweile als Calcineurin-Inhibitor klassifiziert. Außerdem wurde kürzlich von Matsuda und Koyasu(2000) herausgefunden, dass CSA in der Lage ist die JNK und p38 Signalwege zu blockieren, die von der Antigen – Erkennung in T-Zellen getriggert werden. Die Präsenz dieser zwei Interaktionsziele für CSA in der T-Zelle könnte die hohe Spezifität seiner immunsuppressiven Effekte erklären (Allison 2000). Dieser Vorgang findet auf der Ebene der Gentranskription statt. Zwar erstrecken sich die Hauptwirkungen des Medikaments auf die T-Zellen, es gibt jedoch auch einige Anzeichen für mögliche direkte Einflüsse auf andere Zelltypen, wie z.B. B-Zellen, Makrophagen, Knochen- und Knorpelzellen sowie glatte Muskelzellen (Allison 1998)

Neue Studien erhöhten zudem das Verständnis der Mechanismen über die sich die Nebeneffekte von CSA, insbesondere die Nephrotoxizität, manifestieren.

Aktion	Effekte
1. Aktiviert Endothelin-Converting-Enzym, erhöht die Produktion von ET-1	Systemische Hypertension Renale Vasokonstriktion Erniedrigte Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)
2. Induziert Apoptose renaler Tubulusepithelzellen	Ausfall Tubulärer Zellen
3. Augmentiert die Produktion von TGF- β , diese erhöht die Prokollagen Gen-Expression	Tubuläre interstitielle Fibrose

Tabelle 1.3: Mechanismen, über die CSA Nebenwirkungen auslöst

Die hämodynamischen Effekte von CSA bestehen in einer reversiblen, dosisabhängigen renalen Vasokonstriktion mit erniedrigter GFR (Curtis 1986) und systemischer Hypertension (Sanders und Curtis 1995). Endothelin-1 (ET-1), ein pro-inflammatorisches und mitogenes Peptid, wird für diese Effekte mitverantwortlich gemacht. Es wurde gezeigt, dass CSA die Aktivität des Endothelin-Converting-Enzyms verstärken kann, und somit die Produktion von ET-1 durch Endothelzellen erhöht (Herman 1999). Weiterhin wird vermutet, dass ET-1 zur Transplantatvaskulopathie und chronischer Abstoßung beiträgt, da die Suppression von ET-1 das Überleben von Allograft-Rattenherzen in Abwesenheit einer immunsuppressiven Therapie verlängert (Simonson 1999).

CSA-Behandlung kann außerdem zur tubulären interstitiellen Fibrose in der Niere führen (Mihatsch 1995), ein Effekt, der mit der erhöhten Expression von TGF- β zusammenhängt. TGF- β kann weiterhin Tumorzellinvasion und –metastasierung induzieren; Hojo (1999) vermutet, dass CSA Tumorwachstum verstärkt, indem es die Produktion von TGF- β induziert. In Addition kann CSA die Expression Pro-Apoptotischer Gene in der Niere (z.B. p53, Bax, Fas-L) erhöhen und dabei die Expression des „Überlebensgens“ (Bcl-2) reduzieren (Shihab 1999). Die Autoren postulieren, dass dies ein Mechanismus ist, der zum Ausfall tubulärer Zellen führt.

Trotz all dieser Effekte ist CSA ein potenter Suppressor der zellulären Immunantwort. CSA hat das Überleben nach Organtransplantation in den letzten zwei Dekaden erheblich positiv beeinflusst und wird auch weiterhin Verwendung finden. Allerdings werden neue Kombinationstherapien die benötigte CSA-Dosis weiter verringern und somit auch die unerwünschten Wirkungen reduzieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Ciclosporin A auf die Genese der akuten Abstoßung und insbesondere der Transplantatvaskulopathie zu erforschen.

Hierzu wurde ein Niedrig-Dosis-Modell mit einem Hoch-Dosis-Modell verglichen, um auch die Höhe der Ciclosporin-Blutspiegel und deren Auswirkungen mit in die Ergebnisse einfließen lassen zu können.

1.5 Lewis auf Fisher-344-Modell

Das Lewis auf Fisher-344 Transplantationsmodell stellt ein gut evaluiertes und zuverlässiges Modell zur Erforschung der Transplantatvaskulopathie dar. Es findet weltweit Verwendung und lässt sich aufgrund der guten kommerziellen Verfügbarkeit der beteiligten Rattenstämme problemlos durchführen. Die Rattenstämme stimmen in Klasse I und II Antigenen überein, und unterscheiden sich hinsichtlich multipler nicht-MHC-Histokompatibilitätsantigene (Adams 1992, Liebert 1982). Die hier angesetzte Studiendauer von 80 Tagen entspricht ebenfalls internationalen Standards. Das Modell findet nicht nur in der experimentellen Herztransplantation sondern darüber hinaus auch z.B. in der Lungen-, Leber- und Nierentransplantation Verwendung.

Es wurden von verschiedenen Autoren auch andere Modelle zur Erzeugung von Transplantationsvaskulopathie beschrieben. So beschrieb Laden bereits 1971 eine Form der TVP in Slonaker-Grafts die in Wistar-Empfänger transplantiert wurden. Ähnlich dem hier verwendeten Modell, sind auch diese beiden Stämme MHC-kompatibel; ca 50% der Transplantate überlebte mindestens 15 Tage und zeigte fokale intimale Schädigung in 10-50% der untersuchten Arterien (Laden 1971). Cramer et al. untersuchten eine ganze Reihe verschiedener Rattenstämme, die sich ebenfalls bezüglich weniger nicht-MHC-Antigene, bei MHC-Kompatibilität, unterschieden. Sie beschrieben das Auftreten von milder bis moderater intimaler Proliferation in den Arterien der Allografts (Cramer 1989).

Andere Gruppen beschrieben die Transplantatvaskulopathie in Transplantationsmodellen bei denen Allografts zwischen MHC-inkompatiblen Inzuchtstämmen ausgetauscht wurden. Cyclosporin A wurde hierbei ebenfalls als zur Immunsuppression appliziert, vor allem um akuter Abstoßung zu begegnen. Die Ergebnisse zeigten auch hier eine Form der Transplantatvaskulopathie bei den langzeitüberlebenden Grafts (Lurie 1981, Sarris 1989).

2. Material und Methoden

2.1 Studienbeschreibung

In der nachfolgenden tierexperimentellen Studie wurden 120 Ratten nach Herztransplantation unter Immunsuppression mit Ciclosporin A über einen Zeitraum von 80 Tagen in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität beobachtet. Als Empfänger wurden männliche Fisher 344-Ratten und als Spender männliche Lewis-Ratten verwendet, die von der Firma Harlan-Winkelmann in Borcheln, Deutschland bezogen wurden.

Die Transplantation erfolgte heterotop in das Abdomen in Anlehnung an das beschriebene Verfahren von Ono und Lindsey (Ono und Lindsey 1969). Die Genehmigung des Versuches erfolgte durch das Regierungspräsidium Darmstadt. Die Tiere wurden in vollklimatisierten Räumen bei festem Tag-Nacht-Rhythmus in Stahlkäfigen untergebracht und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.2 Transplantationsmodell

Das Lewis auf Fisher-344 Transplantationsmodell stellt ein gut evaluiertes und zuverlässiges Modell zur Erforschung der Transplantatvaskulopathie dar. Es findet weltweit Verwendung und lässt sich aufgrund der guten kommerziellen Verfügbarkeit der beteiligten Rattenstämme problemlos durchführen. Es hat den Vorteil, dass sich Veränderungen, wie z.B. die Transplantatvaskulopathie, in deutlich kürzeren Zeiträumen herbeiführen lassen als dies in der Klinik der Fall ist. Die hier angesetzte Studiendauer von 80 Tagen entspricht ebenfalls dem internationalen Standard. Das Modell findet nicht nur in der experimentellen Herztransplantation sondern darüber hinaus auch z.B. in der Lungen-, Leber- und Nierentransplantation Verwendung.

Die beteiligten Rattenstämme stimmen in Klasse I und II Antigenen überein, und unterscheiden sich hinsichtlich multipler nicht-Major-Histokompatibilitätsantigene (Adams 1992, Liebert 1982).

Es wurden von verschiedenen Autoren auch andere Modelle zur Erzeugung von Transplantationsvaskulopathie beschrieben. So beschrieb Laden bereits 1971 eine Form der TVP in Slonaker-Grafts die in Wistar-Empfänger transplantiert wurden. Ähnlich dem hier verwendeten Modell, sind auch diese beiden Stämme MHC-kompatibel; ca 50% der

Transplantate überlebte mindestens 15 Tage und zeigte fokale intimale Schädigung in 10-50% der untersuchten Arterien (Laden 1971). Cramer et al. untersuchten verschiedene Rattenstämme, die sich ebenfalls bezüglich weniger nicht-MHC-Antigene, bei MHC-Kompatibilität, unterschieden. Sie beschrieben das Auftreten von milder bis moderater intimaler Proliferation in den Arterien der Allografts (Cramer 1989).

Andere Gruppen beschrieben die Transplantatvaskulopathie in Transplantationsmodellen bei denen Allografts zwischen MHC-inkompatiblen Inzuchtstämmen ausgetauscht wurden. Cyclosporin A wurde hierbei ebenfalls als zur Immunsuppression appliziert, vor allem um die akute Abstoßung zu unterdrücken. Die Ergebnisse zeigten auch hier eine Form der Transplantatvaskulopathie bei den langzeitüberlebenden Grafts (Lurie 1981, Sarris 1989).

In aktuellen Publikationen im Bereich der Transplantationsmedizin wird ebenfalls das Lewis-Fisher-344-Modell verwendet (Simonson 2002, Denton 2004, Wiebe 2005)

2.2.1 Narkose

Die Narkose der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg KG Nembutal (Phenobarbital). Die Tiere wurden anschließend in einen abgedunkelten Käfig gesetzt; die Wirkung der Narkose setzte ca. 5 min post injectionem ein.

2.2.2 Vorbereitung des Empfängers

Um die Ischämiezeit des Transplantats zu vermindern, wird zuerst der Empfänger vorbereitet. Nach medianer Laparotomie wird die infrarenale Region der Aorta und Vena cava inferior

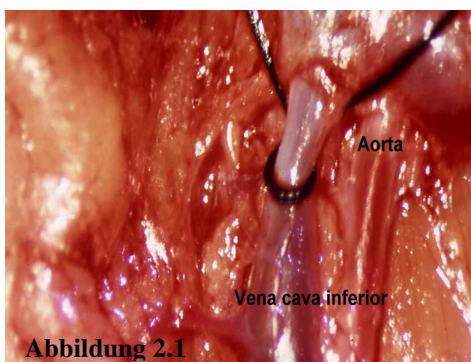


Abbildung 2.1

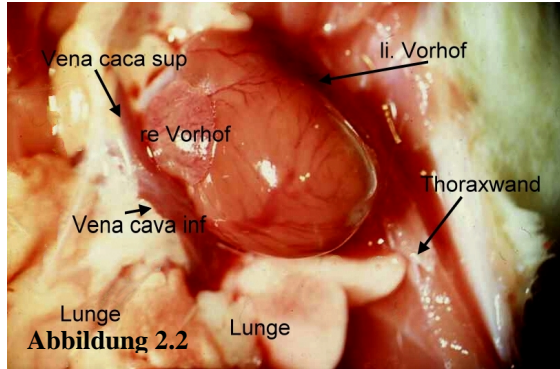
dargestellt. Die Aorta wird dann mit zwei Mikroclips verschlossen; einer wird knapp unterhalb des Abgangs der Nierenarterien platziert, der andere distal davon, so dass ein mindestens 2 cm großes Areal entsteht, um die Aorten Anastomose durchführen zu können. Anschließend wird die Aorta mit einem Mikromesser auf einer Länge inzidiert, die

dem Lumen der Spenderarterie entspricht.

Nach Abschluss der Präparation der Empfängeraorta, wird die Abdominalhöhle noch mit ca. 8 ml NaCl-Lösung ohne Heparin gewaschen. Die Bauchhöhle wird mit feuchtem Zellstoff abgedeckt bevor nun das Spenderherz präpariert wird.

2.2.3. Explantation

Nach medianer Laparatomie wird die infrarenale Aorta durchtrennt, was zu einem Ausbluten des Empfängers führt. Anschließend wird die Thoraxwand durch diagonale Schnitte vom

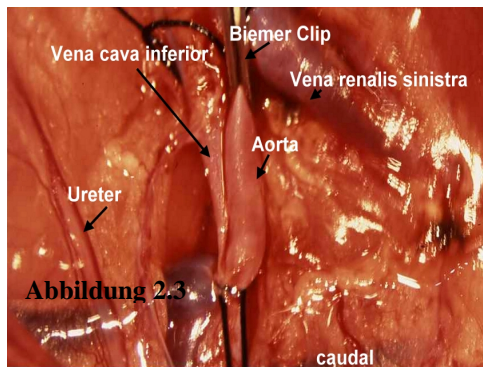


Xyphoid, zunächst zur rechten Fossa axillaris, und anschließend vorsichtig, um Verletzungen des Perikards zu vermeiden, zur linken Fossa axillaris eröffnet. Die komplette Thoraxwand wird angehoben und mit einer Schere abgesetzt. Nach Lösung des Perikards werden ca. 10 bis 20 ml kaltes NaCl, die 200 IE Heparin enthalten,

durch die Vena cava inferior injiziert. Nach Ligatur der beiden oberen Hohlvenen und der unteren Hohlvene wird der Aortenbogen stumpf präpariert. Die Aorta wird proximal des Abganges des Truncus brachiocephalicus abgesetzt. Die Arteria pulmonalis wird ebenfalls präpariert und kurz vor der Aufteilung in rechte und linke Arteria pulmonalis durchtrennt. Das Herz wird nun angehoben, so dass die Lungenvenen gemeinsam mit einer einzigen Ligatur unterbunden werden können. Das Herz wird direkt nach dieser Massenligatur abgesetzt und sofort mit kalter Kochsalzlösung antegrad durchspült, um eventuell vorhandene Thromben zu entfernen. Das Spenderherz wird bis zur Implantation in kalter Kochsalzlösung aufbewahrt.

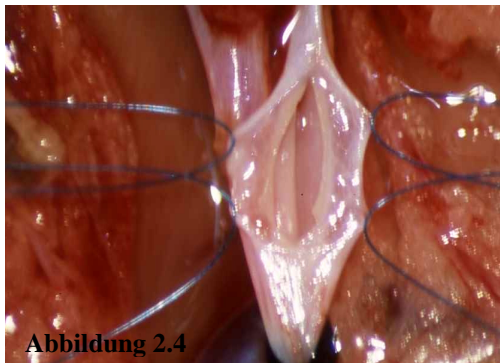
2.2.4. Implantation

Verfahren der Wahl ist eine Herztransplantation mit End-zu-Seit-Anastomose an die großen Bauchgefäße. Für die Transplantation wird beim Empfängertier nach medialer Hautinzision über dem Abdomen die infrarenale Region der Aorta und Vena cava inferior präpariert. Die Aorta wird dabei sorgfältig von der Vena cava inferior präpariert. Nach Anlegen von 2 Clips knapp unterhalb und 1 cm distal des Abganges der Nierenarterien wird die Vorderwand der Aorta mit einer Mikroschere auf einer Länge inzidiert, die dem Lumen der Spenderarterie entspricht. Nach Ausspülen des Aortensegmentes und der Spenderaorta am Transplantat mit Heparin-Ringerlactatlösung wird das Herz so in das Abdomen eingebracht, dass der Stumpf der A. pulmonalis nach rechts lateral und kaudal ohne Verdrehung für eine spannungslose End-zu-Seit-Anastomose an die Vena cava inferior zu liegen kommt.



Nach Anlegen der unteren und der oberen Ecknaht als Einzelknopfnahnt wird von dort die Vorderwand in fortlaufender evertierender Nahttechnik genäht. Dann wird das Transplantat über die Wirbelsäule nach links lateral gelegt, so dass die Hinterwand der arteriellen Anastomose freiliegt, und es wird, ebenfalls in evertierender Nahttechnik, von kranial nach kaudal genäht. Die beiden Fäden werden kaudal miteinander verknüpft.

Bei linksliegendem Transplantat wird die Vena cava inferior angeklemt und inzidiert, wobei



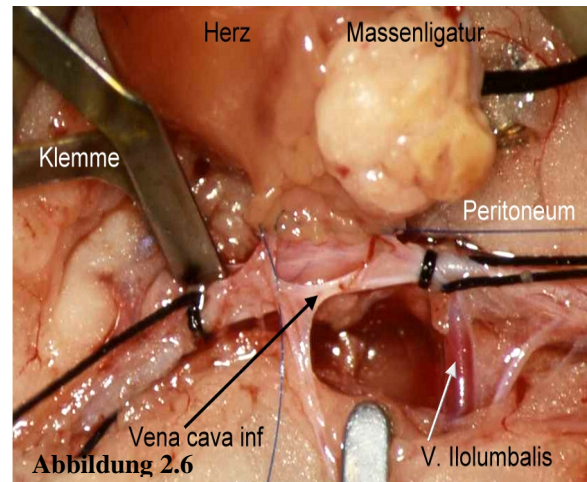
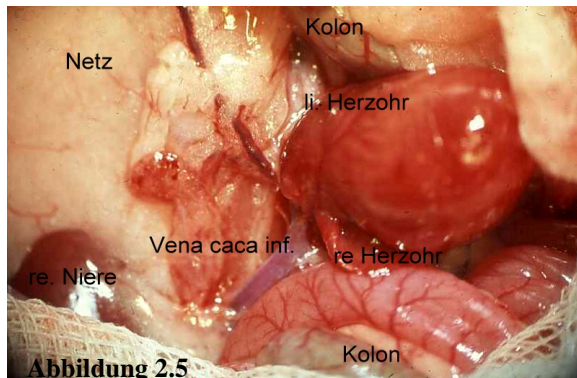
der Schnitt links lateral angelegt wird. Die Arteria pulmonalis wird bis zur eindeutigen Darstellung der Lumina angespült, so dass die erste untere Ecknaht in Einzelknopftechnik erfolgen kann. Anschließend wird die obere Ecknaht angelegt, so dass die Hinterwand unter Spannung und kürzer als die Vorderwand genäht werden kann. Dadurch kommt

die Anastomose ideal zur Darstellung. Zur Naht der Vorderwand wird das Transplantat erneut nach rechts umgelagert und in fortlaufender Nahttechnik von kranial nach kaudal genäht. Für die arterielle Anastomose empfiehlt sich 8-0 Nylon, für die venöse Anastomose 9-0 oder 10-0.

Abschluss der Transplantation

Nach Anschluss der Gefäße wird das Transplantat mit warmer Kochsalzlösung benetzt, eine Unterbrechung des Kammerflimmerns, das initial fast immer eintritt, ist durch die einfache Kompression des Transplantates mit einem Watteträger zu erreichen. Normalerweise beginnt ein Transplantat nach einer Ischämiezeit von 30 min bei idealen Entnahmebedingungen innerhalb von 2 Minuten mit einer regelmäßigen Aktion, zunächst bradykard, später mit einer Frequenz zwischen 100 und 200 Schlägen/min, zu schlagen. Zum Abschluss der Operation wird das Omentum majus über die retroperitoneale Wunde gelegt und das Abdomen mit warmer Kochsalzlösung gespült um Thromben zu entfernen und den intraoperativen Volumenverlust durch Verdunstung auszugleichen. Die Bauchdecke wird in fortlaufender Naht mit 4.0 Ethibond verschlossen, die Hautnaht erfolgt in Einzelknopftechnik mit monofilem Nylon (4.0). Die erste Dosis CSA wird noch auf dem Operationstisch appliziert.

Den Tieren wurde abschließend zur Identifikation eine mit einer Nummer versehene Marke ins Ohr appliziert. Die Entfernung des Nahtmaterials erfolgt am 12. postoperativen Tag.



Die Abbildungen zeigen den Situs nach Abschluss der Transplantation

2.3. Postoperatives Monitoring

2.3.1. Herzpalpation, Gewichtsverläufe und Trinkmengen

Unmittelbar nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Empfänger in ihre Stahlkäfige, die mit Rattenstreu und Rattenfutter sowie Leitungswasser ad libitum ausgestattet waren, verbracht. Sie wurden in einem Raum in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums der Johann-Wolfgang-Goethe Universität gehalten, in dem ein Tag-Nacht-Zyklus simuliert wurde. Die Tiere wurden alle 24 Stunden, jeweils zur gleichen Uhrzeit, versorgt. Die Trinkmenge wurde in ml bestimmt. Das Trinkwasser wurde täglich ausgetauscht, des Weiteren wurden alle 5 Tage die Trinkbehälter ausgetauscht, um Infektionen vorzubeugen. Es wurde der Allgemeinzustand der Tiere bestimmt. Das Transplantat wurde täglich palpiert und quantitativ auf seine Funktion hin beurteilt. Hierfür galt folgender Score:

3 = Sehr gute Herzaktion

2 = Mittlere Herzaktion

1 = Schlechte Herzaktion

0 = Herzstillstand

Alle drei Tage wurde das Gewicht der Tiere mit Hilfe einer geeichten Standardwaage auf 5 g genau bestimmt.

