

Aus dem Zentrum für Chirurgie  
des Klinikums der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie  
Schwerpunkt Thoraxchirurgie und thorakale Transplantationen  
(Leiter: Prof. Dr. med. H.-G. Fieguth)

**Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im peripheren  
Blut unter der Berücksichtigung der chronischen  
Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation am Rattenmodell.  
Vergleichende Studie unter der Behandlung mit Cyclosporin A,  
Mycophenolate mofetil und Tacrolimus**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung  
des Doktorgrades des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Henning M. Jahr  
aus Osnabrück

Frankfurt am Main, 2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. H.-G. Fieguth  
Koreferent: PD G. Oremek  
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2005

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

# Gliederung

<b><u>1.</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>2.</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>9</u></b>
2.1.	STUDIENDESIGN	10
2.2.	VERSUCHSTIERE	11
2.3.	VERSUCHSTIERHALTUNG	11
2.4.	MEDIKAMENTENZUBEREITUNG UND APPLIKATION	11
2.4.1.	CYCLOSPORIN A (CSA)	11
2.4.2.	TACROLIMUS (FK-506)	12
2.4.3.	MYCOPHENOLATE MOFETIL (MMF)	12
2.5.	OPERATIONSTECHNIK	12
2.5.1.	TIERMODELL	12
2.5.2.	NARKOSE UND OPERATIONSVORBEREITUNG	13
2.5.3.	SPENDEROPERATION	13
2.5.4.	EMPFÄNGEROPERATION	14
2.5.5.	POSTOPERATIVER VERLAUF	16
2.5.6.	SAKRIFIKATION UND BLUTENTNAHME	17
2.5.7.	AUSFÄLLE UND PROBLEME	17
2.6.	LABORANALYSEN	18
2.6.1.	ANTI-KÖRPER	18
2.6.2.	AUFBEREITUNG DER PROBE	20
2.6.3.	MESSUNG AM FACS	21
2.6.4.	AUSWERTUNG DER MEßERGEBNISSE	22
2.6.5.	STATISTIK UND GRAFIKEN	25

---

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
<b>3.1.</b>	<b>IMMUNZYTOMETRISCHE MESSUNGEN</b>	<b>27</b>
3.1.1.	PROZENTUALER ANTEIL BESTIMMTER LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN IM PERIPHEREN BLUT	27
3.1.1.1.	CD2	27
3.1.1.2.	CD3	29
3.1.1.3.	CD4	30
3.1.1.4.	CD5	32
3.1.1.5.	CD8	33
3.1.1.6.	CD11a	34
3.1.1.7.	CD11b	35
3.1.1.8.	CD18	36
3.1.1.9.	CD25	37
3.1.1.10.	CD28	38
3.1.1.11.	CD45RA	40
3.1.1.12.	CD49d	41
3.1.1.13.	CD71	43
3.1.2.	REZEPTORDICHTE AUF DEN POSITIVEN LYMPHOZYTEN IM PERIPHEREN BLUT	44
3.1.2.1.	CD2	44
3.1.2.2.	CD3	45
3.1.2.3.	CD4	46
3.1.2.4.	CD5	47
3.1.2.5.	CD8	48
3.1.2.6.	CD11a	49
3.1.2.7.	CD11b	50
3.1.2.8.	CD18	51
3.1.2.9.	CD25	52

3.1.2.10.	CD28	53
3.1.2.11.	CD45RA	54
3.1.2.12	CD49d	55
3.1.2.13	CD71	56
<b>4.</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>57</b>
<b>4.1.</b>	<b>PATHOPHYSIOLOGISCHE MECHANISMEN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG</b>	<b>58</b>
4.1.1.	DIE HYPERAKUTE ABSTOßUNGSREAKTION	59
4.1.2.	DIE AKUTE ABSTOßUNGSREAKTION	59
4.1.3.	DIE CHRONISCHE ABSTOßUNGSREAKTION	60
4.1.4.	DIE BEHANDLUNG DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	60
<b>4.2.</b>	<b>DIE KLINISCHE SITUATION</b>	<b>61</b>
<b>4.3.</b>	<b>ZUR WIRKUNG DER VERWENDETEN IMMUNSUPPRESSIVA</b>	<b>62</b>
4.3.1.	ZUR WIRKUNG VON CYLOSPORIN A (CSA)	62
4.3.2.	ZUR WIRKUNG VON TACROLIMUS (FK-506)	64
4.3.3.	ZUR WIRKUNG VON MYCOPHENOLATE MOFETIL (MMF)	65
<b>4.4.</b>	<b>ZUR EXPRESSION VON AUSGEWÄHLTEN OBERFLÄCHENANTIGENEN AUF PERIPHEREN LYMPHOZYTEN</b>	<b>67</b>
4.4.1.	ZUR EXPRESSION VON CD2	67
4.4.2.	ZUR EXPRESSION VON CD3	69
4.4.3.	ZUR EXPRESSION VON CD4	70
4.4.4.	ZUR EXPRESSION VON CD5	72
4.4.5.	ZUR EXPRESSION VON CD8	73
4.4.6.	ZUR EXPRESSION VON CD11A/CD18 UND CD11B/CD18	73
4.4.7.	ZUR EXPRESSION VON CD25	75
4.4.8.	ZUR EXPRESSION VON CD28	76
4.4.9.	ZUR EXPRESSION VON CD45RA	77
4.4.10.	ZUR EXPRESSION VON CD49D	78

4.4.11.	ZUR EXPRESSION VON CD71	79
4.5.	ZUSMMENFASSEDE ÜBERLEGUNGEN	79
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>99</b>
7.1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
7.2.	LEBENS LAUF	102
7.3.	DANKSAGUNG	103
7.4.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	104

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Aorto-aortale End-zu-Seit Anastomose</i>	15
<i>Abbildung 2: A. pulmonalis-V. cava End-zu Seit-Anastomose</i>	15
<i>Abbildung 3: Probenaufbereitung</i>	20
<i>Abbildung 4: Schematischer Aufbau des FACS</i>	22
<i>Abbildung 5: Darstellung der Meßergebnisse als Dotblot</i>	23
<i>Abbildung 6: Markierung der Lymphozyten im Dotblot</i>	24
<i>Abbildung 7: Darstellung der Fluoreszenzwerte im Histogramm</i>	24
<i>Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der CD2-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	27
<i>Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der CD3-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	29
<i>Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der CD4-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	30
<i>Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der CD5-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	32
<i>Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der CD8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	33
<i>Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der CD11a-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	34
<i>Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der CD11b-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	35

<i>Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der CD18-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	36
<i>Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der CD25-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	37
<i>Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der CD28-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	38
<i>Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der CD45RA-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	40
<i>Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der CD49d-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	41
<i>Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der CD71-positiven Lymphozyten im peripheren Blut</i>	43
<i>Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD2-positiven Lymphozyten</i>	44
<i>Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD3-positiven Lymphozyten</i>	45
<i>Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD4-positiven Lymphozyten</i>	46
<i>Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD5-positiven Lymphozyten</i>	47
<i>Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD8-positiven Lymphozyten</i>	48
<i>Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD11a-positiven Lymphozyten</i>	49
<i>Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD11b-positiven Lymphozyten</i>	50
<i>Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD18-positiven Lymphozyten</i>	51
<i>Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD25-positiven Lymphozyten</i>	52
<i>Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD28-positiven Lymphozyten</i>	53
<i>Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD45RA-positiven Lymphozyten</i>	54
<i>Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD49d-positiven Lymphozyten</i>	55
<i>Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD71-positiven Lymphozyten</i>	56
<i>Abbildung 34: Strukturformel Cyclosporin A</i>	63
<i>Abbildung 35: Strukturformel FK-506</i>	64
<i>Abbildung 36: Strukturformel des Prodrug Mycophenolate mofetil sowie der durch Esterasenspaltung entstandenen Wirkform Mycophenolsäure</i>	65
<i>Abbildung 37: Pyrimidinstoffwechsel inklusive Salvage-pathway</i>	66
<i>Abbildung 38: Differenzierung von naiven CD4-Zellen</i>	70

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Beurteilung der Herzfunktion</i>	16
<i>Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit Clone, Isotype, Verdünnung und Hersteller</i>	19



# **1. Einleitung**

Seit der Erstbeschreibung der orthotopen Herztransplantation beim Menschen durch Christian Barnard 1967 durchlief die Transplantationsmedizin eine rasante Entwicklung [1]. Durch immer fortschrittlichere immunsuppressive Behandlungsregime gelang es die akute Transplantatabstoßung zuverlässig zu verhindern. Die Frühletalität konnte auf unter 15 % gesenkt werden [2]. Insbesondere der Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A sind diese Erfolge zu verdanken. Dies führte dazu, dass die Herztransplantation sich in den letzten zehn Jahren zu einem Standardverfahren in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz entwickelt hat. Die Spätletalität bzw. ihre Hauptursache die chronische Abstoßung konnte jedoch nicht gesenkt werden. Durch die erfolgreiche Prophylaxe und Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen richtet sich nun das Hauptinteresse auf die Unterdrückung und Behandlung der chronischen Abstoßungsreaktion. Denn weiterhin entwickeln jährlich etwa 15-20 % der transplantierten Patienten eine akzelerierte Form der Koronarsklerose, nach drei Jahren findet sich eine Prävalenz von 45 % [3]. Sie ist die häufigste Ursache für Tod und Retransplantation nach den ersten drei Monaten nach einer Herztransplantation und somit der limitierende Faktor für die Langzeitprognose. Bei der chronischen Abstoßung nach orthotoper Herztransplantation entwickelt sich eine streng auf das Transplantat begrenzte Vaskulopathie im Sinne einer obstruktiven Gefäßveränderung. Aufgrund der afferenten autonomen Denervierung des Herzens entwickeln die Patienten normalerweise keine Angina pectoris-Symptomatik, sondern versterben entweder an einer progredienten Herzinsuffizienz oder am plötzlichen Herztod [4].

Mit der vorliegenden Untersuchung sollte in einem Kleintiermodell untersucht werden, ob es im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung Langzeitveränderungen von bestimmten Oberflächenmerkmalen auf Lymphozyten im Blut nach einer Herztransplantation gibt.

## **2. Material und Methoden**

## **2.1. Studiendesign**

Bei der vorliegenden Studie sollten die Auswirkungen von unterschiedlichen immunsuppressiven Medikamenten auf das Geschehen der chronischen Abstoßungsreaktion nach einer Herztransplantation am Tiermodell der Ratte gezeigt werden. Es wurden drei Tiergruppen gebildet, die nach der Herztransplantation mit jeweils einem Immunsuppressivum behandelt wurden. Eine vierte Tiergruppe wurde mit keinem Medikament behandelt und diente als Kontrollgruppe. Folgende Medikamente wurden verabreicht:

- Cyclosporin A (CsA)
- Tacrolimus (FK-506) und
- Mycophenolate mofetil (MMF).

Um kontinuierliche Daten der immunologischen Veränderungen nach erfolgter Transplantation erheben zu können wurden die Tiere an definierten Zeitabständen (Tag 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56 und 60) sakrifiziert. Daraus ergaben sich 23 Messpunkte. Die Reihenfolge der Tötungen war vor Versuchsbeginn in einer Liste randomisiert worden und stand in keinem Zusammenhang mit der Operationsreihenfolge. Pro Messpunkt wurden bei den mit MMF und FK-506 behandelten Tieren jeweils vier Tiere, bei den mit CsA behandelten Tieren und der Kontrollgruppe jeweils drei Tiere sakrifiziert. Hieraus ergaben sich Gruppengrößen von 92 Tieren bei MMF und FK-506 bzw. 69 Tieren bei der CsA- und der Kontrollgruppe.

Um eine Vergleichsgruppe und einen Ausgangswert für die Messungen zu erhalten wurde bei zehn nicht operierten und nicht mit immunsuppressiven Medikamenten behandelten Tieren, die in Alter und Gewicht den Versuchstieren entsprachen, Blut entnommen und wie bei den Versuchstieren weiterverarbeitet.

## **2.2. Versuchstiere**

Die Versuchstiere wurden von der Harlan-Winkelmann GmbH, Gartenstraße 27, 33178 Borcken bezogen.

Als Spendertiere wurden Ratten vom Inzuchtstamm LEWIS und als Empfängertiere Ratten vom Inzuchtstamm FISHER 344 verwendet.

## **2.3. Versuchstierhaltung**

In der Versuchstieranlage des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität wurden die Tiere unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. P. Fortmeyer unter regelmäßiger tierärztlicher Kontrolle gehalten und die Experimente durchgeführt.

Die Tiere wurden in Makrolon Käfigen mit Einstreu, Altromin Standard-Diät Pressfutter, Ratten/Mäuse und Wasser ad libitum bei 22 +/- 1 Grad Celsius Temperatur gehalten. Der Raum, in dem die Tiere gehalten wurden, wurde von 6 Uhr bis 19 Uhr mit Kunstlicht beleuchtet. Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere bei OP lag zwischen 200 g und 240 g.

Dies fand alles unter strenger Beachtung des Tierschutzgesetzes statt.

## **2.4. Medikamentenzubereitung und Applikation**

### **2.4.1. Cyclosporin A (CsA)**

Die Tiere erhielten nach der Transplantation CsA in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht einmal täglich mit einer Insulinspritze subcutan in das Nackenfell verabreicht. Hierzu wurde aus handelsüblichem Sandimmun® Infusionslösungskonzentrat der Sandoz AG und Kochsalzlösung eine Lösung mit konstanter Konzentration hergestellt.

#### 2.4.2. Tacrolimus (FK-506)

Das FK-506 wurde den Tieren in einer Dosierung von 0,32 mg/kg Körpergewicht einmal täglich mit einer Insulinspritze in die Muskulatur des Hinterlaufs verabreicht. Um Entzündungen und Begleiterscheinungen vorzubeugen wurde die Seite der Injektion täglich gewechselt. Das hierfür verwendete FK-506 wurde uns von der Firma Fujisawa in einer speziellen Formulation für Tierversuche und intramuskulären Gebrauch zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.3. Mycophenolate Mofetil (MMF)

Die Applikation von MMF erfolgte peroral in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht und wurde auf zwei Gaben pro Tag aufgeteilt. Hierzu wurden die Tiere mit einer starren Sonde sondiert. Das MMF wurde uns von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt. Die Zubereitung wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums anhand folgenden Rezeptes von Hoffmann-La Roche übernommen: in 100 ml destilliertem Wasser wurden nacheinander langsam 0,9 g Benzylalkohol, 0,4 g Polysorbate 80, 0,9 g Kochsalz und 0,5 g Carboxymethylcellulose 0,5 g gelöst. Danach wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf 3,5 eingestellt und autoklaviert. In diese Trägersubstanz wurde dann über Nacht 1 g MMF-Pulver eingerührt.

### **2.5. Operationstechnik**

#### 2.5.1. Tiermodell

Das Transplantationsmodell bestand in der heterotopen Transplantation von Herzen der Lewis-Ratte auf Fisher 344-Ratten [5]. Die Transplantation wurde, in einigen Teilen modifiziert, nach der Methode von Ono und Lindsey durchgeführt [6]. Dabei wurde die Aorta des Transplantats End-zu-Seit mit der Aorta abdominalis des Empfängertieres und die Arteria pulmonalis mit der Vena cava inferior ebenfalls End-zu-Seit verbunden.

Daraus resultierte ein Transplantat mit arbeitendem rechten Ventrikel, das über den koronaren Kreislauf perfundiert wurde. Arteriell Blut für den Eigenbedarf des Transplantats konnte durch die Koronarien, über den Sinus venosus in den rechten Ventrikel gelangen. Das sich im rechten Ventrikel sammelnde Blut wurde durch die regelmäßige Herzaktion über die Arteria pulmonalis des Spenderherzens in die Vena cava inferior des Empfängers ausgestoßen.

### 2.5.2. Narkose und Operationsvorbereitung

Die Tiere wurden zur Einleitung der Narkose zunächst in einem mit CO<sub>2</sub> gefüllten Behälter in einen CO<sub>2</sub>-Rausch versetzt um die intraperitoneale Gabe von Nembutal® (Phenobarbital) zu ermöglichen. Initial wurden 12,5 mg Nembutal intraperitoneal verabreicht. Das Nembutal wurde hierzu mit Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zeigte sich während der Operation, dass die Narkosetiefe der Tiere abflachte wurde Nembutal in 5 mg Portionen unverdünnt mit einer Insulinspritze in das eröffnete Abdomen nachgegeben.

Nach dem Einleiten der Narkose wurde mit einem Einmalrasierer im späteren OP-Gebiet das Fell entfernt.

### 2.5.3. Spenderoperation

Als Spendertiere wurden Lewis-Ratten verwendet. Nach Analgosedierung wurde das Abdomen durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Es erfolgte die Präparation von V. cava und Aorta. Das Tier wurde durch Gefäßdurchtrennung zum Verbluten gebracht. Anschließend wurde der Thorax durch einen schrägverlaufenden Schnitt zum Xyphoid zunächst nach rechts kranial und dann unter sorgfältiger Beachtung des Perikards nach links kranial eröffnet.

Die komplette Thoraxwand wurde abgehoben und mit der Schere abgesetzt. Mit kalter (4°C) Kochsalzlösung, die in die Thoraxhöhle gegeben wurde, wurde die Herzaktion verlangsamt bis sie zum Erliegen kam. Mit Mikropinzetten wurde das Perikard vom Herz entfernt. Die obere und die untere Hohlvene wurden ligiert und anschließend durchtrennt. Danach wurde

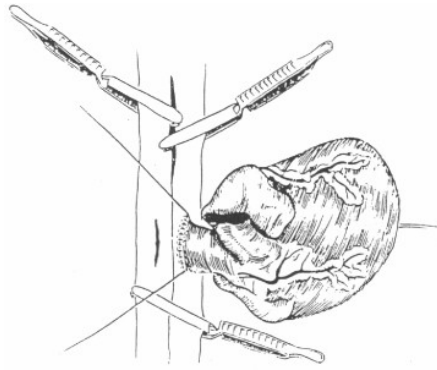
der Aortenbogen stumpf präpariert und vor dem Abgang der rechten A. carotis abgesetzt. Die A. pulmonalis wurde präpariert und vor ihrer Aufteilung in den rechten und linken Hauptast durchtrennt. Anschließend wurde das Herz angehoben, um sämtliche Lungenvenen mit einer einzigen Ligatur zu unterbinden. Durch Absetzen des Herzens unmittelbar hinter dieser Massenligatur war das Herz vollständig mobilisiert und konnte aus der Thoraxhöhle entnommen werden. Nach der Entnahme wurde das Herz noch mit kalter heparinierter Kochsalzlösung gespült und in ihr aufbewahrt.

#### 2.5.4. Empfängeroperation

Als Empfänger dienten ausschließlich Fisher 344-Ratten. Nach Vorbereitung wie beim Spendertier wurde beim Empfängertier nach medianer Hautinzision über dem Abdomen die infrarenale Region der Aorta und Vena cava inferior präpariert. Nach Anlegen von zwei Clips knapp unterhalb und 1 cm distal des Abganges der Nierenarterien wurde die Vorderwand der Aorta mit einer Mikroschere auf einer Länge inzidiert, die dem Lumen der Spenderaorta entsprach. Nach Ausspülen des Aortensegmentes des Empfängers und der Spenderaorta am Transplantat mit Heparin-Ringerlactatlösung wurde 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 kam.

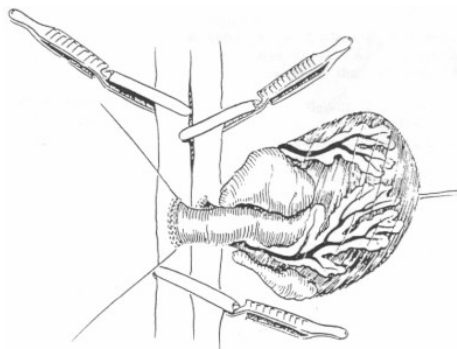
Nach Naht der Anastomosenvorderwand in fortlaufender evertierter Nahttechnik wurde das Transplantat über die Wirbelsäule nach links lateral gelegt, so dass die Hinterwand der arteriellen Anastomose freilag, die ebenfalls in evertierter Nahttechnik, von kranial nach kaudal genäht (siehe Abbildung 1) wurde.





**Abbildung 1: Aorto-aortale End-zu-Seit Anastomose**

Bei linksliegendem Transplantat wurde nun die Vena cava inferior abgeklemmt und inzidiert, wobei der Schnitt links lateral angelegt wurde. Die Arteria pulmonalis wurde bis zur eindeutigen Darstellung der Lumina angespült. Anschließend wurde die die Hinterwand in fortlaufender evertierter Nahttechnik genäht. Zur Naht der Vorderwand wurde das Transplantat erneut nach rechts umgelagert und in fortlaufender Nahttechnik von kranial nach kaudal genäht (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: A. pulmonalis-V. cava End-zu Seit-Anastomose**

Nach Freigabe des Blutflusses durch Entfernen der mikrochirurgischen Clips wurde das Transplantat zusätzlich mit warmer Kochsalzlösung benetzt. Das nun wieder perfundierte Herz verfärbte sich schnell von einem lividen zu einem rosigen Aussehen und wurde sichtbar gefüllt. Eine Unterbrechung des Kammerflimmerns, das initial fast immer eintrat, war durch die einfache, behutsame Kompression der Vorhöfe des Transplantates mit den Fingern zu erreichen.

Abschließend wurden die Anastomosen noch für einige Minuten auf Bluttrockenheit überprüft. Kleinere Nachblutungen konnten meist durch die Kompression mit einem Watteträger beherrscht werden. Reichte dies zur Blutstillung nicht aus, wurden die entsprechenden Stellen übernäht.

Bei weiterhin unauffälligen Verhältnissen wurde zum Abschluss der Operation das Abdomen noch einmal mit warmer Kochsalzlösung gespült und das Omentum majus über die retroperitoneale Wunde gelegt. Nach Verschluss der Bauchdecken mit fortlaufender Naht wurde die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Operationszeiten lagen in einem Bereich zwischen 60 min und 90 min.

#### 2.5.5. Postoperativer Verlauf

Die Tiere wurden nach der Operation täglich klinisch untersucht. Die Trinkmenge und das Körpergewicht wurden täglich gemessen und protokolliert. Bei nicht ausreichender Trinkmenge wurde Flüssigkeit in Form von Fructoselösung durch subkutane Injektion in das Nackenfell substituiert. Zur Vorbeugung von Infektionen wurden alle fünf Tage die Trinkflaschen der Tiere gewechselt.

Des Weiteren wurde täglich durch die Bauchwand die Herzaktion des Transplantats palpirt, seine Funktion beurteilt und protokolliert. Dabei wurde das in Tabelle 1 dargestellte Schema angewandt.

4	normale, kräftige Kontraktilität
3	gute, aber reduzierte Kontraktilität
2	deutlich eingeschränkte Kontraktilität
1	minimale Kontraktilität
0	keine Kontraktion

**Tabelle 1: Beurteilung der Herzfunktion**

Am achten Tag nach der Operation wurden die Fäden der Hautnaht gezogen.

#### 2.5.6. Sakrifikation und Blutentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere wiederum in Narkose versetzt. Nach medianer Laparotomie wurde das Transplantat vorsichtig mobilisiert und von etwaigen Verwachsungen befreit. Aussehen und die Funktion des Herzens wurden beurteilt und die Anastomosenstelle durch stumpfes Präparieren dargestellt. Als nächstes wurde die linke Vena renalis präpariert und mit einer Insulinspritze Heparin injiziert. Die Punktionsstelle wurde danach mit einer Satinskiklemme ausgeklemmt um größere intraabdominelle Blutverluste zu verhindern. Nun wurde der Thorax mit einem Y-förmigen Schnitt eröffnet und die vordere Thoraxwand nach oben weggeklappt. Durch das Durchtrennen der Vena cava inferior wurde das Tier zum Verbluten gebracht. Das sich im Sinus Costophrenicus sammelnde Blut wurde mit Insulinspritzen aufgenommen und in bereitliegende EDTA-Röhrchen gegeben.

#### 2.5.7. Ausfälle und Probleme

Nur Tiere, die nach der Operation das Bewusstsein wiedererlangten wurden mit Ohrclips markiert und in die Studie aufgenommen. Tiere, die intra- oder unmittelbar postoperativ an den Blutverlusten oder durch Narkosemittelüberdosierungen verendeten fanden keine Berücksichtigung.

Ein Tier (ACAD1598), der mit FK-506 behandelten Gruppe musste aufgrund der klinischen Verschlechterung am dritten Tag von der Studie ausgeschlossen werden. Die sofortige Laparotomie zeigte maximal gestaute Nierenbecken. Bei der Eröffnung der Nierenbecken entleerten sich Konkreme, zudem waren die Darmschlingen stark gebläht.

Bei den mit MMF behandelten Tieren bestanden zwei Probleme. Zum einen machte die zur Verfügung stehende orale Medikamentenzubereitung täglich eine zweimalige Sondierung der Tiere notwendig. Bei einigen Tieren führten Fehlsondierungen in der Anfangsphase zur Medikamentenapplikation in die Lunge mit letalem Ausgang, andere erlitten während des

Sondierens tödliche Verletzungen. Zum anderen zeigte sich während des Experimentes, dass die empfohlene Medikamentendosierung von 40 mg/kg Körpergewicht sehr hoch lag. Die Tiere zeigten postoperativ eine schlechte Entwicklung von Gewicht und Trinkmengen. Auch klinisch ging es den Tieren schlecht. Einige Tiere zeigten unerwünschte andere Wirkungen des verabreichten Medikamentes: Anämie mit Bewegungsarmut und Tachypnoe, Agranulozytose, Schleimhautblutungen, Durchfälle. Sieben Tiere verstarben an den Folgen der Nebenwirkungen und wurden tot in ihren Käfigen aufgefunden. Sie wurden nicht in die Studie aufgenommen. Um sowohl die iatrogen als auch die durch die Medikamentennebenwirkungen verursachten Todesfälle zu kompensieren wurden für diese Gruppe insgesamt 105 Tiere operiert, von denen dann 92 in die Studie aufgenommen wurden.

## **2.6. Laboranalysen**

Alle Laborarbeiten fanden wegen der Lichtempfindlichkeit der verwendeten Antikörper in abgedunkelten Räumen statt. Bei allen Arbeiten wurde PBS Dulbecco's, GIBCO BRL, ohne Calcium und Magnesium und ohne Bikarbonat verwendet.

### **2.6.1. Antikörper**

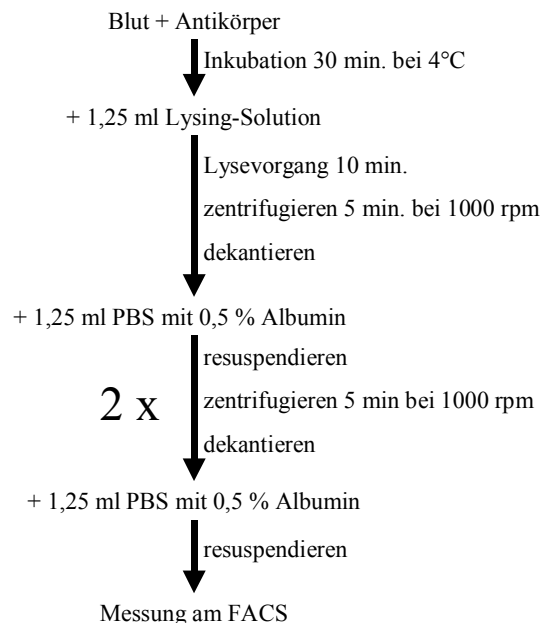
Bei den Versuchen wurden monoklonale Antikörper verwendet, die gegen Oberflächenproteine auf Rattenlymphozyten gerichtet waren. Um die mit den Antikörpern besetzten Lymphozyten bei der späteren Messung erkennen zu können waren die Antikörper primär mit einer fluoreszierenden Substanz markiert. Dabei handelte es sich um Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) dessen maximales Absorptionsspektrum bei 492 nm liegt und bei Anregung maximal in einem Bereich von 520 nm fluoresziert. Zur bessern Handhabbarkeit wurde die Antikörperlösung des Herstellers mit PBS verdünnt. Die Antigene der verwendeten Antikörper, der Clone, die Verdünnung sowie die Hersteller sind in Tabelle 2 aufgelistet.

CD	Clone	Isotype	Verdünnung	Firma
2	OX-34	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:10	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
3	G4.18	IgG <sub>3</sub> , κ	1:10	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
4	W3/25	IgG <sub>1</sub>	1:50	Biosource, 820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA
5	OX-19	IgG <sub>1</sub> , κ	1:10	Pharmingen, 10975 Torreyana Road San Diego, CA 92121, USA
8	MRC OX-8	IgG <sub>1</sub>	1:20	Biosource, 820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA
11a	WT.1	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:5	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
11b	MRC OX-42	IgG <sub>2a</sub>	1:50	Biosource, 820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA
18	WT.3	IgG <sub>1</sub> , κ	1:5	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
25	MRC OX-39	IgG <sub>1</sub>	1:10	Biosource, 820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA
28	JJ319	IgG <sub>1</sub> , κ	1:10	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
45RA	MRC OX-33	IgG <sub>1</sub>	1:10	Biosource, 820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA
49d	MRα4-1	IgG <sub>2a</sub>	1:4	Pharmingen, 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121, USA
71	MRC OX-26	IgG <sub>2a</sub>	1:5	Serotec Ltd., 22 Banside, Puildington, Oxford OX5 1JE, England

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit Clone, Isotype, Verdünnung und Hersteller**

### 2.6.2. Aufbereitung der Probe

Zunächst wurde 1 ml des bei der Explantation gewonnen EDTA-Blutes mit der gleichen Menge PBS vermischt. Für jeden zu bestimmenden Antikörper wurde von dem verdünnten Blut 100 µl in ein Einmal-FACS-Röhrchen Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, gegeben und mit 10 µl des entsprechend verdünnten Antikörpers inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei einer Temperatur von 4°C und Dunkelheit. Um die Erythrozyten in der Probe zu lysieren wurde 1,25 ml entsprechend verdünnte FACS Lysing-Solution 10x concentrate, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, zugegeben. Nach Abschluss des Lysevorgangs nach 10 Minuten wurden die Röhrchen 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Zum Waschen der Lymphozyten wurde 1,25 ml PBS, das mit 0,5 % bovinem Albumin, Fraction V, Sigma, versetzt war, verwendet. Wiederum wurden die Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Waschvorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt und die Probe schließlich nach dem letzten dekantieren mit 1,25 ml PBS mit 0,5 % bovinem Albumin vermischt (siehe Abbildung 3).



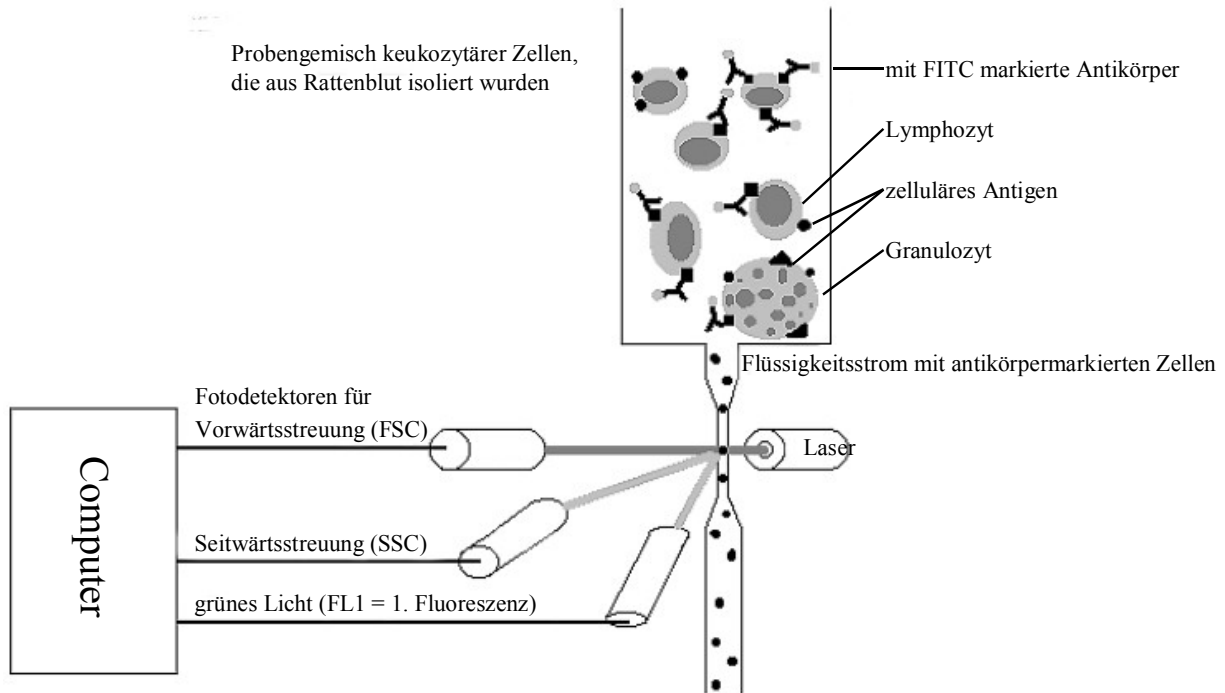
**Abbildung 3: Probenaufbereitung**

### 2.6.3. Messung am FACS

Die Messungen wurden an einem FACScan, Fluorescence Activated Cell Analyzer von der Firma Becton Dickinson an das ein Hewlett Packard 9000-340 Computer angeschlossen war durchgeführt. Für die Messung wurde das Programm Lysis II Ver. 1.1, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, verwendet.

Nach Vorbereitung der Geräte wurden die Proben nacheinander gemessen. Bei der Messung wurde der Inhalt des Probengefäßes durch einen Unterdruck von dem Gerät angesaugt und mit einer definierten Menge von Trägerflüssigkeit (FACSSheat-Fluid) verdünnt. Mit einer konstanten Flussrate floss die Probe dann durch eine dünne, durchsichtige Kanüle auf die ein Laserstrahl gerichtet war. Passierte eine Zelle, die sich in der Probe befand, den Laserstrahl wurde dieser zum einen gestreut, zum anderen regte er, wenn markierte Antikörper an der Zelle gebunden hatten, die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs an. Durch Photodetektoren wurden folgende Messwerte erfasst:

- die Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC), die ein Maß für die Größe der gemessenen Zelle gab,
- die Seitwärtsstreuung (sideward scatter, SSC), die ein Maß für die Granularität der Zelle darstellte und
- die „erste“ Fluoreszenz (FL1), die im Emissionsbereich des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs FITC lag. Sie zeigte an welche Zellen der markierte Antikörper gebunden hatte und die somit positiv für ein bestimmtes Merkmal waren, zum anderen zeigte sie die Dichte des untersuchten Oberflächenmerkmals bzw. des Rezeptors je Zelle an, da der Fluoreszenzwert um so höher war, je mehr Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden hatten. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise des FACS ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des FACS**

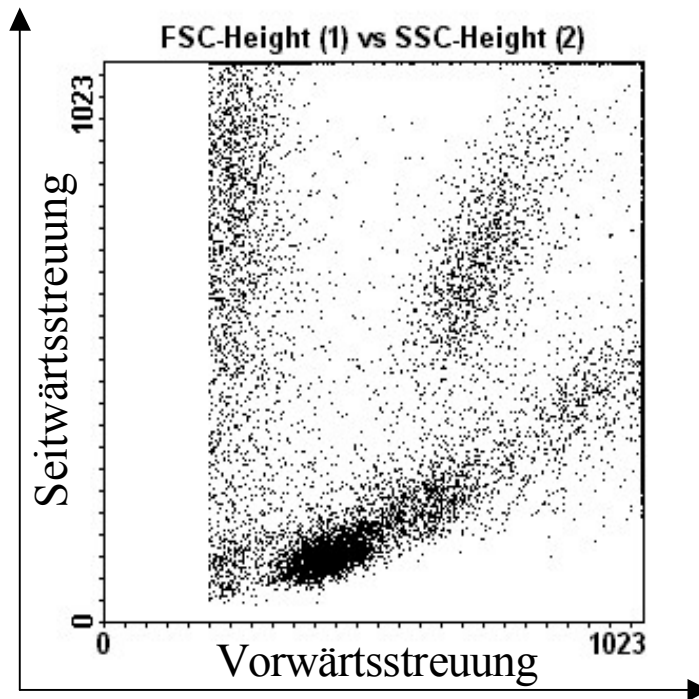
Pro Probe wurden insgesamt 10000 Zellen gemessen. Die Messergebnisse wurden auf Disketten zur späteren Auswertung abgespeichert.

#### 2.6.4. Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.8 © Joseph Trotter, das kostenlos über das Internet bezogen werden kann (<http://www.purdure.edu>).

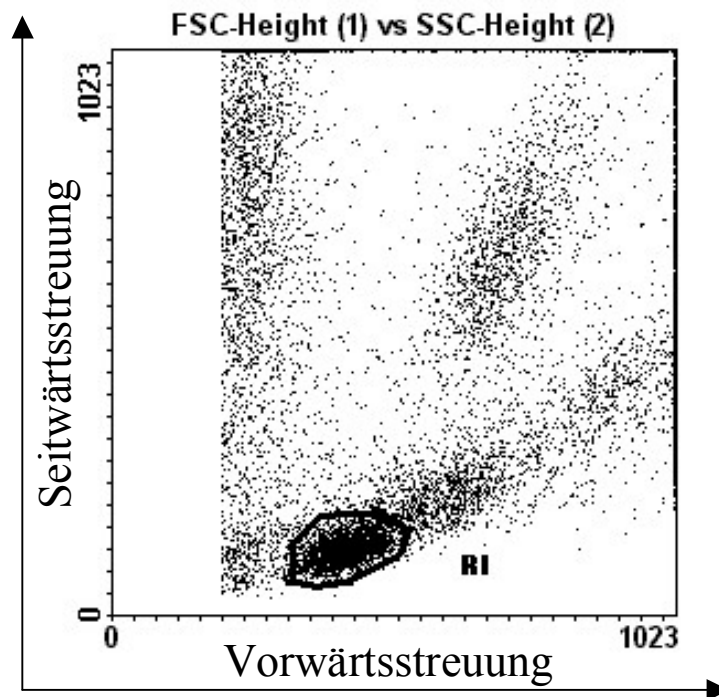
Zunächst wurden die erfassten Werte für jede Zelle in einem Koordinatensystem (Dotplot) dargestellt (siehe Abbildung 5). Wobei die Stärke der Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Stärke Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen wurde. Daraus resultierte ein Diagramm, das einer Darstellung der Zellen nach Größe und Granularität entsprach. Kleine, ungranulierte Zellen wurden nahe des Ursprungs, große, granulierte Zellen im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems abgebildet.





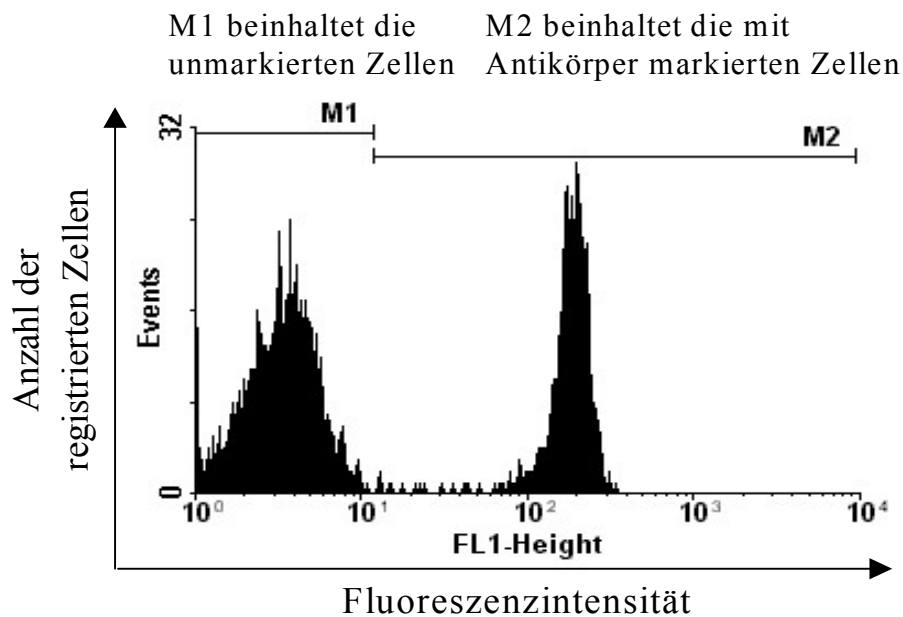
**Abbildung 5: Darstellung der Messergebnisse als Dotplot**

In dieser Darstellung wurde nun die Region (R1), die den Lymphozyten entsprach, markiert (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Markierung der Lymphozyten im Dotplot**

Alle Zellen, die sich innerhalb dieser Region (R1) befanden wurden dann als Histogramm, wobei die Fluoreszenzintensität (FL1) logarithmisch gegen die Anzahl der registrierten Zellen (events) aufgetragen wurde, dargestellt (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Darstellung der Fluoreszenzwerte im Histogramm (hier für CD2)**

In dieser Darstellung wurden die markierten, positiven Zellen und die unmarkierten, negativen Zellen durch das setzen von Markern (M1 und M2) markiert. Das Auswertungsprogramm berechnete nun sowohl den prozentualen Anteil der positiven Zellen (dies entsprach allen in M2 registrierten events), als auch die durchschnittliche Stärke der Fluoreszenz.

#### 2.6.5. Statistik und Grafiken

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Probenzahl von drei bzw. vier Messwerten pro Messpunkt zu gering für eine statistische Auswertung war. Deshalb wurden vom zweiten Tag an jeweils zwei Messpunkte zusammengefasst. Dadurch verminderte sich zwar die Anzahl der Messpunkte von 23 auf 12. Die Anzahl der Proben pro Messpunkt jedoch verdoppelte sich auf sechs bzw. acht. Dies ermöglichte eine statistische Auswertung mit dem unpaaren zweiseitigen t-Test. Dieser wurde für die Bestimmung von Unterschieden der prozentualen Häufigkeit von positiven Lymphozyten bei den Medikamentengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe benutzt. Bei dem statistischen Test wurden Werte von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. Als Ausgangswert für die grafische Darstellung der prozentualen Häufigkeit diente der Median der gemessenen Werte der unbehandelten und nicht operierten Tiere.

Bei der Untersuchung der Rezeptordichte interessierte vor allem die Entwicklung der relativen Rezeptordichte nach Transplantation. Aus diesem Grund wurden der Median der Messwerte der unbehandelten und nicht operierten Tiere als Ausgangswert gleich 100 % gesetzt. Die prozentualen Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert wurden bei den vier Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf grafisch dargestellt.

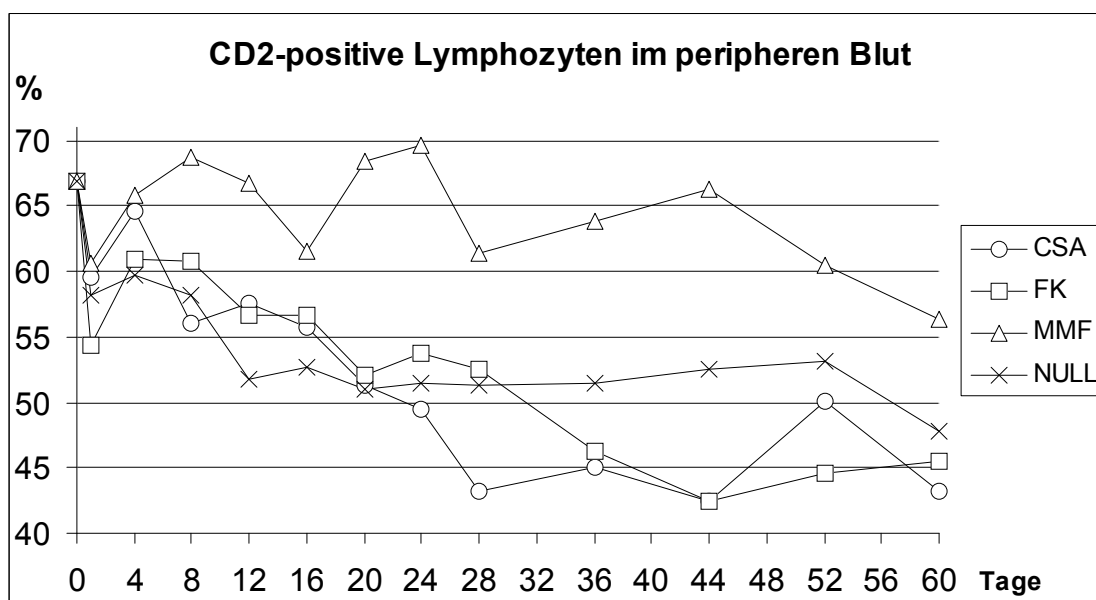
# **3. Ergebnisse**

### 3.1. Immunzytometrische Messungen

Bei allen grafischen Darstellungen und der Beschreibung der Versuchsergebnisse wurde die unbehandelte, operierte Kontrollgruppe in der Legende bzw. im Text mit „NULL“ bezeichnet. Als Ausgangswert für die grafische Darstellung diente der Median der gemessenen Werte der nicht immunsuppressiv behandelten und nicht operierten Tiere.

#### 3.1.1. Prozentualer Anteil bestimmter Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut

##### 3.1.1.1. CD2



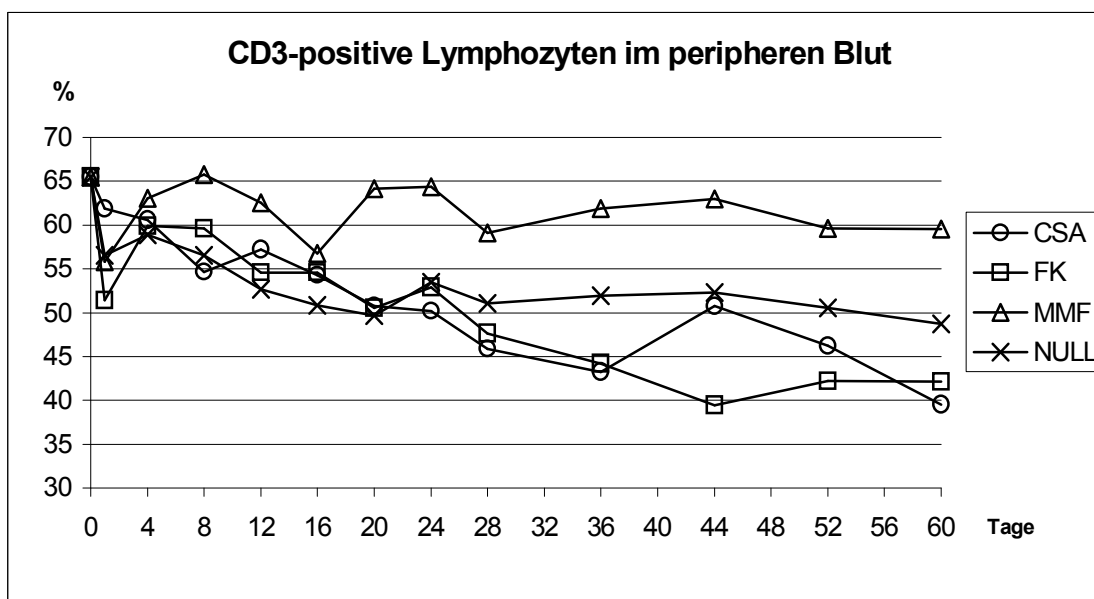
**Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der CD2-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Der Anteil der CD2-positiven Lymphozyten wurde jeweils durch eine durchflusszytometrische Messung am Entnahmetag bestimmt. Der Median der unbehandelten und nicht operierten Tiere lag bei  $66,8 \pm 5,9$  %. In Abbildung 8 ist der postoperative Verlauf der vier Versuchsgruppen grafisch dargestellt. Am ersten postoperative Tag fielen die Messwerte bei alle vier Versuchsgruppen ab (CsA:  $59,6 \pm 0,8$  %, FK-506:  $54,4 \pm 4,4$  %, MMF:  $60,6 \pm 5,1$  %, NULL:  $58,1 \pm 7,4$  %). Bis zum 24. Tag zeigten sich bei den mit CsA und

FK-506 behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gemessenen Werte fielen kontinuierlich auf Werte um 50 % ab (CsA:  $49,3 \pm 8,7$  %, FK-506:  $52,6 \pm 8,0$  %, NULL:  $53,5 \pm 4,3$  %). Im weiteren Verlauf fielen die Werte der CsA- und der FK-506-Gruppe bis auf Werte um 45 % am Versuchsende ab (CsA:  $43,2 \pm 9,8$  %, FK-506:  $45,5 \pm 5,9$  %). Das entsprach einem relativen Verlust von CD2-positiven Lymphozyten von mehr als 30 %. Die Messwerte der Kontrollgruppe zeigten keine Änderung mehr. Nur am 44. Tag zeigten die Messwerte für CsA- und FK-506-Gruppe signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ( $p=0,0019$  bzw.  $p=0,0181$ ), an allen anderen Tagen unterschieden sie sich nicht signifikant.

Der Verlauf bei den mit MMF behandelten Tieren zeigte eine andere Entwicklung. Nach dem initialen Abfall am ersten postoperativen Tag stieg der Anteil der CD2-positiven Lymphozyten wieder auf Werte an, die knapp unter dem Ausgangswert lagen und hielten sich konstant über 60 % (Tag 16:  $61,6 \pm 4,3$  %, Tag 44:  $66,2 \pm 3,8$  %). Dies entsprach einer relativen Abnahme an CD2-positiven Zellen von 10 %. Lediglich am letzten Messtag unterschritten die Messwerte 60 % ( $56,3 \pm 8,5$  %). Vom achten Tag an zeigen die Messwerte signifikante Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe (Tag 8:  $p=0,0287$ , Tag 24:  $p=0,0046$ , Tag 60:  $p=0,0380$ ).

## 3.1.1.2. CD3



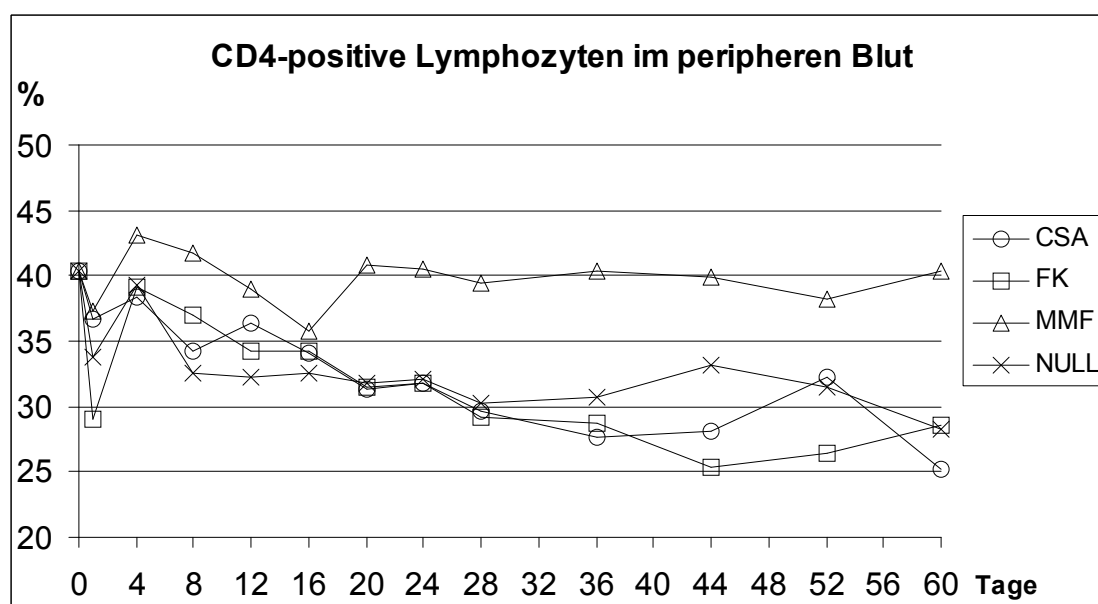
**Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der CD3-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Der Median der CD3-positiven Lymphozyten bei den Tieren der unbehandelten und nicht operierten Vergleichsgruppe lag bei  $65,5 \pm 6,5$  %. Der weitere postoperative Verlauf der vier Versuchsgruppen ist in Abbildung 9 grafisch dargestellt. Am ersten postoperativen Tag fiel die Menge der CD3-positiven Zellen bei allen Versuchsgruppen ab. Der stärkste Abfall war bei den mit FK-506 behandelten Tieren auf  $51,4 \pm 5,7$  %, der schwächste bei der CsA-Gruppe auf einen Wert von  $61,9 \pm 1,6$  % zu beobachten. Am nächstfolgenden Beobachtungspunkt (Tag 4) stiegen die Messwerte aller Versuchsgruppen auf Werte um 60 % an (CsA:  $60,6 \pm 4,3$ , FK-506:  $59,9 \pm 3,5$ , MMF  $63,0 \pm 4,9$ , NULL:  $58,9 \pm 3,7$ ). Im weiteren Verlauf fielen die Messwerte für Tiere der CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe kontinuierlich bis zum 20. Beobachtungstag auf Werte um 50 % ab (CsA:  $50,8 \pm 5,0$  %, FK-506:  $50,5 \pm 4,1$  %, NULL:  $49,7 \pm 9,7$  %), ohne sich signifikant voneinander zu unterscheiden. Danach fielen die Messwerte für die CsA- und die FK-506-Gruppe bis zum Beobachtungsende kontinuierlich auf Werte zwischen 40 % und 45 % ab, was einen relativen Verlust von CD3-positiven Lymphozyten von ungefähr 40 % bedeutete. Die Messwerte der Kontrollgruppe fielen im

weiteren Verlauf nicht weiter ab und stabilisierten sich bis zum Beobachtungsende bei 50 %, dies entsprach einem relativen Verlust von 25 % gegenüber dem Ausgangswert. Sowohl die CsA-, als auch die FK-506-Gruppe zeigten in der statistischen Auswertung im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede.