2.3.2. Medikamentenansatz und Applikation

Den Tieren wurde noch während der Operation, kurz vor der Bauchdeckennaht, die entsprechende Dosis CSA von 3 mg/kg KG bzw. 12 mg/kg /KG bzw. Kochsalzlösung (Leergruppe) zur intraperitonealen Resorption in den offenen Bauch injiziert.

Anschließend wurde ihnen täglich in NaCl gelöstes Ciclosporin A in den entsprechenden Dosierungen von 3 mg/kg KG bzw. 12 mg/kg subkutan in den Nacken injiziert.

2.4. Studiengruppen

Die Gesamtzahl der transplantierten Tiere betrug 120. Nach Transplantation wurden die Tiere in drei Studiengruppen randomisiert; in eine Kontrollgruppe mit 20 Tieren sowie eine 3mg-Gruppe und eine 12mg-Gruppe mit jeweils 50 Tieren.

Die Studiendauer betrug 80 Tage. Es wurden jedoch bereits nach 20 Tagen 15 Tiere, nach 40 Tagen 25 Tiere und nach 60 Tagen weitere 35 Tiere sakrifiziert. Die restlichen 45 Tiere wurden am Tag 80 explantiert. Es wurde zum Zeitpunkt der Transplantation bereits randomisiert, um die Tiere der Kontrollgruppe, der 3mg-Gruppe und der 12mg-Gruppe zuordnen zu können.

Nach 20 Tagen wurden die überlebenden Tiere erneut randomisiert, entsprechend wurde bei einigen Tieren die CSA-Therapie beendet, einige Tiere wurden für die Sakrifizierung nach 40 oder 60 Tagen ausgewählt. Gleiches wurde nach 40 und 60 Tagen durchgeführt. Dies geschah nach dem in Tabelle 2.1 ersichtlichen Schema.

Die Studiengruppen bestanden aus jeweils fünf Tieren, die nach folgendem Muster eingeteilt waren (Tabelle 2.1)

Therapiedauer 3mg Gruppe				
Lebensdauer post OP	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
20 Tage	n=5	-	-	-
40 Tage	n=5	n=5	-	-
60 Tage	n=5	n=5	n=5	-
80 Tage	n=5	n=5	n=5	n=5
Therapiedauer 12mg Gruppe				
	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
20 Tage	n=5	-	-	-
40 Tage	n=5	n=5	-	-
60 Tage	n=5	n=5	n=5	-
80 Tage	n=5	n=5	n=5	n=5
Kontrollgruppe (kein CSA)				
	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
20 Tage	n=5	-	-	-
40 Tage	n=5	-	-	-
60 Tage	n=5	-	-	-
80 Tage	n=5	-	-	-

Tabelle 2.1: Studiengruppen

2.5. CSA-Bestimmung

Zur Bestimmung der CSA-Spiegel wurde den Tieren alle 10 Tage in Äthernarkose Blut aus dem retrobulbären Plexus abgenommen. Bei den Tieren, die das CSA abgesetzt bekamen,



Abbildung 2.7

war bereits 10 Tage nach Ende der Therapie kein CSA mehr bestimmbar. Die quantitative CSA-Bestimmung wurde mit Hilfe des Emit[®] 2000 Ciclosporin spezifischen Tests der Firma Syva[®] durchgeführt. Dieser verwendet ein homogenes Enzymimmunoassay-Verfahren zur Bestimmung von Ciclosporin im Vollblut. Er enthält

monoklonale Maus-Antikörper mit hoher Spezifität für Ciclosporin. Der Emit[®] 2000 Ciclosporin-spezifische Test basiert auf der Konkurrenz um die Bindungsstellen der Ciclosporin-Antikörper. Das in der Probe vorhandene Ciclosporin konkurriert mit Ciclosporin in einem Enzymreagenz, das mit dem Enzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH) markiert ist. Das aktive (nicht gebundene) Enzym wandelt das oxidierte Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in einer Antikörperreagenz in NADH um, was zu einer kinetischen Extinktionsänderung führt, die spektralphotometrisch messbar ist. Die Enzymaktivität verringert sich durch die Bindung an den Antikörper, so dass die Ciclosporinkonzentration der Probe anhand der Enzymaktivität gemessen werden kann. Endogene G-6-PDH des Serums

beeinträchtigt das Testergebnis nicht, da das Coenzym NAD nur bei dem im Test eingesetzten bakteriellen (*Leuconostoc mesenteroides*) Enzym wirksam ist.

Vor der Analyse mit dem Emit[®] 2000 Ciclosporin-spezifischen Test werden die Proben, Kalibratoren und Kontrollen mit Methanol vorbehandelt. Methanol lysiert die Zellen, löst das Ciclosporin und scheidet die meisten Blutproteine ab. Danach werden die Proben zentrifugiert, und ein Aliquot des Ciclosporinhaltigen Überstands wird mit Emit[®] 2000 Ciclosporin-spezifischen Verdünnungsmittel verdünnt. Diese Lösung wird dann unter Verwendung zweier Reagenzien auf dem chemischen Analysensystem COBAS MIRA[®], COBAS MIRA S[®] oder COBAS MIRA[®] plus getestet.

Die Bestimmung der CSA-Spiegel erfolgte mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Dr. Scheuermann im Labor des Funktionsbereiches Nephrologie (Ltg. Prof. Dr. Geiger) der Universitätsklinik der Johann-Wolfgang-Universität Frankfurt.

2.5.1. Nierenfunktionslabor

Zur Bestimmung der Nierenfunktion wurden nach Sakrifizierung folgende Parameter untersucht:

Harnstoff, Natrium, Kalium, Chlorid, Glucose, Kalzium, Kreatinin, Phosphat, Osmolarität.

Sie wurden ebenfalls im Labor des Funktionsbereiches Nephrologie (Ltg. Prof. Dr. Geiger) der Universitätsklinik der Johann-Wolfgang-Universität Frankfurt.

untersucht.

2.6. Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit 40 mg / kg KG Nembutal narkotisiert. Nach medianer Laparotomie erfolgte zunächst die Spülung mit ca. 10 bis 20 ml kaltem NaCl, die 200 IE Heparin enthalten, durch die Vena cava inferior. Nach Thorakotomie erfolgte die Durchtrennung der thorakalen Vena cava inferior. Das Blut wurde gesammelt und zur weiteren Untersuchung in das Nierenfunktionslabor transportiert. Anschließend wurde das transplantierte Herz freipäpariert und entnommen. Die entnommenen Herzen wurden halbiert und in Formalin fixiert.

2.7. Histologische Aufarbeitung der Präparate

Die Herzen wurden anschließend in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Schnitte wurden dann auf einen Objektträger aufgebracht und entparaffiniert indem sie drei Mal für jeweils 5 Minuten in Xylol eingelegt wurden.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Präparate auf 2 verschiedene Arten angefärbt.

Zur Untersuchung auf akute Abstoßung wurden die Präparate einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) unterzogen.

1. Einlegen in Hämalan nach Mayer für 10 Minuten
2. Spülen in Aqua dest.
3. Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten
4. Spülen in Aqua dest.
5. Einlegen in Eosin in 0,05%iger Lösung für 7 Minuten
6. Differenzieren in Aqua dest.
7. Einlegen in Alkohollösungen aufsteigender Konzentration(70-96-100 % je 2 mal) je 2 Minuten
8. Spülen in Karbol-Xylol
9. Spülen in Xylol
10. Eindecken mit Eukitt

Die Färbung lässt die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Kollagenfasern rot erscheinen.

Zur Untersuchung der chronischen Abstoßung wurden die Schnitte einer Domagk-Elastica-Färbung unterzogen.

1. Einlegen in Celestin blue-Lösung für 5 Minuten
2. Spülen in Aqua dest.
3. Einlegen in Hämalan nach Mayer für 5 Minuten
4. Spülen in Aqua dest.
5. Differenzieren in 0,5%-gem HCL-Alkohol
6. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
7. Einlegen in Domagk-Lösung für 7 Minuten
8. Spülen in Aqua dest.
9. Differenzieren in 96%igem Alkohol
10. Zweimaliges kurzes Eintauchen in 100%igem Alkohol

11. Einlegen in Xylol drei Mal für jeweils 5 Minuten

12. Eindecken mit Eukitt

Die Färbung lässt die Zellkerne schwarzbraun, das kollagene Bindegewebe leuchtend rot, die Muskulatur intensiv gelb und die Membrana elastica interna schwarz erscheinen.

2.8. Bestimmung der akuten Abstoßungsreaktion nach ISHT (Billingham 1990)

Die nach H.E. gefärbten Präparate wurden anschließend einem Pathologen (OA PD Dr. Hermann, Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Frankfurt) zur Beurteilung der akuten Abstoßung vorgelegt. Nachfolgend die Einteilung, die zur Auswertung der Präparate als Referenz herangezogen wurde (Billingham 1990):

Grad 0 (Keine akute Abstoßung)

Grad 0 wird verwendet, wenn kein Hinweis auf akute Abstoßung oder Myozytenschaden besteht. Nicht eindeutige Hinweise auf Abstoßungsreaktionen wurden ebenfalls als Grad 0 bezeichnet.

Grad 1A (Fokale, milde akute Abstoßung)

Grad 1A steht für fokale, perivaskuläre oder interstitielle Infiltrate großer Lymphozyten, die keinen Myozytenschaden anrichten. Ein oder mehrere Biopsate können betroffen sein.

Grad 1B (Diffuse, milde akute Abstoßung)

Grad 1B repräsentiert mehr diffuse perivaskuläre oder interstitielle oder kombinierte Infiltrate großer Lymphozyten, ebenfalls ohne Myozytenschaden. Ein oder mehrere Biopsate können betroffen sein.

Grad 2 (Fokale, moderate akute Abstoßung)

Grad 2 wird verwendet, wenn nur ein Fokus entzündlicher Infiltrate (Große aggressive Lymphozyten mit oder ohne Eosinophile) zu entdecken ist, welcher scharf abgegrenzt ist. Architektonische Beeinträchtigung mit Myozytolyse sollte im Solitärfokus präsent sein.

Grad 3A (Multifokale moderate Abstoßung)

Grad 3A repräsentiert multifokale inflammatorische Infiltrate, die aus großen aggressiven Lymphozyten mit oder ohne Eosinophile bestehen. Diese Infiltrate können in einem oder mehreren Biopsaten bestehen. Eine Myozytolyse ist vorhanden.

Grad 3B (Diffuse, grenzwertige schwere akute Abstoßung)

Grad 3B repräsentiert einen diffusen inflammatorischen Prozess in mehreren der Biopsate. Eine Myozytolyse ist vorhanden, wie auch ein aggressives inflammatorisches Infiltrat großer Lymphozyten und Eosinophiler, teilweise auch mit Neutrophilen. Hämorrhagien sind normalerweise nicht vorhanden.

Grad 4 (Schwere akute Abstoßung)

Grad 4 repräsentiert ein diffuses aggressives polymorphes Infiltrat welches aggressive Lymphozyten, Eosinophile und Neutrophile beinhaltet. Myozytäre Nekrosen and Schäden sind immer vorhanden. Ödeme, Hämorrhagien und Vaskulitis sind normalerweise vorhanden. In einigen Fällen, in denen der Patient aggressiv für einige Zeit immunsuppressiv behandelt wurde, können Ödeme und Hämorrhagien ausgeprägter als das zelluläre Infiltrat sein.

2.9. Morphometrie zur Bestimmung der neointimalen Proliferation

Die Beurteilung einer chronischen Abstoßung wurde an den nach Domagk-Elastica gefärbten Präparaten durchgeführt. Die einzelnen Schnitte wurden mit Hilfe von computergestützter digitaler Morphometrie ausgewertet. Hierzu wurde ein KS 300 System (Contron, Deutschland) mit einem Zeiss Axioplan-Mikroskop (Zeiss Deutschland) verwendet.

Das Oberflächenareal der arteriellen Intima, Media und des Restlumens wurden mit der o.g.



Abbildung 2.8

Methode vermessen. Gefäße im Zentrum fibrotischer Areale oder unmittelbar fibrösem Narbengewebe anliegende Gefäße wurden von der Studie ausgeschlossen. Ebenso ausgeschlossen wurden Gefäße, die diagonal angeschnitten waren, um Fehler in der Bestimmung der neointimalen Auflagerung zu vermeiden.

Die ausgemessenen Gefäße wurden zur Unterscheidung zwischen intramyokardialen Gefäßen und epikardialen Gefäßen und zur weitergehenden statistischen Auswertung in kleine und große Gefäße unterteilt. Kleine Gefäße wurden hier als Gefäße mit einem Durchmesser von bis zu 50 µm (intramyokardiale Gefäße) definiert, große Gefäße als Gefäße mit einem Durchmesser von mehr als 50 µm (epikardiale Gefäße).

Anschließend wurde der prozentuale Verschluss des ehemaligen Lumens durch die Neointima mit Hilfe der Formel

$$A \text{ neointima} / (A \text{ neointima} + A \text{ restlumen}) \times 100$$

bestimmt (A=Fläche).

2.9.1. Inzidenzbestimmung

Als weiterer Parameter zur Grundlage der statistischen Auswertung wurde die Inzidenz der chronischen Abstoßung ermittelt. Hierzu wurde die Anzahl der ausgewerteten befallenen Gefäße durch die Gesamtzahl der ausgewerteten Gefäße geteilt und mit 100 multipliziert. Das Ergebnis ist als die Inzidenz der chronischen Abstoßung definiert.

$$\text{Inzidenz} = (\text{Befallene Gefäße} / \text{Alle Gefäße}) \times 100$$

2.10. Statistische Analyse und Nullhypothesen

Zur Erfassung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Insgesamt wurden 2158 Gefäße in die Auswertung einbezogen.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms "WinBias V.7.01" von Hanns Ackermann, erschienen im Epsilon-Verlag, vorgenommen.

Für die Studie wurde verschiedene Nullhypothesen (H_0) formuliert.

1. Ein höherer Grad akuter Abstoßung führt zu einer vermehrten Transplantatvaskulopathie
2. Höhere Dosierungen und ein höherer CSA-Spiegel führen zu einer Zunahme der TVP-Inzidenz
3. Höhere CSA-Spiegel führen zur Zunahme der TVP in intramyokardialen und epikardialen Arterien (gemessen als MVO; mean vessel occlusion)
4. Höhere CSA-Spiegel unterdrücken suffizient die akute Abstoßungsreaktion verglichen mit niedrigeren CSA-Spiegeln

3. Ergebnisse

3.1. Nierenfunktionslabor

Die erhobenen Parameter wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz geprüft.

Hier ergab sich aber in keinem Fall ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Werte werden im Einzelnen in einer Tabelle wiedergegeben:

	Kalium(mmol/L)	Harnstoff (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)
Kontrollgruppe	3,9	25	0,5
3mg durchbehandelt	3,6	48	0,8
12 mg durchbehandelt	5,1	21	0,5
p-wert Kontrollgruppe vs.3mg-Gruppe	0,94	0,74	0,23
p-wert Kontrollgruppe vs.12mg-Gruppe	0,26	0,21	0,83
p-wert 3mg-Gruppe vs.12mg-Gruppe	0,23	0,09	0,06

Es ergab sich somit kein Hinweis auf eine Überdosierung von Ciclosporin A mit einer Manifestation beschriebener renaler Nebenwirkungen im Sinne einer Hyperkaliämie oder Kreatininerhöhung, auch bei hohen Ciclosporin-Spiegeln im Blut.

3.2. Palpationsscores

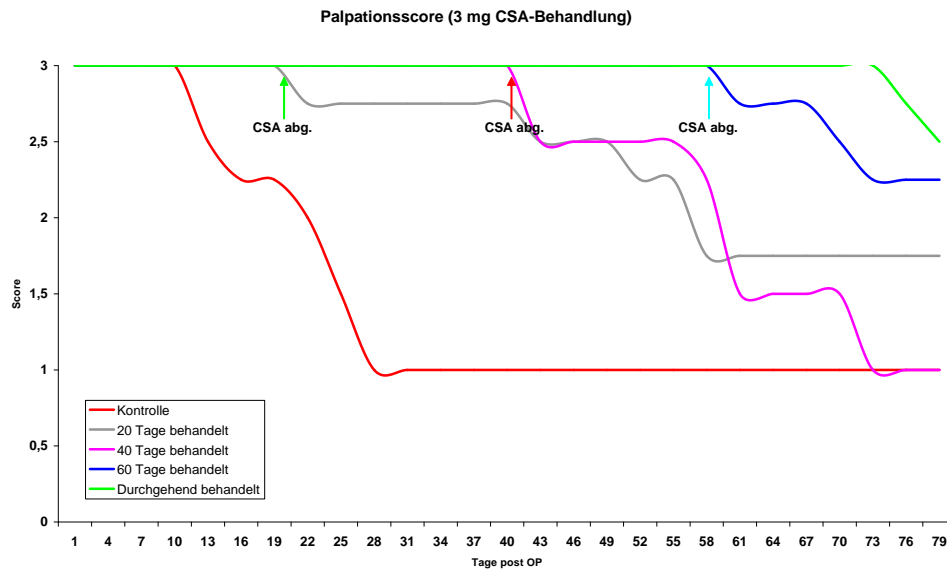
Alle Tiere überlebten bis zum Zeitpunkt der Sakrifizierung.

Die Funktion des Transplantates, die durch tägliche Palpation und qualitative Beurteilung überprüft und dokumentiert wurde, fiel in der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere (rote Linie, Grafik 3.1) auf einen Wert von 1 ab.

Bei durchgehender Behandlung mit 3 mg CSA (grüne Linie) wurde der Palpationsscore mit 3 bis zum post-OP-Tag 70 gemessen und fiel dann leicht auf 2,5 zum Ende der Studiendauer ab. Nach Beendigung der CSA-Behandlung 20, 40 oder 60 Tage post-OP fiel eine deutliche Verschlechterung des Palpationsscores in beiden Gruppen auf.

Grafik 3.1 stellt den Verlauf des Palpationsscores in der mit 3 mg CSA behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere dar. In der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere fiel der Wert nach dem zehnten Tag stetig bis zu einem Wert von 1, welcher für eine gerade noch messbare Herzaktion steht, ab.

Man erkennt weiterhin den Abfall des Palpationsscores in allen Gruppen nach Beendigung der CSA-Therapie.

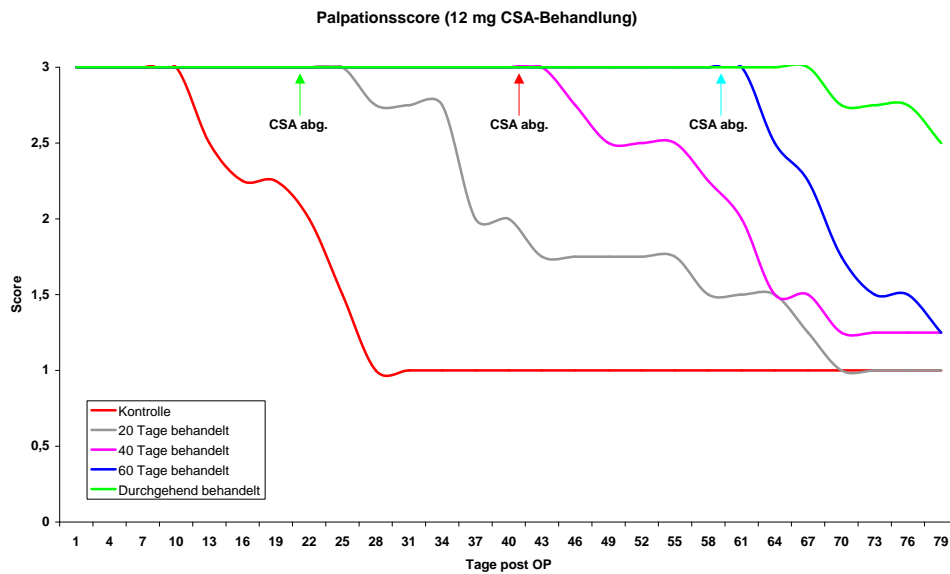


Grafik 3.1 Palpationsscore bei Behandlung mit 3mg CSA

Grafik 3.2 stellt den Verlauf des Palpationsscores in der mit 12 mg CSA behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere dar. In der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere fiel der Wert, wie oben beschrieben, nach dem zehnten Tag stetig bis zu einem Wert von 1, welcher für eine gerade noch messbare Herzaktion steht, ab.

In der Gruppe der durchgehend behandelten Tiere fiel der Wert erst nach 75 Tagen auf einen Wert von 2,5 ab.

Man erkennt den Abfall des Palpationsscores in allen Gruppen nach Beendigung der CSA-Therapie.



Grafik 3.2 Palpationsscore bei Behandlung mit 12mg CSA

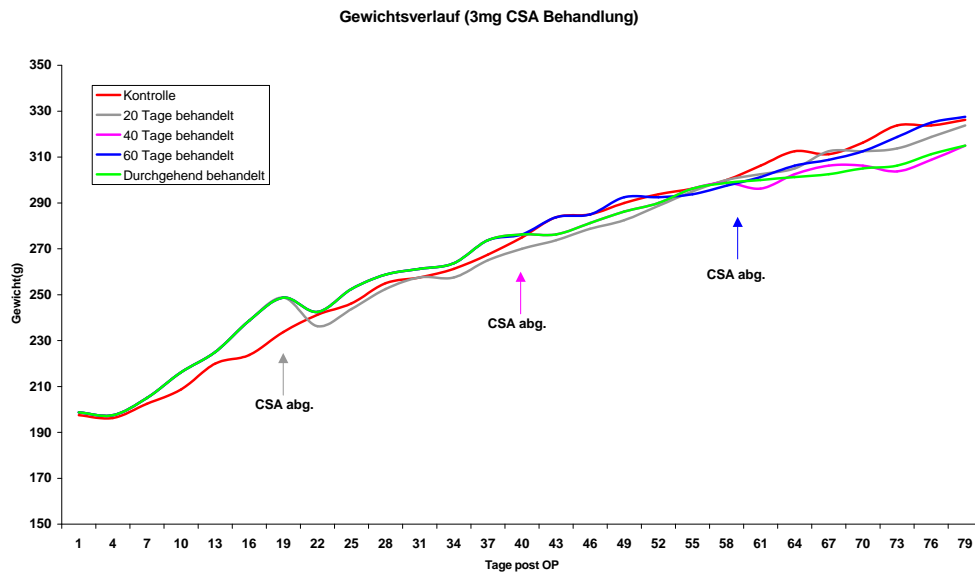
3.3 Gewichtsentwicklung unter CSA

In der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere (rote Linie) wurde mit einem durchschnittlichen Gewicht von $197,5 \pm 2,4\text{g}$ transplantiert. Es wurde eine Gewichtszunahme von $128,7\text{g} \pm 5,5\text{g}$ in 80 Tagen oder $1,6\text{g}$ pro Tag bis zu einem Gewicht von $326,2\text{g} \pm 4,5\text{g}$ festgestellt.

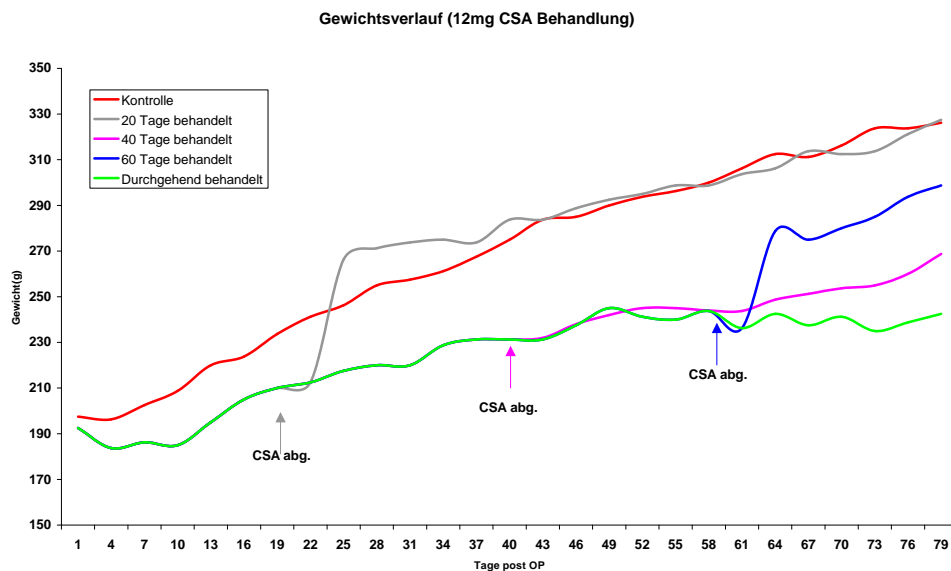
Die Tiere, die durchgehend mit 3mg CSA behandelt wurden (grüne Linie), wurden mit einem durchschnittlichen Gewicht von $198,7\text{g} \pm 3,5\text{g}$ transplantiert. Die Gewichtszunahme betrug $116\text{g} \pm 4,6\text{g}$ bis Tag 80 oder $1,45\text{g}$ pro Tag bis zu einem Endgewicht von $315\text{g} \pm 4,4\text{g}$.

Die Gewichtszunahme war in der 3mg -Gruppe nicht beeinträchtigt ($p > 0,05$).

In der 12mg -Gruppe erreichten die Tiere lediglich eine Gewichtszunahme von insgesamt 50g oder $0,625\text{g}$ pro Tag resultierend in einem Endgewicht von $242\text{g} \pm 6,4\text{g}$ ($p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll- und 3mg -Gruppe). Nach Beendigung der 12mg CSA-Behandlung holten die 20 Tage behandelten Tiere (graue Linie) die Gewichtszunahme auf, die 40 (rosafarbene Linie) und 60 (blaue Linie) Tage behandelten Tiere vergrößerten ihre Gewichtszunahme, blieben aber unter dem zu erwartenden Gewicht ($p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll- und 3mg -Gruppe).



Grafik 3.3: Diese Grafik zeigt, dass das Gewicht in allen Gruppen gleichmäßig über die gesamte Studiendauer anstieg.



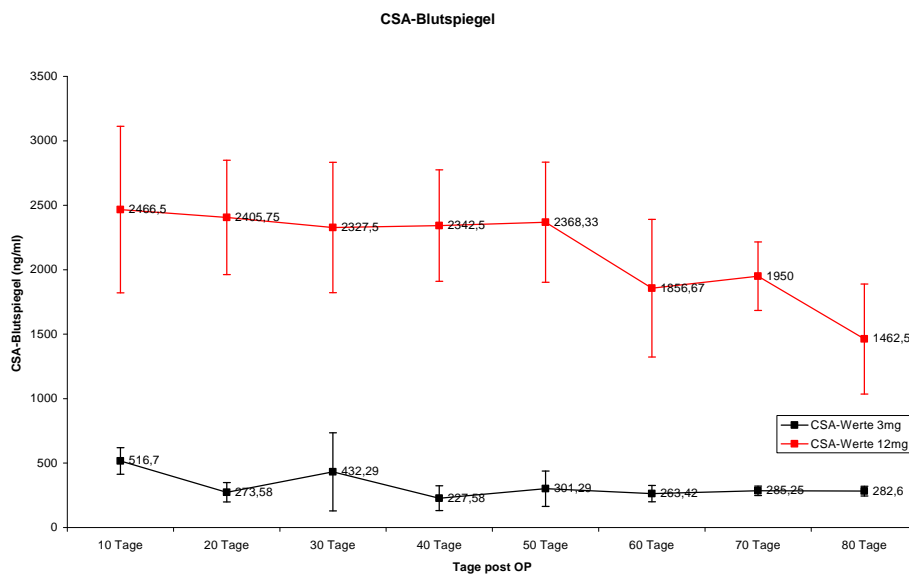
Grafik 3.4: In Grafik 3.4 wird der Unterschied der Gewichtsentwicklung zwischen der Kontrollgruppe und der durchgehend behandelten Gruppe deutlich. Obwohl beide Gruppen annähernd gleiche Ausgangsgewichte hatten, stieg das Gewicht der Tiere der Kontrollgruppe deutlich schneller und stärker an. Nach Absetzen des CSA erholten sich lediglich die Tiere der 20 Tage behandelten Gruppe auf das zu erwartende Niveau. Das Gewicht der 60 Tage behandelten Tiere stieg nach Beendigung der CSA-Therapie

zwar stärker an als zuvor, erreichte jedoch nicht das Niveau der unbehandelten Tiere, während der Gewichtsverlauf der 40 Tage behandelten Tiere sich nur geringfügig nach oben veränderte.

3.4 CSA-Blutspiegel

In Grafik 3.5 werden die CSA-Blutspiegel unter 3mg (schwarze Linie) bzw. 12mg (rote Linie) CSA-Behandlung als Mittelwert in ng/ml \pm Standardabweichung dargestellt. Es fallen die 5- bis 10-mal höheren Spiegel in der 12mg-Behandlungsgruppe auf. Die Blutspiegel bewegten sich konstant um einen Mittelwert von $322,83 \pm 98$ ng/ml in der 3mg-Gruppe und 2331 ± 82 ng/ml in der 12mg-Gruppe.

10 Tage nach Ende der Behandlung war kein CSA mehr im Blut nachzuweisen.



Grafik 3.5: Entwicklung der CSA-Blutspiegel

Bei der täglichen Injektion von 3mg/kg KG CSA war der höchste Blutspiegel nach 10 Tagen erreicht, fiel dann zunächst nach 20 Tagen ab, um am Tag 30 wieder anzusteigen und an Tag 40 erneut abzufallen. Nach ca. 60 Tagen war ein stabiler Blutspiegel erreicht.

Bei der täglichen Injektion von 12mg /kg KG CSA stellte sich der höchste Blutspiegel ebenfalls nach 10 Tagen ein, variiert jedoch bis Tag 50 kaum. Am Tag 60 fand ein Abfall statt, der sich nach einer kurzen Erholung an Tag 70 bis zum Studienende fortsetzte.

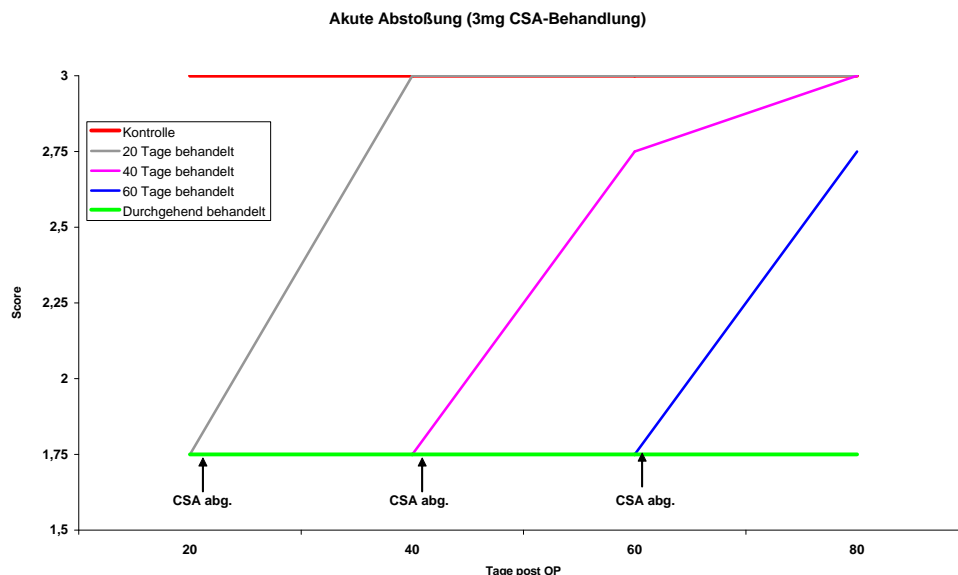
3.5 Akute Abstoßung

In den folgenden Grafiken werden die Mediane der akuten Abstoßung dargestellt. Die unbehandelten Kontrolltiere (rote Linie) hatten einen histologischen Abstoßungsscore von 3 (ISHLT IV) an den histologischen Untersuchungstagen 20, 40, 60 und 80.

Unter kontinuierlicher CSA-Behandlung (grüne Linie), konnte der Abstoßungsscore auf 1,75 (IIa) in der 3mg-Gruppe und auf 2 (IIIa) (1,75 (IIa) an Tag 40) in der 12mg-Gruppe reduziert werden. Nach Beendigung der CSA-Behandlung stieg der Abstoßungsscore in allen Gruppen auf 2,5 und höher an.

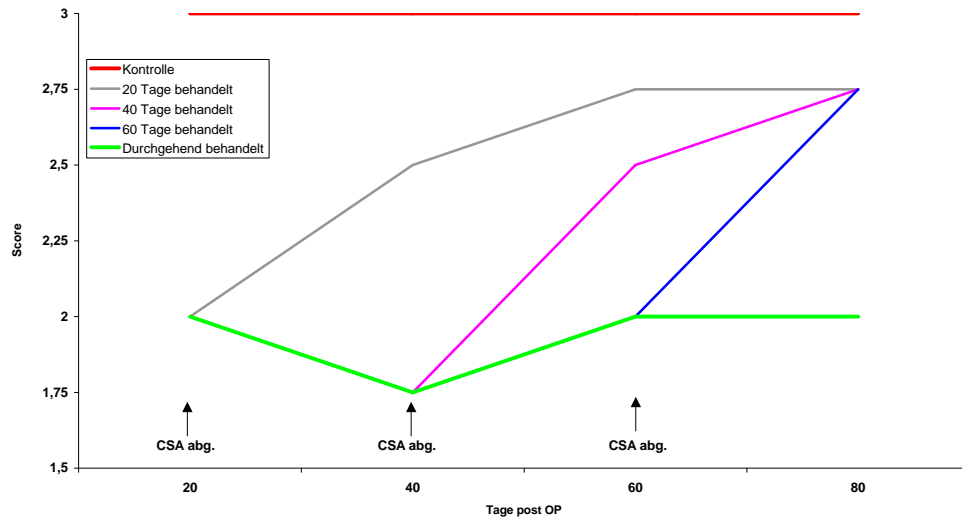
Es fanden sich zu jeder Zeit statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen der durchgehend behandelten Tiere und der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere ($p < 0,05$).

Schon 20 Tage nach dem Ende der Behandlung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden, und am Studienende zeigte sich keine Signifikanz, wenn die Behandlungsdauern von 20 (graue Linie), 40 (rosafarbene Linie) und 60 (blaue Linie) Tagen mit den unbehandelten Kontrolltieren verglichen wurden. Zu keinem Zeitpunkt fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der 3mg-CSA-Behandlungsgruppe und der 12mg-CSA-Behandlungsgruppe ($p > 0,05$).



Grafik 3.6 zeigt, dass die Kontrollgruppenherzen bereits nach 20 Tagen ohne Behandlung akut abgestoßen (ISHLT IV) wurden. Die durchgehend behandelten Herzen blieben bei einem Wert von 1,75 (ISHLT IIa). Die übrigen Herzen stiegen im Score sofort nach Absetzen der Therapie an.

Akute Abstoßung (12mg CSA-Behandlung)



Grafik 3.7 zeigt, dass die durchgehend mit 12 mg behandelten Herzen nach 20, 60 und 80 Tagen bei einem Wert von 2 (ISHLT IIIa) lagen. Hier stieg der Score ebenfalls nach Beendigung der Therapie an.

3.6. Transplantatvaskulopathie (Neointimale Proliferation)

3.6.1 Chronische Abstoßung intramyokardialer Arterien unter verschiedenen CSA-Dosierungen

3.6.1.1 3mg Cyclosporin A

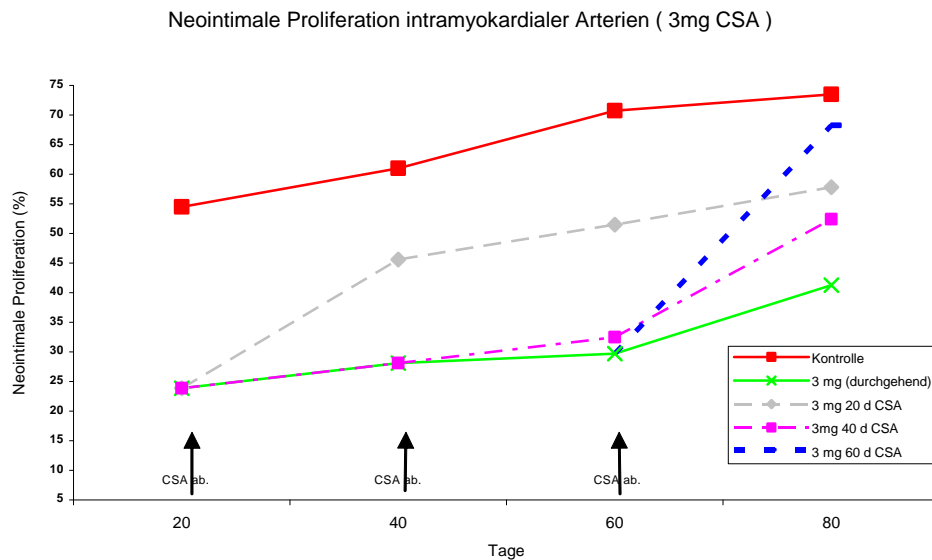
In der unbehandelten Kontrollgruppe wurde 20 Tage nach Transplantation die mittlere luminale Stenose mit 54,5% bestimmt (Grafik 3.8; rote Linie). Von diesem Wert ausgehend stieg die mittlere luminale Stenose im Verlauf der Studie an und erreichte am Tage 80 mit $73,5\% \pm 9,48\%$ den Höchstwert.

Eine kontinuierliche Therapie mit 3 mg CSA/kg/Tag verringerte signifikant die mittlere luminale Stenose am Tag 20 auf $23,86\% \pm 7,6\%$ ($p < 0,05$ versus Kontrolle) sowie im weiteren Zeitverlauf. Am Tag 40 betrug die Stenose $28,1\% \pm 5,14\%$ und am Tag 60 betrug die Stenose $29,7\% \pm 16\%$. Am Tag 80 wurde eine mittlere Stenose von $41,27\% \pm 11\%$ gemessen. Die Transplantatvaskulopathie wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine durchgehende Therapie mit 3 mg CsA signifikant reduziert ($p < 0,05$).

Das Absetzen der CSA Behandlung am Tage 20 (graue Linie) führte zum Anstieg der mittleren Gefäßstenose im weiteren Studienverlauf. Am Tag 40 wurde die mittlere Gefäßstenose mit $45,6\% \pm 9,3\%$, am Tag 60 mit $51,5\% \pm 14,6\%$ und 80 Tage nach Transplantation mit $57,8 \pm 16,2\%$ bestimmt. Im Vergleich zu der durchbehandelten CSA Gruppe zeigte sich an den Tagen 40, 60 und 80 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Zur unbehandelten Versuchsgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Nach einer 40tägigen Behandlungsdauer mit 3 mg CsA (rosafarbene Linie) betrug die mittlere luminale Stenose $28,1\% \pm 5,1\%$. Nach Absetzen der Therapie am Tag 40 stieg die mittlere luminale Stenose am Tag 60 auf $32,5\% \pm 10,7\%$ und betrug 80 Tage nach Transplantation $52,4\% \pm 10,2\%$ (Grafik 3.8.: grüne Linie). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich am Tag 60 eine statistisch signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der mittleren luminalen Stenose. Verglichen mit der durchbehandelten Versuchsgruppe zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Am Tag 80, also 40 Tage nach Absetzung der CSA Therapie, zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied.

Nach 60 Tagen CSA Therapie wurde in der 3 mg CSA Gruppe eine mittlere luminale Stenose von $29,7 \% \pm 16,76$ bestimmt. Wurde am Tag 60 die Therapie abgesetzt (blaue Linie), so wurde der mittlere Gefäßverschluss am Tag 80 mit $68,2 \% \pm 8,6$ bestimmt, signifikant höher im Vergleich zur Gruppe der durchgehend mit CSA behandelten Tiere ($p < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied.



Grafik3.8: Die Grafik zeigt, dass das Absetzen der Behandlung mit CSA zu jedem Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg des mittleren Gefäßverschlusses führte. Am Tag 80 der Studie fand sich jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur durchgehend behandelten Gruppe, während der Unterschied zur Kontrollgruppe nicht signifikant ist. Die Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur durchgehend behandelten Gruppe zu jedem bestimmten Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Zur besseren Übersicht sind die in den Grafiken dargestellten Daten jeweils noch einmal in tabellarischer Übersicht zusammengefasst (Mittlere luminale Stenose, Angaben in Prozent)

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	54,5 ± 12,2	61 ± 9,8	70,7 ± 9,4	73,5 ± 9,5
20 Tage	23,9 ± 7,6	45,6 ± 9,3	51,5 ± 14,6	57,8 ± 16,2
40 Tage	-	28,1 ± 5,1	32,5 ± 10,7	52,4 ± 10,2
60 Tage	-	-	29,7 ± 16,8	68,2 ± 8,6
80 Tage	-	-	-	41,3 ± 11

3.6.1.2 12 mg Cyclosporin A

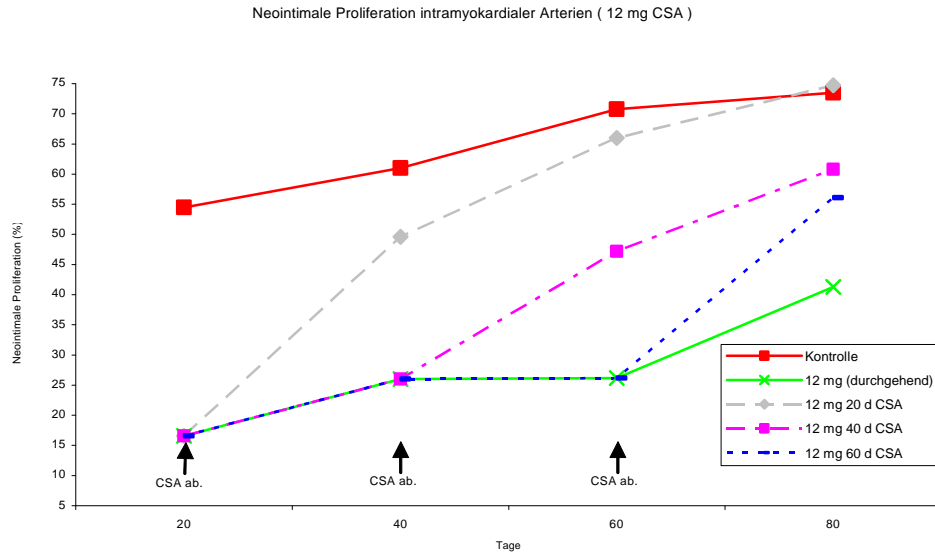
Eine durchgehende 12 mg CSA-Behandlung (rote Linie, Grafik 3.9) reduzierte die mittlere lumenale Stenose in intramyokardialen Arterien auf $16,56\% \pm 7,4\%$ am Tag 20, auf $26,16\% \pm 9,4\%$ am Tag 60, gefolgt von einem Anstieg auf $42,39\% \pm 16,4\%$ am Tag 80. Die Reduktion der mittleren lumenalen Stenose durch 3mg- und 12mg-Therapie war zu jeder Zeit statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (grüne Linie) ($p < 0,05$), die verschiedenen CSA-Regime untereinander zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied an den unterschiedlichen Zeitpunkten.