Die Anzahl von CD3-positiven Lymphozyten hielten sich bei der MMF-Gruppe nach dem initialen Einbruch bis zum Versuchsende bei Werten um 60 % (Tag 20:  $64,1 \pm 4,4$  %, Tag 44:  $63,0 \pm 4,9$  %), was einen relativen Verlust von 10 % gegenüber dem Ausgangswert bedeutet. Vom achten Tag an unterschieden sich die Messwerte der MMF-Gruppe an allen Messpunkten signifikant von denen der Kontrollgruppe (Tag 8:  $p=0,0240$ , Tag 60:  $p=0,0305$ ).

### 3.1.1.3. CD4



**Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der CD4-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

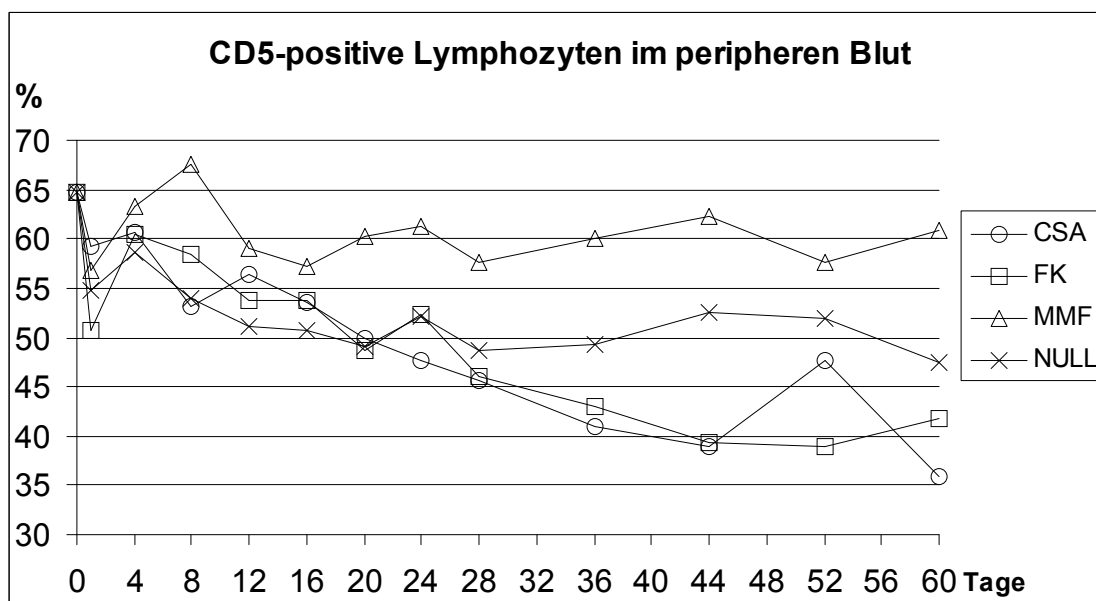
Der Median der nicht operierten und unbehandelten Vergleichsgruppe für CD4-positive Lymphozyten lag bei  $40,4 \pm 6,7$  %. Abbildung 10 zeigt die postoperative Entwicklung bei den vier Versuchsgruppen. Am ersten Tag nach der Transplantation fielen die gemessenen Werte bei allen vier Versuchsgruppen ab. Den geringsten Abfall zeigte die mit MMF behandelte Gruppe auf  $37,4 \pm 4,6$  %, den größten die FK-506-Gruppe auf  $29,0 \pm 2,6$  %. Die Werte der



CsA-, FK-506- und der Kontrollgruppe stiegen bis zum nächsten Beobachtungspunkt (Tag 4) wieder auf Werte nahe des Ausgangswertes an (CsA:  $38,3 \pm 2,6$  %, FK-506:  $39,1 \pm 2,6$  %, NULL:  $39,3 \pm 3,9$  %). Die MMF-Gruppe übertraf diesen mit  $43,0 \pm 2,4$  %. Im weiteren Verlauf zeigten die Messwerte für CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe einen relativ gleichförmigen Verlauf und einen Abfall bis auf Werte um 30 % am Tag 28 (CsA:  $29,7 \pm 3,7$  %, FK-506:  $29,2 \pm 4,0$  %, NULL:  $30,2 \pm 10,9$  %). Danach entwickelten sie sich mit der gleichen Tendenz, jedoch nicht mehr so gleichförmig weiter um bis zum Beobachtungsende auf Werte von  $25,1 \pm 8,7$  % bei der CsA-,  $28,6 \pm 4,1$  % bei der FK-506- und  $28,2 \pm 1,7$  % bei der Kontrollgruppe abzufallen. Dies entsprach einem relativen Verlust von rezeptortragenden Zellen zwischen 30 % und 40 %. Die Messwerte sowohl von der CsA-, als auch der FK-506-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe am 44. Tag signifikante Unterschiede ( $p=0,0133$  bzw.  $p=0,0024$ ). An keinem anderen Tag waren die Unterschiede signifikant.

Die Werte der MMF-Gruppe fielen nach dem postoperativen Anstieg auf den Wert von  $35,8 \pm 3,3$  % am 16. Tag ab. Danach lagen die Werte zwischen mit minimal  $38,2 \pm 10,9$  % am 53. Tag und maximal  $40,8 \pm 4,0$  % am 20. Tag auf einem Niveau, das dem des Ausgangswertes entsprach. Die Messwerte unterschieden sich beim statistischen Vergleich mit der Kontrollgruppe an allen Tagen, bis auf den 1. und 16. Tag, signifikant voneinander (Tag 4:  $p=0,0111$ , Tag 36:  $p=0,0015$ , Tag 60:  $p=0,0194$ ).

## 3.1.1.4. CD5



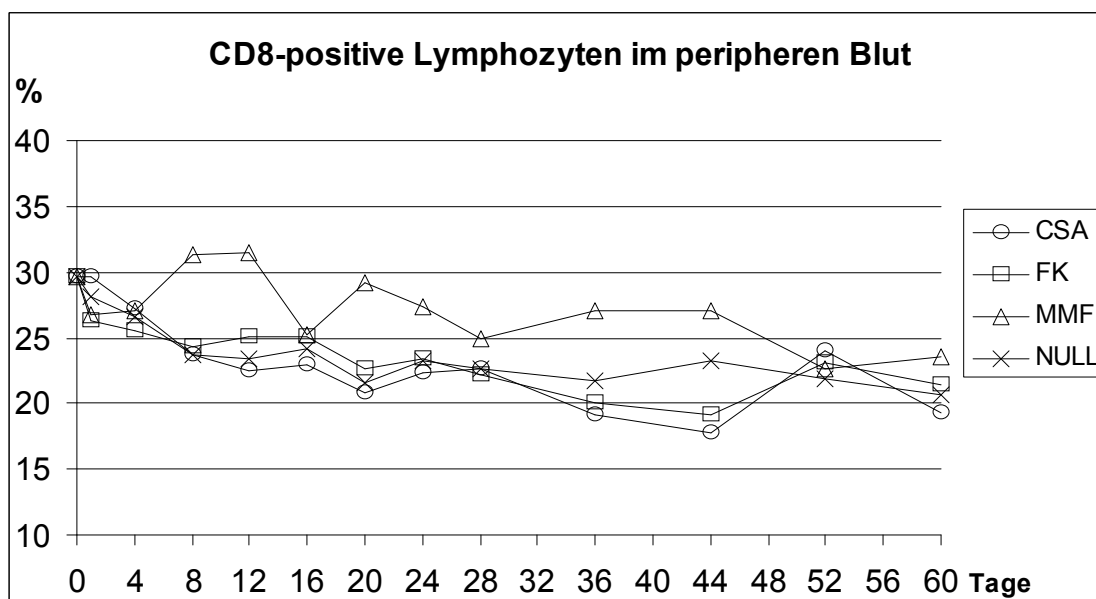
**Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der CD5-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Der Median der Vergleichsgruppe der nicht operierten und nicht immunsupprimierten Tiere für CD5-positive Lymphozyten lag bei  $64,7 \pm 7,4$  %. Der postoperative Verlauf ist für alle vier Versuchsgruppen in Abbildung 11 grafisch dargestellt. Am ersten postoperativen Tag war bei allen Versuchsgruppen ein Rückgang zu beobachten (CsA:  $59,2 \pm 2,1$  %, FK-506:  $50,7 \pm 5,5$  %, MMF:  $56,8 \pm 6,6$  %, NULL:  $54,8 \pm 3,3$  %). Zum nächsten Beobachtungspunkt (Tag 4) stiegen alle Messwerte wieder auf Werte um 60 % an (CsA:  $60,7 \pm 5,0$  %, FK-506:  $60,4 \pm 14,1$  %, MMF:  $63,2 \pm 4,9$  %, NULL:  $58,6 \pm 4,5$  %). Anschließend gingen die Messwerte bei CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe bis zum 20. Tag kontinuierlich auf Werte von  $49,9 \pm 5,0$  %,  $48,6 \pm 4,3$  % und  $49,0 \pm 8,1$  % zurück. Bis zum Beobachtungsende schwankten die Messwerte der Kontrollgruppe dann um 50 % (Tag 60:  $47,4 \pm 1,7$  %, Tag 44:  $52,6 \pm 4,0$  %). Dies bedeutete einen relativen Verlust an CD5-positiven Zellen von 25 %. Bei der CsA- und der FK-506-Gruppe setzte sich der Rückgang bis zum Versuchsende bis auf Werte um 40 % fort (CsA:  $35,9 \pm 10,9$  %, FK-506:  $41,7 \pm 5,4$  %), was einen relativen Verlust von 40 % CD5-positiven Lymphozyten bedeutete. Am 52. Beobachtungstag unterschied sich die CsA-Gruppe

( $p=0,0010$ ) am 44. und 52. Beobachtungstag die FK-506-Gruppe ( $p=0,0015$  bzw.  $p=0,0002$ ) signifikant von der Kontrollgruppe.

Die Werte der mit MMF behandelten Gruppe stiegen auch nach dem initialen Anstieg zum 4. Beobachtungstag, der sich bei allen Versuchsgruppen beobachten lässt, auch bis zum nächsten Messpunkt (Tag 8) weiter an und überstiegen den Ausgangswert mit  $67,6 \pm 6,9$  %. Danach fielen die Werte wieder ab und schwankten bis zum Beobachtungsende um 60 % (Tag 16:  $57,3 \pm 3,4$  %, Tag 44:  $62,3 \pm 5,1$  %) und lagen somit relativ etwa 10 % unter dem Ausgangswert. Die Messwerte unterschieden sich bis zum 16. Tag nicht danach bis zum Versuchsende an allen Tagen, außer dem 28. und 52. Messtag, signifikant von der Kontrollgruppe (Tag 20:  $p=0,0216$ , Tag 60:  $p=0,0144$ ).

### 3.1.1.5. CD8



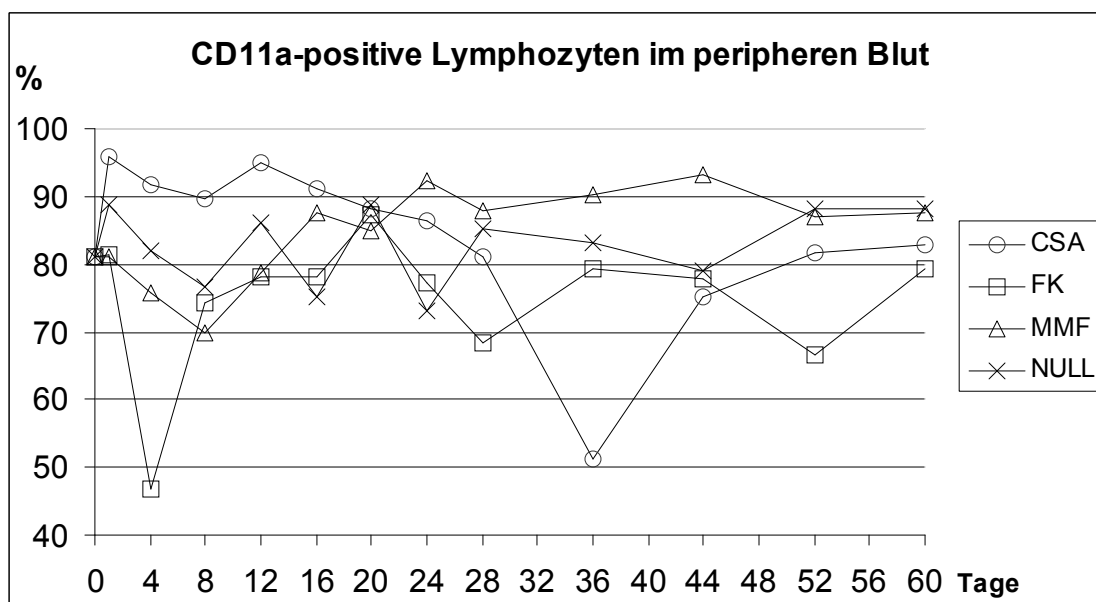
**Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der CD8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Der mediane Wert für CD8-positive Lymphozyten lag bei der nicht operierten und unbehandelten Vergleichsgruppe bei  $29,6 \pm 1,3$  %. Die Entwicklung der vier Versuchsgruppen nach Transplantation ist in Abbildung 12 grafisch dargestellt. Nach der Transplantation zeigten alle vier Versuchsgruppen einen ähnlichen Verlauf. Bis zum letzten

Versuchstag Versuchs fielen die Messwerte langsam und kontinuierlich auf Werte um 20 % ab (CsA:  $19,2 \pm 3,7$  %, FK-506:  $21,4 \pm 4,9$  %, MMF:  $23,5 \pm 4,6$  %, NULL:  $20,6 \pm 1,1$  %). Dies entsprach einem relativen Rückgang der CD8 positiven Zellen zwischen 20,4 % bei den mit CsA und 34,9 % bei den mit MMF behandelten Tieren.

An fast allen Messtagen wiesen die MMF-Gruppe die höchsten und die CsA-Gruppe die niedrigsten Messwerte auf. An keinem Tag sind jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu finden.

### 3.1.1.6. CD11a



**Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der CD11a-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Bei der nicht operierten und unbehandelten Vergleichsgruppe trugen  $81,1 \pm 8,9$  % der Lymphozyten das Oberflächenmerkmal CD11a. Die Entwicklung der vier Versuchsgruppen nach der Transplantation sind in Abbildung 13 grafisch dargestellt. Postoperativ lies sich bei der CsA ein Anstieg der Messwerte auf  $95,7 \pm 0,4$  % beobachten. Danach gingen die Messwerte bis zum Versuchsende wieder zurück. Eine besonders große Varianz der Messwerte zeigte sich am 36. Versuchstag ( $51,2 \pm 19,8\%$ ). Der letzte Messwerte lag mit  $82,9 \pm 12,6$  % im Bereich des Ausgangswertes. Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe waren die

Messwerte am 24. Beobachtungstag mit  $86,5 \pm 7,3$  % signifikant erhöht ( $p=0,0277$ ). Weitere signifikante Unterschiede ergaben sich nicht. Bei der mit FK-506 behandelten Versuchsgruppe lagen die Messwerte bis auf einen Ausreißer am 4. Tag ( $46,9 \pm 20,6$  %) zwischen minimal  $66,2 \pm 11,5$  % am 52. Beobachtungstag und maximal  $87,2 \pm 10,9$  % am 20. Beobachtungstag. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Gruppe ergaben sich nicht. Bei der mit MMF behandelten Gruppe lies sich bis zum 8. Versuchtag ein Rückgang der Werte auf  $69,9 \pm 28,5$  % beobachten. Danach stiegen die Messwerte wieder an und schwanken bis zum Versucheende um 90 % (Tag 44:  $93,1 \pm 4,6$  %, Tag 52:  $87,1 \pm 11,8$  %). Am 24. Tag war der Messwert gegenüber der unbehandelten Gruppe signifikant erhöht ( $p=0,008$ ). An allen weiteren Tagen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte der unbehandelten Versuchsgruppe schwankten bis zum Versucheende mit minimal  $73,0 \pm 9,0$  % am 24. Versuchtag und maximal  $88,9 \pm 14,4$  % am 20. Versuchstag um den Ausgangswert.

### 3.1.1.7. CD11b

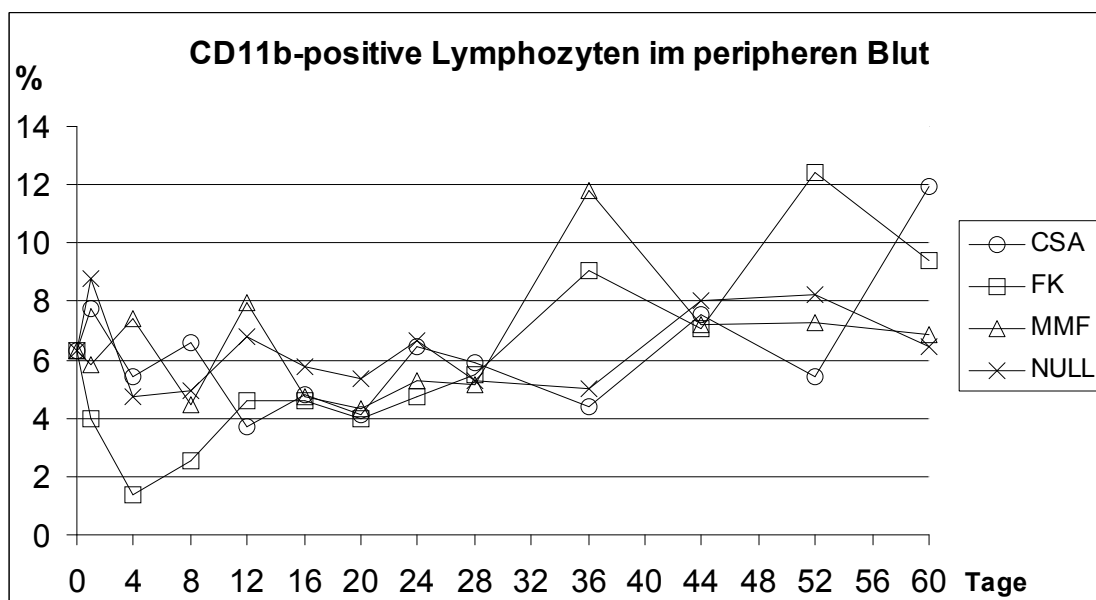
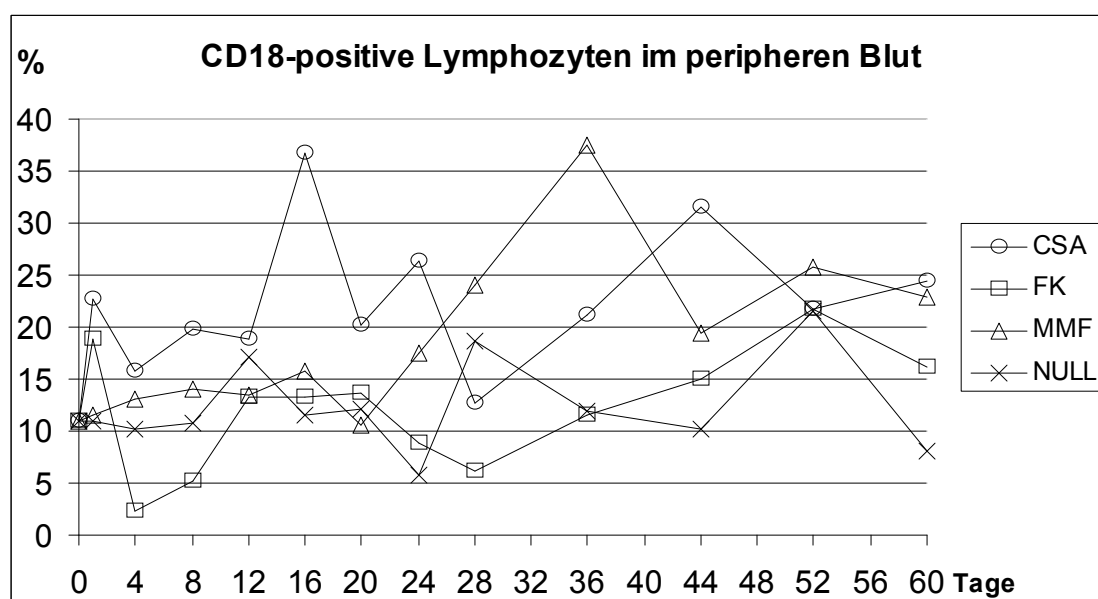


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der CD11b-positiven Lymphozyten im peripheren Blut

Der Median der unbehandelten und nicht operierten Tiergruppe lag bei  $6,3 \pm 4,7$  %. Der Verlauf der postoperativen Messwerte der vier Versuchsgruppe ist in Abbildung 14 grafisch dargestellt. Bei der mit FK-506 behandelte Versuchsgruppe lies sich initial ein Rückgang der Messwerte bis auf minimal  $1,4 \pm 0,6$  % am 4. Versuchstag beobachten. Danach stiegen die Messwerte bis zum letzten Versuchtag auf  $9,4 \pm 3,2$  % an. Die drei restlichen Gruppen schwankten bis zum 28 Beobachtungstag um den Ausgangswert, ohne dass sich eine gerichtete Entwicklung erkennen lies. Danach hielten sich die Messwerte bis zum Versuchsende oberhalb des Ausgangswertes. In der statistische Auswertung ergaben sich für keine der drei behandelten Gruppen an keinem Tag signifikante Unterschiede zur unbehandelten Gruppe.

### 3.1.1.8. CD18

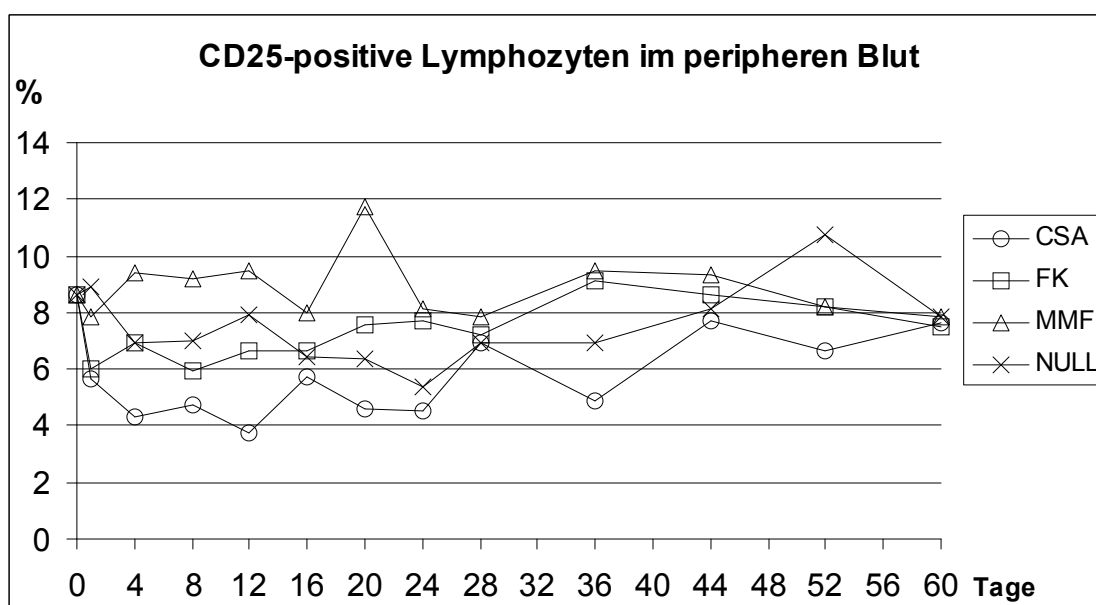


**Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der CD18-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Bei der unbehandelten und nicht operierten Vergleichsgruppe lag der Median der für CD18 positiven Lymphozyten bei  $11,0 \pm 1,5$  %. Die postoperative Entwicklung der Messwerte ist in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Die Varianz der Messwerte war hier bei allen Gruppen und an allen Tagen sehr groß. Es fiel auf, dass an fast allen Tagen die Messwerte der mit CsA

behandelten Gruppe am höchsten waren. Hier ergaben sich für den 16. Tag mit  $36,8 \pm 13,0 \%$  ( $p=0,0044$ ), den 44. Tag mit  $31,6 \pm 9,0 \%$  ( $p=0,0074$ ) und den 60. Tag mit  $24,5 \pm 12,0 \%$  ( $p=0,0313$ ) gegenüber der unbehandelten Gruppe signifikant höhere Werte. Bei den übrigen Gruppen war aufgrund der starken Schwankungen der Messwerte keine Aussage über eine tendenzielle Entwicklung während des Versuchs möglich. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Gruppe konnten an keinem der Messpunkte beobachtet werden.