Das Beenden der 12 mg CSA Therapie am Tag 20 (graue Linie) führte zu einem Anstieg der mittleren lumenalen Stenose auf $49,6\% \pm 6,3\%$ am Tag 40, auf $66\% \pm 8,1\%$ am Tag 60 und auf $74,73\% \pm 11\%$ am Tag 80. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach Absetzung der Therapie.

Wurde die CSA Therapie am Tag 40 beendet, so stieg die mittlere lumenale Stenose von $26,12\% \pm 8\%$ innerhalb der nächsten 20 Tage auf $47,2\% \pm 11,2\%$ an und wurde am Tag 80 mit $60,8\% \pm 12\%$ bestimmt.

Die Werte an den Tagen 60 und 80 unterschieden sich signifikant von denen der durchbehandelten Gruppe. Am 60. Tag war immer noch eine Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt festzustellen. Am Studienende war jedoch kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen.

Eine 60 Tage währende Therapie führte zu einer mittleren lumenalen Stenose von $26,16\% \pm 9,4\%$. Nach Beendigung der 12mg-CSA-Therapie am Tag 60 fand sich eine mittlere Gefäßstenose von $56,1\% \pm 24,1\%$. Verglichen mit der durchbehandelten Gruppe, die hier einen Wert von $42,39\% \pm 16,39$ aufwies, ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Am Tag 80 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der 60 Tage behandelten Tiere verglichen mit den unbehandelten Tieren ($60,8\% \pm 9,8$) ($p > 0,45$).



Die Grafik 3.9 zeigt die mittlere luminal Stenose in intramyokardialen Gefäßen für unbehandelte Tiere (rot) und für Tiere, die eine dauerhafte 12 mg CSA Therapie erhielten. Die CSA Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der mittleren luminalen Stenose verglichen zu unbehandelten Tieren ($p < 0,05$). Wurde die CSA Therapie am Tag 20, 40 oder 60 unterbrochen, so zeigten die mittleren luminalen Stenosen am Tag 80 in den einzelnen Gruppen keinen signifikanten Unterschied verglichen zur unbehandelten Versuchsgruppe.

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	54,5 ± 12,2	61 ± 9,8	70,7 ± 9,4	73,5 ± 9,5
20 Tage	16,6 ± 7,4	49,6 ± 6,3	66 ± 8,1	74,7 ± 11
40 Tage	-	26,1 ± 8	47,2 ± 11,2	60,8 ± 12
60 Tage	-	-	26,2 ± 9,4	56,1 ± 24,1
80 Tage	-	-	-	42,4 ± 16,4

3.6.2 Transplantatvaskulopathie in epikardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen

3.6.2.1 3 mg Cyclosporin A

In der unbehandelten Kontrollgruppe wurde die mittlere lumenale Stenose am Tag 20, 40, 60 und 80 mit $48,75\% \pm 11,2\%$, $62,6\% \pm 12,5\%$, $64,88\% \pm 12,14\%$, bzw. mit $69,12\% \pm 13,4\%$ bestimmt (Grafik 3.10).

Eine kontinuierliche Therapie mit 3mg CSA/kg KG/Tag (grüne Linie), verringerte die mittlere lumenale Stenose signifikant auf $13,25\% \pm 9\%$ an Tag 20 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($p < 0,05$). Es konnte ein leichter Anstieg der mittleren lumenalen Stenose in der durchgehend mit 3mg CSA behandelten Gruppe beobachtet werden. Am Tag 80 nach Transplantation wurde die mittlere Stenosierung mit $29,7\% \pm 8,5\%$ gemessen. Zu jedem Zeitpunkt der Studie ließ sich eine signifikante Reduktion der neointimalen Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe finden ($p < 0,05$).

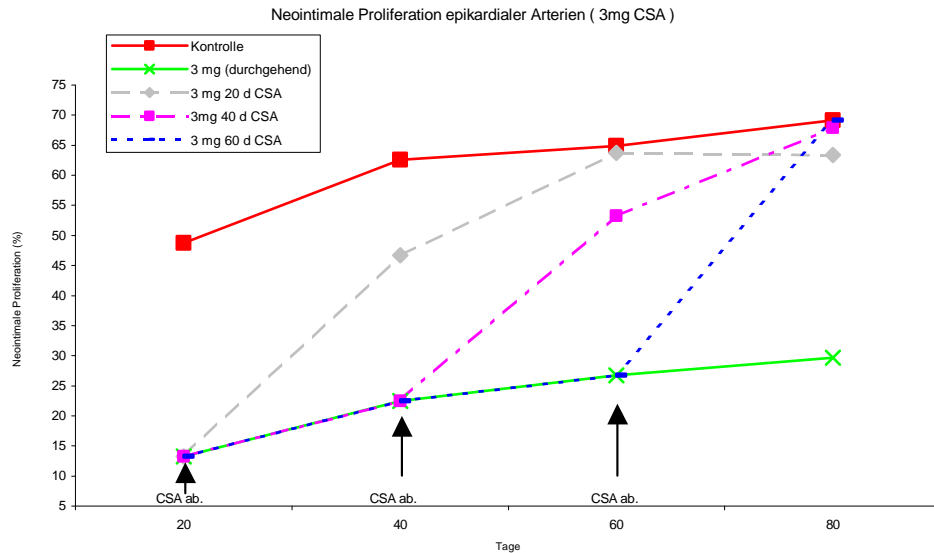
Nach Beendigung der 3mg-CSA-Therapie am 20sten Tag (graue Linie) zeigte sich eine Zunahme der mittleren lumenalen Stenose. Hier führte die neointimale Proliferation bis zum Tag 60 zu einer mittleren Lumenstenose von $64,9\% \pm 8,2\%$ ($p > 0,05$) und auch am Studienende zeigte sich keine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 80: $63,4\% \pm 6,3\%$; $p > 0,05$).

Die Behandlung mit 3 mg CSA/kg KG/D führt nach dem Ende der Therapie am Tag 40 (rosafarbene Linie) zu einem Anstieg neointimaler Proliferation an den Tagen 60 und 80 verglichen mit den kontinuierlich behandelten Tieren der Kontrollgruppe (Grafik).

In der mit 3mg CSA behandelten Gruppe zeigte sich ein Anstieg von $22,5\% \pm 8,5\%$ an Tag 40 auf $53,3\% \pm 10\%$ an Tag 60 und auf $67,28\% \pm 5,6\%$ an Tag 80. Die Werte zeigen keine statistisch signifikante Differenz zu den unbehandelten Kontrolltieren an den Tagen 60 und 80 ($p > 0,05$).

Die Beendigung der CSA-Therapie an Tag 60 (blaue Linie) führte bei den epikardialen Arterien ebenfalls zu einem rapiden Anstieg des Ausmaßes der mittleren lumenalen Stenose bis zum Studienende an Tag 80.

In der mit 3mg CSA behandelten Gruppe zeigte sich nach Beendigung der Therapie am Tag 60 ein Anstieg von $26,7\% \pm 8,4\%$ am Tag 60 auf $69,16\% \pm 12,3\%$ am Tag 80. Dieses Stenoseausmass unterschied sich nicht signifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe am Tag 80 ($73,5\% \pm 9,48\%$, $p > 0,05$).



Grafik 3.10: In der Grafik wird deutlich, dass die Beendigung der CSA-Therapie zu einem Anstieg der mittleren luminalen Stenose auf das Niveau der unbehandelten Tiere führte. Am Studienende war kein signifikanter Unterschied der nur begrenzt behandelten Tiere zu den unbehandelten Kontrolltieren nachzuweisen. Der Unterschied zu den durchgehend behandelten Tieren war jedoch signifikant. Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant voneinander.

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	48,8 ± 11,2	62,6 ± 12,5	64,9 ± 12,1	69,1 ± 13,4
20 Tage	13,3 ± 9	46,7 ± 6,7	64,9 ± 8,2	63,4 ± 6,3
40 Tage	-	22,5 ± 8,5	53,3 ± 10	67,3 ± 5,6
60 Tage	-	-	26,7 ± 8,4	69,2 ± 12,3
80 Tage	-	-	-	29,7 ± 8,5

3.6.2.2 12 mg Cyclosporin A

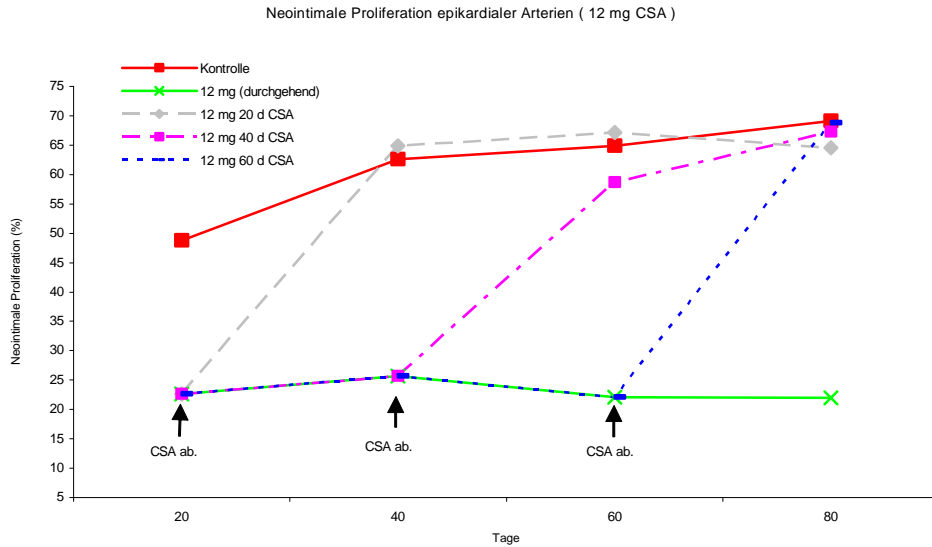
Die Therapie mit 12mg CSA führte nach 20, 40, 60 und 80 Tagen zu einer mittleren luminalen Stenose durch neointimale Proliferation von 22,63%, 25,7%, 22,1% und 22%.

Zu jedem dieser Zeitpunkte war das Stenoseausmass signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe (p jeweils <0,05). Im Vergleich zur mit 3mg CSA behandelten Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p jeweils >0,5).

Das Absetzen der Therapie nach 20 Tagen (graue Linie) führt zu einer Zunahme der mittleren luminalen Stenose bis zum Tag 60 auf $67,18 \% \pm 8,9 \%$ gegenüber einem Wert von $64,88 \% \pm 12,1 \%$ in der Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere. Nach 80 Tagen zeigt sich in der Gruppe, in der die Therapie nach 20 Tagen beendet wurde, eine mittlere luminal Stenose von $64,58 \pm 25,9$. Auch dieser Wert unterscheidet sich nicht mehr von der Kontrollgruppe ($69,12 \pm 13,4$, $p > 0,05$).

Die Beendigung der Therapie nach 40 Tagen führte zu einem Anstieg der mittleren luminalen Stenose auf $58,66\% \pm 15\%$ an Tag 60 und auf $67,9\% \pm 14\%$ an Tag 80. Hier zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Tieren an den Tagen 60 ($64,88 \% \pm 12,1$) und 80 ($69,1 \% \pm 13,4 \%$) (p jeweils >0,05).

Auch nach Beendigung der Therapie an Tag 60 ließ sich ein Anstieg der mittleren luminalen Stenose feststellen. Die Stenose durch neointimale Proliferation stieg von $22,13\% \pm 8,5\%$ am Tag 60 auf $68,76\% \pm 18,79 \%$ am Tag 80 an. Wieder zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren, die Werte von $64,88 \% \pm 12,1 \%$ an Tag 60 und $69,1 \% \pm 13,4 \%$ an Tag 80 aufwiesen, aber ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den mit 12mg CSA/kg KG/d durchgehend behandelten Tieren ($22,13 \% \pm 8,5$ an Tag 60 sowie $21,99 \pm 8,16$ an Tag 80, p jeweils <0,05). Zwischen der Gruppe, die mit 3 mg CSA/kg KG/d und der Gruppe die mit 12 mg CSA/kg KG/d behandelt wurden, zeigten sich hinsichtlich der mittleren luminalen Stenose zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten weder Unterschiede bei den durchbehandelten Tieren noch bei den Tieren, bei denen die Therapie abgesetzt wurde.



Grafik 3.11: Dargestellt wird hier die neointimale Proliferation epikardialer Arterien unter 12mg-CSA-Therapie. In der Grafik wird deutlich, dass zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des mittleren Gefäßverschlusses durch neointimale Proliferation zwischen den unbehandelten Kontrolltieren (rote Linie) und den durchgehend behandelten Tieren (grüne Linie) bestand. Weiterhin wird ersichtlich, dass das Niveau des mittleren Gefäßverschlusses nach dem Absetzen der Therapie sich dem der unbehandelten Kontrolltiere angleich.

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Behandlungsdauer				
Kontrollgruppe	48,8 ± 11,2	62,6 ± 12,5	64,9 ± 12,1	69,1 ± 13,4
20 Tage	22,6 ± 4,7	64,9 ± 12,3	67,2 ± 8,9	64,6 ± 25,9
40 Tage	-	25,7 ± 8,8	58,7 ± 15	67,9 ± 14
60 Tage	-	-	22,1 ± 8,5	68,8 ± 18,8
80 Tage	-	-	-	22 ± 8,2

3.7. Inzidenz der chronischen Abstoßung

3.7.1 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie in intramyokardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen

3.7.1.1 3 mg Cyclosporin A

In der nachstehenden Grafik ist die Inzidenz der TVP intramyokardialer Arterien dargestellt. Bei den unbehandelten Kontrolltieren wurde am Tag 20 eine TVP- Inzidenz von $94,4 \pm 9,6$ beobachtet. Am post OP-Tag 40 wurde ein Wert von $96,9 \pm 31,55$ erreicht und am Tag 60 ein Wert von 100 ± 0 . (rote Linie).

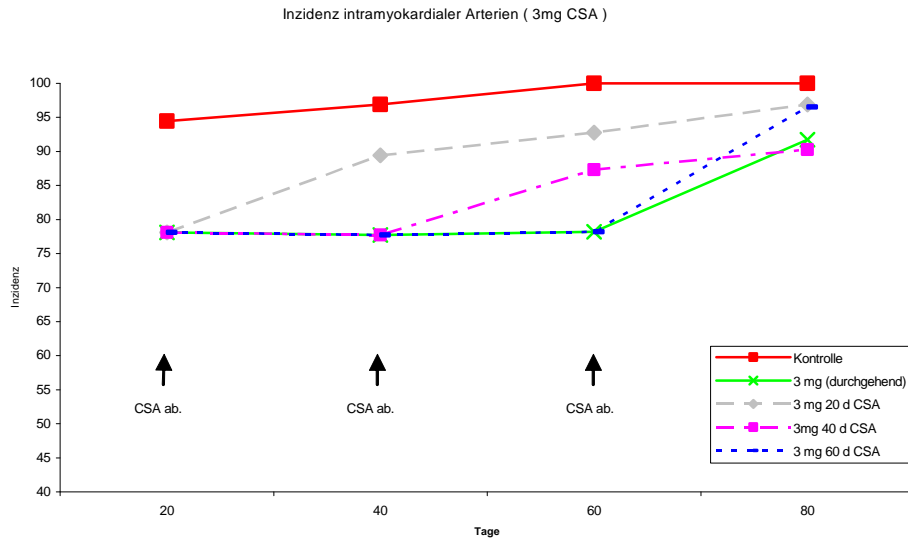
Die durchgehende Behandlung mit 3mg CSA (grüne Linie) führte zu einer Inzidenz von $78,1 \pm 7,4$ 20 Tage post OP ($p > 0,3$ im Vergleich zur Kontrollgruppe) und einem Wert von $91,74 \pm 9,4$ an Tag 80.

Nach Beendigung der CSA-Therapie am Tag 20 (graue Linie) stieg die Inzidenz auf $89,45 \pm 8,2$ am Tag 40, verglichen mit $77,73 \pm 18,5$ zum gleichen Zeitpunkt in der kontinuierlich mit 3 mg CSA/kg KG/d behandelten Gruppe (grüne Linie, $p > 0,4$).

Am Tag 80 betrug die Inzidenz $96,9 \pm 6,25$, verglichen mit $91,74 \pm 9,4$ in der durchgehend mit 3 mg CSA/kg KG/d behandelten Gruppe ($p > 0,6$).

Das Absetzen der 3 mg CSA Therapie am Tag 40 (rosafarbene Linie) führte zu einer Inzidenz an Tag 60 von $87,3 \pm 18,9$, verglichen mit $78,22 \pm 14,2$ in der kontinuierlich behandelten Gruppe (grüne Linie, $p > 0,9$). Am Tag 80 erreichten beide Gruppen, die durchgehend behandelte und die Gruppe der 40 Tage behandelten Tiere, Werte von $91,74 \pm 9,4$ bzw. $90,3 \pm 11,4$ ($p > 0,8$).

Das Beenden der CSA Therapie am Tag 60 führte zu einem Anstieg der TVP Inzidenz von $78,2 \pm 14,2$ am Tag 60 auf $96,5 \pm 12$ am Tag 80, verglichen mit $91,74 \pm 9,4$ am Tag 80 in der mit 3mg CSA kontinuierlich behandelten Gruppe (grüne Linie, $p > 0,5$).



Grafik 3.12: Die Grafik zeigt die Inzidenz der TVP intramyokardialer Arterien mit 3 mg CSA/kg KG/d behandelter Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Das Absetzen der Therapie führte zu einem deutlich sichtbaren Anstieg der Inzidenz. Der Inzidenz bei den durchgehend behandelten Tieren zeigte sich ebenfalls während der gesamten Studiendauer sehr hoch und stieg zum Endpunkt noch einmal deutlich an.

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	94,4 ± 9,6	96,9 ± 31,6	100 ± 0	100 ± 0
20 Tage	78,1 ± 7,4	89,4 ± 8,2	92,8 ± 18,9	96,9 ± 6,3
40 Tage	-	77,7 ± 18,5	87,3 ± 13,3	90,3 ± 11,4
60 Tage	-	-	78,2 ± 14,2	96,5 ± 12
80 Tage	-	-	-	91,7 ± 9,4

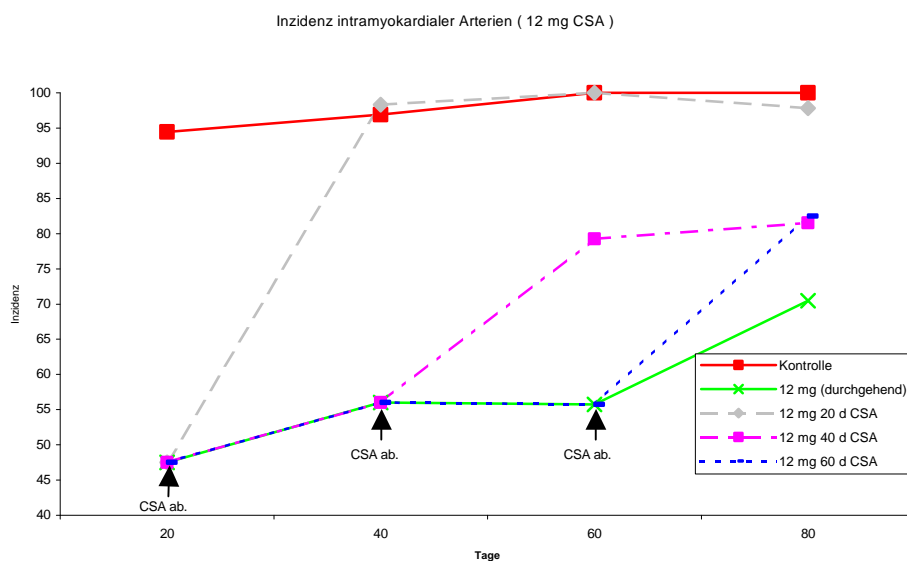
3.7.1.2 12 mg Cyclosporin A

In der mit 12mg CSA durchgehend behandelten Gruppe (Grafik 3.13, grüne Linie) wurde die Inzidenz der TVP mit $47,5 \pm 12,5$ am Tag 20 ($p < 0,05$ verglichen mit den unbehandelten Tieren; $p > 0,5$ verglichen mit 3mg CSA/kg KG/d-Behandlung) bestimmt. Es fand sich ein Wert von $55,8 \pm 11,4$ am Tag 40. 80 Tage nach Transplantation wird eine Inzidenz von $70,5 \pm 14,3$ erreicht (p jeweils $< 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Die Beendigung der CSA-Therapie 20 Tage nach Transplantation (graue Linie) führte zu einer Inzidenz chronischer Abstoßung von $98,3 \pm 3,44$ am Tag 40, die Differenz zur unbehandelten Kontrollgruppe war nicht signifikant ($p > 0,6$). Die Inzidenz am Tag 80 beträgt $97,8 \pm 4,4$; verglichen mit 100 in der nicht behandelten Gruppe und $91,7 \pm 5,8$ in der mit 3mg CSA durchgehend behandelten Gruppe (p jeweils $> 0,05$).

Wurde 40 Tage lang mit 12mg CSA/kg KG/d behandelt und die Therapie dann beendet (rosafarbene Linie), zeigte sich die Inzidenz nach dem Ende der Therapie bei $78,22 \pm 6,4$ am Tag 60 und $81,54 \pm 9,3$ am Tag 80.

Wurde die Therapie mit 12mg CSA/kg KG/d nach 60 Tagen beendet (blaue Linie), stieg die Inzidenz auf $82,5 \pm 23,63$ am Tag 80, dies war nicht signifikant im Vergleich zur durchgehend behandelten Gruppe ($70,5 \pm 14,3$; $p > 0,8$).



Grafik 3.12: Diese Grafik zeigt deutlich, dass die durchgehende Therapie mit 12mg CSA/kg KG zu einer deutlichen Reduktion der TVP-Inzidenz im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die Beendigung der Therapie nach 20 Tagen führte dagegen zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz der TVP. Das Absetzen

der Therapie zu einem späteren Zeitpunkt führte ebenfalls zu einem Anstieg, am Endpunkt nach 80 Tagen war der Unterschied zur Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere jedoch noch signifikant, während er zur Gruppe der durchgehend mit 12 mg CSA/kg KG/d behandelten Tiere nicht signifikant war. Die Kontrollgruppe wies zu jedem bestimmten Zeitpunkt signifikante Unterschiede zur durchbehandelten Gruppe (p jeweils <0,05).

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	94,4 ± 9,6	96,9 ± 31,6	100 ± 0	100 ± 0
20 Tage	47,5 ± 12,5	98,3 ± 3,4	98 ± 2,7	97,8 ± 4,4
40 Tage	-	55,8 ± 11,4	78,2 ± 6,4	81,5 ± 9,3
60 Tage	-	-	55,7 ± 9,9	82,5 ± 23,6
80 Tage	-	-	-	70,5 ± 14,3

3.7.2 Inzidenz der Transplantatvaskulopathie in epikardialen Arterien unter verschiedenen CSA-Regimen

3.7.2.1 3 mg Cyclosporin A

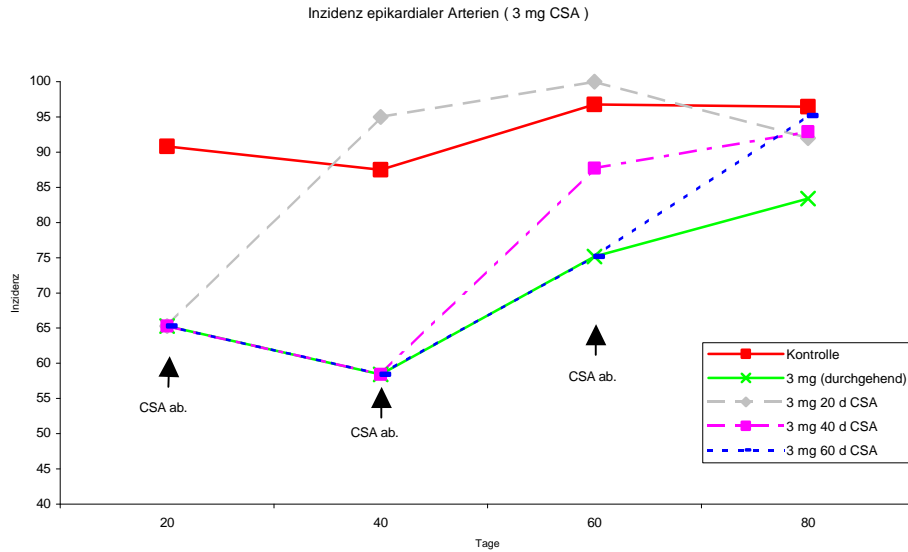
Die Inzidenz chronischer Abstoßung in der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere wurde nach 20 Tagen mit $90,8 \pm 10,6$ bestimmt und erreichte am Studienende am Tag 80 einen Wert von $96,9 \pm 7,1$ (Grafik 3.13, rote Linie).

Unter einem Behandlungsregime von 3mg CSA für die gesamte Studiendauer (grüne Linie) wurde die Inzidenz mit $65,3 \pm 9,1$ nach 20 Tagen bestimmt und zeigte sich bei $83,4 \pm 6,9$ am Tag 80. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere war die Inzidenz der TVP an den Tagen 20 ($p < 0,03$) und 40 ($p < 0,05$) statistisch signifikant reduziert. An den Tagen 60 und 80 zeigte die Reduktion dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere ($p > 0,6$ bzw. $p > 0,8$).

Die Beendigung der Behandlung nach 20 Tagen, führte zu einer Inzidenz nach dem Ende der Therapie von $95 \pm 4,5$ am Tag 40. Am Tag 80 war sie mit einem Wert von $92 \pm 6,5$ statistisch gesehen nicht mehr von der Kontrollgruppe zu unterscheiden ($p > 0,5$).

Nach Beendigung der 3mg CSA-Therapie am 40sten postoperativen Tag (rosafarbene Linie) wurde die Inzidenz mit $58,4 \pm 9,1$ am Tag 40, mit $87,7 \pm 8,8$ am Tag 60 und mit $93 \pm 6,2$ an Tag 80 bestimmt ($83,4 \pm 6,9$ an Tag 80 in der durchgehend behandelten Gruppe; $p > 0,4$).

Das Ende der Behandlung mit 3mg CSA/kg KG/d nach 60 Tagen (blaue Linie) führte zu einer Inzidenz der TVP von $75,15 \pm 8,3$ am Tag 60 und $95,2 \pm 5$ am Tag 80, verglichen mit $83,4 \pm 6,9$ an Tag 80 in der durchgehend mit 3mg CSA/kg KG/d behandelten Gruppe ($p > 0,05$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere am Tag 80 ($p > 0,4$).



Grafik 3.13: Die Grafik verdeutlicht, dass die Beendigung der Therapie mit 3 mg CSA/kg KG/d zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz der TVP führte. In der Gruppe der durchgehend behandelten Tiere zeigte sich ebenfalls ab Tag 40 ein Anstieg. Am Endpunkt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Lebensdauer

	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	90,8 ± 10,6	91,5 ± 6,5	96,8 ± 4,3	96,9 ± 7,1
20 Tage	65,3 ± 9,1	95 ± 4,5	93,2 ± 5,2	92 ± 6,5
40 Tage	-	58,4 ± 9,1	87,7 ± 8,8	93 ± 6,2
60 Tage	-	-	75,2 ± 8,3	95,2 ± 5
80 Tage	-	-	-	83,4 ± 6,9

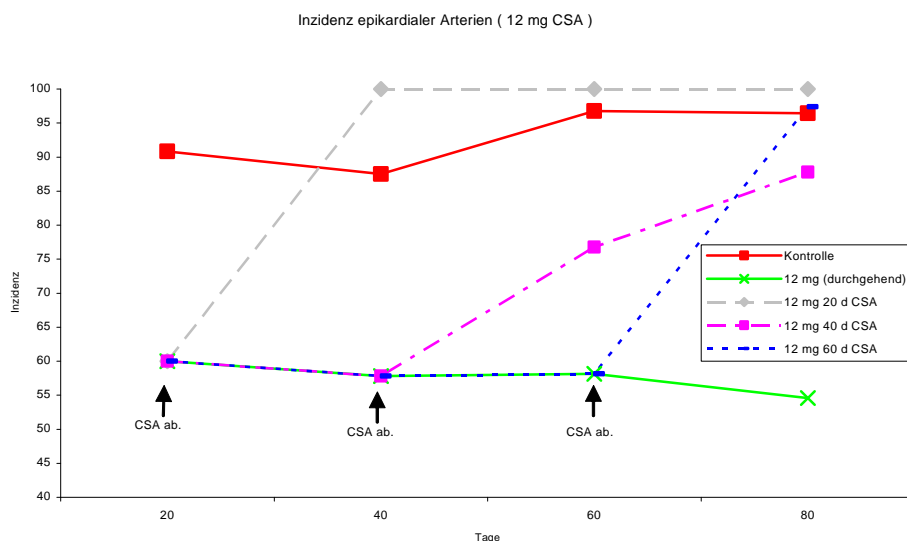
3.7.2.2 12 mg Cyclosporin A

In der Gruppe der mit 12 mg CSA durchgehend behandelten Tiere (grüne Linie) zeigte sich die Inzidenz am Tag 20 bei $60 \pm 8,2$. Am Tag 80 wurde sie mit $55 \pm 9,8$ bestimmt. Dies war ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den anderen Gruppen (unbehandelt, bzw. 3mg CSA durchgehend behandelt) am Tag 80 (p jeweils $<0,05$).

Die Beendigung der Therapie am Tag 20 (graue Linie) führte zu einer Inzidenz von 100 ab dem Tag 40.

In der 12mg CSA-Behandlungsgruppe führte das Ende der CSA-Therapie nach 40 Tagen zu einer Inzidenz von $76,8 \pm 12,4$ am Tag 60 verglichen mit $58,15 \pm 7,6$ in der durchgehend behandelten Gruppe zum gleichen Zeitpunkt. Die Inzidenz am Tag 80 wurde mit $87,8 \pm 9,2$ bestimmt.

In der mit 12mg CSA behandelten Gruppe, führte das Ende der Therapie am 60sten Tag post OP (blaue Linie) zu einer Inzidenz von $58,15 \pm 7,6$ an Tag 60 und einem Wert von $97,37 \pm 5,2$ an Tag 80. Nach Entzug der 12mg CSA-Behandlung am 60sten postoperativen Tag zeigte sich an Tag 80 kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$).



Grafik 3.14: In der Grafik wird deutlich, dass kontinuierliche CSA-Behandlung mit 12mg die Inzidenz chronischer Abstoßung in epikardialen Arterien im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant reduzierte.

Nach Beendigung der Therapie zeigte sich in den entsprechenden Gruppen ein deutlicher Anstieg der Inzidenz chronischer Abstoßung, so dass am Studienendpunkt nach 80 Tagen kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der unbehandelten Tiere bestand.

Eine durchgehende Behandlung mit 12mg CSA reduzierte die Inzidenz chronischer Abstoßung epikardialer Arterien am Studienendpunkt im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

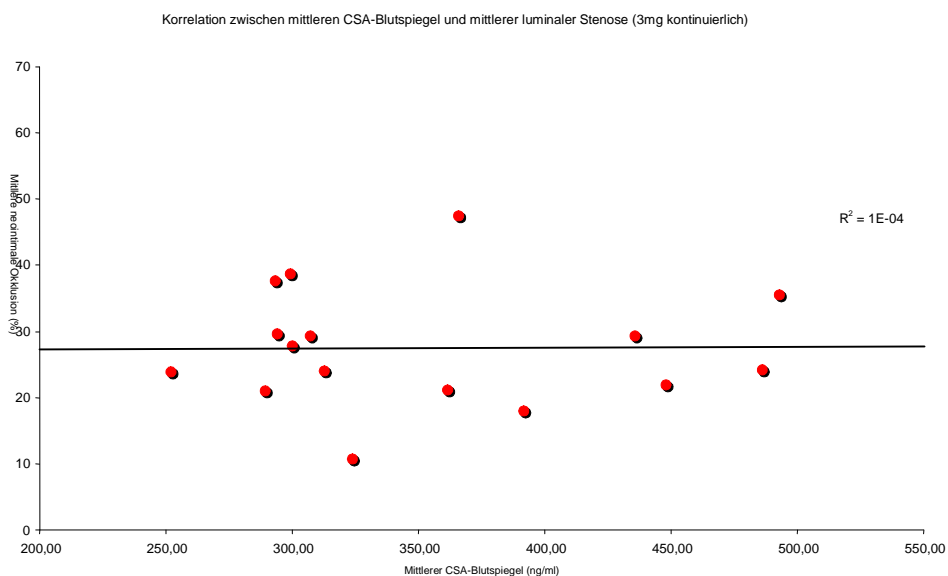
Lebensdauer

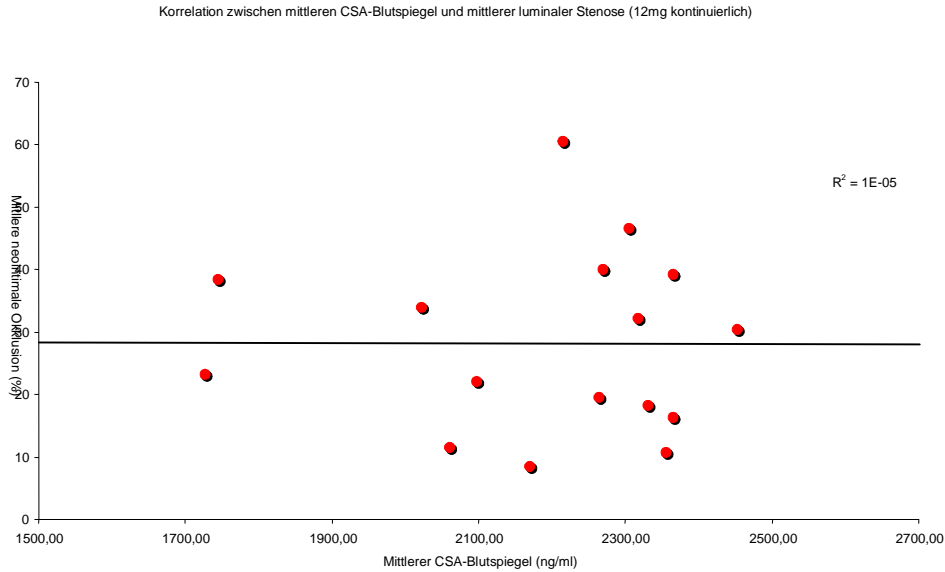
	20 Tage	40 Tage	60 Tage	80 Tage
Kontrollgruppe	90,8 ± 10,6	91,5 ± 6,5	96,8 ± 4,3	96,9 ± 7,1
20 Tage	60 ± 8,2	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
40 Tage	-	57,8 ± 6,9	76,8 ± 12,4	87,8 ± 9,2
60 Tage	-	-	58,2 ± 7,6	97,4 ± 5,2
80 Tage	-	-	-	55 ± 9,8

3.8. Korrelation der CSA-Blutspiegel und der mittleren luminalen Stenose

Korreliert man die Mittelwerte der CSA-Blutspiegel mit der mittleren luminalen Stenose der einzelnen mit CSA behandelten Gruppen und stellt dieses grafisch dar, erkennt man keinerlei unterschiedliche Auswirkung auf die TVP, d.h. keine Abhängigkeit der chronischen Abstoßung von der Höhe der CSA-Blutspiegel. Dieses wird durch die in die Grafik integrierte Ausgleichsgerade, die nahezu horizontal verläuft, verdeutlicht.

Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient zeigt ebenfalls keine Korrelation an ($R^2 = 1E^{-04}$ bzw. $R^2 = 1E^{-05}$).

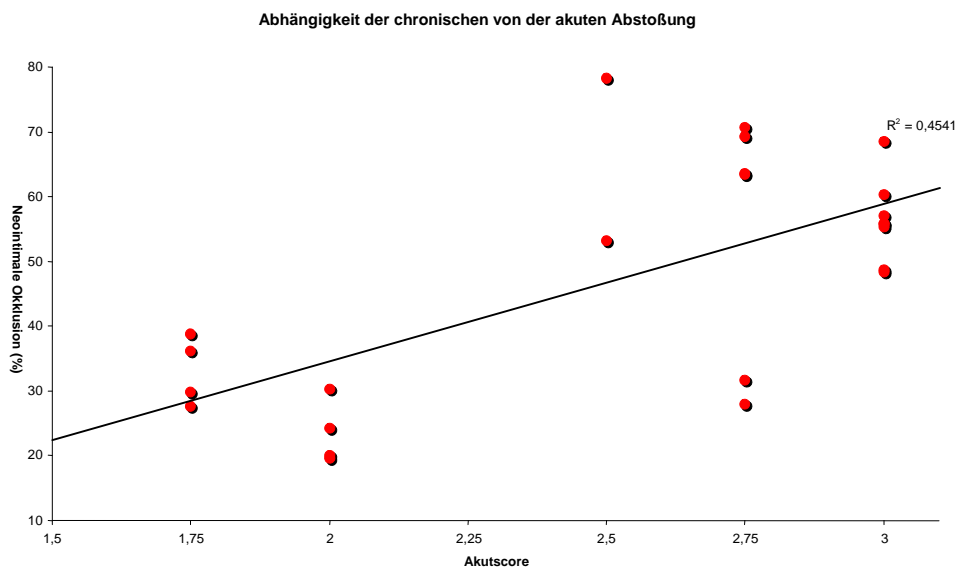




Grafik 3.15 und 3.16: Korrelation zwischen mittlerem CSA-Blutspiegel und mittlerer luminaler Stenose

3.9. Korrelation der akuten Abstoßung und der Transplantatvaskulopathie

Korreliert man die mittlere luminaler Stenosen mit den Medianen der akuten Abstoßung in den einzelnen Gruppen und stellt diese graphisch dar, wird die starke Abhängigkeit beider Werte voneinander anhand der ebenfalls dargestellten Trendlinie deutlich. Das Bestimmtheitsmaß des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten wird anhand dieser Werte mit 0,4541 angegeben, d.h. die Werte hängen mit ca. 45%iger Wahrscheinlichkeit voneinander ab.



Grafik 3.17 Abhängigkeit der chronischen von der akuten Abstoßung

4. Diskussion

Moderne immunsuppressive Therapiestrategien haben die Herztransplantation zu einer etablierten Option in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz gemacht.

Obwohl das Überleben nach Herztransplantation in der Frühphase nach wie vor von akuter Abstoßung und Infektionen beeinträchtigt wird, ist der limitierende Faktor, das Langzeitüberleben betreffend, die Transplantatvaskulopathie (TVP).

Die TVP kann sich in Form eines stillen Myokardinfarkts, akuten Herzversagens, akuter Arrhythmien oder plötzlichen Herztods äußern, wobei eine Angina pectoris-Symptomatik aufgrund der Denervierung äußerst selten ist (Weis 1997).

Ciclosporin A ist derzeit noch ein Grundstein der immunsuppressiven Therapie nach Herztransplantation. Die ideale Dosis, die seine immunsuppressiven Möglichkeiten maximiert und seine Toxizität minimiert, ist trotz langjähriger Erfahrung mit dieser Substanz nur empirisch definierbar und von Zentrum zu Zentrum unterschiedlich.

Aktuelle immunsuppressive Protokolle haben den Transplantatverlust durch akute Abstoßung signifikant verringert, hatten aber keinen Einfluss auf die Inzidenz der Transplantatvaskulopathie, welche sich morphologisch in einer neointimalen Proliferation sowohl arteriellen als auch des venösen Gefäßsystems äußert. Obwohl mehrere Faktoren bekannt sind, die einen späten Transplantatverlust begünstigen, wird die Transplantatvaskulopathie nach wie vor als einer der wichtigsten angesehen (Dennis 1989, Rose 1992, Sanroman Budino 2004).

Obwohl sich das wissenschaftliche Interesse zwischenzeitlich auf neuere Immuntherapeutika, wie Tacrolimus, Rapamycin oder MMF, konzentrierte, führen neue Untersuchungen zurück zu den Anfängen moderner Immunsuppression und damit zur weiteren Erforschung der Wirkungsweise und der Nebenwirkungen von Ciclosporin A (Garrity 2004, Haverich 2004).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen einer Hochdosis- Therapie mit CSA verglichen mit einer Niedrigdosis- Therapie mit CSA auf die Entwicklung der akuten Abstoßung sowie der Inzidenz und der Schwere der Transplantatvaskulopathie in intra- und epikardialen Arterien nach heterotoper Herztransplantation in einem Rattenmodell zu untersuchen.

In der hier vorliegenden Studie wurde im Lewis auf Fisher-344-Herztransplantationsmodell der Ratte der Einfluss des CSA-Spiegels und der CSA-Therapiedauer auf die Entstehung der TVP untersucht. Dabei wurden entweder 3mg/kg KG/d oder 12mg/kg KG/d CSA subkutan für die randomisierte Therapiedauer von 20 bis 80 Tagen appliziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte transplantierte Tiere gleicher Kombination verwendet. Es erfolgte die Bestimmung des CSA-Spiegels, der akuten Abstoßungsreaktion (ISHLT-Score), der TVP-Inzidenz und der mittleren luminalen Stenose (MVO) in intramyokardialen und epikardialen Arterien. In der 12mg Dosisgruppe wurde ein mittlerer CSA-Spiegel von 2331 ± 82 ng/ml, in der 3mg-Dosisgruppe von $322,8 \pm 98$ ng/ml erreicht.