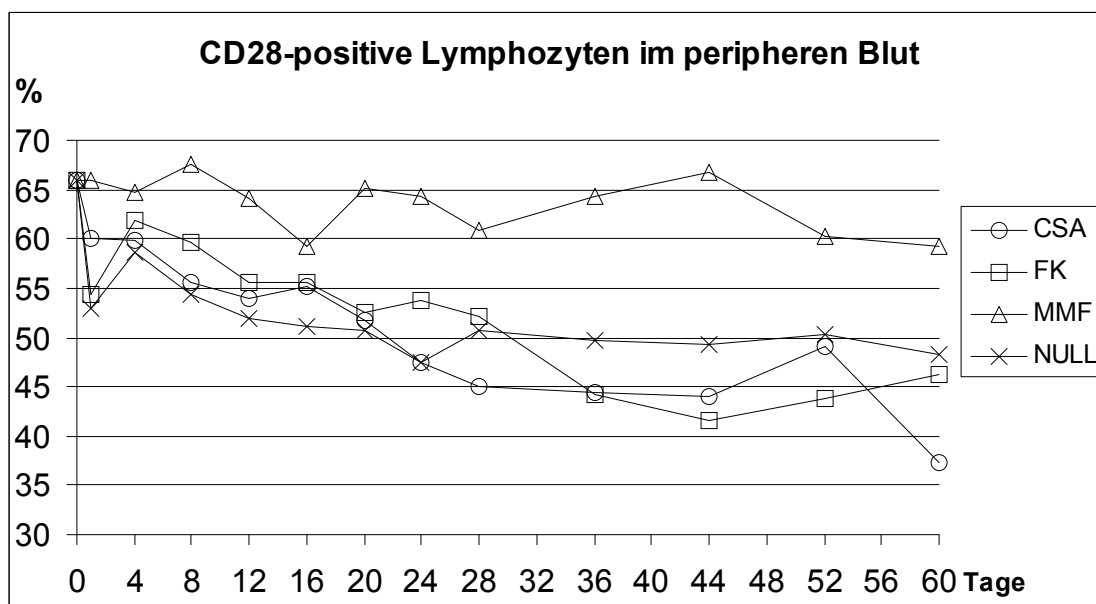
### 3.1.1.9. CD25



**Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der CD25-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Von den Lymphozyten der unbehandelten und nicht operierten Vergleichsgruppe waren im Median  $8,6 \pm 5,7 \%$  CD25-positiv. Der postoperative Verlauf ist in Abbildung 16 für alle vier Versuchsgruppen grafisch dargestellt. Postoperativ zeigten die gemessenen Werte während des gesamten Verlauf des Versuchs keine Änderungen. Sie schwankten mit minimal  $3,7 \pm 1,1$  (CsA Tag 12) und maximal  $11,8 \pm 3,8 \%$  (MMF Tag 20) um den Ausgangswert. Eine Tendenz lässt sich im zeitlichen Verlauf nicht Erkennen. An keinem der Messtage zeigte eine der drei Medikamentengruppen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

## 3.1.1.10. CD28



**Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der CD28-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

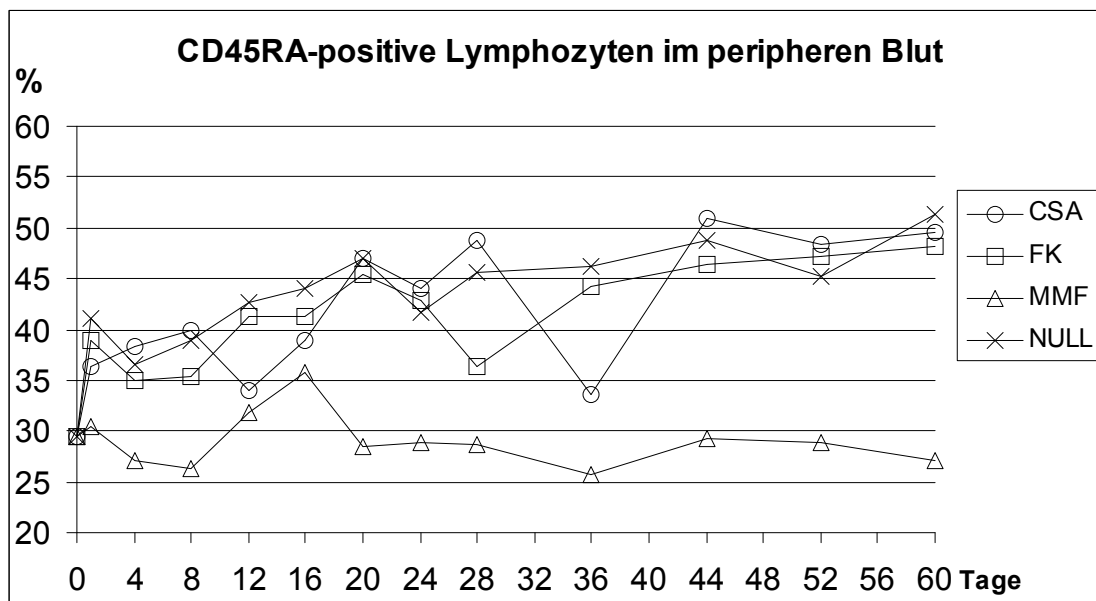
Der mediane Ausgangswert der CD28-positiven Lymphozyten bei den weder operierten noch immunsuppressiv behandelten Tieren lag bei  $66,0 \pm 5,9$  %. Der weitere Verlauf während des Versuches ist für alle vier Versuchsgruppen in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Am ersten Tag nach der Transplantation fielen die Messwerte der CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe auf Werte von  $60,1 \pm 1,5$  %,  $54,3 \pm 4,9$  % bzw.  $52,9 \pm 6,0$  % ab. Dies entsprach einem relativen Verlust zwischen 10 % und 20 %. Am zweiten Messpunkt (Tag 4) stiegen die Messwerte für alle drei Versuchsgruppe wieder auf Werte um 60 % an (CsA:  $59,7 \pm 4,3$  %, FK-506:  $61,9 \pm 4,3$  %, NULL:  $58,6 \pm 3,8$  %). Bis zum 20. Beobachtungstag zeigten die Messwerte der drei Gruppen einen ähnlichen Verlauf. Sie fielen stetig auf Werte oberhalb von 50 % ab (CsA:  $51,7 \pm 7,2$  %, FK-506:  $52,5 \pm 5,1$  %, NULL:  $50,8 \pm 8,9$  %). Im weiteren Verlauf änderten sich die Messwerte der Kontrollgruppe kaum noch und schwankten um 50 % (Tag 60:  $46,5 \pm 3,4$  %, Tag 28:  $50,7 \pm 10,3$  %). Dies entsprach bis zum Versuchsende einem relativen Verlust von CD28-positiven Zellen von etwa 30 %.



Die Messwerte der mit CsA und die mit FK-506 behandelten Versuchsgruppen fielen bis zum 44. Tag noch weiter auf  $44,0 \pm 3,7$  % bzw.  $41,5 \pm 6,4$  % ab. Dies entsprach einem relativen Verlust von etwa 35 %. Die Messwerte der FK-506-Gruppe stiegen nach dem 44. Tag bis zum Versuchsende wieder an und lagen am letzten Versuchstag bei  $46,2 \pm 5,3$  % was einen relativen Verlust von 30 % bedeutete. Verglichen mit der Kontrollgruppe unterschied sich die FK-506-Gruppe am 8., 12. und 56. Beobachtungstag signifikant ( $p=0,0399$ ,  $p=0,0375$  bzw.  $p=0,0026$ ). Bei der CsA-Gruppe waren nach dem 44. Tag an den letzten beiden Messpunkten starke Schwankungen (Tag 52:  $49,0 \pm 4,8$  %, Tag 60:  $37,3 \pm 11,4$  %) zu beobachten.

Bei der MMF-Gruppe war unmittelbar postoperativ kein Abfall der CD28-positiven Lymphozyten zu beobachten. Der erste Messwert war mit  $66,0 \pm 5,9$  % mit dem Ausgangswert nahezu identisch. Über den gesamten Verlauf schwankten die Messwerte zwischen Werten von  $59,2 \pm 4,2$  % am 60. Tag und  $67,5 \pm 6,3$  % am 8. Tag, ohne dass eine Tendenz zu erkennen war. Ab dem 4. Tag zeigt der statistische Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede an allen Beobachtungstagen (Tag 8:  $p=0,0008$ , Tag 24:  $p=0,0040$ , Tag 60:  $p=0,0051$ ).

## 3.1.1.11. CD45RA



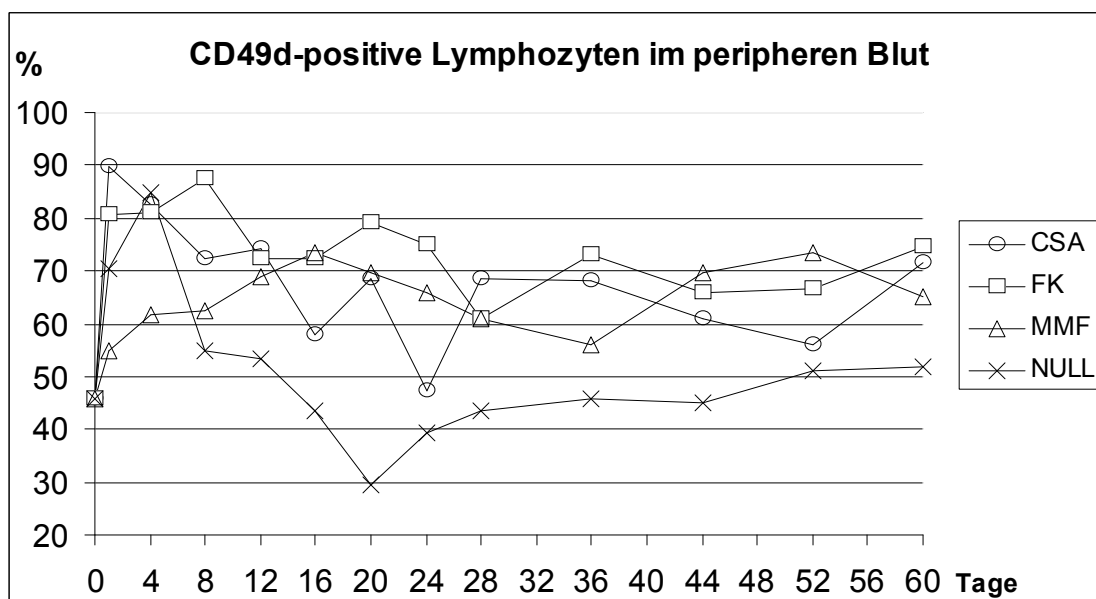
**Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der CD45RA-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

Der mediane Ausgangswert der unbehandelten und nicht operierten Vergleichsgruppe für CD45RA-positive Lymphozyten lag bei  $29,6 \pm 15,5$  %. Die zeitliche Entwicklung dieses Oberflächenmoleküles ist in Abbildung 18 für die vier Versuchsgruppen grafisch dargestellt. Am ersten postoperativen Messpunkt war bei der CsA-, FK-506- und der Kontrollgruppe ein Anstieg auf  $36,4 \pm 2,1$  %,  $38,9 \pm 7,1$  % und  $41,0 \pm 7,5$  % zu beobachten. Dies bedeutete einen relativen Anstieg zwischen 23,2 % und 38,8 %. Bis zum 8. Versuchstag blieben die Messwerte dieser drei Versuchsgruppen dann zwischen 30 % und 35 %. Danach stiegen die gemessenen Werte bei allen drei Gruppen bis zum Versuchsende kontinuierlich auf Werte um 50 % an (CsA:  $49,5 \pm 6,9$  %, FK-506:  $48,2 \pm 8,2$  %, NULL:  $51,4 \pm 4,7$  %). Der relative Anstieg von CD45RA-positiven Zellen betrug für die CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe bis zum Versuchsende zwischen 62,9 % und 73,8 %. Beim statistischen Vergleich ergaben sich bei der FK-506-Gruppe am 12. Beobachtungstag signifikante Unterschiede zur

Kontrollgruppe ( $p=0,0095$ ). Weitere signifikante Unterschiede bei der CsA- und FK-506-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bestanden nicht.

Bei den Werten der mit MMF behandelten Gruppe war unmittelbar postoperativ kein Anstieg zu beobachten. Am ersten postoperativen Messpunkt unterschied sich der Messwert mit  $30,5 \pm 7,2$  % kaum vom Ausgangswert. Im weiteren Verlauf sanken die Messwerte auf bis  $26,2 \pm 5,5$  % am 8. Beobachtungstag ab. Danach war ein Anstieg der Werte bis zum 16. Tag auf  $35,7 \pm 4,1$  % zu beobachten. Im gesamten restlichen Verlauf des Versuchs schwankten die Werte dann um den Ausgangswert (Tag 36:  $25,8 \pm 9,4$  %, Tag 44:  $29,3 \pm 6,1$  %). Verglichen mit der Kontrollgruppe unterscheidet sich die MMF-Gruppe ab dem 8. Versuchstag signifikant (Tag 8:  $p=0,0002$ , Tag 28:  $p=0,0001$ , Tag 60:  $p=0,0014$ ).

### 3.1.1.12 CD49d



**Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der CD49d-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

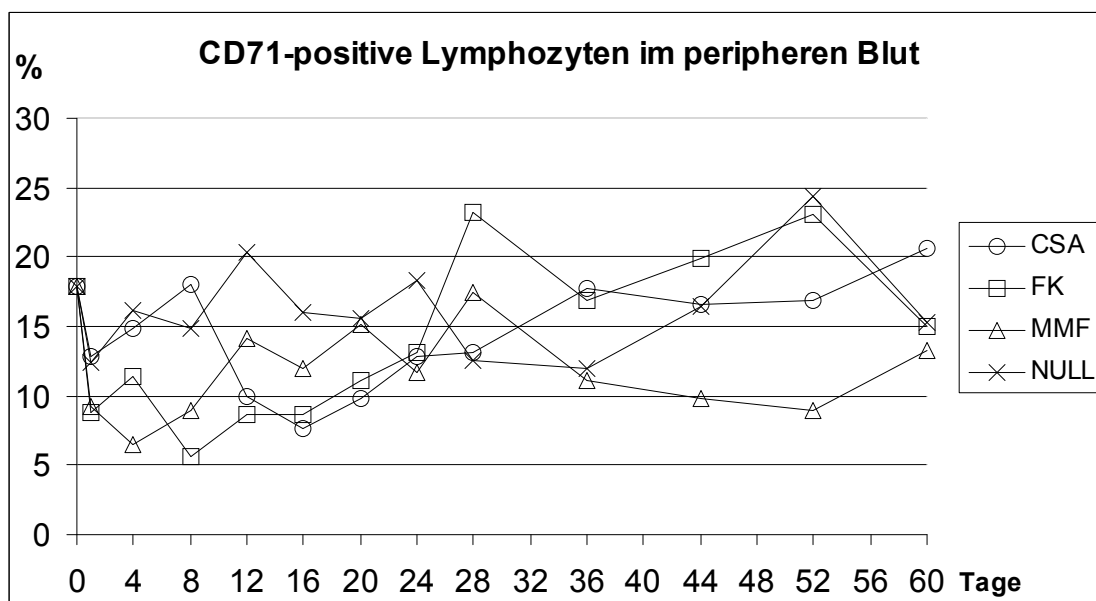
Bei den nicht operierten und unbehandelten Tieren der Vergleichsgruppe trugen  $45,94 \pm 15,4$  % der Lymphozyten im peripheren Blut das Oberflächenmerkmal CD49d. Der postoperative Verlauf der vier Versuchsgruppen ist in Abbildung 19 grafisch dargestellt. Postoperativ war bei allen Versuchsgruppen ein Anstieg der Messwerte zu beobachten. Der größte Anstieg war

am 1. postoperativen Tag bei der CsA und der FK-506-Gruppe zu beobachten (CsA:  $89,9 \pm 1,8$  %; FK-506:  $80,6 \pm 6,2$  %). Danach fielen ihre Messwerte bis zum 12. Beobachtungstag wieder ab. Die Messwerte der mit MMF behandelten Gruppe stiegen von Beginn an kontinuierlich bis zum 12. Beobachtungstag an. Am 12. Beobachtungstag zeigten alle drei Medikamentengruppen ähnliche Werte (CsA:  $74,0 \pm 11,5$  %; FK-506:  $72,3 \pm 10,8$  %; MMF:  $68,8 \pm 12,2$  %). Bis zum Versuchsende schwankten die Messwerte dann weiter um 70%, was einer relativen Zunahme von rezeptortragenden Zellen von rund 50 % entsprach.

Der Verlauf der Messwerte der unbehandelten Gruppe unterschied sich von dem Verlauf der mit Medikamenten behandelten Gruppen. Nach einem initialen Anstieg der Werte bis zum Tag 4 fielen die Messwerte wieder kontinuierlich bis zum 20. Beobachtungstag auf  $29,3 \pm 9,2$  % ab. Bis zum Versuchsende stiegen die Messwerte dann wieder kontinuierlich bis auf  $52,0 \pm 7,6$  % am letzten Versuchstag an. Dies entsprach einem relativen Anstieg der rezeptortragenden Zellen von gut 10 %.

Am 12. und 20. Messtag unterschieden sich alle Medikamentengruppen signifikant von der unbehandelten Gruppe. Die CsA-Gruppe zeigte am 1. und 36. Messtag signifikant höhere Werte als die unbehandelte Gruppe ( $p=0,011$  bzw.  $p=0,0154$ ). Die Messwerte der FK-506-Gruppe waren ab dem 8. Tag bis zum Versuchsende bis auf den 44. und 52. Tag signifikant höher (Tag 8:  $p=0,0219$ ; Tag 24:  $p=0,0016$ ; Tag 60  $0,0015$ ). Bei der MMF-Gruppe waren am 28. Messpunkt signifikante Unterschiede zur unbehandelten Gruppe zu beobachten ( $p=0,0305$ ).

## 3.1.1.13 CD71



**Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der CD71-positiven Lymphozyten im peripheren Blut**

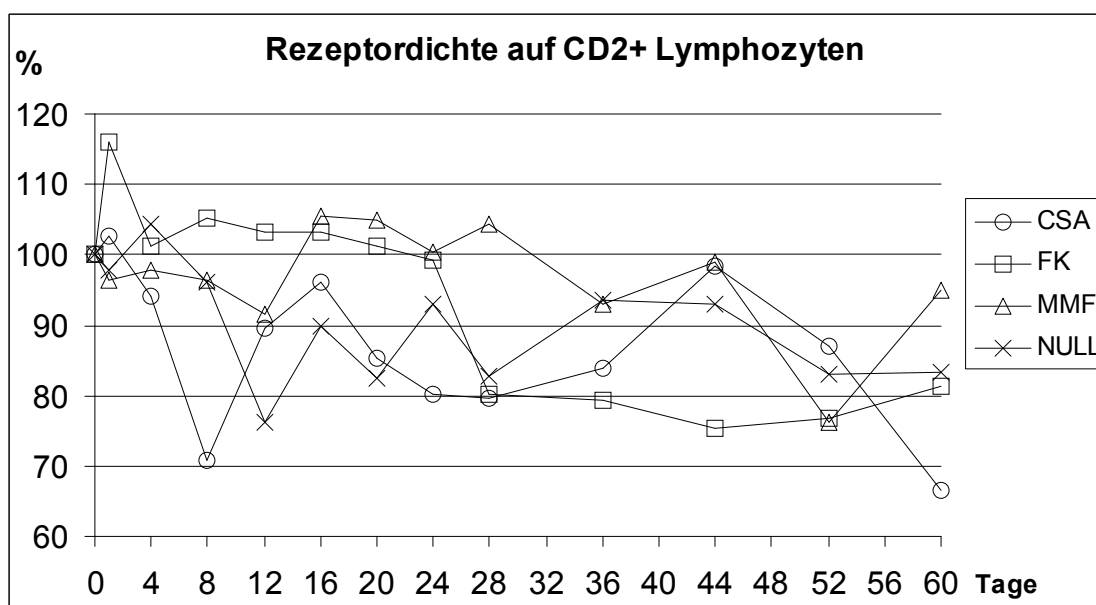
Der Median der unbehandelten und nicht operierten Vergleichsgruppe für das Oberflächenmerkmal CD71 lag bei  $17,9 \pm 6,2$  %. Der zeitliche Verlauf der postoperativen Entwicklung der Messwerte ist in Abbildung 20 grafisch dargestellt. Die postoperative Entwicklung zeigte bei allen vier Versuchsgruppen einen ähnlichen Verlauf. Unmittelbar zu Beginn des Versuchs ist ein Rückgang der Messwerte zu beobachten. Danach schwanken die Messwerte stark und steigen bis zum Versuchende wieder auf ein Niveau an, das dem des Ausgangswertes entsprach. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ergaben sich für keine der behandelten Gruppen.

### 3.1.2. Rezeptordichte auf den positiven Lymphozyten im peripheren Blut

Bei der grafischen Auswertung der Rezeptordichte auf den positiven Lymphozyten wurde als Ausgangswert der Darstellung der Median der unbehandelten und nicht operierten Tiere gleich 100 % gesetzt. Die prozentualen Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert wurden für die vier Versuchsgruppen im zeitlichen Vergleich grafisch dargestellt.

Bei den Messwerten für die Rezeptordichte waren sehr starken Schwankungen zu beobachten, weshalb eine statistische Auswertung nicht sinnvoll war. Aus den Grafiken konnten aber tendenzielle Entwicklungen - über den gesamten Versuch gesehen - abgelesen werden.

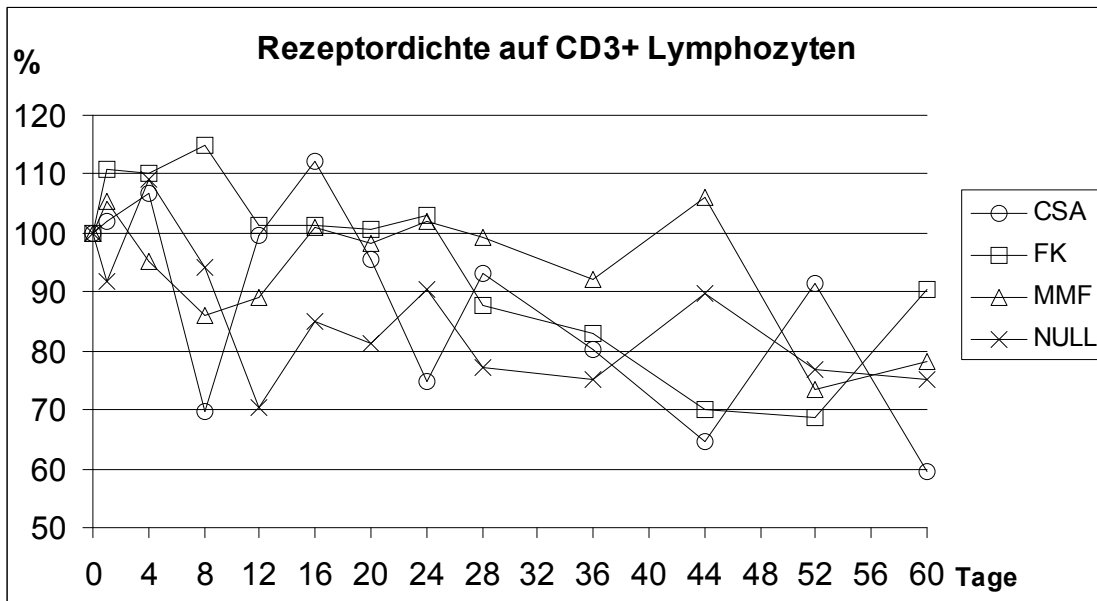
#### 3.1.2.1. CD2



**Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD2-positiven Lymphozyten**

Die relative Rezeptordichte fiel bei den CD2-positiven Lymphozyten bei allen vier Versuchsgruppen, wie in Abbildung 21 zu sehen ist, über die gesamte Versuchsdauer auf ein etwa 10 % bis 20 % tiefer liegendes Niveau ab.

## 3.1.2.2. CD3



**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD3-positiven Lymphozyten**

Die relative Rezeptordichte auf den Lymphozyten die für CD3 positiv ist für alle Versuchsgruppen in Abbildung 22 dargestellt und sank über die gesamte Versuchsdauer gesehen bei allen vier Versuchsgruppen auf ein etwa 20 % niedriges Niveau ab.

## 3.1.2.3. CD4

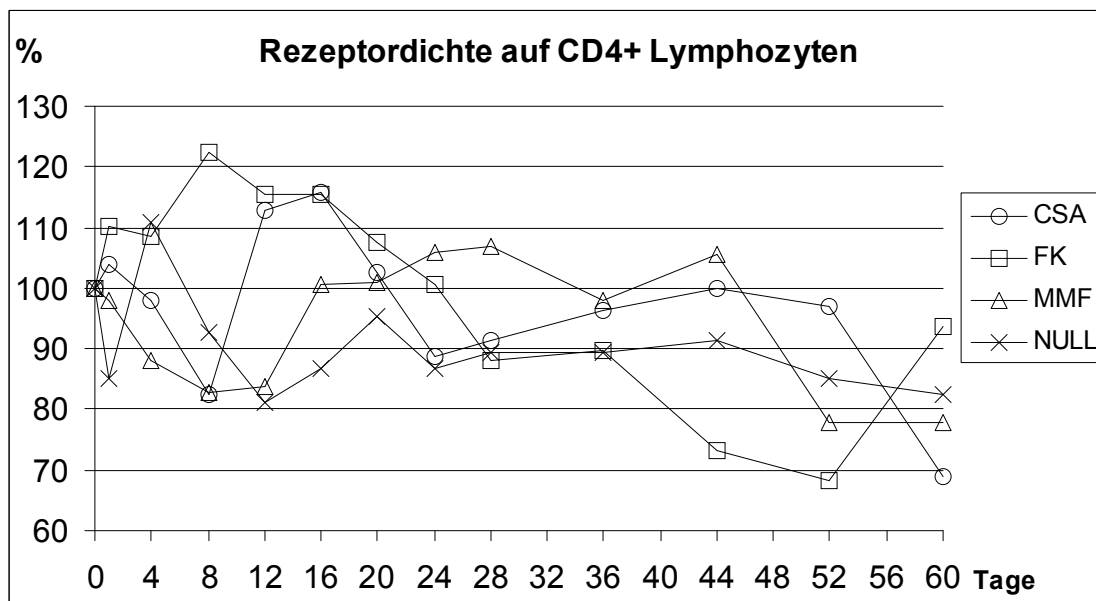
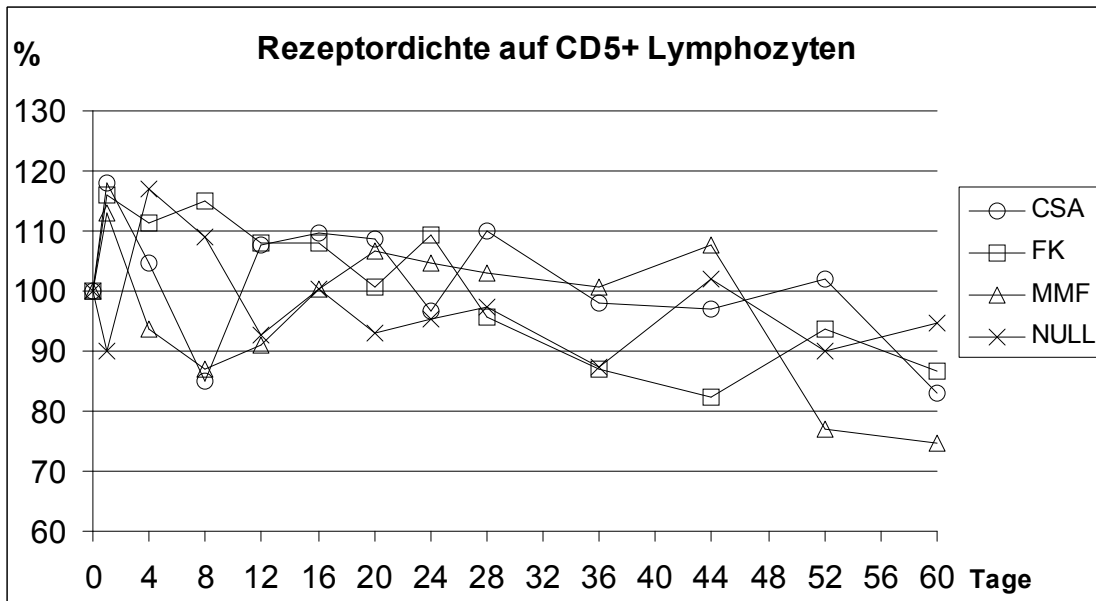


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD4-positiven Lymphozyten

Die Entwicklung der Rezeptordichte auf CD4-positiven Lymphozyten ist in Abbildung 23 dargestellt. Bei allen vier Versuchsgruppen fiel die relative Dichte der CD4-Rezeptoren auf den CD4-positiven Lymphozyten während des Versuchs um etwa 20 % ab.