Es wurde folgendes festgestellt:

- 1) Die CSA-Applikation per se führte nicht zur erhöhten TVP, sondern reduzierte signifikant die TVP verglichen mit der Kontrolle.
- 2) Ein hoher CSA-Spiegel reduzierte die TVP-Prävalenz in intra- und epikardialen Arterien verglichen mit der Kontrolle. Niedrige CSA-Spiegel reduzierten in epikardialen Arterien die TVP-Inzidenz innerhalb der ersten 40 Versuchstage im Vergleich zur Kontrolle, hatten aber keinen Einfluss auf die Inzidenz in intramyokardialen Arterien.
- 3) Die Höhe des CSA-Spiegels hatte keinen Einfluss auf die Schwere der TVP. Hohe CSA-Spiegel führten weder zur Reduktion noch zur Verstärkung der TVP.
- 4) Beide CSA-Dosierungen führten zu einer signifikanten Reduktion der akuten Abstoßungsreaktion. Die Höhe des CSA-Spiegels hatte keinen Einfluss auf den Grad der Akutabstoßung.
- 5) Die Beendigung der Therapie führte zum raschen Anstieg der akuten Abstoßungsreaktion, der TVP-Inzidenz und der mvo in beiden Gefäßkompartimenten.
- 6) Zwischen der Höhe des CSA-Spiegels und der sich entwickelnden TVP konnte keine Korrelation gezeigt werden, wohl aber zwischen dem Schweregrad der akuten Abstoßungsreaktion und der TVP ($R = 0,45$; $p < 0,01$).

Die hier dargestellten Ergebnisse sind nur auf das in der Studie verwendete Tiermodell zu beziehen, welches im Folgenden genauer dargestellt wird.

Modell:

Das in dieser Studie verwendete Modell Lewis auf Fisher 344 basiert auf einem Bericht von Barker und Billingham aus dem Jahre 1971, in dem das Langzeitüberleben einiger Allografts beschrieben wird. Bereits 1971 wurde die Präsenz von familiären Stigmata eines chronischen Abstoßungsprozesses im Lewis auf Fisher 344-Modell festgestellt (Barker und Billingham 1971). Die beiden Stämme unterscheiden sich in multiplen nicht-Major-Histokompatibilitätsantigenen (MHC), während sie über identische Klasse I und Klasse II – Antigene verfügen (Liebert 1982).

Cramer und Mitarbeiter tauschten Grafts zwischen einer großen Anzahl verschiedener Stämme der Pittsburgh School of Medicine-Kolonie aus, die sich nur in nicht MHC-Histokompatibilitätsantigenen unterschieden (Cramer 1989). Sie stellten milde bis moderate intimale Proliferation in einigen Arterien chronisch abstoßender Grafts fest.

Andere Gruppen immunsupprimierten Empfänger von MHC-inkompatiblen Grafts und beschrieben das Auftreten von arteriellen Läsionen in langzeitüberlebenden Herzen, verbunden jedoch mit einer verminderten Inzidenz und Schwere der Läsionen, verglichen mit MHC-kompatiblen Kombinationen, wahrscheinlich wegen der Notwendigkeit der Immunsuppression, um akuten Transplantatverlust zu vermeiden (Lurie 1981).

Das verwendete Modell ist international anerkannt und etabliert zur Untersuchung der TVP nach heterotoper Herztransplantation sowie orthotoper Nierentransplantation und wird international verwendet und weist die im Folgenden dargestellten Vor- und Nachteile auf.

Zusammengefasst liegen die Nachteile des Lewis-F344-Modells in folgenden Punkten:

- 1.) Nur 25% der Grafts überleben auf unbestimmte Zeit (Nicht ideal für Langzeitstudien);
- 2.) Obwohl die arteriellen Läsionen den klinisch beobachteten arteriosklerotischen Läsionen langzeitüberlebender Grafts nach Herztransplantation ähnlich sind, ist der Schweregrad der mononukleären Infiltration und Nekrose höher (Adams 1992).

Die Vorteile liegen in den folgenden Punkten begründet:

- 1.) Die involvierten Stämme sind jederzeit kommerziell zu erwerben;
- 2.) Die Inzidenz und Schwere der Läsionen in langzeitüberlebenden Grafts ist hoch;
- 3.) Da dieses System nicht notwendigerweise Immunsuppression erfordert, kann ein entzündliches Stadium der Läsionen einfach erkannt werden.

Die unterschiedlichen Resultate verschiedener Tierstudien könnten mit dem verwendeten Tiermodell, den Unterbringungsbedingungen, der Wirkstoffpräparation und dem Applikationsweg zusammenzuhängen, was sich in unterschiedlichen Blutspiegeln niederschlägt, wie Wassef für Ciclosporin A 1985 demonstrieren konnte (Wassef 1985).

In der vorliegenden Studie zeigten sich unter den oben beschriebenen Bedingungen und der gewählten subkutanen Applikation relativ homogene Ciclosporin A-Spiegel innerhalb der einzelnen Gruppen.

Toleranzinduktion:

Die von uns verwendete kurzzeitige Therapie mit Ciclosporin A (3 mg und 12 mg) führte in dem verwendeten Modell nicht zur dauerhaften Annahme des Transplantates (Toleranz).

Die Beendigung der Ciclosporin A-Therapie führte immer zu einer signifikanten Zunahme akuter und chronischer Abstoßung. Durch eine Kurzzeit-Ciclosporin A-Therapie konnten keinerlei Zeichen einer Toleranzinduktion in diesem Modell herbeigeführt werden, was jedoch in der Literatur beschrieben ist (Abbud-Filho 1984, Chui 1985). In diesen Untersuchungen wird über das Langzeitüberleben heterotop transplantierte Versuchstiere berichtet, die durch eine nur kurz andauernde CSA-Behandlung Toleranz gegenüber dem Transplantat entwickelten. Diese Ergebnisse können durch die vorliegende Studie nicht verifiziert werden. Nach erfolgreicher Reduktion der Transplantatvaskulopathie durch eine 20tägige Behandlung mit 3mg oder 12mg Ciclosporin A beendete das Absetzen der Therapie diesen Effekt bis zum Studienende, die entstehende Transplantatvaskulopathie übersteigt sogar die Werte der Kontrollgruppe.

Einfluss von Ciclosporin A auf die Transplantatvaskulopathie:

In den letzten Jahren sind widersprüchliche Ergebnisse, die Einwirkung von Ciclosporin A auf die Inzidenz und Schwere der chronischen Abstoßung betreffend, veröffentlicht worden. Einige Studien erbrachten Hinweise darauf, dass CSA für die Entstehung der TVP verantwortlich ist.

Seit der Einführung von CSA gab es verschiedene Untersuchungen die TVP nach Herztransplantation betreffend. Es wurde berichtet, dass die CSA-Monotherapie für die Entstehung von TVP verantwortlich ist.

CSA induziert einige molekulare Mechanismen, die in die Genese der Transplantatvaskulopathie bzw. der Arteriosklerose involviert sind. Als Calcineurin-Inhibitor reduziert es die Produktion von Stickoxydul (NO), welches einen protektiven Effekt hinsichtlich der Proliferation glatter Muskelzellen aufweist (Strestikova 2001, Dusting 1999). NO ist ein potenter Vasodilatator der sowohl Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation als auch die Migration glatter Muskelzellen mit neointimaler Neubildung nach Gefäßverletzung inhibiert (Sarkar 1996, von der Leyen 1996, Strestikova 2001). Durch Applikation von L-Arginin, dem Vorläufer der NO-Synthese, konnte tierexperimentell die TVP inhibiert werden. (Lou 1996, Farhy 1993).

CSA induziert die Endothelin-1-Produktion nach Transplantationen, welches die Produktion glatter Muskelzellen verstärkt, die wiederum für die Entwicklung der TVP mitverantwortlich sind (Kandoussi 2002, Simonson 2002, Rezzani 2001). In präklinischen Studien konnte der Endothelin-1-Antagonist Bosentan den Schweregrad der TVP senken (Okada 1998, Yang 2002).

Es wurden jedoch auch gegensätzliche Ergebnisse aus der klinischen Transplantationsmedizin publiziert, die zeigten, dass ein niedriger CSA-Spiegel nach Transplantation sowohl mit akuten Abstoßungsepisoden als auch mit dem Auftreten einer TVP korreliert (Vasalli 1996).

Ciclosporin A stimuliert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und verstärkt die monozytäre Adhäsion, wie von Hu et al. 1999 in einer in vitro-Studie an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorta beschrieben wurde (Hu1999).

Diese Monozyten-Adhäsion an glatte Gefäßmuskelzellen ist ein wichtiger Schritt in der Genese der TVP. Die Rekrutierung von Monozyten durch glatte Gefäßmuskelzellen setzt Zytokine und Mitogene frei, die eine intimale Proliferation und Migration weiterer glatter

Gefäßmuskelzellen in die Intima bewirken. Deshalb scheint die durch glatte Gefäßmuskelzellen mediierte monozytäre Adhäsion von besonderer Wichtigkeit zu sein, nicht nur weil sie zum inflammatorischen Prozess beiträgt, sondern vor allem die Proliferation glatter Muskelzellen und die Matrixsynthese stimuliert, die den Hauptteil der stenotischen Läsion formt, wie Ross und Giraldo in in-vitro-Studien feststellen konnten (Ross 1990, Giraldo 1985).

Mennander berichtet über eine Form der frühen Transplantat-Arteriopathie, die vornehmlich die erste und zweite Ordnung epikardialer und intramyokardialer Zweige der Koronararterien von Herztransplantaten betrifft. Es wurde hier ein Dark Aguti (RTIa) auf Wistar Furth (RTIv)-Modell verwendet, welches eine MHC-Inkompatibilität aufweist. Es wurde, ähnlich dem vorliegenden Modell, eine Niedrigdosis und eine Hochdosis-Gruppe gebildet. CSA wurde oral appliziert und nach einem definierten Zielblutspiegel dosiert. (Mennander 1991, 1992).

P. Häyry (1996) berichtet in einem Review, dass Ciclosporin A, FK506, Methylprednisolon und Azathioprin die Arteriosklerose des Allografts in einem Tiermodell verstärken, wenn sie alleine appliziert werden.

Alle diese Untersucher vermuten, dass zumindest die beschleunigte Form dieser Läsion mit der Applikation von Ciclosporin A zusammenhängt.

Paul und Mitarbeiter stellten in einem Fisher-344 auf Lewis-Modell ebenfalls fest, dass CSA für die Entstehung einer TVP verantwortlich ist. Auch syngene Transplantationen zeigten nach CSA-Applikation die Entwicklung einer TVP während unbehandelte syngene Transplantationen keine TVP aufwiesen (Paul 1994).

In einem ACI auf LBN Allograft-Ratten-Modell stellte Lurie keinerlei protektiven Effekt einer Ciclosporin A-Behandlung fest, obwohl die Ciclosporin A-Therapie kontinuierlich durchgeführt wurde (Lurie 1981).

Bereits 1987 wurde Ciclosporin A für atherogen erklärt (Muskett 1987).

Einige Vorgänge auf molekularer Ebene könnten für den Einfluss von CSA auf die TVP verantwortlich sein.

CSA stimuliert autoreaktive T-Zellen, die wiederum die Entwicklung vaskulärer Läsionen im transplantierten Herzen fördern. Die Entwicklung und der Schweregrad der TVP korrelieren mit den Zytokinprofilen von infiltrierenden Lymphozyten. Die Initiierung dieser Zellantwort korreliert wiederum mit der verstärkten Regulation der Zielantigene, die von den CSA-

Aktivierten autoreaktiven T-Zellen erkannt werden. Es handelt sich hierbei um einen Antigen-Komplex, der auf Endothelzellen, im Falle einer Stimulation durch Interferon, von den autoreaktiven T-Zellen erkannt wird (Zhang 1995, Chen 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die durch CSA hervorgerufenen autoreaktiven Mechanismen zur Entstehung einer TVP beitragen.

In der internationalen Literatur finden sich jedoch auch einige Berichte und Untersuchungen, die über eine präventive Wirkung einer Ciclosporin A-Therapie hinsichtlich der Transplantatvaskulopathie berichten.

Ferns et al. berichteten über einen in-vitro Versuch, in dem Ciclosporin A die Proliferationsrate glatter Muskelzellen von Rattenaorta in einer dosisabhängigen Weise hemmen konnte (Ferns 1990). Mohacsis Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass Ciclosporin A eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation glatter Muskelzellen aufweist, die IC₅₀-Werte (inhibitory concentration 50) waren jedoch gerade noch subtoxisch (Mohacsi 1997). Diese Beobachtungen werden in der vorliegende Studie bestätigt, denn Hochdosis-Ciclosporin A-Therapie führt zu einem deutlichen Abfall der Gewichtszunahme der Versuchstiere, dieser Effekt verschwindet nach Beendigung der Therapie jedoch wieder. Es könnte sich hierbei also um einen toxischen Effekt handeln, der sich jedoch nicht in einer Erhöhung der Retentionsparameter niederschlägt.

Die Studie von Handa, ein Lewis auf Fisher-344-Modell, demonstriert, dass hochdosierte Kurzzeit-Immunsuppression mit Ciclosporin A effektiv die vaskulären Ereignisse im Rahmen einer chronischen Abstoßung verringern kann, sogar wenn die Therapie erst nach Manifestation einer koronaren Pathologie einsetzt. Handa und Kollegen demonstrierten in diesem Modell, dass Ciclosporin A in einer Dosierung von 10mg / kg / d in der Lage war, bereits bestehende arteriosklerotische Läsionen signifikant zu unterdrücken. Die ersten Zeichen einer Transplantatvaskulopathie, Leukozyten-Adhäsion ans intimale Endothel und fokale intimale Hyperplasie, verschwanden sogar vollständig unter einer Kurzzeit-Hochdosis-Therapie mit Ciclosporin A. CSA wurde hier in einer Dosierung von 10mg/kgKG/d subkutan appliziert (Handa 1993).

Guttmann beschrieb 1994 ebenfalls die Reversibilität der chronischen vaskulären Abstoßung unter Behandlung mit Ciclosporin A in einem Wistar Furth 1L auf Lewis-Modell und berichteten, dass Ciclosporin A in einer Dosierung von 15mg/kg/d die Ausbildung vaskulärer Läsionen an kardialen Allografts in einem Rattenmodell für 2 Monate nach Transplantation völlig unterdrückte (Guttmann 1994).

Forbes berichtete ebenfalls in einer Tierstudie (Wistar Furth auf Lewis) über die Fähigkeit von Ciclosporin A die Entwicklung der chronischen Abstoßung am transplantierten Herzen zu hemmen. CSA wurde hier s.c. in einer Dosierung von 15mg/kg KG/d für 14 bzw. 60 Tage appliziert (Forbes 1993). 1995 stellten Koskinen et al. fest, dass die Prävention der chronischen Abstoßung durch suffiziente Immunsuppression mit Ciclosporin A dosisabhängig erreicht werden kann. Hochdosisbehandlung mit Ciclosporin A vermochte hierbei die intimale Verdickung und die intimale Zellakkumulation an kardialen Allografts von langzeitüberlebenden Ratten in einem "High-responder"-Modell (Dark Aguti auf Wistar Furth), d.h. Empfängern und Spendern mit großer genetischer Ungleichheit, zu hemmen. Hier wurde CSA in einer Dosierung von 5, 10 oder 20 mg/kg KG/d oral appliziert, wöchentlich wurden die CSA-Spiegel bestimmt (Koskinen 1995).

Mennander et al. stellten in einem Dark Aguti auf Wistar Furth - Modell fest, dass die Transplantatvaskulopathie, die während der Applikation von Ciclosporin A an der Ratte auftrat, stark vom herkömmlichen arteriosklerotischen Prozess in Aorten-Allografts abwich. Es lag hier keine periarterielle Inflammation vor, welche die treibende Kraft des langsamen arteriosklerotischen Prozesses in nichtimmunsupprimierten Allografts ist. Ciclosporin A schien den periarteriellen Inflammationsprozess weit besser zu unterdrücken als z.B. Azathioprin. Auf der anderen Seite fanden sich Endothelialitis sowie frühe Einwanderung von proliferierenden glatten Muskelzellen in den subintimalen Raum nur in mit Ciclosporin A immunsupprimierten Allografts (Mennander 1991).

Die Beobachtungen von Meiser et al. in einem Brown Norway auf Lewis-Modell (Meiser 1991) zeigen, dass in allotransplantierten Rattenherzen, die mit 1,5mg/kg KG Ciclosporin A behandelt wurden, die Gefäßmanifestationen nicht signifikant schwerer waren, als in einer mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppe. CSA wurde hier intraperitoneal in einer Dosierung von 1,5mg/kg KG/d und 6mg/kg KG/d appliziert. In einem weiteren Rattenmodell zeigte Hu, dass die Behandlung mit 6mg/kg Ciclosporin A die Entwicklung der chronischen Abstoßung völlig unterdrückte (Hu 1999). Cramer et al. untersuchten die Effektivität einer kontinuierlichen Ciclosporin A-Gabe im Vergleich zur kontinuierlichen Applikation von FK506 in einem Dark Aguti 1N auf Brown Norway-Allograft-Ratten-Modell (High responder Modell). Wurde die Therapie zum Zeitpunkt der Transplantation begonnen, reduzierte eine subtherapeutische Ciclosporin A-Behandlung (2,5mg/kg KG/Tag für die ersten 14 Tage) den Schweregrad chronischer Abstoßung erfolgreich, wogegen therapeutische Dosen von FK506 (1mg/kg KG/d) dieses nicht vermochten (Cramer 1990).

Jonasson et al. zeigten die antiproliferative Wirkung von Ciclosporin A auf die Replikation glatter Muskelzellen in vivo in einer Studie über Ballon-Katheter induzierte Verletzungen von Ratten-Karotiden (Jonasson 1988).

Würde jedoch die Entwicklung einer TVP durch CSA getriggert werden, so müssten höhere Dosen oder CSA-Spiegel auch zu einer Schweregraderhöhung führen. Zumindest für die vorliegende Studie traf dies nicht zu. Ein CSA-Blutspiegel von $2331 \pm 82 \text{ ng/dl}$ führte nicht zu einer schwereren TVP als ein Blutspiegel von $322 \pm 98 \text{ ng/ml}$. Dies zeigt sich auch an hier bestimmten Pearson'schen Korrelationskoeffizienten, der keinerlei Korrelation zwischen der Höhe des CSA-Blutspiegels und dem Schweregrad der TVP erkennen lässt.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Ciclosporin A am verwendeten Lewis auf Fisher-344 – Modell keine Steigerung der TVP bewirkt. Ein Blutspiegel von über 2000 ng/ml über 80 Tage erhöhte das Ausmaß neointimaler Proliferation in epikardialen und intramyokardialen Arterien nicht. Im Gegenteil, durch die Therapie wurde die Schwere neointimaler Proliferation im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe reduziert, dieser Effekt verschwand allerdings kurze Zeit nach Beendigung der Ciclosporin A-Applikation.

Es muss jedoch konzediert werden, dass ein bestimmter Mindest-Blutspiegel eingehalten werden muss, um die Transplantatvaskulopathie erfolgreich zu hemmen.

In einer klinischen Studie untersuchte Lindholm Risikofaktoren für Transplantatvaskulopathie in Nierentransplantationspatienten. Es zeigte sich, dass einer der Hauptrisikofaktoren eine Ciclosporin A-Dosis unter 5 mg/kg KG/d 1 Jahr postoperativ war (Lindholm 1993).

In einer retrospektiven klinischen Studie untersuchte Gamba die Relevanz diverser Risikofaktoren bei der Entstehung einer TVP nach Herztransplantation. Bei 163 Patienten ging das Alter des Patienten, das Geschlecht, die Diagnose, die zur Transplantation führte, das Alter des Spenders, die Anzahl der HLA-AB-Nichtübereinstimmungen, die CMV-Serologie, der mittlere Cholesterol- und Triglycerid-Spiegel, die Anzahl der behandelten akuten Abstoßungsepisoden sowie die CSA-Dosis und die CSA-Blutspiegel in die Studie mit ein.

Die Multivarianzanalyse zeigte hierbei, dass nur die CSA-Dosis als alleiniger Prädiktor für die Entstehung einer TVP heranzuziehen war. Gamba fand ebenfalls keine Korrelation zu CSA-Blutspiegeln. Bei Patienten die mit einer Dosis von $> 4 \text{ mg/kg KG/d}$ behandelt wurden, lag die Wahrscheinlichkeit, dass die Gefäße am transplantierten Herzen 8,9 Jahre TVP-frei

blieben, bei 69% im Vergleich zu 31% bei den Patienten, die eine Dosis $< 4\text{mg/kg KG/d}$ erhielten (Gamba 1997).

In einer randomisierten klinischen Studie untersuchte Vasalli den Einfluss einer Niedrig-Dosis-Therapie (200-400 $\mu\text{g/l}$) und einer Hoch-Dosis-Therapie (400-600 $\mu\text{g/l}$) CSA. Ein, zwei und drei Jahre nach Herztransplantation wurde die TVP durch Koronarangiographie gemessen. Vasalli kam zu dem Schluss, dass Niedrig-Dosis-CSA-Therapie das Risiko einer TVP geringgradig erhöht (Vasalli 1996).

Eine Dosisreduktion von CSA nach Transplantation minimiert die Nebenwirkungen von CSA. Im Rahmen einer Triple-Therapie gilt ein Spiegel von 200 – 250 $\mu\text{g/l}$ als adäquat um akute Abstoßungsperioden zu vermeiden, es kommt jedoch immer noch zur Ausbildung einer TVP (El Gamel 1997).

Eine adäquate Immunsuppression könnte eventuell die Inzidenz und den Schweregrad der TVP senken, diese Therapie findet jedoch ihre Limitierung in den nephrotoxischen Nebenwirkungen von CSA

Diese experimentellen Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass Transplantatvaskulopathie nicht durch Ciclosporin A stimuliert wird, sondern die Entwicklung der chronischen Abstoßung eher eine Folge einer unzureichenden Immunsuppression mit Ciclosporin A ist

Diese experimentelle Hypothese wird durch klinische Daten von Leslie Miller gestützt. Diverse retrospektive Analysen von Nierentransplantatempfängern deuten stark darauf hin, dass die Dosis von Ciclosporin A eine große Rolle in der Entwicklung dieser vaskulären Erkrankung spielt. Eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,005$, odds ratio 2,5) zwischen der Entwicklung chronischer Abstoßung und der Verwendung einer Dosierung unter 5mg/kg KG/Tag in einer Studiengruppe von mehr als 500 Nierentransplantatempfängern konnte durch Multivarianzanalysen nachgewiesen werden (Miller 1995).

Sumethkul zeigte, dass eine Dosierung von weniger als 3mg/kg KG/Tag Ciclosporin A der wichtigste Prädiktor für die Entwicklung chronischer Abstoßung ist, ebenfalls unterlegt durch extensive Multivarianzanalysen in einer weiteren großen Studiengruppe von Nierentransplantationspatienten. Er zeigte weiterhin, dass diese Ergebnisse signifikanter korreliert waren, als mit der Inzidenz der akuten zellulären Abstoßung (Sumethkul 1995).

Im vorliegenden Tiermodell führte die Beendigung der Ciclosporin A-Therapie immer zu einer Zunahme der akuten Abstoßung sowie zu einem Anstieg der Inzidenz und des Schweregrades der Transplantatvaskulopathie.

Hohe Ciclosporin A-Blutspiegel verschlimmerten weder die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie in den beiden gewählten Gefäßkompartimenten, noch reduzierten sie in diesem Modell den Schweregrad im Vergleich zu niedrigen Blutspiegeln. Unabhängig von der Höhe des Blutspiegels konnte Ciclosporin A im vorliegenden Modell die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie in intramyokardialen und epikardialen Arterien hemmen. Diese Reduktion ist in epikardialen Arterien ausgeprägter als in intramyokardialen. In Tierexperimenten wurde beobachtet, dass intramyokardiale Arterien oftmals vor den großen epikardialen betroffen sind, und ihre Okklusion nach Herztransplantation führt zum Myokardschaden. Das diffuse Erscheinungsbild der Transplantatvaskulopathie limitiert die Effektivität therapeutischer Interventionen wie z.B. Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA) oder Koronare Bypasschirurgie, bzw. lässt ihren Einsatz gar nicht erst zu (Neish 1992).

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Resultate ist, wie bereits weiter oben diskutiert wurde, dass die meisten Studien hinsichtlich des Modellaufbaus, der Ciclosporin A-Applikationsroute und der Kombination unterschiedlicher Stämme in Rattenmodellen differieren (Wassef 1985, Hu 1999).

Dies bedingt auch die limitierte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation am Menschen.

Einfluss akuter Abstoßung auf die Transplantatvaskulopathie:

Einige Autoren machen auch das Auftreten einer akuten Abstoßung für den Schweregrad der TVP verantwortlich, insgesamt ist diese Abhängigkeit jedoch umstritten.

Lurie fand 1981 in einem bereits weiter oben vorgestellten heterotopen Modell an der Ratte unter Verwendung von Ciclosporin A keinen Zusammenhang zwischen akuter und chronischer Abstoßung (Lurie 1981).

Olivari et al. fanden in einer klinischen Studie keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Inzidenz akuter Abstoßung und einer vorliegenden KHK, die durch eine Koronarangiographie nachgewiesen wurde (Olivari 1989).

Nakagawa et al. fanden dagegen in einem Modell am Hasen heraus, dass der Entzug von Ciclosporin A und damit verbunden das vermehrte Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen sehr wohl mit höheren Schweregraden der TVP einhergingen (Nakagawa 1995).

Radovancevic und Mitarbeiter konnten in einer Multi-Center-Studie eine Korrelation zwischen akuter Abstoßung und Transplantatvaskulopathie demonstrieren, allerdings unter Verwendung eines akuten Abstoßungsscores, der sich von den Standardkriterien der ISHLT unterscheidet (Radovancevic 1990). Uretsky und Kollegen berichteten ebenfalls von einem Zusammenhang zwischen angiographisch diagnostizierter TVP und dem Auftreten von ein bis zwei schweren Abstoßungsreaktionen (Uretsky 1987).

In einer Autopsiestudie fand Winters eine positive Korrelation mit dem Schweregrad der Transplantatvaskulopathie, wenn man die absolute Anzahl der akuten Abstoßungsreaktionen zur Berechnung heranzog (Winters 1990).

Costanzo versuchte 1992 zu erklären, warum es so schwer ist, aus klinischen Studien Rückschlüsse zu diesem Thema zu ziehen. Die klinischen Studien sind meist limitiert durch einen retrospektiven Studienansatz, kleine Fallzahlen, variierende immunsuppressive Regime zwischen den einzelnen Studiengruppen und in verschiedenen Zentren, inkomplette Analysen von negativ und positiv wirkenden Co-Faktoren und vor allem durch die Methodik zur Diagnostik der Transplantatvaskulopathie (Costanzo 1994).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie lassen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen akuter und chronischer Abstoßung erkennen. Die graphische Darstellung der akuten Abstoßung und der TVP gegeneinander lassen die Abhängigkeit voneinander deutlich werden. Auch der rechnerisch bestimmte Korrelationskoeffizient zeigt mit 0,45 eine nahezu 50%ige Abhängigkeit der chronischen von der akuten Abstoßung.

Insgesamt bleibt die Abhängigkeit jedoch umstritten. Die komplexen Interaktionen zwischen Zytokinen, Adhäsions-Molekül-Expression und Aktivierung verschiedener Arten von T-Zellen lassen allerdings eine Abhängigkeit vermuten.

Schlussfolgerung:

1. Die Transplantatvaskulopathie ist, zumindest teilweise, vom Schweregrad der akuten Abstoßung abhängig.

Die Nullhypothese 1 wird angenommen.

2. Wenn Ciclosporin A der Induktor der Transplantatvaskulopathie wäre, müssten ja gerade die mit einem Hochdosis-Ciclosporin A-Regime versorgten Tiere den höchsten Ausprägungsgrad und die höchste Inzidenz der Transplantatvaskulopathie aufweisen. Dies konnte aber im vorliegenden Studienmodell nicht bestätigt werden. Sogar Ciclosporin A-Blutspiegel von über 2000 ng/ml erhöhen den Schweregrad und die Inzidenz der Transplantatvaskulopathie nicht.

Die Nullhypothesen 2 und 3 müssen abgelehnt werden.

3. Die Hochdosis-Therapie weist gegenüber der Niedrigdosis-Therapie keine sicheren Vorteile auf. Dies gilt zumindest für die intramyokardialen Arterien. Hochdosis-Therapie scheint jedoch die Veränderungen in epikardialen Arterien auf lange Sicht zu reduzieren. Die für Ciclosporin A beschriebenen Nebenwirkungen manifestieren sich in den gewählten Dosis-Bereichen nicht.

Die Nullhypothese 4 wird abgelehnt.

4. Das Absetzen einer Therapie mit Ciclosporin A führt hingegen bereits innerhalb von 20 Tagen zu einem Anstieg der Transplantatvaskulopathie auf ein Niveau welches mit dem der unbehandelten Kontrolltiere vergleichbar ist. Eine Toleranzinduktion ist im vorliegenden Modell nicht erfolgt.

Natürlich besteht eine limitierte direkte Übertragbarkeit des vorliegenden Tiermodells auf den Menschen, denn es weist diverse Unterschiede zur klinischen Situation auf.

1. Es wurde hier ein Minor-MHC-Modell bei der Ratte verwendet, welches sicher nicht die aktuelle klinische Situation widerspiegelt.
2. Es ließ sich im vorliegenden Modell ein Langzeitüberleben ohne den Gebrauch von immunsuppressiven Substanzen erzielen. Die unbehandelten Tiere stießen das Transplantat nicht wie erwartet ab, die Funktion des Grafts, die durch tägliche

Palpation ermittelt wurde, ließ jedoch im Studienverlauf signifikant nach. Die histologische Aufarbeitung zeigte schwerste akute Abstoßungsreaktionen bei den unbehandelten Kontrolltieren.

3. Es wurden weder Zytokinprofile, T-Zell-Untergruppen, zelluläre Infiltration des Transplantats noch die Aktivitäten von Selektinen, Integrinen oder Adhäsionsmolekülen gemessen.
4. Es wurde CSA als Monotherapie appliziert, dies spiegelt nicht den Standard einer modernen immunsuppressiven Therapie wieder.

Die Unterschiede zwischen den hier vorliegenden Resultaten und den Resultaten der oben genannten Studien könnten durch Unterschiede bei den verwendeten Rattenstämmen sowie der Art der CSA-Applikation erklärt werden. Zumindest im verwendeten Modell scheint Ciclosporin A nicht der hauptverantwortliche Faktor in der Entstehung der Transplantatvaskulopathie zu sein.

Weiter lässt sich schlussfolgern, dass auch subtoxische Ciclosporin A-Blutspiegel nicht in der Lage sind, einen effektiven Schutz vor der Entstehung der Transplantatvaskulopathie zu bieten.

Ein neuer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse der oben diskutierten Studien ergibt sich aus einer aktuellen Studie von Giese et al (2004).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Ciclosporin A um einen Calcineurin-Inhibitor. Calcineurin wiederum dephosphoryliert einen Faktor namens NFAT (nuclear factor of activated t-cells), welcher wiederum über die T-Zell-Aktivierung eine bedeutende Rolle in der Entstehung der TVP spielt (Murphy 2002, Venkatesh 2004).

Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Hemmung des NFAT durch CSA in verschiedenen Geweben völlig unterschiedliche Ausprägungsgrade erreicht. Eine in vivo-Studie von Halloran zeigte, dass Calcineurin nur unvollständig von CSA gehemmt wird. Es kommt, je nach Gewebeart, nur zu einer 70%-96%igen Inhibition von Calcineurin durch CSA (Halloran 1999).

Eine in-vitro Studie von Kung ergab, dass die maximale Calcineurin-Inhibition im Herzen nur ca. 60% beträgt (Kung 2001). Zudem zeigte sich, dass bereits wenige Stunden nach Applikation von CSA die durch NFAT regulierten Gene wieder die Ausgangswerte erreichten, teilweise überstiegen sie sogar die Werte vor CSA-Applikation (Giese 2004). Ob

es sich hierbei um klinisch relevante Daten oder reine ex-vivo-Phänomene handelt, muss allerdings noch geklärt werden.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass

1. Aufgrund der unvollständigen Calcineurin-Hemmung nur eine Verlangsamung der TVP durch CSA erreicht werden kann und keine vollständige Unterdrückung
2. Durch die nur kurzzeitige Hemmung der Aktivität von NFAT-regulierten Genen bereits wenige Stunden nach CSA-Applikation wieder TVP-assoziierte Prozesse in Gang kommen
3. Somit bringen auch deutlich höhere CSA-Spiegel keinen weiteren Nutzen, da die maximale Hemmung des Calcineurins bereits erreicht ist und Dosissteigerungen keinen zusätzlichen Effekt haben

Eine effiziente Unterdrückung der TVP durch CSA kann so nicht möglich sein.

So geht die Suche nach neuen immunsuppressiven Substanzen, die bei minimalen Nebenwirkungen die Entstehung akuter Abstoßungsepisoden und die Entwicklung der TVP verhindern können, weiter.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Ciclosporin A auf die Transplantatvaskulopathie zu erfassen.

Die Transplantatvaskulopathie oder chronische Abstoßung ist nach wie vor der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben von Patienten nach Herztransplantation. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine diffuse Arteriosklerose der epikardialen sowie intramyokardialen Arterien des Allografts. Da hierbei die intramyokardialen Koronaräste als erstes verschlossen sind, limitieren sich die Interventionsmöglichkeiten, im Sinne einer PTCA oder Bypass-Operation. Histopathologisch divergiert die Transplantatvaskulopathie ebenfalls von der herkömmlichen Koronarsklerose, da es sich um eine diffuse konzentrische Wandverdickung mit intakter Lamina elastica interna handelt. Die Entwicklung einer manifesten Transplantatvaskulopathie kann sich, ebenfalls im Gegensatz zur Koronarsklerose, im Verlauf weniger Monate manifestieren.

Ciclosporin A (CSA) hat in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung des Langzeitüberlebens nach Organtransplantation erheblich positiv beeinflusst. CSA wurde 1969 entdeckt und wirkt als potentes Immunsuppressivum hauptsächlich auf die T-Zellen.

CSA wurde in den letzten Jahren jedoch auch teilweise für die Entstehung der Transplantatvaskulopathie verantwortlich gemacht.

Um den Einfluss von CSA auf die Transplantatvaskulopathie besser einordnen zu können, wurde für die vorliegende Arbeit ein tierexperimenteller Aufbau gewählt.

Hierzu wurde das seit Jahren bewährte Modell der heterotopen Herztransplantation von Lewis auf Fisher-344-Ratten gewählt. Es handelt sich hierbei um ein Modell, bei dem sich Spender und Empfänger in multiplen nicht-MHC-Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden, jedoch über identische Klasse I und II-Antigene verfügen.

Die Tiere wurden bereits vor der Transplantation randomisiert und verschiedenen Studiengruppen zugeordnet. Die einzelnen Studiengruppen unterschieden sich durch die Dosierung von CSA (3mg/kg KG/d vs. 12mg /kg KG/d) sowie die Applikationsdauer (20, 40, 60 oder 80 Tage). Die Studiendauer betrug 80 Tage.

Nach Ablauf der 80 Tage und Sakrifizierung der Tiere wurde die Auswertung mit Hilfe von digitaler Computergestützter Morphometrie durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die Inzidenz als auch der Schweregrad der Transplantatvaskulopathie und der akuten Abstoßung erfasst.

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass sowohl ein Hoch- als auch ein Niedrig-Dosis-CSA-Regime im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unbehandelter Tiere in der Lage waren, chronische Abstoßung wirkungsvoll zu reduzieren.

Die Beendigung der Therapie mit CSA führte in allen Fällen zu einem Anstieg der Inzidenz und des Schweregrades der Transplantatvaskulopathie, der keinen Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies. Toleranzinduktion konnte nicht beobachtet werden.

Trotz deutlich höherer CSA-Blutspiegel in den Hochdosisgruppen zeigte sich keine statistisch signifikante Überlegenheit im Vergleich zur Niedrig-Dosis-Gruppe, obwohl die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie zunächst langsamer verlief.

Es fanden sich jedoch auch keine negativen Effekte hoher CSA-Spiegel, die bei, wie teilweise vermutet, atherogener Eigenschaften von CSA die Transplantatvaskulopathie hätten aggravieren müssen.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie und der akuten Abstoßung nicht durch CSA stimuliert wird, sondern im Gegensatz dazu eher ein bestimmter CSA-Mindest-Blutspiegel erforderlich ist, um diese Erkrankungen zu verhindern. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass extrem hohe CSA-Blutspiegel nicht zu einer Zunahme der Transplantatvaskulopathie führen, während die Beendigung der CSA-Therapie innerhalb von 20 Tagen zu einem Anstieg der TVP auf das Niveau unbehandelter Tiere führt.

Die Suche nach der optimalen Dosierung von CSA ist jedoch noch nicht abgeschlossen und wird Gegenstand weiterer Studien sein.

6. Literaturverzeichnis

1.

Abbud-Filho M, Kupiec-Weglinski JW, Araujo JL et al.:

*Cyclosporine therapy of rat heart allograft recipients and release of interleukins (IL 1, IL 2, IL 3): a role for IL 3 in graft tolerance? J Immunol*133(5):2582-6, 1984

2.

Ackermann H, Stotz M, Zelmer G:

BIAS für Windows 95/98/NT-Biometrische Analysen von Stichproben. Version 7.02, Epsilon Verlag, Darmstadt, 1989-2004

3.

Adams DH, Tilney NL, Collins JJ Jr et al.:

Experimental graft arteriosclerosis. I. The Lewis-to-F-344 allograft model. Transplantation. 53(5):1115-9, 1992

4.

Allison AC:

The mode of action of immunological adjuvants. Dev Biol Stand. 92:3-11, 1998

5.

Allison AC:

Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology. 47(2-3):63-83, 2000

6.

Barker CF, Billingham RE :

Histocompatibility requirements of heart and skin grafts in rats. Transplant Proc. 3(1):172-5, 1971

7.

Barnard CN:

The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. South African Medical Journal. 41(48):1271-4, 1967

8.

Barnhart GR, Pascoe EA, Mills AS et al. :

Accelerated coronary arteriosclerosis in cardiac transplant recipients. Transplant Rev (Orlando). 1:31-46, 1987

9.

Bergese SD, Pelletier RP, Ohye RG et al. :

Treatment of mice with anti-CD3 mAb induces endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. Transplantation. 57(5):711-7, 1994

10.

Bieber CP, Stinson EB, Shumway N et al.:

Cardiac transplantation in man. VII. Cardiac allograft pathology. Circulation. 41(5):753-72, 1970

11.

Billingham ME, Cary NR, Hammond ME et al.:

A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant. 9(6):587-93, . 1990

12.

Billingham ME :

Histopathology of graft coronary disease. J Heart Lung Transplant. 11(3 Pt 2):S38-44, 1992

13.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU:

Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions. 6(4):468-75, 1976

14.

Bowen-Pope DF, Rosenfeld ME, Seifert RA et al. :

The platelet-derived growth factor receptor. Int J Neurosci. 26(1-2):141-53, 1985

15.

Burke CM, Theodore J, Dawkins KD et al.

Post-transplant obliterative bronchiolitis and other late lung sequelae in human heart-lung transplantation. Chest. 86(6):824-9, 1984

16.

Busch GJ, Galvanek EG, Reynolds ES Jr.:

Human renal allografts. Analysis of lesions in long-term survivors. Hum Pathol. 2(2):253-98, 1971

17.

Casscells W:

Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. Circulation. 86(3):723-9, 1992

18.

Caves PK, Stinson EB, Billingham ME et al.:

Diagnosis of human cardiac allograft rejection by serial cardiac biopsy. Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery. 66(3):461-6, 1973

19.

Cerilli J, Brasile L, Galouzis T et al. :

The vascular endothelial cell antigen system. Transplantation. 39(3):286-9, 1985

20.

Cerilli J, Brasile L, Sosa J et al. :

The role of autoantibody to vascular endothelial cell antigens in atherosclerosis and vascular disease. Transplant Proc. 19(4 Suppl 5):47-9, 1987

21.

Chait A, Ross R, Albers JJ et al.:

Platelet-derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 77(7):4084-8, 1980

22.

Chamley-Campbell JH, Campbell GR :

What controls smooth muscle phenotype? Atherosclerosis. 40(3-4):347-57, 1981

23.

Chen W, Thoburn CJ, Miura Y, Sommer M, Hruban R, Qian Z, Baldwin W, Hess AD.

Autoimmune-mediated vasculopathy. Clin Immunol. 2001 Jul;100(1):57-70.

24.

Chui YL, Batchelor JR :

Mechanisms underlying continued survival of rat kidney allografts after a short period of chemical immunosuppression. Transplantation 40(2):150-3, 1985

25.

Claas FH, Paul LC, van Es LA et al.:

Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts. Tissue Antigens. 15(1):19-2, 1980

26.

Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J et al.:

Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. J Cardiovasc Pharmacol. 14 Suppl 6:S12-15, 1989

27.

Clowes AW, Clowes MM, Au YP et al.:

Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. Circ Res. 67(1):61-7, 1990

28.

Costanzo MR, Beto JA, Potempa LD et al.:

Longitudinal effects of cyclosporine administration at 0 to 60 months after heart transplantation. Transplant Proc. 26(5):2704-9, 1994

29.

Cramer DV, Qian SQ, Harnaha J et al. :

Cardiac transplantation in the rat. I. The effect of histocompatibility differences on graft arteriosclerosis. Transplantation. 47(3):414-9, 1989

30.