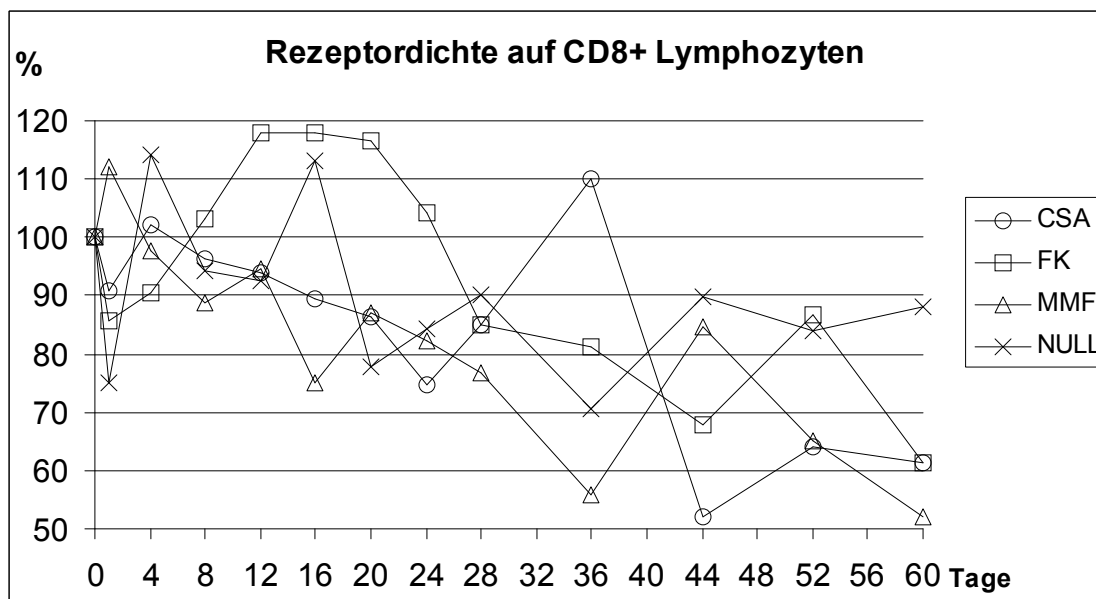
## 3.1.2.4. CD5



**Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD5-positiven Lymphozyten**

Bei den CD5-positiven Lymphozyten war unmittelbar postoperativ bei allen Versuchsgruppen, wie aus Abbildung 24 zu ersehen ist, ein Anstieg der relativen Rezeptordichte um 10 % zu beobachten. Danach fielen die Werte bis zum Versuchsende auf Werte zwischen 10 % und 20 % unterhalb des Ausgangswertes ab.

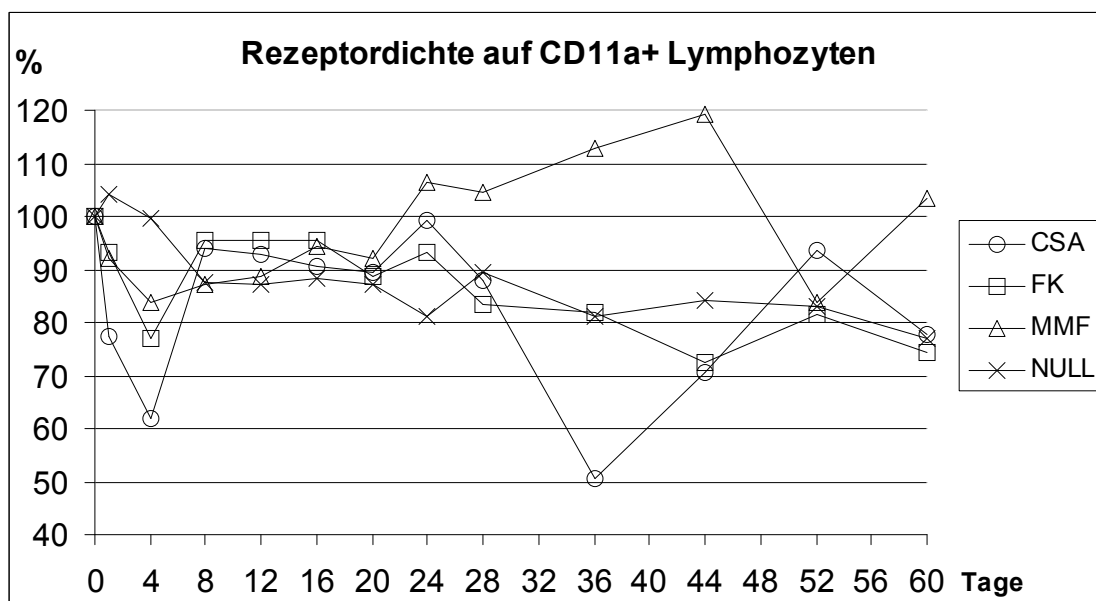
## 3.1.2.5. CD8



**Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD8-positiven Lymphozyten**

Abbildung 25 zeigt die postoperative Entwicklung der relativen Rezeptordichte auf CD8-positiven Lymphozyten. Es zeigten sich postoperativ besonders starke Schwankungen. Insgesamt war eine abfallende Tendenz zu beobachten. Am Versuchsende lag die relative Rezeptordichte zwischen gut 10 % (Kontrollgruppe) und fast 50 % (MMF-Gruppe) unterhalb des Ausgangswertes.

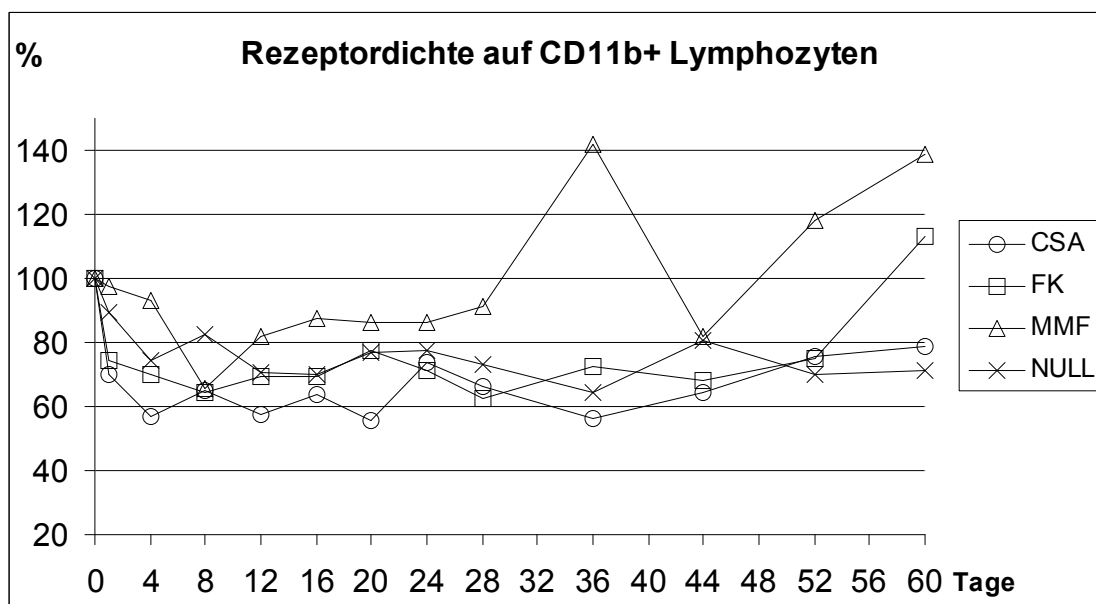
## 3.1.2.6. CD11a



**Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD11a-positiven Lymphozyten**

Die postoperative Entwicklung der relativen Rezeptordichte bei den für CD11a positiven Lymphozyten ist in Abbildung 26 dargestellt. In der frühen postoperativen Phase war bei den drei immunsuppressiv behandelten Gruppen ein Rückgang der Rezeptordichte zu beobachten. Bis zum 8. postoperativen Tag stieg die Rezeptordichte dann wieder auf ein Niveau an, das knapp unterhalb des Ausgangswertes lag. Auf diesem 10-20 % tieferen Niveau hielten sich die Messwerte bis zum Versuchsende, wobei besonders gegen Ende des Versuchs eine sehr große Streuung zu beobachten war.

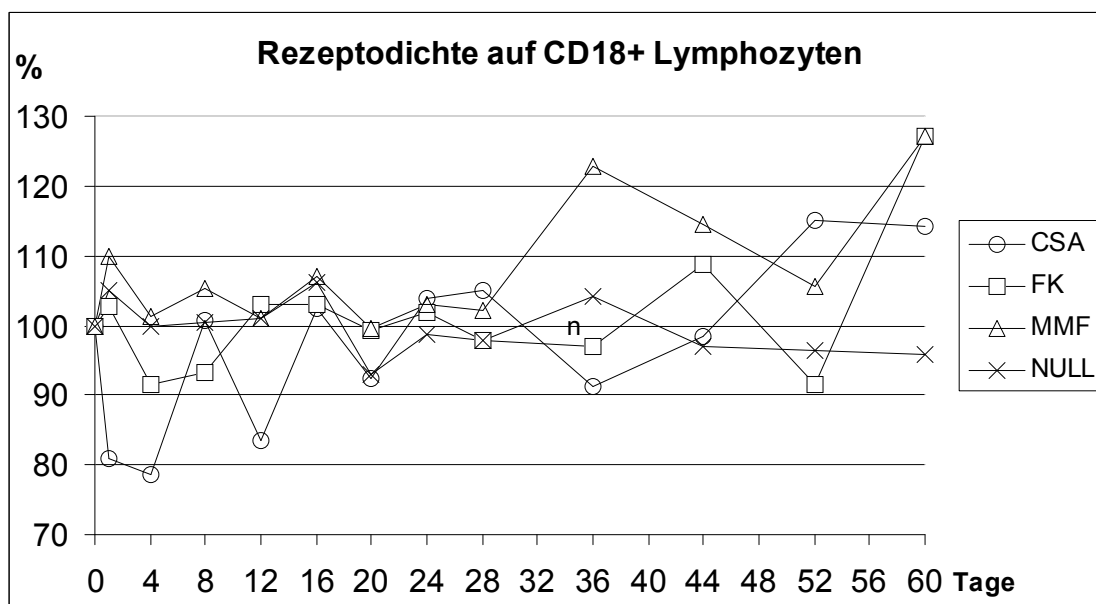
## 3.1.2.7. CD11b



**Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD11b-positiven Lymphozyten**

Die relative Rezeptordichte auf den Lymphozyten die für CD11b positiv waren ist für alle Versuchsgruppen in Abbildung 27 dargestellt. Alle Versuchsgruppen zeigten in den ersten Messpunkten nach der Operation einen Rückgang der Rezeptordichte zwischen 20 % und 40 %. Auf diesem Niveau schwankten die Messwerte bis zum Versuchende. Auffallend war, dass die mit MMF behandelte Gruppe an fast allen Tagen die höchsten und die mit CsA behandelte Gruppe an fast allen Tagen die niedrigsten Messwerte aufwies.

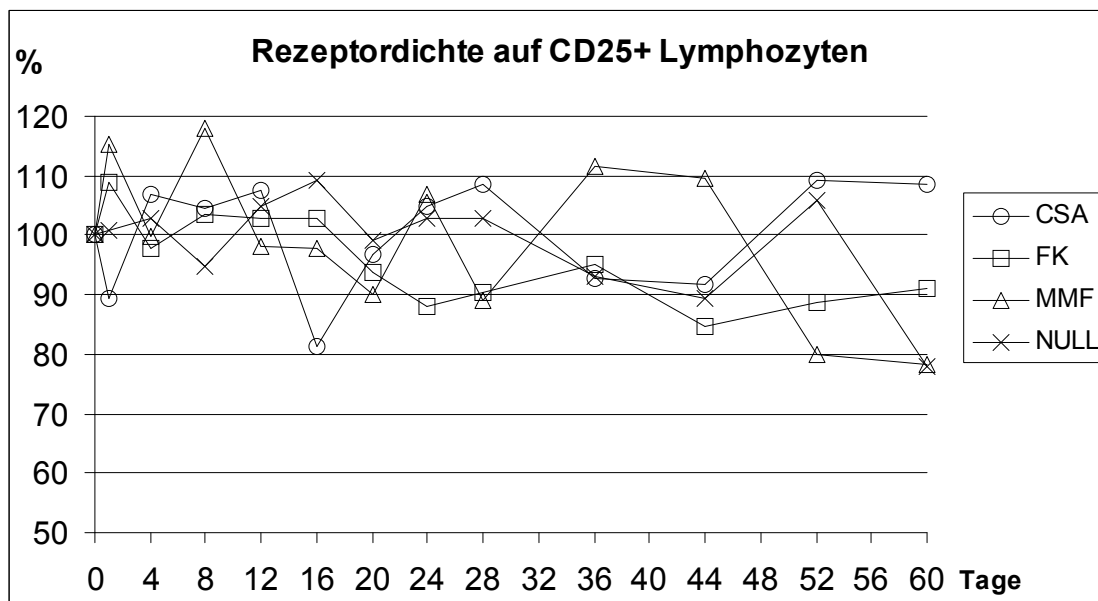
## 3.1.2.8. CD18



**Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD18-positiven Lymphozyten**

Die postoperative Entwicklung der Rezeptordichte auf CD28-positiven Lymphozyten ist in Abbildung 30 grafisch dargestellt. Unmittelbar postoperativ zeigte die mit CsA behandelte Versuchsgruppe einen Rückgang der Messwerte von etwa 20 %. Die übrigen Versuchsgruppen zeigten einen leichten Anstieg der Werte. Danach schwankten die Messwerte bis zum Versuchsende um den Ausgangswert, ohne dass sich eine Entwicklungstendenz erkennen lies.

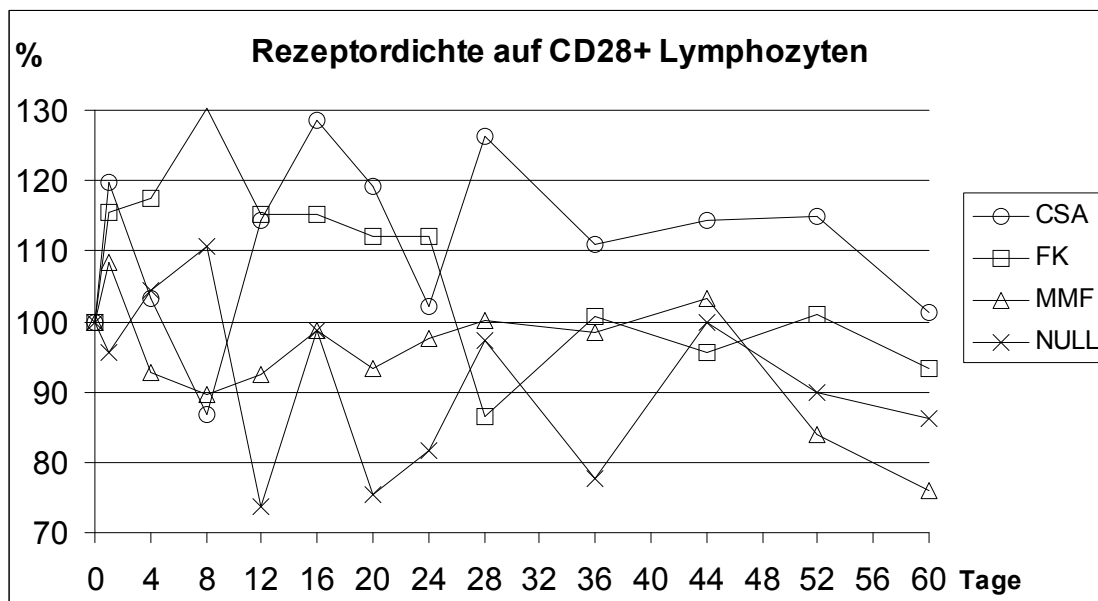
## 3.1.2.9. CD25



**Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD25-positiven Lymphozyten**

Die CD25-positiven Zellen zeigten nach Transplantation Schwankungen um den Ausgangswert, wie aus Abbildung 29 zu entnehmen ist. Eine Tendenz war nicht zu erkennen.

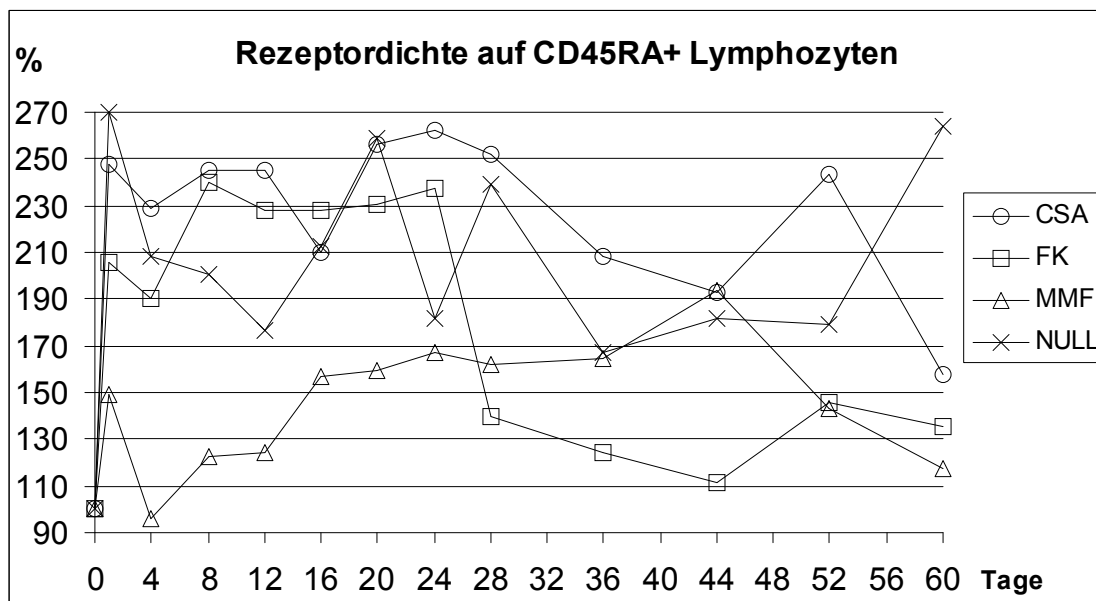
## 3.1.2.10. CD28



**Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD28-positiven Lymphozyten**

Die postoperative Entwicklung der Rezeptordichte auf CD28-positiven Lymphozyten ist in Abbildung 30 grafisch dargestellt. Dabei waren postoperativ besonders große Schwankungen zu beobachten. Die Messwerte aller vier Versuchsgruppen schwankten um bis zu 30 % in beide Richtungen um den Ausgangswert. Ein Trend lies sich im zeitlichen Verlauf nicht erkennen.

## 3.1.2.11. CD45RA

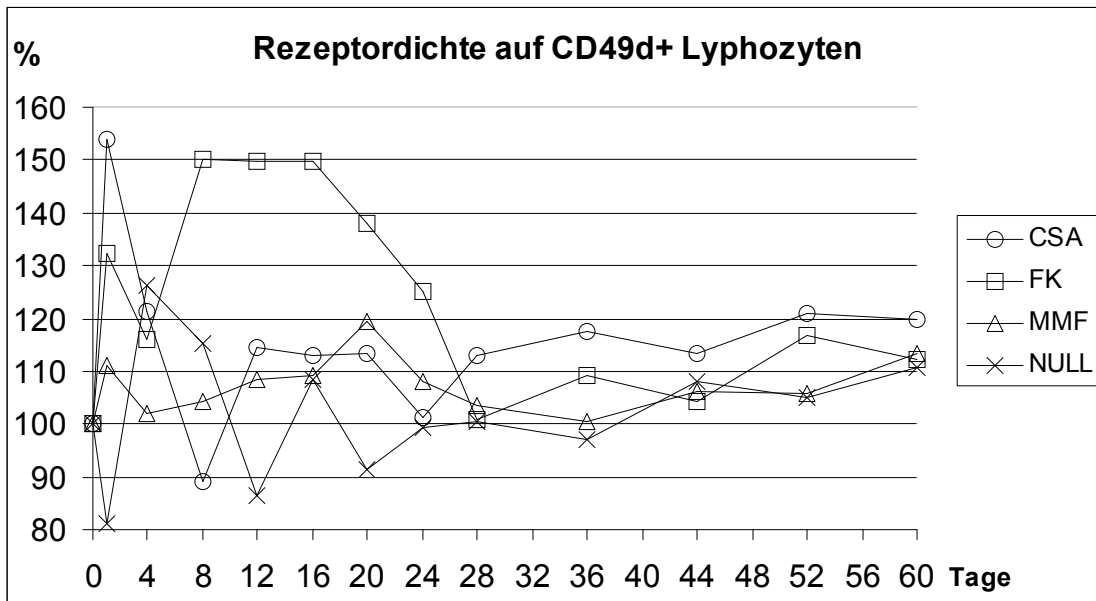


**Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD45RA-positiven Lymphozyten**

Abbildung 31 zeigt die postoperative Entwicklung bei den CD45RA-positiven Lymphozyten. Unmittelbar postoperativ lies sich bei allen Versuchsgruppen ein exzessiver Anstieg der relativen Rezeptordichte beobachten. Der relative Anstieg betrug bei der MMF-Gruppe fast 50 %, der FK-506-Gruppe 110 %, der CsA-Gruppe 150 % und war mit 170 % bei der Kontrollgruppe am größten. Die Messwerte der CsA- und der Kontrollgruppe halten sich bis zum Versuchsende bei Werten, die dem doppelten des Ausgangswertes entsprachen. Die mit FK-506 behandelten Tiere zeigten einen anderen Verlauf. Bis zum 24. Beobachtungstag hielten sich die Messwerte stabil auf einem etwa 130 % über dem Ausgangswert liegendem Niveau. Danach fielen sie bis zum nächsten Beobachtungspunkt auf Werte ab, die 30 % über dem Ausgangswert lagen. Bei der MMF-Gruppe zeigte sich ein Rückgang der Werte am zweiten Messpunkt auf Ausgangsniveau. Im weiteren Verlauf stiegen die Werte kontinuierlich bis auf fast doppelte Werte zum 44. Tag an. Bis zum Versuchsende fielen die Werte wieder ab und lagen am Versuchsende etwa 10 % oberhalb des Ausgangswertes.



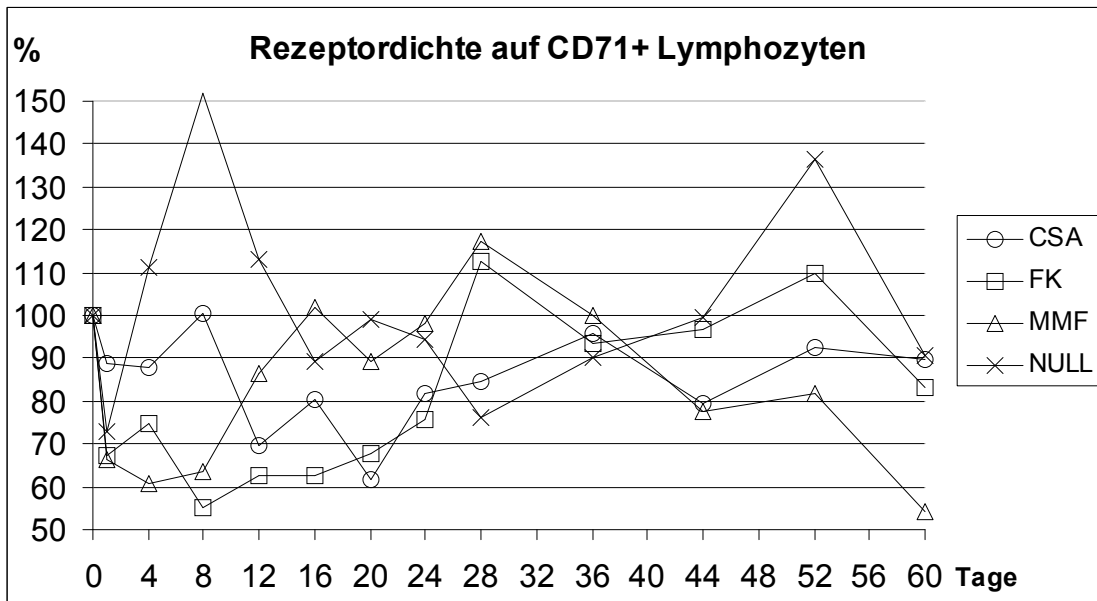
## 3.1.2.12 CD49d



**Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD49d-positiven Lymphozyten**

Bei den CD49d-positiven Lymphozyten war unmittelbar postoperativ, wie aus Abbildung 24 zu ersehen ist, bei allen immunsuppressiv behandelten Versuchsgruppen ein Anstieg der relativen Rezeptordichte bis über 50 % zu beobachten. Besonders deutlich war der Anstieg bei der CsA- und der FK-506-Gruppe. Die MMF-Gruppe zeigte lediglich einen Anstieg um etwa 10 %. Die unbehandelte Gruppe schwankte während der ersten Tage mit breiter Streuung um den Ausgangswert. Gegen Versuchsmitte am 28. Beobachtungstag zeigten dann alle Versuchsgruppen wieder Messwerte, die nur knapp oberhalb des Ausgangswertes lagen. Von hier an stiegen die Messwerte dann kontinuierlich bis zum Versuchsende auf ein etwa 10 – 20 % über dem Ausgangswert liegendes Niveau an. Dabei fiel auf, dass die CsA-Gruppe ab dem 28. Tag an allen Messpunkten die größten Werte zeigte.