Cramer DV, Chapman FA, Wu GD et al.:

Cardiac transplantation in the rat. II. Alteration of the severity of donor graft arteriosclerosis by modulation of the host immune response. Transplantation50(4):554-8, 1990

31.

Curtis JJ, Luke RG, Dubovsky E et al.:

Cyclosporin in therapeutic doses increases renal allograft vascular resistance. Lancet. 30;2(8505):477-9, 1986

32.

Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel Dh et al.:

Pathology of hepatic transplantation: A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen. Am J Pathol. 118(1):151-61, 1985

33.

Dennis MJ, Foster MC, Ryan JJ et al.:

The increasing importance of chronic rejection as a cause of renal allograft failure. Transpl Int. 2(4):214-7, 1989.

34.

Denton MD, Magee C, Melter M, Dharnidharka VR, Sayegh MH, Briscoe DM.

TNP-470, an angiogenesis inhibitor, attenuates the development of allograft vasculopathy. Transplantation. 2004 Oct 27;78(8):1218-21.

35.

Dusting GJ, Akita K, Hickey H, Smith M, Gurevich V.

Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. Br J Pharmacol. 1999 Sep;128(2):337-44.

36.

el Gamel A, Keevil B, Rahman A, Campbell C, Deiraniya A, Yonan N.

Cardiac allograft rejection: do trough cyclosporine levels correlate with the grade of histologic rejection? J Heart Lung Transplant. 1997 Mar;16(3):268-74.

37.

Farhy RD, Carretero OA, Ho KL, Scicli AG.

Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. Circ Res. 1993 Jun;72(6):1202-10.

38.

Ferns G, Reidy M, Ross R:

Vascular effects of cyclosporine A in vivo and in vitro. Am J Pathol137(2):403-13, 1990

39.

Foegh ML :

Chronic rejection--graft arteriosclerosis. Transplant Proc. 22(1):119-22, 1990

40.

Foegh ML : *Angiopeptin: a treatment for accelerated myointimal hyperplasia? J Heart Lung Transplant. 11(3 Pt 2):S28-31. 13, 1992*

41.

Forbes RD, Gomersall M, Guttman RD :

Effect of cyclosporine on chronic vascular rejection in an inbred rat cardiac model. Transplant Proc. 25(1 Pt 1):530-1, 1993

42.

Fritz KE, Jarmolych J, Daoud AS :

Association of DNA synthesis and apparent dedifferentiation of aortic smooth muscle cells in vitro. Exp Mol Pathol. 12(3):354-62, 1970

43.

Gamba A, Mamprin F, Fiocchi R, Senni M, Troise G, Ferrazzi P, Ferrara R, Corbetta G.

The risk of coronary artery disease after heart transplantation is increased in patients receiving low-dose cyclosporine, regardless of blood cyclosporine levels. Clin Cardiol. 1997 Sep;20(9):767-72.

44.

Gao SZ, Alderman EL, Schroeder JS et al.:

Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient: coronary arteriographic findings. J Am Coll Cardiol. 12(2):334-40, 1988

45.

Garrity ER Jr, Mehra MR.:

An update on clinical outcomes in heart and lung transplantation. Transplantation. 15;77(9 Suppl):S68-74, 2004

46.

Giese T, Zeier M, Schemmer P, Uhl W, Schoels M, Dengler T, Buechler M, Meuer S.

Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. Transplantation. 2004 Feb 15;77(3):339-44.

47.

Giraldo AA, Esposito OM, Meis JM:

Intimal hyperplasia as a cause of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Arch Pathol Lab Med. 109(2):173-5, 1985

48.

Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA et al. :

Eight-year results of cyclosporine-treated patients with cardiac transplants. J Thorac Cardiovasc Surg. 99(3):500-9, 1990

49.

Gravanis MB :

Accelerated coronary atherosclerosis in the allograft heart. Postgrad Med J. 70 Suppl 1:S93-8, 1994

50.

Guttman RD, Forbes RD, Zheng S:

Cyclosporine and the reversibility of chronic vascular rejection. Transplant Proc. 6(5):2564-6, 1994

51.

*Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J.**The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. Transplantation. 1999 Nov 15;68(9):1356-61.*

52.

*Handa N, Hatanaka M, Baumgartner WA et al.:**Late cyclosporine treatment ameliorates established coronary graft disease in rat allografts. Transplantation. 56(3):535-40, 1993*

53.

*Haverich A, Gorler H. :**Experience with cyclosporine: from revolution to evolution of immunosuppressive protocols in thoracic organ transplantation. Transplant Proc. 36(2 Suppl):314S-317S, 2004*

54.

*Hayry P:**Mechanisms of rejection. Curr Opin Immunol. 1(6):1230-5, 1989*

55.

*Hayry P:**Pathophysiology of chronic rejection. Transplant Proc 28(6 Suppl 1):7-10, 1996*

56.

*Hayry P, Aavik E, Savolainen H:**Mechanisms of chronic rejection. Transplant Proc. 31(7A):5S-8S, 1999*

57.

*Heldin CH, Wasteson A, Westermarck B:**Platelet-derived growth factor. Mol Cell Endocrinol. 39(3):169-8, 1985.*

58.

*Herman WH, Holcomb JM, Hricik DE et al.:**Interleukin-1 beta induces endothelin-1 gene by multiple mechanisms. Transplant Proc. 31(1-2):1412-3, 1999*

59.

Hojo M, Morimoto T, Maluccio M et al.: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. Nature. 11;397(6719):530-4, 1999

60.

*Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR :**Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future directions. J Heart Lung Transplant. 11(1 Pt 1):9-23, 1992*

61.

*Hoshi H, Kan M, Chen JK et al.:**Comparative endocrinology-paracrinology-autocrinology of human adult large vessel endothelial and smooth muscle cells. In Vitro Cell Dev Biol. 24(4):309-20, 1988*

62.

*Hruban RH, Beschorner WE, Baumgartner WA et al.:**Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis. Am J Pathol. 137(4):871-82, 1990*

63.

*Hu SJ, Fernandez R, Jones JW Jr :**Cyclosporine A stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells and enhances monocyte adhesion to vascular smooth muscle cells. Transplant Proc. 31(1-2):663-5, 1999*

64.

*Hume DM, Merrill JP:**Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. Journal of Clinical Investigation 34: 327, 1955*

65.

*Jonasson L, Holm J, Hansson GK:**Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(7):2303-6, 1988*

66.

*Kandoussi A, Martin F, Hazzan M, Noel C, Fruchart JC, Staels B, Duriez P.**HMG-CoA reductase inhibition and PPAR- alpha activation both inhibit cyclosporin A induced endothelin-1 secretion in cultured endothelial cells. Clin Sci (Lond). 2002 Aug;103 Suppl 48:81S-83S*

67.

*Kobashigawa JA, Kirklin JK, Naftel DC et al.:**Pretransplantation risk factors for acute rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study. The Transplant Cardiologists Research Database Group. J Heart Lung Transplant. 12(3):355-66, . 1993*

68.

*Kosek JC, Hurley EJ, Lower RR :**Histopathology of orthotopic canine cardiac homografts. Lab Invest. 19(1):97-112, 1968*

69.

*Koskinen PK, Lemstrom KB, Hayry PJ:**How cyclosporine modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. Am J Pathol. 146(4):972-80, 1995*

70.

*Kronke M, Leonard WJ, Depper JM et al.:**Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(16):5214-8, 1984*

71.

*Kung L, Batiuk TD, Palomo-Pinon S, Noujaim J, Helms LM, Halloran PF.**Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. Am J Transplant. 2001 Nov;1(4):325-33.*

72.

*Laden AM, Sinclair RA.**Thickening of arterial intima in rat cardiac allografts. A light and electron microscopic study. Am J Pathol. 1971 Apr;63(1):69-84*

73.

*Libby P, Salomon RN, Payne DD et al.:**Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. Transplant Proc. 21(4):3677-84, 1989*

74.

*Liebert M, Kunz HW, Gill TJ 3rd et al.:**CML characterization of a product of a second class I locus in the rat MHC. Immunogenetics. 16(2):143-55, 1982*

75.

*Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D et al.:**The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. Transplantation. 56(2):307-15, 1993*

76.

*Lou H, Kodama T, Zhao YJ, Maurice P, Wang YN, Katz N, Foegh ML.**Inhibition of transplant coronary arteriosclerosis in rabbits by chronic estradiol treatment is associated with abolition of MHC class II antigen expression. Circulation. 1996 Dec 15;94(12):3355-61.*

77..

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS et al.:

Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell. 23;66(4):807-15, 1991

78.

Lurie KG, Billingham ME, Jamieson SW et al.:

Pathogenesis and prevention of graft arteriosclerosis in an experimental heart transplant model. Transplantation31(1):41-7, 1981

79.

Matsuda S, Koyasu S:

Mechanisms of action of cyclosporine. Immunopharmacology. 47(2-3):119-25, 2000

80.

Mennander A, Tiisala S, Paavonen T et al.:

Chronic rejection of rat aortic allograft. II. Administration of cyclosporin induces accelerated allograft arteriosclerosis. Transpl Int. 4(3):173-9, 1991

81.

Mennander A, Paavonen T, Hayry P :

Cyclosporine-induced endothelialitis and accelerated arteriosclerosis in chronic allograft rejection. Transplant Proc. 24(1):341, 1992

82.

Meiser BM, Billingham ME, Morris RE:

Effects of cyclosporin, FK506, and rapamycin on graft-vessel disease. Lancet. 23;338(8778):1297-8, 1991

83.

Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F:

The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. Kidney Int Suppl. 52:S63-9, 1995

84.

Miller LW:

Treatment of cardiac allograft rejection with intravenous corticosteroids. J Heart Transplant. 9(3 Pt 2):283-7, 1990

85.

Miller L, Kobashigawa J, Valantine H et al.: The impact of cyclosporine dose and level on the development and progression of allograft coronary disease. Sandoz/CVIS Investigators. J Heart Lung Transplant. 14(6 Pt 2):S227-34, 1995

86.

Mohacsi PJ, Tuller D, Hulliger B:

Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. J Heart Lung Transplant. 16(5):484-92, 1997

87.

Murphy LL, Hughes CC.

Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 beta pathway. J Immunol. 2002 Oct 1;169(7):3717-25.

88..

Muskett A, Burton NA, Eichwald EJ et al.:

The effect of antiplatelet drugs on graft atherosclerosis in rat heterotopic cardiac allografts. Transplant Proc. 19(4 Suppl 5):74-6, 1987

89.

Nakagawa T, Sukhova GK, Rabkin E et al.:

Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. Circulation. 92(4):987-93, 1995

90.

Neish AS, Loh E, Schoen FJ:

Myocardial changes in cardiac transplant-associated coronary arteriosclerosis: potential for timely diagnosis. J Am Coll Cardiol. 1;19(3):586-92, 1992

91

Okada K, Nishida Y, Murakami H, Sugimoto I, Kosaka H, Morita H, Yamashita C, Okada M. Role of endogenous endothelin in the development of graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts: antiproliferative effects of bosentan, a nonselective endothelin receptor antagonist. Circulation. 1998 Jun 16;97(23):2346-51.

92.

Olivari MT, Homans DC, Wilson RF:

Coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving triple-drug immunosuppressive therapy. Circulation. 80(5 Pt 2):III111-5, 1989

93.

Ono K, Lindsey ES:

Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. 57(2):225-9, 1969

94.

Pascoe EA, Barnhart GR, Carter WH Jr et al.:

The prevalence of cardiac allograft arteriosclerosis. Transplantation. 44(6):838-9, 1987

95.

Paul LC, Davidoff A, Benediktsson H.

Cardiac allograft atherosclerosis in the rat. The effect of histocompatibility factors, cyclosporine, and an angiotensin-converting enzyme inhibitor. Transplantation. 1994 Jun 27;57(12):1767-72.

96.

Rabin BS, Griffith BP, Hardesty RL:

Vascular endothelial cell HLA-DR antigen and myocyte necrosis in human allograft rejection. J Heart Transplant. 4(3):293-5, 1985

97.

Radovancevic B, Birovljev S, Frazier OH et al.:

Long-term follow-up of cyclosporine-treated cardiac transplant recipients. Transplant Proc. 22(3 Suppl 1):21-4, 1990

98.

Rezzani R, Rodella L, Bianchi R.

Induction of endothelin in rat kidney after cyclosporine A treatment. Acta Histochem. 2001 Oct;103(4):423-31.

99.

Rose AG, Viviers L, Odell JA:

Autopsy-determined causes of death following cardiac transplantation. Arch Pathol Lab Med 116:137, 1992

100.

Ross R :

The pathogenesis of atherosclerosis--an update. N Engl J Med. 20;314(8):488-500, 1986

101.

Ross R, Masuda J, Raines EW :

Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis. Ann N Y Acad Sci. 598:102-12, 1990

102.

Roza AM, Pieper G, Moore-Hilton G, Johnson CP, Adams MB. *Free radicals in pancreatic and cardiac allograft rejection. Transplant Proc. 1994 Apr;26(2):544-587.*

103.

Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ et al. :

Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. Am J Pathol. 138(4):791-8, 1991

104.

Sanders CE Jr, Curtis JJ:

Role of hypertension in chronic renal allograft dysfunction. Kidney Int Suppl. 52:S43-7, 1995

105.

Sanroman Budino B, Vazquez Martul E, Pertega Diaz S et al.:

Autopsy-determined causes of death in solid organ transplant recipients. TransplantProc. 36(3):787-9, 2004

106.

Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC.

Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1996 Feb;78(2):225-30.

107.

Sarris GE, Mitchell RS, Billingham ME, Glasson JR, Cahill PD, Miller DC.

Inhibition of accelerated cardiac allograft arteriosclerosis by fish oil. J Thorac Cardiovasc Surg. 1989 Jun;97(6):841-54

108.

Schmid C, Kerber S, Baba HA et al.:

Graft vascular disease after heart transplantation European Heart Journal. 18(4):554-9, 1997

109.

Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM et al.:

Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. Kidney Int. 56(6):2147-59, 1999

110.

Shumway NE, Lower RR, Stofor RC: *Transplantation of the heart. Advances in Surgery. 2:265-84, 1966.*

111.

Simonson MS, Herman WH, Robinson A et al.:

Inhibition of endothelin-converting enzyme attenuates transplant vasculopathy and rejection in rat cardiac allografts. Transplantation. 27;67(12):1542-7, 1999

112.

Simonson MS, Robinson AV, Schulak JA, Hricik DE.

Inhibition of endothelin-1 improves survival and vasculopathy in rat cardiac transplants treated with cyclosporine. Transplantation. 2002 Apr 15;73(7):1054-9.

113.

Stinson EB, Dong E Jr, Shumway NE: *Experimental and clinical cardiac transplantation. Postgraduate Medicine. 46(3):199-203, 1969*

114.

Strestikova P, Otova B, Filipec M, Masek K, Farghali H.

Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression by FK 506 and cyclosporin A. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2001 Feb;23(1):67-74.

115.

Sumethkul V, Jirasiritham S, Chiewsilp P:

Optimum maintenance dosage of cyclosporine and the impact on the occurrence of chronic rejection: an extensive multivariate analysis. Transplant Proc. 27(1):844-5, 1995

116.

Taylor DO, Edwards LB, Mohacsi PJ, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI.

The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twentieth official adult heart transplant report--2003. J Heart Lung Transplant. 2003 Jun;22(6):616-24

117.

Thomas F, Araneda D, Henretta J et al.:

Extended and expanded studies of xenograft rejection in immunodeficient animals. Transplant Proc. 26(3): 1224-7, 1994

118.

Thomas H, Green IC, Wallis M et al.:

Heterogeneity of growth-hormone receptors detected with monoclonal antibodies to human growth hormone. Biochem J. 15;243(2):365-72, 1987

119.

Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J et al.:

Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells. On the role of platelet-derived growth factor. Differentiation. 25(2):156-67, 1983

120.

Tullius SG, Hancock WW, Heemann U et al.:

Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. Transplantation. 15;58(1):93-9, 1994

121.

Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO et al.:

The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report—2004. J Heart and Lung Transplant. 23(7): 804-15, 2004

122.

Uretsky BF, Murali S, Reddy PS et al.:Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. Circulation. 76(4):827-34, 1987

123.

Vassalli G, Kaski JC, Tousoulis D, Kiowski W, Turina M, Follath F, Gallino A.

Low-dose cyclosporine treatment fails to prevent coronary luminal narrowing after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 1996 Jun;15(6):612-9.

124.

Venkatesh N, Feng Y, DeDecker B, Yacono P, Golan D, Mitchison T, McKeon F.

Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):8969-74. Epub 2004 Jun 7.

125.

von der Leyen HE, Mann MJ, Dzau VJ.

Gene inhibition and gene augmentation for the treatment of vascular proliferative disorders. Semin Interv Cardiol. 1996 Sep;1(3):209-14. Review.

126.

Wassef R, Cohen Z, Langer B:

Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. Transplantation. 40(5):489-93, 1985

127.

Weis M, von Scheidt W.

Cardiac allograft vasculopathy: a review. Circulation. 1997 Sep 16;96(6):2069-77. Review.

128.

Wiebe K, Fraund S, Steinmuller C, Steinhoff G.

Rat cytomegalovirus and Listeria monocytogenes infection enhance chronic rejection after allogenic rat lung transplantation. Transpl Int. 2005 Oct;18(10):1166-74.

129.

Winters GL, Kendall TJ, Radio SJ et al.:

Posttransplant obesity and hyperlipidemia: major predictors of severity of coronary arteriopathy in failed human heart allografts. J Heart Transplant. 9(4):364-71, 1990

130.

Witte LD, Cornicelli JA:

Platelet-derived growth factor stimulates low density lipoprotein receptor activity in cultured human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 77(10):5962-6, 1980

131.

Yang HT, Ren J, Laughlin MH, Terjung RL.

Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Jan;282(1):H301-10.

132.

Zhang H, Horwitz L, Ruvolo P, Colombani P, Hess AD.

The role of cyclosporine-induced autoreactive T lymphocytes in solid organ allograft survival and chronic rejection. Transplantation. 1995 Jul 27;60(2):115-22.

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD. Dr. Olbrich für die Betreuung meiner Arbeit und für die kreativen Verbesserungsvorschläge

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Fortmeyer und Dr. Maybaum von der Tierversuchsanlage der Uniklinik Frankfurt am Main für die Unterstützung und für die Möglichkeit, jederzeit die Einrichtungen der TVA Frankfurt nutzen zu können

Ich danke PD Dr. Hermann für die professionelle Beurteilung der akuten Abstoßung

Ich danke Prof. Dr. Scheuermann und den MTAs des Nierenfunktionslabors für die Bestimmung der Blutwerte

Ich danke Frau Schröder vom Zentrallabor der Uniklinik Frankfurt am Main für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Präparate

Ich danke PD Dr. Wicht für die Hilfe bei der Entwicklung der computergestützten Auswertung und die Möglichkeit, diese in seinem Büro durchführen zu können

Ich danke meinem Freund Marc Weinert für die Unterstützung und die guten Zeiten

Zu guter letzt danke ich Dr. Dr. Markus Richter, Freund und Vorbild, für die Überlassung der Arbeit und für seine visionären Ideen, sein unermüdliches Streben nach Perfektion und seine hilfreichen Ratschläge

Claudia – Amir – Helena

8. Lebenslauf

ZU MEINER PERSON

- § David Oliver Schramm
- § Geb. am 04. Juli 1972 in Königstein im Taunus
- § Verheiratet, 2 Kinder

SCHULBILDUNG

- § Viktoria-Schule Kronberg **1978 - 1982**
- § Altkönig-Gymnasium, Kronberg **1982 - 1991**
- § Abschluß: Abitur **1991**

HOCHSCHULAUSSCHULUNG

- § Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main **10 / 1993**
- **2 / 1994**
- § Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main **4 / 1994**
- **4 / 2000**
- § Physik **3 / 1996**
- § Erstes Staatsexamen **3 / 1997**
- § United States Medical Licensing Examination Step 1 **6 / 1998**
- § Zweites Staatsexamen **4 / 1999**
- § Drittes Staatsexamen **4 / 2000**

ARZT IM PRAKTIKUM

- § Arzt im Praktikum am Klinikum Stadt Hanau, Abteilung für Anästhesie und operative Intensivmedizin, Direktor: Prof. Dr. med. P. M. Osswald **6 / 2000**
- **11/2001**

ASSISTENZARZT

- Assistenzarzt am Klinikum Stadt Hanau, Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-, Thorax- und Unfallchirurgie, Direktor: Prof. Dr. med. Anton Valesky **Seit 12 / 2001**

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Einfluss der Dauer der Ciclosporin A-Therapie und der Höhe des
Ciclosporin A-Spiegels auf die Entwicklung der akuten Transplantatabstoßung und
der Transplantatvaskulopathie am heterotopen Herztransplantationsmodell der Ratte**

in der Medizinischen Klinik IV: Kardiologie

unter Leitung von Herrn PD Dr. H.G. Olbrich mit Unterstützung durch Dr. Dr. med. M. Richter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit zu Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Transplant Proc. 34(5):1479-80, 2002

J Heart Lung Transplant. 21(4): 425-34, 2002

J Heart Lung Transplant. 20(2): 234, 2001

Ortenberg, den 09.01.2005

David Schramm