## 3.1.2.13 CD71



**Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der Rezeptordichte auf CD71-positiven Lymphozyten**

Die Entwicklung der Expressionsstärke von CD71 auf den Lymphozyten ist aus Abbildung 33 zu entnehmen. Dabei waren postoperativ bei allen Gruppen Werte unterhalb des Ausgangswertes zu finden. Danach schwankten die Messwerte so stark, dass sich keine Entwicklungstendenz ablesen lässt.

## **4. Diskussion**

#### **4.1. Pathophysiologische Mechanismen der Transplantatabstoßung**

Jede Gewebeübertragung löst bei HLA-Inkompatibilität im Empfängerorganismus eine Reaktion auf das übertragene Gewebe aus, es sei denn, dass Empfänger und Spender genetisch identisch sind. Dies ist nur bei eineiigen Zwillingen der Fall. Alle anderen Organismen unterscheiden sich genetisch. Einen besonders ausgeprägten Polymorphismus und Polygenie zeigt dabei der auf Chromosom 6 gelegene und über 50 Gene umfassende MHC (major histocompatibility complex), der für wichtige Oberflächenproteine codiert. Dies sind die immunologisch wichtigsten Oberflächenproteine, die auf jeder kernhaltigen Zelle antigene Peptidfragmente präsentieren. T-Zellen können mit ihrem T-Zell-Rezeptor die präsentierten Antigene erkennen und so die Zelle als körpereigen oder als fremd unterscheiden.

Eine spezifische Immunantwort wird ausgelöst, wenn naive T-Zellen ein fremdes Antigen erkennen. Dies kann zum einen durch den direkten Kontakt mit dem fremden Antigen oder durch Kontakt mit einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle geschehen. Professionelle antigenpräsentierende Zellen präsentieren Peptidfragmente von Antigenen an geeigneten MHC-Molekülen und tragen daneben auch costimulierende Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese Fähigkeit konnte bisher bei dendritischen Zellen, Macrophagen und B-Zellen nachgewiesen werden. Als Reaktion auf den Kontakt mit dem fremden Antigen proliferieren die naiven T-Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen. Dabei differenzieren die CD8-T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen aus. CD4-T-Zellen zu  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen, die dann wiederum Makrophagen aktivieren und B-Zellen zur Bildung von Immunglobulinen anregen [69]. Jede Proliferation und Differenzierung von T-Zellen wird durch das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), das von aktivierten Zellen selbst gebildet wird, gesteuert. Bei der Aktivierung einer ruhenden T-Zelle, tritt diese in den Zellzyklus ein und beginnt mit der

Produktion sowohl von IL-2 als auch von der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors. Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Ketten:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Ruhende T-Zellen exprimieren eine Form des Rezeptors, der nur  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten enthält und eine geringe Affinität zu IL-2 aufweist. Erst durch die Verbindung mit der  $\alpha$ -Kette entsteht ein hochaffiner Rezeptor. Bindung von IL-2 lässt die Zellen den Rest des Zellzyklus durchlaufen. So entstehen durch mehrere Teilungen pro Tag innerhalb von wenigen Tagen tausende Zellen mit identischem Antigenrezeptor. Des Weiteren sind zur effektiven IL-2-Produktion noch costimulierende Signale notwendig. CD2, CD6 und CD28 sind bekannte Corezeptoren des T-Zell-Rezeptors.

Diese Mechanismen führen u.a. zur Abstoßung eines transplantierten Organs. Klinisch lassen sich dabei eine hyperakute, eine akute und eine chronischen Form unterscheiden.

#### 4.1.1. Die hyperakute Abstoßungsreaktion

Die hyperakute Abstoßungsreaktion tritt unmittelbar nach der Transplantation auf. Sie wird durch präformierte, gegen den Spender gerichtete Antikörper verursacht. Solche Antikörper können eine sehr schnelle Abstoßung, bisweilen innerhalb von Minuten, verursachen, da sie mit Antigenen auf dem Gefäßendothel in dem fremden Gewebe reagieren und die Komplement- und Gerinnungskaskade aktivieren. Morphologisch kommt es zu einer rapiden Kongestion des Transplantates mit tieferer Verfärbung als Folge von Hämorrhagien, die mit einem akuten Funktionsverlust des Organs einhergeht [7, 8].

#### 4.1.2. Die akute Abstoßungsreaktion

Die akute Abstoßungsreaktion eines Transplantates ist ein von T-Zellen vermitteltes Geschehen. Ohne Immunsuppression kommt es nach einer Übertragung von fremdem Gewebe innerhalb von 11-15 Tagen zur Abstoßung. Es kommt zu einer massiven Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in das fremde Organ und zu einem interstitiellen Ödem. Außerdem kommt es zur, durch  $T_H2$ -Zellen stimulierten, Produktion von IgG-Antikörpern,

die gegen das Transplantat gerichtet sind [70]. Unbehandelt führt sie ebenfalls zu einem raschen Funktionsverlust und schließlich zum Absterben des Organs.

#### 4.1.3. Die chronische Abstoßungsreaktion

Während die akute Abstoßung klinisch gut zu beherrschen ist, stellt die chronische Abstoßung eines der ungelösten Probleme der aktuellen Transplantationsmedizin dar. Unter chronischer Abstoßung versteht man Veränderungen im Transplantat, die sich von denen der akuten Abstoßung unterscheiden und letztlich aber ebenfalls zum Transplantatverlust führen. In erster Linie handelt es sich um streng auf das Transplantat begrenzte Gefäßveränderungen, die histopathologisch der gewöhnlichen Arteriosklerose ähneln. [9, 10]. Daher wird der Begriff chronische Abstoßung häufig durch die Termini Transplantatvaskulopathie und Transplantatarteriosklerose ersetzt. Im Gegensatz zur gewöhnlichen Arteriosklerose treten die Veränderungen jedoch unabhängig vom Lebensalter mit einem diffusen Befall auch der distalen, kleinen Äste der Koronarien auf. Histologisch sind bereits nach wenigen Monaten eine konzentrische Intimaproliferation mit anfangs intakter *Elastica interna* zu beobachten. Bei der gewöhnlichen Arteriosklerose hingegen entstehen die Veränderungen nach jahrelanger Entwicklung meist erst im hohen Lebensalter mit Bevorzugung bestimmter Prädilektionsstellen, wie den proximalen Gefäßbifurkationen. Ihr histologisches Korrelat ist eine exzentrische Intimaproliferation mit Kalziumablagerungen und unterbrochener *Elastica externa* [11]. Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung der Transplantatvaskulopathie führen sind bislang unbekannt. Allen Theorien zu ihrer Entstehung ist jedoch gemein, dass ein immunologischer Ursprung angenommen wird [12, 13].

#### 4.1.4. Die Behandlung der Transplantatabstoßung

Um eine Abstoßung zu verhindern werden in erster Linie zwei Wege beschritten: zum einen wird vor der Transplantation versucht durch eine Gewebstypisierung eine größtmögliche Ähnlichkeit zwischen den MHC-Molekülen von Transplantat und Empfänger sicherzustellen

und durch eine Kreuzprobe präformierte Antikörper gegen das Transplantat auszuschließen [14, 15]. Zum anderen wird durch immunsuppressive Medikamente auf verschiedenen Wegen die Aktivierung von T-Zellen unterdrückt. Dabei ist besonders das akute Abstoßungsgeschehen klinisch gut zu beherrschen und wirkungsvoll zu unterdrücken. Die chronische Abstoßung entzieht sich derzeit jedoch noch einer ursächlichen Behandlung und kann nur symptomatisch behandelt werden. Daher kommt der chronischen Abstoßung in Betracht auf die Transplantatüberlebenszeit und somit der Prognose entscheidende Bedeutung zu.

#### **4.2. Die klinische Situation**

Die Herztransplantation ist derzeit die beste Therapieform bei terminalem Herzversagen. In ihrem Jahresbericht 2003 berichtete die Internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantationen über weltweit 62.851 Herztransplantationen in 220 Institutionen [16].

In einer Übersicht der Überlebensraten aller Herztransplantierten von 1967 bis 1999 liegt die Einjahrüberlebensrate bei 81 %, nach 9,8 Jahren leben noch 50 % der Patienten. Führende Todesursache der langzeitüberlebenden Patienten ist die Transplantatvaskulopathie [17, 18]. Ihre Inzidenz beträgt etwa 10-20 % nach einem Jahr, 25-45 % nach drei und mindestens 40-50 % nach fünf Jahren [3, 19,].

Die frühe Diagnose der Transplantatvaskulopathie ist schwierig, da die Patienten aufgrund der kardialen Denervierung keine Angina pectoris-Beschwerden haben. Kongestive Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod bestimmen das klinische Bild. Elektrokardiographische Veränderungen eines Myocardinfarktes können unspezifisch sein oder fehlen [18]. Szintigraphische Methoden und Myokardbiopsien sind ungeeignet, um diese Veränderungen nachzuweisen. Daher ist das Mittel der Wahl zur Diagnose der Transplantatvaskulopathie bislang die Koronarangiographie. Dieses invasive Verfahren

unterschätzt jedoch die wahre Inzidenz der Transplantatvaskulopathie, da ein diffuser Befall kleiner Koronargefäße unter Umständen nicht oder nicht adäquat erkennbar ist [20]. Angesichts der Invasivität und Unsicherheit dieses Verfahrens wäre eine einfachere Diagnosemöglichkeit wünschenswert. Es wäre ein gewaltiger Fortschritt, wenn sich aus immunologischen Veränderungen im Blut Rückschlüsse über die Effektivität der Immunsuppression oder die Aktivität der chronischen Abstoßungen ziehen lassen könnten. Diese Untersuchung wäre zudem für den Patienten wenig belastend.

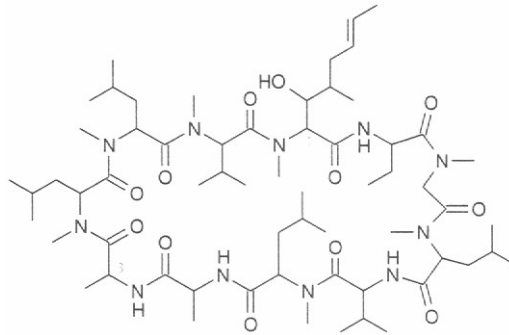
Eine zufrieden stellende Therapie der Transplantatvaskulopathie existiert derzeit jedoch noch nicht. Aufgrund des meist diffusen Befalls und einer hohen Rezidivrate ist eine Bypass-Operation oder eine perkutane transluminale Angioplastie nur selten möglich oder nur von limitiertem Nutzen [21, 22]. Als einzige Alternative bleibt die Retransplantation, welche jedoch mit einer deutlich erhöhten perioperativen Morbidität und Letalität verbunden ist [23, 24]. Auch die Langzeitergebnisse sind schlecht, da mit einem Rezidiv im Zweittransplantat gerechnet werden muss [25]. Daher kommt der Früherkennung der Transplantatvaskulopathie und der Optimierung des immunsuppressiven Behandlungsregimes entscheidende Bedeutung zu. Dies könnte durch solche Messungen individuell auf jeden Patienten abgestimmt werden.

### **4.3. Zur Wirkung der verwendeten Immunsuppressiva**

#### 4.3.1. Zur Wirkung von Cylosporin A (CsA)

Bei der Suche nach antibiotischen Substanzen wurden Mitte der siebziger Jahre verschiedene Cyclosporine isoliert [26].





**Abbildung 34: Strukturformel Cyclosporin A**

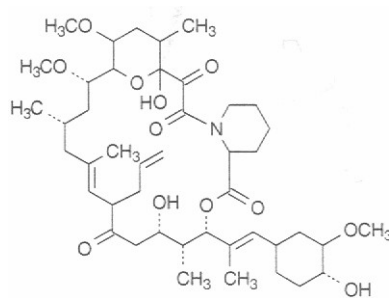
CsA ist ein zyklisches Dekapeptid aus *Tolypocladium inflatum*, einem Pilz, der in Bodenproben aus Norwegen gefunden wurde. Seine Strukturformel ist in Abbildung 34 dargestellt. CsA wurde 1983 zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung nach Organ- und Knochenmarktransplantationen und zur Therapie der graft-versus-host Krankheit eingeführt und hat wie keine andere Maßnahme die Organtransplantation revolutioniert. Die Frühletalität und vermutlich auch die Spätletalität haben sich signifikant verbessert, da die Inzidenz und Schwere der akuten Abstoßung unter CsA stark abgenommen haben. CsA übt jedoch zahlreiche, teilweise erhebliche Nebenwirkungen aus, die seine Anwendbarkeit erheblich limitieren können. Klinisch am bedeutsamsten ist die Nephrotoxizität, welche vermutlich auf der Vasokonstriktion glomerulär afferenter Arteriolen beruht und binnen kurzer Zeit zu Kreatininretention und arterieller Hypertonie führt [27, 28]. Darüber hinaus können Cholestase, Hyperglykämie, Polyneuropathie oder gastrointestinale Symptome in Erscheinung treten.

CsA blockiert die Proliferation der T-Zellen durch eine verminderte Expression mehrerer Zytokingene, die normalerweise bei der T-Zell-Aktivierung induziert werden. Dazu gehört eine verminderte Freisetzung von IL-2-Freisetzung aus T-Zellen [29, 30]. In höheren Konzentrationen wird auch die Expression des IL-2-Rezeptors unterdrückt [31]. CsA bindet spezifisch an spezielle intrazelluläre Bindungsproteine, die Cyclophiline [32]. Diese CsA-Cyclophilin-Komplexe hemmen die Phosphatase Calcineurin, so dass nachfolgend die

calciumabhängige Aktivierung der Interleukingene unterbrochen ist [33, 34, 35]. Außerdem erhöht CsA die Expression von TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), der die durch IL-2 stimulierte T-Zell-Proliferation und die Generation der zytotoxischen Lymphozyten hemmt.

#### 4.3.2. Zur Wirkung von Tacrolimus (FK-506)

FK-506 greift trotz seiner unterschiedlichen Struktur ähnlich in die intrazelluläre Signaltransduktion von T-Zellen ein wie CsA [36].



**Abbildung 35: Strukturformel FK-506**

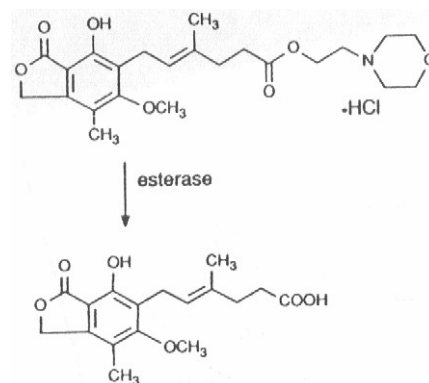
FK-506 ähnelt in seiner Struktur Makrolidantibiotika und wird aus dem Kulturmedium von *Streptomyces tsukubaensis* isoliert, den man in Japan entdeckt hatte [37], die Strukturformel ist in Abbildung 35 dargestellt. Die Substanz wurde 1995 zur Prophylaxe und Behandlung der Transplantatabstoßung nach Lebertransplantation und als Medikament der zweiten Wahl nach Nierentransplantation eingeführt.

FK-506 hemmt die Aktivierung bestimmter Gene, die wachstumsfördernde Zytokine codieren. So wird die Expression von IL-2, IL-3, IF- $\gamma$  und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), von Protoonkogenen und von spezifischen Zytokinrezeptoren unterdrückt. Wie für CsA existiert für FK-506 eine eigene Familie von intrazellulären Bindungsproteinen, die als FKBP (FK binding protein) bezeichnet werden [38, 39]. Wie die CsA-Cyclophilin-Komplexe hemmen auch die FK-506-FKBP-Komplexe die Phosphatase Calcineurin. Die calciumabhängige Signalkaskade in T-Zellen wird unterbrochen

und die Expression von Interleukinen unterdrückt [33, 34]. Obwohl CsA und FK-506 zwei unterschiedliche Substanzklassen repräsentieren, werden die immunsuppressive Wirkung und wahrscheinlich auch die gleichartigen Nebenwirkungen wie Neuro- und Nephrotoxizität oder Hyperglykämien über denselben Mechanismus vermittelt [40, 41].

#### 4.3.3. Zur Wirkung von Mycophenolate mofetil (MMF)

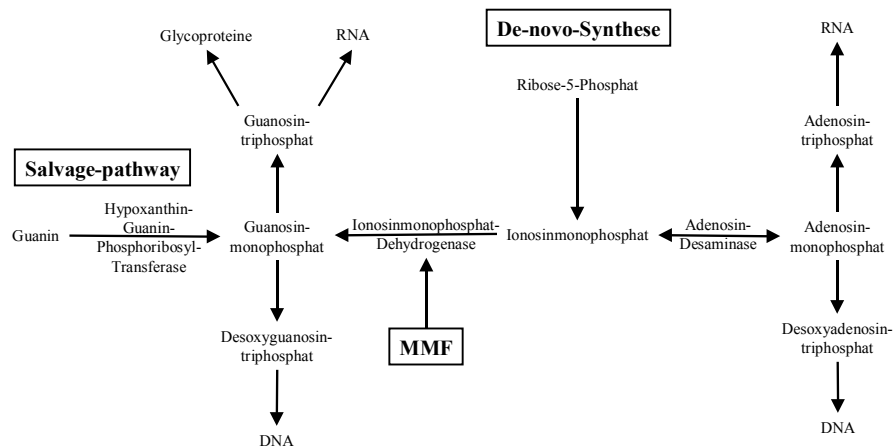
Als neuestes immunsuppressiv wirksames Medikament wurde 1996 MMF in Europa zugelassen. MMF ist der Morpholinoethylester der Mycophenolsäure. Mycophenolsäure, ein Fermentationsprodukt unterschiedlicher *Penicillium*-Spezies, ist die eigentliche immunsuppressive Verbindung, die durch Esterabspaltung aus dem Prodrug MMF gebildet wird.



**Abbildung 36: Strukturformel des Prodrug Mycophenolate mofetil sowie der durch Esterasenspaltung entstandenen Wirkform Mycophenolsäure**

Die Strukturformeln von Mycophenolate mofetil und Mycophenolsäure sind in Abbildung 36 dargestellt.

MMF hemmt die Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) und damit die De-novo-Synthese von Guanosinmonophosphat (GMP). Die antiproliferative Wirkung ist relativ spezifisch für B- und T-Zellen, weil diese im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen nicht in der Lage sind, Pyrimidinnukleotide in Wiederverwertungsreaktionen (Salvage-pathway) aus Purinen zurückzugewinnen (siehe Abbildung 37)[42, 43].



**Abbildung 37: Pyrimidinstoffwechsel inklusive Salvage-pathway**

Zusätzlich hemmt MMF *in vitro* den Einbau von Mannose und Fucose in Glycoproteine, zum Beispiel in Adhäsionsmoleküle. Aufgrund dieses Effektes ist möglicherweise die transendotheliale Diapedese von Monozyten und T-Zellen in entzündliches Gewebe gehemmt [44, 45].

Bisher durchgeführte tierexperimentelle Studien konnten die Effektivität der Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen bestätigen [46, 47]. Eine Kombinationstherapie mit CsA zeigte tierexperimentell eine additive Wirksamkeit ohne Anstieg der Nebenwirkungen. Durch Reduzierung der CsA-Dosis war es sogar möglich, die Rate von Nebenwirkungen ohne Einbußen am immunsuppressiven Effekt zu senken [48, 49]. In Kombination mit FK-506 konnte in einer Multicenterstudie eine gut verträgliche effektive Immunsuppression nach Nierentransplantation gezeigt werden [50]. Darüber hinaus wurde MMF in einer humanen Multicenterstudie bei therapierefraktären Abstoßungen von Nierentransplantaten erfolgreich eingesetzt [51].

#### **4.4. Zur Expression von ausgewählten Oberflächenantigenen auf peripheren Lymphozyten**

##### 4.4.1. Zur Expression von CD2

Bei dem Oberflächenantigen CD2 (LFA-2) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das der Immunglobulinsuperfamilie zugerechnet wird. Es wird von T-Zellen, Thymozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert [52, 53]. Sein Ligand ist das von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere den dendritischen Zellen, exprimierte LFA-3 (CD48 [das murine Homolog des menschlichen CD58]), das ebenfalls der Immunglobulinsuperfamilie der Adhäsionsmoleküle zugerechnet wird. Bei der Wanderung von naiven T-Zellen durch den Cortex eines Lymphknotens binden sie vorübergehend an jede antigenpräsentierende Zelle, die die naiven T-Zellen, unter anderem durch Interaktionen zwischen CD2 auf der T-Zelle und LFA-3 auf der antigenpräsentierenden Zelle, sehr effektiv binden können. Die vorübergehende Bindung an antigenpräsentierende Zellen ist wichtig damit die T-Zellen ausreichend Zeit haben, um viele MHC-Moleküle auf das Vorhandensein spezifischer Peptide prüfen zu können. Trifft eine naive T-Zelle dabei ihr spezifisches Peptidfragment kommt es unter anderem zu einer über den T-Zellrezeptor induzierten Konformationsänderung eines weiteren Adhäsionsmoleküls der T-Zelle, dem LFA-1 (CD11a/CD18-Komplex). Dadurch wird die Affinität von LFA-1 für seine Bindungspartner ICAM-1, ICAM-1 und ICAM-3 auf der antigenpräsentierenden Zelle deutlich erhöht. So kommt es zu einer festen Bindung zwischen den beiden Zellen, die über mehrere Tage bestehen kann, in denen die naive T-Zelle dann proliferiert und ausdifferenziert [54]. CD2 wirkt dabei costimulierend und macht die T-Zelle um den Faktor 3-10 empfindlicher für ihr dargebotene Antigene [55]. Als T-Effektorzelle exprimiert sie dann zwei- bis viermal mehr CD2 und kann daher an ihre Zielzellen binden, die weniger LFA-3 als professionelle antigenpräsentierende Zellen an ihrer Oberfläche aufweisen.

CD2 scheint ein sehr wichtiger Costimulator bei der Aktivierung von T-Zellen und somit wichtig für die T-Zell-vermittelte Transplantatabstoßung zu sein [56]. Experimentell konnte durch die Blockade von CD2 durch monoklonale Antikörper die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen inhibiert werden und gleichzeitig die Transplantatüberlebenszeit verlängert werden [57, 58, 59].

Bei den von uns gemachten Untersuchungen zeigten sowohl die mit CsA und FK-506 behandelte als auch die unbehandelte Gruppe nach der Transplantation eine ähnliche Entwicklung. Es war nach einem ersten Rückgang der CD2-positiven Zellen am ersten Messpunkt nach der Transplantation eine kurzfristige Erholung und dann ein kontinuierlicher Abfall auf Werte um 45 % zu beobachten. Zwar lagen die Messwerte bei den mit CsA und FK-506 immunsuppressiv behandelten Tieren unter denen der unbehandelten Tiere, statistisch zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die mit MMF behandelte Gruppe zeigte dagegen eine andere Entwicklung. Am ersten Messpunkt nach der Transplantation ist auch ein Rückgang der CD2-positiven Lymphozyten zu beobachten, im weiteren Verlauf stiegen die Messwerte jedoch wieder auf Werte um 60 %. Ab dem dritten Messpunkt ergeben sich bis auf Tag 52 an allen Messpunkten statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Diese Beobachtung wird durch eine klinische Studie bestätigt, bei der sich unter der immunsuppressiven Behandlung mit MMF im Vergleich zu anderen immunsuppressiven Regimen kein Abfall der CD2-Subpopulation fand, ohne den Therapieerfolg zu beeinträchtigen [60]. Dies könnte in dem unterschiedlichen Wirkungsansatz der Medikamente begründet sein.

Bei der Auswirkung auf die Rezeptordichte auf den Lymphozyten waren bei den immunsuppremierten Tieren keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen.

#### 4.4.2. Zur Expression von CD3

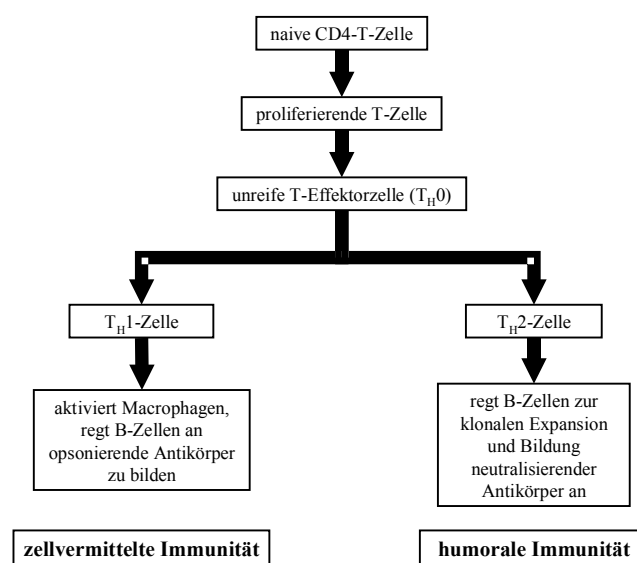
CD3 gehört ebenfalls der Immunglobulinsuperfamilie an und ist ein mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR) assoziierter Oberflächenproteinkomplex. Da der T-Zellrezeptor über keine große zytoplasmatische Domäne verfügt, die die Übertragung eines Signals in die Zelle bewerkstelligen könnte, wenn ein Antigen-MHC-Ligand gebunden hat. Stattdessen übernimmt ein Komplex aus drei verschiedenen Proteinen diese Funktion der Signalübertragung durch Aktivierung von Proteinkinasen, die über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zur Aktivierung von Calcineurin führen. Dieser Komplex wird als CD3-Rezeptor bezeichnet und setzt sich aus drei stabil miteinander verbundenen Proteinen zusammen. Man bezeichnet diese Proteine als CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  und CD3 $\epsilon$ . Die CD3-Proteine sind für das Erscheinen des T-Zell-Rezeptors an der Zelloberfläche erforderlich [61]. Monoklonale Antikörper gegen CD3 führen in vivo zu einer Anergie der T-Zellen. Dies bedeutet, dass sie trotz optimaler Stimulierung nicht auf ihr spezifisches Antigen reagieren. Seit einigen Jahren werden sie erfolgreich in der Transplantationsmedizin eingesetzt, um die Transplantatüberlebenszeit zu verlängern [62, 63, 64], sowie zur Therapie der akuten Transplantatabstoßung [65, 66].

Der postoperative Verlauf der CD3-positiven Lymphozyten war dem von CD2 sehr ähnlich. Am ersten Messpunkten nach der Transplantation sanken die CD3-positiven Lymphozyten bei allen Versuchsgruppen ab. Im weiteren Verlauf fielen die Werte von CsA- und FK-506-Gruppe weiter auf Werte um 45 % ab. Sie lagen unter denen der Kontrollgruppe (um 50 %), zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede. Bei der MMF-Gruppe stiegen die Messwerte nach der initialen Reduktion ab dem 4. Tag wieder auf Werte um 60 % an und änderten sich bis zum Versuchsende nicht mehr wesentlich. Auch dieser Unterschied müsste sich durch den unterschiedlichen Wirkansatz der Medikamente erklären lassen.

Bei der Rezeptordichte auf den CD3-positiven Lymphozyten war bei allen Gruppen über die Versuchsdauer eine Abnahme zu erkennen, ohne dass sich die Gruppen voneinander unterschieden.

#### 4.4.3. Zur Expression von CD4

Auch das Oberflächenmolekül CD4 gehört der Superimmunglobulinfamilie an. Es findet sich auf einigen Gruppen von Thymozyten, T-Helferzellen, inflammatorischen T-Zellen (etwa zwei Drittel der peripheren T-Zellen), Macrophagen und Monozyten. Während der Antigenerkennung assoziiert es sich auf der T-Zell-Oberfläche mit Komponenten des T-Zellrezeptors. Dabei bindet es an eine unveränderliche Region des MHC-II-Komplexes der antigenpräsentierenden Zelle und wirkt bei der Signalübermittlung synergistisch mit dem T-Zell-Rezeptor. Aus diesem Grund wird es auch als Corezeptor bezeichnet [67]. Die Anwesenheit von CD4 führt zu einem beachtlichen Anstieg der Empfindlichkeit einer T-Zelle für ein von MHC-II präsentierte Antigen. Um die T-Zelle zu aktivieren ist nur ein Hundertstel der sonst benötigten Menge von Antigen nötig [68]. Aus naiven proliferierenden CD4-T-Zellen entwickeln sich zunächst unreife T-Effektorzellen ( $T_{H0}$ ). Aus diesen entstehen bei der weiteren Differenzierung entweder  $T_{H1}$  oder  $T_{H2}$ -Zellen (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38: Differenzierung von naiven CD4-Zellen**



Sie unterscheiden sich durch ein unterschiedliches Repertoire an Effektormolekülen, das von ihnen exprimiert wird. T<sub>H</sub>1-Zellen sind wichtiger Bestandteil der zellvermittelten Immunität, wirken aktivierend auf Makrophagen und regen B-Zellen an, opsonierende Antikörper zu bilden. Dies sind Antikörper, die durch Anlagerung an körperfremde Antigene deren Elimination durch Phagozytose begünstigen. Im Wesentlichen wird dies über die Effektormoleküle Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), den Granulozyten-Makrophagen-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vermittelt. T<sub>H</sub>2-Zellen regen durch Produktion von Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 5 (IL-5) B-Zellen zur Bildung neutralisierender Antikörper und zur klonalen Expansion an [69]. Sie sind somit wichtig für die humorale Immunität. Für die Transplantatabstoßung spielen die CD4-T-Zellen, insbesondere die T<sub>H</sub>2-Zellen, durch Induktion der Produktion von IgG-Antikörpern, die gegen das Transplantat gerichtet sind, eine wichtige Rolle [70, 71, 72]. Experimentell werden monoklonale Antikörper gegen CD4 zur Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung erfolgreich eingesetzt [73, 74, 75, 76].

Auch bei der Entwicklung der CD4-positiven Zellen ließen sich nach Transplantation sehr ähnliche Beobachtungen machen: ein kurzer postoperativer Einbruch am ersten Beobachtungstag bei allen Versuchsgruppen mit anschließender Erholung. Dann Abfall der Werte bei der CsA-, FK-506- und Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer, wobei die Werte von CsA- und FK-506-Gruppe unter denen der Kontrollgruppe lagen ohne sich jedoch signifikant zu unterscheiden. Die Messwerte der mit MMF behandelten Gruppe blieben nach dem postoperativen Einbruch auf Höhe des Ausgangswertes. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in einer klinischen Studie, bei der die Transplantatabstoßung erfolgreich mit MMF unterdrückt werden konnte, ohne dass eine Veränderung der CD4-Lymphozytensubpopulation zu beobachten war [60]. Daher muss sich die immunsuppressive Wirkung von MMF durch einen anderen Mechanismus als die Unterdrückung von bestimmten Oberflächenmerkmalen erklären lassen.

Bei der Rezeptordichte ließ sich beim Vergleich der einzelnen Gruppen kein Unterschied finden. Alle Versuchsgruppen fallen über die Versuchsdauer leicht ab.

#### 4.4.4. Zur Expression von CD5

CD5 ist ein transmembranöses Typ-1 Glycoprotein, das die Signalübertragung von B- und T-Zell-Rezeptoren moduliert und auf Thymozyten, T-Zellen und einer Untergruppe der B-Zellen exprimiert wird. Die extrazelluläre Region von CD5 ist zusammengesetzt aus drei Scavenger-Rezeptoren mit cystinreichen Domänen, die mit D1, D2 und D3 bezeichnet werden. Über die genaue Funktion und die Struktur dieses Rezeptors sind derzeit noch keine Daten verfügbar [77, 78]. In experimentellen Studien konnte sowohl durch eine Vorbehandlung als auch durch eine Therapie nach der Transplantation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD5 die Überlebenszeit des Transplantates verlängert werden [79, 80, 81]. Die Ergebnisse bei CD5 deckten sich mit den zuvor beschriebenen. Einem postoperativen Einbruch folgte zunächst eine Erholung. Bei den mit CsA und FK-506 behandelten Gruppen zeigte sich dann während des Versuches ein kontinuierlicher Abfall. Auch bei der unbehandelten Gruppe war bis zur Versuchsmitte eine Verringerung der CD5-positiven Lymphozyten zu beobachten. Danach blieben die Werte jedoch bis zum Versuchsende stabil und lagen über den Werten von der CsA- und der FK-506-Gruppe. Gegen Ende des Versuchs unterschieden sich die Werte von CsA und FK-506-Gruppe teilweise signifikant von der Kontrollgruppe. Die mit MMF behandelten Tiere zeigten über die gesamte Versuchsdauer Messwerte im Bereich des Ausgangswertes. Ab Versuchsmitte zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Bei der Rezeptordichte zeigte sich bei allen vier Versuchsgruppen eine leichte Abnahme während des Versuchs.

#### 4.4.5. Zur Expression von CD8

CD8 gehört der Immunglobulinsuperfamilie an und wird auf Thymozyten und zytotoxischen T-Zellen (etwa ein Drittel der peripheren T-Zellen) gefunden. Das CD8-Molekül besteht aus einem, durch eine Disulfidgruppe verbundenen Heterodimer, das sich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammensetzt. Ähnlich wie CD4 fungiert es als Corezeptor bei der Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor. Es wirkt allerdings bei der Antigenerkennung an MHC-Klasse-I-Proteinen mit [67]. Auch die Anwesenheit von CD8 steigert die Empfindlichkeit der T-Zelle um etwa das 100fache [68]. Werden naive CD8-T-Zellen aktiviert differieren sie zu zytotoxischen T-Zellen aus. Diese sind mitverantwortlich für die Transplantatabstoßung [70]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade von CD8 durch monoklonale Antikörper die Transplantatüberlebenszeit verlängerte [75].

Bei den für CD8 positiven Lymphozyten ließ sich im zeitlichen Verlauf bei allen Versuchsgruppen ein leichter Verlust beobachten. Auffällig war dabei, dass die MMF-Gruppe an fast allen Messpunkten die höchsten Werte und die CsA-Gruppe die tiefsten Werte aufwies, ohne dass sich aber signifikante Unterschiede finden. Die Expression von CD8 schien von keinem der Medikamente entscheidend beeinflusst zu werden. Die Rezeptordichte zeigte bei allen Gruppen eine leichte Abnahme während des Versuchs.

#### 4.4.6. Zur Expression von CD11a/CD18 und CD11b/CD18

Integrine stellen eine große Familie von Oberflächenproteinen dar, die die Adhäsion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort ermöglichen. Integrine bestehen aus einer großen  $\alpha$ -Kette, die nichtkovalent mit einer kleineren  $\beta$ -Kette zusammengelagert sind. Die verschiedenen Unterfamilien der Integrine werden definiert durch ihre gemeinsame  $\beta$ -Kette. CD18 bezeichnet die gemeinsame Untereinheit der  $\beta_2$ -Integrinfamilie. CD11a bezeichnet die  $\alpha^L$ -Untereinheit, die assoziiert mit CD18, in der Literatur oftmals auch als LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1)

genannt wird. CD11b stellt eine weitere  $\alpha^M$ -Untereinheit dieser Integrinfamilie dar und wird auch als Mac-1 bezeichnet. Beide Integrine können effektiv an ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 (intercellular adhesion molecules) binden. In Absatz 4.4.1. wurde bereits über die wichtige Funktion von LFA-1 im Rahmen der Leukozytenaktivierung berichtet. Man nimmt an, dass es das wichtigste Adhäsionsmolekül für die Lymphozytenaktivierung ist. Jedoch können T-Zell-Antworten bei Patienten mit Leukozyten-Adhäsionsdefizienz, einer erblichen Immunschwäche, die auf einem Defekt bei der Synthese der gemeinsamen  $\beta_2$ -Kette beruht, normal ausfallen. Diese Beobachtung wird durch experimentelle Beobachtungen unterstützt, die bei einer alleinigen LFA-1-Blockade keinen Anstieg der Transplantatüberlebenszeit zeigten [82].

Da ICAM-1 und ICAM-2 aber nicht nur von antigenpräsentierenden Zellen, sondern auch von Endothelzellen exprimiert werden, spielen diese Rezeptoren auch bei der transendothelialen Diapedese von inflammatorischen Zellen eine wichtige Funktion. Experimentell konnte durch Antikörperblockade von CD18 die Infiltration von T-Zellen in heterologes Gewebe reduziert werden [83].

Diese Aussagen treffen auch für Mac-1 zu. Darüber hinaus entspricht Mac-1 dem C3-Rezeptor des Komplementsystems und kann die Komplementkomponente C3b binden, eines der wichtigsten Opsonine des Komplementsystems [84].

Bei der Auswertung der Messungen zeigten sich bei allen drei Oberflächenmerkmalen im Vergleich zu den anderen untersuchten Oberflächenmerkmalen solche Schwankungen der Ergebnisse, dass keine Aussage über eine Entwicklung gemacht werden kann. CD11a und CD11b erscheinen auf der Zelloberfläche nur in nichtkovalenter Verbindung mit CD18. Aufgrund dieser relativ lockeren Verbindung ist auch das Bindungsverhalten der zur Detektion verwendeten Antikörper starken Schwankungen unterworfen. Um Veränderungen der Oberflächenexpression dieser Oberflächenmerkmale messen zu können, muss die

verwendete Messmethode verfeinert werden um stabilere Bindungen zu erhalten, oder andere Detektionsmethoden verwendet werden.

In der zu diesem Thema vorliegenden Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass die Infiltration von lymphoiden Zellen im Rahmen der Transplantatabstoßung unter anderem auf einer gesteigerten Expression des Bindungspartners ICAM-1 im Endothel basiert [85, 86]. Auch in der Pathogenese von einigen autoimmunen, chronischen Erkrankungen spielt die erhöhte endotheliale ICAM-1-Expression eine wichtige Rolle. Hierzu gibt es eine Vielzahl von Literatur, die den immunsuppressiven Effekt von Medikamenten durch die Unterdrückung dieser vermehrten Expression im Endothel beschreibt [87, 88, 89]. Leider kann aufgrund der vorliegenden Messungen über die Entwicklung der Bindungspartner ICAM-1 und ICAM-2 hier keine Aussage gemacht werden.

#### 4.4.7. Zur Expression von CD25

CD25 bezeichnet die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, die sich mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette zu einen funktionstüchtigen Rezeptor verbindet (s. Kap. 4.1.). Er findet sich auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten. Dem IL-2-Rezeptor kommt während der Aktivierung von T-Zellen entscheidende Bedeutung zu. In experimentellen Studien konnte durch die Blockade des Rezeptors gezielt die T-Zell-Aktivierung unterdrückt werden [90, 91]. Zurzeit werden am Menschen zwei den IL-2-Rezeptor blockierende monoklonale Antikörper in klinischen Studien zur Unterdrückung der akuten Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation getestet [92, 93, 94].

Die von uns durchgeführten Messungen zeigten bei keiner der drei Medikamentengruppen signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe. Sowohl der prozentuale Anteil der CD25-positiven, als auch die Stärke der Expression von CD25 änderte sich während des Versuches nicht. Es war jedoch auffällig, dass die Messwerte der mit CsA behandelten Gruppe an allen Tagen im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen am

niedrigsten waren, ohne dass sich jedoch Signifikanzen fanden. Dies spricht dafür, dass CsA die Expression von CD25 nur in sehr hohen Dosen merklich unterdrückt und wird durch in der Literatur gemachten Beobachtungen über die Wirkung von CsA unterstützt [31]. Ob die Sekretion von IL-2 durch die verwendeten immunsuppressiven Medikamente unterdrückt wurde, kann nicht beurteilt werden. Die Rezeptordichte auf den CD25-positiven Lymphozyten blieb während der Untersuchung annähernd unverändert.

#### 4.4.8. Zur Expression von CD28

CD28 gehört der Immunglobulinsuperfamilie an und findet sich auf bestimmten T-Zell-Untergruppen und aktivierten B-Zellen. CD28 ist einer der wichtigsten Rezeptoren für costimulierende Signale bei der T-Zell-Aktivierung. Die costimulierende Wirkung scheint so stark zu sein, dass CD28 auch unabhängig von IL-2 eine T-Zelle aktivieren kann [95]. Sein Bindungspartner ist das Glykoprotein B7, von dem zwei Formen (B7.1 [CD80] und B7.2 [CD86]) existieren [96]. Eine Bindung von CD28 an B7 oder an Anti-CD28-Antikörper costimuliert das Wachstum naiver T-Zellen. Durch Antikörper gegen B7 wird hingegen dessen Bindung an CD28 unterdrückt und somit eine T-Zell-Antwort verhindert [97]. Experimentell konnte gezeigt werden, dass dies zu einem starken Anstieg der Transplantatüberlebenszeit führte [98, 99, 100].

Bei den von uns durchgeführten Messungen zeigte sich nach der Transplantation bei der mit CsA- und FK-506-Gruppe ein deutlicher Abfall der Lymphozyten, die CD28 exprimieren. Diese Beobachtung ist als Effekt der Immunsuppression zu sehen und deckt sich mit Ergebnissen einer klinischen Untersuchung, bei der nach Lebertransplantation ein starker Abfall von CD28-positiven T-Zellen unter CsA-Behandlung beschrieben wurde [101]. Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe war der beobachtete Abfall zwar stärker, unterschied sich jedoch nicht signifikant. Der Anteil der CD28-positiven Zellen in der mit MMF behandelten Gruppe blieb im Gegensatz dazu nahezu unverändert und unterschied sich ab

dem dritten Messpunkt signifikant von der Kontrollgruppe. Dieses unterschiedliche Verhalten muss durch den unterschiedlichen Wirkungsansatz der Medikamente erklärt werden.

Die Messungen der Rezeptordichte zeigten sehr große Schwankungen und machen eine Beurteilung nicht möglich.

#### 4.4.9. Zur Expression von CD45RA

Auf allen hämatopoetischen Zellen ist das Oberflächenprotein CD45 zu finden, das deshalb auch als leukocyte common antigen (LCA) bezeichnet wird. Durch alternatives Spleißen der Exons, die die extrazelluläre Domäne von CD45 kodieren, können mehrere Isoformen entstehen. CD45RA ist die Isoform mit dem höchsten Molekulargewicht [102]. Es ist bekannt, dass die Anzahl an T-Zellen, die auf ein Antigen reagieren können, nach einer Immunisierung deutlich erhöht ist und für den Rest des Lebens gegenüber der anfänglichen Menge auf einem deutlich (zehn- bis hundertfach) höheren Niveau persistiert. Diese Zellen besitzen Oberflächenmerkmale, die eher für bewaffnete T-Effektorzellen als für naive T-Zellen charakteristisch sind und werden T-Gedächtniszellen genannt. Sie führen bei einem erneuten Antigenkontakt schneller zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort als beim Erstkontakt und vermitteln so einen langfristigen Immunschutz. Drei Oberflächenantigene verändern sich beim Antigenkontakt besonders deutlich: L-Selektin, CD44 und CD45. Die Isoform CD45RA wird von naiven T-Zellen 10fach stärker als von T-Gedächtniszellen exprimiert. Die Expression von CD45R0 auf T-Gedächtniszellen ist hingegen um den Faktor 30 stärker als auf naiven T-Zellen [103, 104, 105].

Die Ergebnisse bei den CD45RA-positiven Lymphozyten zeigten eine postoperative Entwicklung, die den zuvor beschriebenen Verläufen bei fast allen anderen Oberflächenmerkmalen, entgegengesetzt ist. Die Messwerte bei der CsA- und FK-506-Gruppe zeigten nach der Transplantation einen sprunghaften Anstieg zum ersten Messpunkt und stiegen dann über die gesamte Versuchsdauer weiter an, um sich bis zum Ende nahezu zu

verdoppeln. Sie zeigten keinen Unterschied zur unbehandelten Gruppe. Es muss sich dabei um eine Reaktion auf die Transplantation handeln, die von CsA und FK-506 nicht oder nur sehr gering beeinflusst wird. Die Messwerte MMF-Gruppe hingegen veränderten sich über die Versuchsdauer nicht und schwankten um den Ausgangswert. Dieser Effekt muss der anderen Wirkungsweise von MMF zugeschrieben werden.

Bei den Messungen der Rezeptordichte ist bei den für CD45RA-positiven Lymphozyten der einzige Fall, wo es bei allen Gruppen zu einem massiver Anstieg, zum Teil bis auf das 2,5-fache des Ausgangswertes, zu beobachten war. Dieser Anstieg war bei der MMF-Gruppe am wenigsten ausgeprägt.

#### 4.4.10. Zur Expression von CD49d

Eine weitere Leukozytenintegrinfamilie ist durch die gemeinsame  $\beta_1$ -Untereinheit (CD29) gekennzeichnet. Die Expression der  $\beta_1$ -Integrine steigt während der späten Phase der T-Zell-Aktivierung deutlich an. Aus diesem Grund werden sie auch als VLA (very late activation antigens) bezeichnet. CD49d bezeichnete die  $\alpha^4$ -Untereinheit dieser Integrinfamilie und wird auch mit VLA-4 bezeichnet. Die vollständigen Aktivierung von naiven T-Zellen geht mit Veränderungen der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche einher, welche die ausdifferenzierten bewaffneten T-Effektorzellen zu den Infektionsherden im peripheren Gewebe leiten. Eine wichtige Veränderung ist dabei die deutlich gesteigerte Expression von VLA-4. Es bindet an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), das von Endothelzellen exprimiert wird. Durch Cytokine, die am Ort der Entzündung freigesetzt werden steigt die lokale Expression der Endothelzellen von VCAM-1 und ICAM-1 an. Dadurch wird die Einwanderung weiterer T-Effektorzellen und vieler weiterer akzessorischer Zellen im Entzündungsgeschehen erleichtert [106, 107].

Ähnlich wie bei der  $\beta_2$ -Integrinfamilie scheint bei der Pathogenese der chronischen Abstoßung eine vermehrte VCAM-1-Expression im Endothel entscheidend zu sein [86, 87,



108]. Auch hier kann die vermehrte Expression durch immunsuppressive Medikamente verringert werden [109].

Gleich zu Beginn des Beobachtungszeitraumes kommt es bei allen vier Versuchsgruppen zu einem steilen Anstieg von CD49d-positiven Zellen. Dieser initiale Anstieg war bei den mit MMF behandelten Tieren nicht zu beobachten. Im weiteren Verlauf gehen die Messwerte dann wieder zurück, liegen aber über die gesamte Versuchsdauer über dem Ausgangswert. Auffallend ist, dass die unbehandelte Gruppe ab dem 8. Beobachtungstag an allen Tagen mit Abstand die niedrigsten Werte aufweist.

#### 4.4.11. Zur Expression von CD71

CD71 ist ein homodimeres transmembranöses Molekül, das als Rezeptor für Transferrin fungiert. CD71 wird vor allem von stark proliferierenden Zellen exprimiert. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung über den T-Zellrezeptor wird neben dem Interleukin-2-Rezeptor auch der Transferrinrezeptor verstärkt exprimiert [110]. Experimentell konnte durch Blockade des Transferrinrezeptors mit monoklonalen Antikörpern die Transplantatüberlebenszeit verlängert werden [111, 112].

Die Bewertung der Messergebnisse für CD71 werden durch eine schlechte Trennschärfe und einer daraus resultierenden sehr großen Streuung der Messwerte erschwert bzw. unmöglich gemacht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der zur Detektion des Transferrinrezeptors verwendete Antikörper von einer anderen Firma stammte. Schon bei der Titrierung des Antikörpers in Vorversuchen zeigte sich eine sehr große Schwankungsbreite, die auch durch zusätzliche Arbeitsschritte bei der Probenaufbereitung nicht zu beeinflussen waren.

### **4.5. Zusammenfassende Überlegungen**

Bei allen Versuchsgruppen war bei fast allen Oberflächenmerkmalen ein Abfall am ersten Messpunkt nach der Transplantation zu verzeichnen. Dieses Phänomen kann am ehesten als Auswirkung des Operationstraumas angesehen werden. Die nachfolgende weitere

unterschiedliche Entwicklung, die sich bei den mit CsA und FK-506 behandelten Gruppen auf der einen Seite und der mit MMF behandelten Gruppe auf der anderen Seite zeigte, muss durch den unterschiedlichen Angriffsort der Medikamente erklärt werden. Ob die verminderte Expression von Oberflächenmerkmalen, die sich bei den mit CsA und FK-506 behandelten Tieren zeigte, oder die gleich bleibende Expression bei der MMF-Gruppe eine Auswirkung auf die Entstehung der chronischen Transplantatabstoßung hat, muss durch weiterführende histologische Untersuchungen geklärt werden.

In anbetracht der positiven Ergebnisse die experimentell und klinisch mit monoklonalen Antikörpern gegen die beobachteten Oberflächenmerkmale gemacht wurden, ist eine verminderte Expression als günstiger Faktor anzusehen. Wenngleich dies bei der Vielzahl der für die chronische Transplantatabstoßung verantwortlich gemachten anderen Ursachen, wie humorale Faktoren, Endothelzellverletzungen durch Ischämie, Reperfusion und chirurgische Manipulation, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder anderen hier nicht beobachteten Oberflächen- und Adhäsionsmoleküle nicht der alleinige Grund für die chronische Abstoßung sein kann. Auch die Wirkung von MMF kann nur dadurch erklärt werden, dass andere hier nicht gemessene Faktoren an der chronischen Transplantatabstoßung ursächlich sein müssen.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass es deutliche Veränderungen bei den einzelnen Oberflächenmerkmalen gibt. Es ist durchaus vorstellbar, dass man eines Tages anhand von diesen Veränderungen Aussagen über die Aktivität der chronischen Abstoßung machen kann. Dazu muss weiter untersucht werden ob und welche der untersuchten Merkmale mit der Transplantatvaskulopathie korrelieren. In Zukunft könnten sich dann aus solchen Veränderungen therapeutische Konsequenzen ergeben, deren Erfolg man dann auch wieder auf gleiche Weise kontrollieren könnte. Dies wäre eine für den Patienten sehr schonende und wenig invasive Methode. Welche Gründe ursächlich dafür verantwortlich sind und welche Strategien am wirkungsvollsten bei der Unterdrückung der chronischen Abstoßung sind müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Ein Nachteil bei solchen immunologischen Messungen ist, dass sie von vielen Störfaktoren und teilweise bekannten, teilweise unbekannte Einflussgrößen abhängig sind. Daher sind viele Messungen notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Besonders große Schwankungen konnten bei den Messungen der Rezeptordichte beobachtet. Zudem zeigten sich bei fast allen Oberflächenmerkmalen keine Unterschiede unter den einzelnen Versuchsgruppen, so dass aus diesen Messwerten wahrscheinlich keine zusätzlichen Informationen zu erhalten sind.

Auch die Entwicklung von transgenen Tieren, die als Organspender dienen könnten und vom Empfänger nicht als fremd erkannt werden und somit keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen würden, eine Immunsuppression daher überflüssig machen würden, sind erfolgsversprechende Entwicklungen auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin.

# **5. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, inwieweit sich die Expression bestimmter Oberflächenmerkmale auf Lymphozyten im peripheren Blut nach einer Transplantation im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion verändert. Dazu wurde ein etabliertes Modell zur chronischen Abstoßung mit zwei sich genetisch nur gering differierenden Rattenspezies verwendet. Dabei wurden Herzen von Lewis-Ratten heterotop auf Fisher 344-Ratten transplantiert. Die Untersuchung wurde vergleichend unter der immunsuppressiven Behandlung von Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (FK-506) und Mycophenolate Mofetil (MMF) sowie einer unbehandelten Gruppe durchgeführt. Über den Zeitraum von 60 Tagen wurden die Oberflächenmerkmale mit durchflusszytometrischen Messungen bestimmt.

Bei den Messungen zeigte sich, dass die Entwicklung bei der Expression von Oberflächenmerkmalen bei den mit CsA und FK-506 behandelten Gruppen grundlegend von der mit MMF behandelten Gruppe unterschied. Die mit CsA und FK-506 behandelten Tiere zeigten über die Versuchsdauer eine verminderte oder vermehrte Expression, die mit MMF behandelten Tiere eine nahezu gleich bleibende Expression bei fast allen Oberflächenmerkmalen. Besonders eindrucksvolle Unterschiede zeigten sich bei den Oberflächenmolekülen CD2, CD3, CD4, CD5, CD28 und CD45RA

# **6. Literatur**

- 1 BANARD CN. The Operation. *S. Afr. Med. J.* 41: 1271, 1967.
- 2 KRIETT JM, KAYE MP. The registry of the international society for heart transplantation: seventh official report-1990. *J. Heart Lung Transpl.* 9: 323-330, 1990.
- 3 URETSKY BF, MURALI S, REDDY PS, RABIN B, LEE A, GRIFFITH BP, HARDESTY RL, TRENTO A, BAHNSON HT. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisolone. *Circulation* 76: 827-834, 1987.
- 4 VAN DEN BROEK SAJ, VAN VELDHUISEN DJ, DE GRAEFF PA, CRIJNS HJGM, VAN GILST WH, HILLEGH H, LIE KI. Mode of death in patients with congestive heart failure: comparison between possible candidates for heart transplantation and patients with less advanced disease. *J. Heart Lung Transpl.* 12: 367-371, 1993.
- 5 ADAMS DH, TILNEY NL, COLLINS JJ, KARNOVSKY MJ. Experimental Graft Atherosclerosis. The Lewis-to-F 344 allograft model. *Transplantation* 53: 1115-1119, 1992.
- 6 ONO K, LINDSEY ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thoracic Surgery* 57: 225-229, 1969.
- 7 KISSMEYER NIELSEN F, OLSEN S, PETERSEN VP, FJEDBORG O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2: 662-665, 1966.
- 8 WILLIAMS GM, HUME DM, HUDSON RP, MORRIS PJ, KANO K, MILGROM F. „Hyperacute“ renal-homograft rejection in man. *N. Engl. J. Med.* 279: 611-618, 1968.
- 9 FEOGH ML. Chronic rejection – graft arteriosclerosis. *Transpl. Proc.* 22: 119, 1990.

- 10 RUSSEL ME, FUJITA M, MASEK MA, ROWAN RA, BILLINGHAM ME. Cardiac graft vascular disease. nonselective involvement of large and small vessels. *Transplantation* 56: 762-764, 1993.
- 11 SHARDA B, WASIR HS. Atherosclerosis in transplant heart. *J. Assoc. Physicians India* 44(2): 131-134, 1996.
- 12 ROBIN KA. Cardiac-Allograft Vasculopathy. *N. Engl. J. Med.* 349(9): 829-830, 2003
- 13 LIBBY P, ZHAO DX. Allograft arteriosclerosis and immune-driven angiogenesis. *Circulation* 107(9): 1237-1239, 2003.
- 14 MARTIN S, DYER PA. The case for matching MHC genes in human organ transplantation. *Nat Genet.* 5: 210-213, 1993.
- 15 OPELZ G, WUJCIAK T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. the collaborative transplant study. *N. Engl. J. Med.* 330: 816-819, 1994.
- 16 HERTZ MI, MOHACSI PJ, TAYLOR DO, TRULOCK EP, BOUCEK MM, DENG MC, KECK BM, EDWARDS LB, ROWE AW. The registry of the international society for heart and lung transplantation: introduction to the twentieth annual reports - 2003. *J. Heart Lung Transplant.* 22: 610-615, 2003.
- 17 BILLINGHAM ME. Cardiac transplant arteriosclerosis. *Transpl. Proc.* 19 suppl 5: 19-25, 1987.
- 18 SCHOEN FJ, LIBBY P. Cardiac transplant graft arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 1: 216-223, 1991.
- 19 GAO SZ, SCHROEDER JS, ALDERMAN EL, HUNT SA, VALENTINE HA, WIEDERHOLT V, STINSON EB. Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors. Comparison of cyclosporin and azathioprine regimes. *Circulation* suppl. 3: 100-105, 1989.



- 
- 20 CLAGUE JR, COX ID, MURDAY AJ, CHAROKOPOS N, MADDEN BP. Low clinical utility of routine angiographic surveillance in the detection and management of cardiac allograft vasculopathy in transplant recipients. *Clin. Cardiol.* 24(6): 459-462, 2001.
  - 21 TOPAZ O, COWLEY MJ, MOHANTY PK, VETROVEC GW. Percutaneous revascularization modalities in heart transplant recipients. *Catheter Cardiovasc. Interv.* 46(2): 227-237, 1999.
  - 22 HALLE AA 3<sup>RD</sup>, DISCIASCIO G, MASSIN EK, WILSON RF, JOHNSON MR, SULLIVAN HJ, BOURGE RC, KLEINMAN NS, MILLER LW, AVERSANO TR, ET AL. Coronary angioplasty, artherectomy and bypass surgery in cardiac transplant recipients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26(1): 120-128, 1995.
  - 23 MUSCI M, LOEBE M, WELLNHOFER E, MEYER R, PASIC M, HUMMEL M, BOCKSCH W, GRAUHAN O, WENG Y, HETZER R. Coronary angioplasty, bypass surgery and retransplantation in cardiac transplant patients with graft coronary disease. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 46(5): 268-274, 1998.
  - 24 RADOVANCEVIC B, MCGIFFIN DC, KOBASHIGAWA JA, CINTRON GB, MULLEN GM, PITTS DE, O'DONNELL J, THOMAS C, BOURGE RC, NAFTEL DC. Retransplantation in 7290 primary transplant patients: a 10-year multi-institutional study. *J. Heart Lung Transplant.* 22(8): 862-868, 2003.
  - 25 GALLO P, BAROLDI G, THIENE G, AGOZZINO L, ARBUSTINI E, BARTOLONI G, BOSMAN C, CATANI G, COCCO P. When and why do heart transplant recipients die? A 7 year experience of 1068 cardiac transplants. *Virchows Archiv – A, Pathological Anatomy & Histopathology* 422: 453-458, 2002.

- 26 RÜEGGER A, KUHN M, LICHTI H, LOOSLI HR, ET AL. Cyclosporin A, a peptide metabolite from *Trichoderma polysporum*, with a remarkable immunosuppressive activity. *Helv. Chim. Acta.* 59: 1075-92, 1976.
- 27 ENGLISH J, EVAN A, HOUGHTON DC, BENNET WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat: evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44: 135-141, 1987.
- 28 PALESTINE AG, NUSSENBLATT RB, CHAN CC. Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation. *Am. J. Med.* 77: 652-656, 1984.
- 29 ELLIOT JF, LIN Y, MIZEL SB, BEACKLEY RC, ET AL. Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science* 226: 1439-1441, 1984.
- 30 KRONKE M, LEONARD WJ, DEPPER JM, AYRA SK, ET AL. Cyclosporin A inhibits T cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Sci. USA* 81: 5214-5218, 1984.
- 31 HEROLD KC, LANCKI DW, MOLDWIN RL, FITCH FW. Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J. Immunol.* 136: 1315-1321, 1986.
- 32 HANDSCHUMACHER RE, HARDING MW, RICE J, DRUGGE RH. Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 236: 544-547, 1984.
- 33 CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* 696: 20-30, 1993.
- 34 HAMAWY MM. Molecular actions of calcineurin inhibitors. *Drug News Perspect.* 16(5): 277-282, 2003.
- 35 ZAV'YALOW VP, DENESYUK AI, LUNDELL J, KORPELA T. Some new aspects of molecular mechanisms of cyclosporin A effect on immune response. *APMIS* 103: 401-415, 1995.

- 
- 36 LIN CS, BOLTZ RC, SIEKIERKA JJ, SIGAL NH. FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 33: 269-284, 1991.
- 37 NEYE H. Biochemie der Immunsuppressiva. *Arzneimitteltherapie* 3: 82-90, 1998.
- 38 COHEN P, COHEN PTW. Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264: 21435-21438, 1989.
- 39 COHEN P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 453-508, 1989.
- 40 CONDE M, ANDRADE J, BEDOYA FJ, SANTA MARIA C, ET AL. Inhibitory effect of cyclosporin A and FK506 on nitric production by cultured macrophages. *Immunology* 84: 476-481, 1995.
- 41 LANGREHR JM, MULLER AR, MARKUS PM, SIMONS RL, ET AL. FK506 inhibits nitric oxide production by cells infiltrating sponge matrix allografts. *Transplant Proc.* 23: 3260-3261, 1991.
- 42 ALLISON AC, EUGUI EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immun. Rev.* 136: 5-28, 1993
- 43 ALLISON AC, EUGUI EM. Preferential Suppression of Lymphocyte Proliferation by mycophenolic acid and predicted long-term effects of mycophenolate mofetil in transplantation. *Transpl. Proc.* 26: 3205-3210, 1994.
- 44 LAURENT AF, DUMONT S, POINDRON P, MULLER CD. Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and some substrates. *Exp. Hematol.* 24: 59-67, 1996.

- 
- 45 ALLISON AC, KOWALSKI WJ, MULLER CJ, WATERS RV, EUGUI EM. Mycophenolic acid and Brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transpl. Proc.* 25 suppl 2: 68-70, 1993.
- 46 MORRIS RE, HOYT EG, MURPHY MP, EUGUI EM, ALLISON AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T and B cell purine synthesis. *Transpl. Proc.* 22: 1659-1662, 1990.
- 47 HAO L, LAFFERTY KJ, ALLISON AC, EUGUI EM. RS-61443 allows islet allografting and specific tolerance induction in adult mice. *Transpl. Proc.* 22: 876-879, 1990.
- 48 MORRIS RE, WANG J, BLUM JR, FLAVIN T, MURPHY MP, ALMQUIST SJ, CHU N, TAM YL, KALOOSTIAN M, ALLISON AC, EUGUI EM. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transpl. Proc.* 23 suppl 2: 19-25, 1991.
- 49 PLATZ KP, SOLLINGER HW, HULLETT DA, ECKHOFF DE, EUGUI EM, ALLISON AC. RS-61443: a new potent immunosuppressive agent. *Transplantation* 51: 27-31, 1991.
- 50 MENDEZ R. FK 506 and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients: six-month results of a multicenter, randomized dose ranging trial. FK 506 MMF Dose-ranging Kidney Transplant Study Group. *Transplant. Proc.* 30(4): 1287-1289, 1998.
- 51 SOLLINGER HW, BELZER FO, DEIERHOI MH, DIETHELM AG, GONWA TA, KAUFFMANN RA, KLINTMANN GB, MCDIARMID SV, ROBERTS J, ROSENTHAL JT, TOMLANOVICH SJ. RS-63441 (Mycophenolate Mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann. Surg.* 216: 513-519, 1992.

- 
- 52 WILLIAMS AF, BARCLAY AN, CLARK SJ, PATERSON DJ, WILLIS AC. Similarities in sequences and cellular expression between rat CD 2 and CD 4 antigens. *J. Exp. Med.* 165: 368-380, 1987.
- 53 CLARK SJ, LAW DA, PATERSON DJ, PUKLAVEC M, WILLIAMS AF. Activation of rat T lymphocytes by anti-CD monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 167: 1861-1872, 1988.
- 54 SEVENTER GA; SIMUZI Y, SHAW S. Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 294-303, 1991.
- 55 BACHMANN MF, BARNER M, KOPF M. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J. Exp. Med.* 190: 1383-1392, 1999.
- 56 BAI Y, FU S, HONIG S, WANG Y, QIN L, CHEN D, BROMBERG JS. CD2 is a dominant target for allogenic responses. *Am. J. Transplant.* 2(7): 618-626, 2002.
- 57 QIN L, CHAVIN KD, LIN J, YAGITA H, BROMBERG JS. Anti-CD2 rezeptor and anti-CD2 ligand antibodies synergize to prolong allograft survival. *J. Exp. Med.* 179: 341-346, 1994.
- 58 PUNCH JD, TONO T, QIN L, BISHOP DK, BROMBERG JS. Tolerance induction by anti-CD2 plus anti-CD3 monoclonal antibodies: evidence for an IL-4 requirement. *J. Immunol.* 161: 1156-1162, 1998.
- 59 SIDO B, OTTO G, ZIMMERMANN R, MULLER P, MEUER SC, DENGLER TJ. Modulation of the CD2 receptor and not disruption of the CD2/CD48 interaction is the principal action of CD2-mediated immunosuppression in rat. *Cell Immunol.* 182: 57-67, 1997.
- 60 MATHIEU P, CARRIER M, WHITE M, PELLERIN M, PARRAULT L, PELLETIER G, ROBITAILLE D, PELLETIER LC. Effect of mycophenolate mofetil in heart transplantation. *Can. J. Surg.* 43(3): 202-206, 2000.

- 
- 61 MALISSEN B, MALISSEN M. Functions of TCR and preTCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 394-401, 1996.
- 62 RENDERS L, VALERIUS T. Engineered CD3 antibodies for immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 133(3): 307-309, 2003
- 63 NICOLLS MR, AVERSA GA, PEARCE NW, SPINELLI A, BERGER MF, GURLEY KE, HALL BM. Induktion of long term specific tolerance to allografts in vivo by therapy with a monoclonal antibody to rat CD3. *Transplantation* 55: 459-468, 1993.
- 64 ALEGRE ML, LENSCHOW DJ, BLUESTONE JA. Immunomodulation of transplant rejection using monoclonal antibodies and soluble receptors. *Dig. Dis. Sci.* 40: 58-64, 1995.
- 65 COSIMI AB, BURTON RC, COLVIN RB, ET AL. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 32: 535,1981.
- 66 ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP. A randomized clinical trail of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplant. *N. Engl. J. Med.* 313: 337, 1985.
- 67 MICELI MC, PARNES JR. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin. Immunol.* 3: 133-141, 1991.
- 68 JANEWAY CA. The T-cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 645-675, 1992.
- 69 ROMAGNANI S. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 5: 285-294, 1999.
- 70 HSU LW, GOTO S, LIN YC, LAI CY, TSENG HP, WU CL, LORD R, KITANO S, CHEN SH, CHEN CL. Prolongation of heart allograft survival of rats treated by a Th2 inhibitor. *Transpl. Immunol.* 11(3-4): 385-388, 2003.

- 
- 71 LIN Y, SOARES MP, SATO K, TAKIGAMI K, CSIZMADIA E, ANRATHER J, BACH FH. Rejection of cardiac xenografts by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 162: 1206-1214, 1999.
- 72 SHIRWAN H. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 68: 715-26, 1999.
- 73 BINDER J, LEHMANN M, GRASER E, HANCOCK WW, WTSCHINGER B, ONODERA K, SAYEGH MH, VOLK HD, KUPIEC-WEGLINSKI JW. The effects of nondepleting CD4 targeted therapy in presensitized rat recipients of cardiac allografts. *Transplantation* 61: 804-811, 1996.
- 74 LEHMANN M, GRASER E, RISCH K, HANCOCK WW, MULLER A, KUTTLER B, HAHN HJ, KUPIEC-WEGLINSKI JW, BROCK J, VOLK HD. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation* 64: 1181-1187, 1997.
- 75 NEWELL KA, HE G, HART J, THISTLETHWAITE JR. Treatment with either anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies block alpha beta T cell-mediated rejection of intestinal allografts in mice. *Transplantation* 64: 959-965, 1997.
- 76 MORTON AL, BELL EB, BOLTON EM, MARSHALL HE, ROADKNIGHT C, MCDONAGH M, BRADLEY JA. CD4<sup>+</sup> T cell-mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts: a role for alloantibody. *Eur. J. Immunol.* 23: 2078-2084, 1993.
- 77 MCALISTER MS, BROWN MH, WILLIS AC, RUDD PM, HARVEY DJ, APLIN R, SHOTTON DM, DWEK RA, BARCLAY AN, DRISCOLL PC. Structural analysis of the CD5 antigen-expression, disulphide bond analysis and physical characterisation of CD5-scavenger receptor superfamily domain 1. *Eur. J. Biochem.* 257: 131-141, 1998.

- 
- 78 CALVO J, PADILLA O, PLACES L, VIGORITO E, VILA JM, VILELLA R, MILA J, VIVES J, BOWEN MA, LOZANO F. Relevance of individual CD5 extracellular domains on antibody recognition, glycosylation and co-mitogenetic signalling. *Tissue Antigens* 54: 16-26, 1999.
- 79 HEIDECHE CD, HANCOCK WW, WESTERHOLT S, SEWZIK T, JAKOBS F, ZANTL N, VARZARU A, SIEGLING A, KURRLE R, DEUSCH K, VOLK HD, KUPIEC-WEGLINSKI JW. alpha/beta-T cell receptor-directed therapy in rat allograft recipients. Long-term survival of cardiac allografts after pretreatment with R73 mAb is associated with upregulation of Th2-type cytokines. *Transplantation* 61: 948-956, 1996.
- 80 HEIDECHE CD, HANCOCK WW, JAKOBS F, ZANTL N, KURRLE R, WESTERHOLT S, SEWCZIK T, DEUSCH K, KUPIEC-WEGLINSKI J. alpha/beta-T cell receptor-directed therapy in rat cardiac allograft recipients. Treatment prior to alloantigen exposure prevents sensitization and abrogates accelerated rejection. *Transplantation* 59: 78-84, 1995.
- 81 LEE CJ, YOSHIMURA N, SHISHO O, KITA M, OKA T. Local immunosuppressive therapy with monoclonal anti T-cell antibody on renal allograft survival in rat. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 362-367, 1993.
- 82 BRANDT M, STEINMANN J, STEINHOFF G, HAVERICH A. Treatment with monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1 in rat heart allograft rejection. *Tranpl. Int.* 10(2): 141-144, 1997.
- 83 AKIMOTO H, McDONALD TO, WEYHRICH JT, THOMAS R, ROTHNIE CL, ALLEN MD. Antibody to CD18 reduces neutrophil and T lymphocyte infiltration and vascular cell adhesion molecule-1 expression in cardiac rejection. *Transplantation* 61(11): 1610-1617, 1996.



- 
- 84 WAGNER C, HANSCH GM, STEGMAIER S, DENEFLER B, HUG F, SCHOELS M. The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur. J. Immunol.* 21(4):1173-1180, 2001.
- 85 KAUPPINEN H, SOOTS A, KROGERUS L, LOGINOV R, HOLMA K, AHONEN J, LAUTENSCHLAGER I. Sequential analysis of adhesion molecules and their ligands in rat allografts during the development of chronic rejection. *Transpl. Int.* 13(4): 247-254, 2000.
- 86 HERSKOWITZ A, MAYNE AE, WILLOUGHBY SB, KANTER K, ANSARI AA. Patterns of myocardial cell adhesion molecule expression in human endomyocardial biopsies after cardiac transplantation. Induced ICAM-1 and VCAM-1 related to implantation and rejection. *Am. J. Pathol.* 145(5):1082-1094, 1994.
- 87 MAMPASO F, SANCHEZ-MADRID F, MARCEN R, MOLINA A, PASCUAL J, BRICIO T, MARIN A, ALVAREZ V. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 56(3): 687-691, 1993.
- 88 MOLOSSI S, CLAUSELL N, SETT S, RABINOVITCH M. ICAM-1 and VCAM-1 expression in accelerated arteriopathy and myocardial rejection are influenced differently by cyclosporine A and tumor necrosis factor-alpha blockade. *J. Pathol.* 176(2): 175-182, 1995.
- 89 Thomason AW, Nalesnik MA, Rilo HR, Woo J, Crroll PB, Van Thiel DH. ICAM-1 and E-selectin expression in lesional biopsies of psoriasis patients responding to systemic FK 506 therapy. *Autoimmunity* 15(3): 215-213, 1993.
- 90 VAN BESOUW NM, BALK AH, VAN VLIET M, VAN DER MEIDE PH, MAAT AP, VAN GELDER T, BAAN CC, WEIMAR W. Anti-CD25 therapy impairs donor-specific Th1 and Th2

- cytokine-producing peripheral blood cells after clinical heart transplantation. *Transplant. Proc.* 34(7): 2942-2943, 2003.
- 91 YASUDA K, NEMOTO T, OHASHI Y, SATOMI S, MURATA K, ISHII N, TAKESHITA T, SUGAMURA K. Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of IL-2 receptor. *Int. Immunol.* 10: 561-567, 1998.
- 92 RENGEL M, FERNANDEZ RODRIGUEZ A, GOMEZ HUERTAS E, PLAZA JJ, RUIZ SAN MILLAN JC, OPPENHEIMER F, BUSTAMANTE J, CHECA D, SANCHEZ PLUMED JA, GARZIA PEREZ J, SANZ GUAJARDO A, LLORENTE S, MARTIN GOVANTES JA, GENTIL MA, GOMEZ ULLATE P, SANCHEZ GUISANDE D, PUIG JM, FERNANDEZ C. Immunoprophylaxis with Simulect (basiliximab) in kidney transplantation: results from routine clinical practice at 18 kidney transplant units. *Transplant. Proc.* 35(5): 1691-1693, 2003.
- 93 CINCENTI F, KIRKMAN R, LIGHT S, BUMGARDNER G, PESCOVITZ M, HALLORAN P, NEYLAN J, WILKINSON A, EKKBERG H, GASTON R, BACKMAN L, BURDICK J. Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* 338: 161-165, 1998.
- 94 WALDMANN TA, O'SHEA J. The use of antibodies against the IL-2-receptor in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 507-512, 1998.
- 95 BOULOUGOURIS G, MCLEOD JD, PATEL YI, ELLWOOD CN, WALKER LS, SANSOM DM. IL-2-independent activation and proliferation in human Tcells induced by CD28. *J. Immunol.* 163: 1809-1816, 1999.
- 96 MAEDA K, SATO T, AZUMA M, YAGITA H, OKUMURA K. Characterization of rat CD80 and CD86 by molecular cloning and mAb. *Int. Immunol.* 9: 993-1000, 1997.

- 
- 97 HARADA H, SALAMA AD, SHO M, IZAWA A, SANDNER SE, ITO T, AKIBA H, YAGITA H, SHARPE AH, FREEMAN GJ, SAYEGH MH. The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. *J. Clin. Invest.* 112(2): 234-243, 2003.
- 98 OSSEVOORT MA, RINGERS J, KUHN EM, BOON L, LORRE K, VAN DEN HOUT Y, BUJIN JA, DE BOER M, JONKER M, DE WAELE P. Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CDC28 pathway. *Transplantation* 68: 1010-1018, 1999.
- 99 GUO L, FUJINO M, KIMURA H, FUNESHIMA N, KITAZAWA Y, HARIHARA Y, TEZUKA K, MAKUUCHI M, SUZUKI S, LI XK. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation. *Transpl. Immunol.* 12(1): 41-48, 2003.
- 100 REHMAN A, TU Y, ARIMA T, LINSLEY PS, FLYE MW. Long-term survival of rat to mouse cardiac xenografts with prolonged blockade of CD28/B7 interaction combined with peritransplant T-cell depletion. *Surgery* 120: 205-212, 1996.
- 101 GARCIA-ALONSO AM, MINGUELA A, MURO M, ONTANON J, TORIO A, MARIN L, LOPEZ-SEGURA P, MIRAS M, ALVAREZ-LOPEZ MR. CD28 expression on peripheral blood T lymphocytes after orthotopic liver transplant: upregulation in acute rejection. *Hum. Immunol.* 53: 64-72, 1997.
- 102 MERKENSCHLAGER M, BEVERLY PC. Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursor for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45R0 (UCHL 1). *Int. Immunol.* 1: 450-459, 1989.
- 103 JOHANNISSON A, FESTIN R. Phenotype transition of CD4+ cells from CD45RA to CD45R0 is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 19: 343-352, 1995.

- 
- 104 NOVAK TJ, FARBER D, LEITENBERG D, HONG SC, JOHNSON P, BOTTOMLY K. Isoforms of the transmembrane tyrosin phosphatase CD45 differently affect T cell recognition. *Immunity* 1: 109-119, 1994.
- 105 MICHIE CA, MCLEAN A, ALCOCK C, BEVERLEY PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360: 264-265, 1992.
- 106 MADRI JA, GRAESSER D, HAAS T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem. Cell Biol.* 74(6): 749-757, 1996.
- 107 WEBER C, SPRINGER TA. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J. Immunol.* 161(12): 6825-6834, 1998.
- 108 BRISCOE DM, YEUNG AC, SCHOEN FJ, ALLRED EN, STAVRAKIS G, GANZ P, COTRAN RS, POBER JS. Predictive value of inducible endothelial cell adhesion molecule expression for acute rejection of human cardiac allografts. *Transplantation* 59(2): 204-211, 1995.
- 109 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): 972-980, 1995.
- 110 BAYER AL, BALIGA P, WOODWARD JE. Transferrin receptor in T cell activation and transplantation. *J. Leukoc. Biol.* 64(1): 19-24, 1998.
- 111 WOODWARD JE, BAYER AL, CHAVIN KD, BOLEZA KA, BALIGA P. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody: a novel immunosuppressant. *Transplantation* 65(1): 6-9, 1998.
- 112 BAYER AL, BALIGA P, WOODWARD JE. Differential effects of transferrin receptor blockade on the cellular mechanisms involved in graft rejection. *Transpl. Immunol.* 7(3): 131-139, 1999.



# **7. Anhang**

### **7.1. Abkürzungsverzeichnis**

CD	Cluster of differentiation
CsA	Cyclosporin A
EDTA	Ethylen diamin tetraacetic acid
FACS	Flourescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FK-506	Tacrolimus
FL1	1. Fluoreszenz
FSC	Forward scatter
HLA	human leukocyte antigene
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LCA	leukocyte common antigen
LFA	leucyte function-associated antigen
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolate Mofetil
PBS	Phosphat buffered saline
SSC	Sideward scatter
TCR	T-Zellrezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late activation antigen
Längeneinheiten:	
nm	Nanometer
Masseneinheiten:	
mg	Milligramm

g                    Gramm

Hohlmaße:

µl                   Mikroliter

ml                   Milliliter



## **7.2. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Henning Michael Jahr

Geburtsdatum: 3. Januar 1973

Geburtsort: Osnabrück

Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

08/79 – 07/83 Grundschule Georgsmarienhütte

08/83 – 07/85 Orientierungsstufe Oesede

08/85 – 05/92 Städtisches Gymnasium Nordhorn

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulausbildung:**

10/92 – 1998 Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

Studiengang: Medizin

09/94 Ärztliche Vorprüfung

08/95 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/97 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/98 – 11/99 St. Elisabethen-Krankenhaus Frankfurt; Wahlfach: Urologie

11/99 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

02/01 Arzt im Praktikum

Abteilung für Chirurgie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

08/02 Assistenzarzt

Abteilung für Chirurgie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

Frankfurt am Main, den 14. Januar 2004

### **7.3. Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Fieguth für seine freundliche Beratung und Unterstützung bei der Fertigstellung und Vollendung meiner Dissertation. Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. M. Richter für die Durchführung des praktischen Versuchsteils danken.

Auch möchte ich Frau Dr. med. vet. B. Maybaum für ihre Unterstützung in der Tierversuchsanlage ebenso wie Frau E. Oppermann für die freundliche Unterstützung und Anleitung bei den praktischen Laborarbeiten danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Helfern und Unterstützern Bettina Weimer, Jens Hahner, Jochen Haack, Carsten Pikkemaat, Hannes Drogd und Lars Lehmann für die Durchsicht meiner Arbeit und den moralischen Beistand.

#### **7.4. Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut unter der Berücksichtigung der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation am Rattenmodell. Vergleichende Studie unter der Behandlung mit Cyclosporin A, Mycophenolate mofetil und Tacrolimus  
in der

Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Moritz)

unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Fieguth

mit Unterstützung durch

Herrn 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- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 14. Januar 2004