

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(ärztl. Direktor: Prof. Dr. med. T. Becker)
des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
INDUKTION OPERATIONALER TOLERANZ (WOFIE = WINDOW OF
OPPORTUNITY FOR IMMUNOLOGICAL ENGAGEMENT) UNTER VERWENDUNG
VON TACROLIMUS AM BEISPIEL DER ALLOGENEN HERZTRANSPLANTATION IN
DER RATTE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MALTE-CHRISTIAN THODE
aus Kiel

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Ú:ãëö[] : ëö:ë ^ãëöë:ã••\^

2. Berichterstatter: Ú:ãëö[] : ëö:ë ^ãëöë}ã^•

Tag der mündlichen Prüfung: €€é €€FF

Zum Druck genehmigt, Kiel, den Fĩ €-€€FF

gez. Ú:[] -ëö:ëö:ëö:ëö:ë & |àë

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

- 1.1. Immunsuppression
- 1.2. Spenderspezifische Toleranz
- 1.3. Ansätze zur Toleranzinduktion
- 1.4. Spontane Toleranz und WOFIE

2. Fragestellung **7**

3. Material und Methoden **8**

- 3.1. Versuchstierstämme, Tierhaltung und experimentelle Gruppen
- 3.2. Immunsuppression und Spenderantigene
- 3.3. Operationsverfahren
 - 3.3.1. Technik der heterotopen Herztransplantation (HTx)
- 3.4. Klinische Verlaufskontrolle
- 3.5. Organentnahme und Gewebeaufbereitung
- 3.6. Histologie und Immunhistochemie
 - 3.6.1. Hämatoxylin-Eosin -Färbung
 - 3.6.2. Immunhistochemie
- 3.7. Quantitative Auswertung
- 3.8. Statistik

4. Ergebnisse **14**

- 4.1. Organüberlebenszeiten nach heterotoper Herztransplantation
 - 4.1.1. Organüberlebenszeiten nach syngener und allogener Herztransplantation ohne Immunsuppression
 - 4.1.2. Organüberlebenszeiten allogener Herztransplantate unter Immunsuppression mit Tacrolimus (FK-506) (kontinuierliche Immunsuppression versus WOFIE-Protokoll)
 - 4.1.3. Beeinflussung des „WOFIE-Effektes“ durch eine Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels spenderspezifischer Vollbluttransfusion
 - 4.1.4. Beeinflussung des „WOFIE-Effektes“ durch eine Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels Applikation spenderspezifischer Milzzellen
- 4.2. Pathomorphologie allogener Herztransplantate in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll
- 4.3. Histomorphologie allogener Herztransplantate in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll
- 4.4. Infiltrationsmuster und –Frequenz immunkompetenter Zellen in transplantierten Herzen in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll (Immunhistochemie)
 - 4.4.1. Infiltrationsmuster und –Frequenz natürlicher Killerzellen
 - 4.4.2. Infiltrationsmuster und –Frequenz von Makrophagen
 - 4.4.3. Infiltrationsmuster und –Frequenz von T-Lymphozyten

- 4.4.4. Infiltrationsmuster und –Frequenz von B-Lymphozyten
- 4.4.5. Infiltrationsmuster und –Frequenz proliferierender Zellen

5. <u>Diskussion</u>	30
6. <u>Zusammenfassung</u>	36
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	38
8. <u>Anhang</u>	49
9. <u>Danksagung</u>	55
10. <u>Lebenslauf</u>	56

1. Einleitung

Die Transplantation solider Organe bietet bei verschiedenen Erkrankungen im Terminalstadium häufig die einzige verbleibende Therapieoption. Verbesserte Operations- und Konservierungstechniken und nicht zuletzt der Einsatz neuer Immunsuppressiva konnten das Organ- und Patientenüberleben in den letzten Jahren deutlich verbessern (Hariharan S et al. 2000). Die Entwicklung neuer Immunsuppressiva konnte die Inzidenz akuter Transplantatabstossungen deutlich reduzieren (Takemoto SK et al. 2000). Ihr Einsatz ist jedoch mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden, welche Morbidität und Mortalität transplantierten Patienten negativ beeinflussen. Neben einer erhöhten Inzidenz von Infektionen sowie malignen Erkrankungen sind es insbesondere kardiovaskuläre Nebenwirkungen, welche Morbidität und Mortalität von Transplantatempfängern erhöhen (Kasiske et al. 2000; Juffe et al. 2003). Ziel ist daher die Induktion spenderspezifischer Toleranz, d.h. ein Zustand des Empfängerimmunsystems, in welchem dieses das Transplantat nicht als „fremd“, sondern als „selbst“ erkennt und dadurch der Verzicht auf immunsupprimierende Medikamente ermöglicht wird.

Bei der Transplantation von Organen zwischen genetisch nicht identischen Individuen einer Spezies (Allotransplantation) oder zwischen Individuen verschiedener Spezies (Xenotransplantation) laufen vielfältige immunologische Vorgänge ab, die zur Abstoßung des Spenderorgans führen. Hierbei ist das Unterscheiden zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ abhängig von spezifischen Zelloberflächenmolekülen, vor allem die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodierte MHCs (engl.: major histocompatibility complex, MHC) (Dausset, 1958). Die der Erkennung dann folgenden Abstoßungsreaktion ist ein Zusammenspiel der non-adaptiven (unspezifischen) und adaptiven (spezifischen) Immunantwort. Bereits während des initialen Transplantationstraumas werden die Zellen des non-adaptiven Immunsystems (natürliche Killerzellen und Makrophagen) aktiviert, welche ohne vorherige Erkennungs- und Aktivierungsphasen zur Zerstörung von Zielzellen führen können. Makrophagen setzen Zytokine (IL-1, IL-2, INF- γ , IL-12) frei, welche die non-adaptive Immunantwort weiter stimulieren. Zudem kann die adaptive Immunantwort über Präsentation aufgenommener Spenderantigene durch Makrophagen (Te Velde, 1994) und die Ausschüttung verschiedener Zytokine durch NK-Zellen aktiviert und verstärkt werden (Bolton et. al., 1989; Fändrich, 1996).

Die adaptive Immunantwort zeichnet sich durch eine spezifische Erkennung der genannten MHC-Antigene durch T-Lymphozyten aus, und zwar direkt über Antigenrezeptoren von T-

Lymphozyten oder indirekt durch Präsentation von empfängereigenen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) (Müller-Ruchholz et al., 1984; Roitt et al., 1991, Harlan & Kirk, 1999). Ersteres findet bereits direkt nach Reperfusion des transplantierten Organes statt, wenn spendereigene Lymphozyten aus dem transplantierten Organ in die sekundären lymphatischen Gewebe des Spenders wandern (Larsen et al., 1990), die indirekte Antigenerkennung durch T-Lymphozyten über Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen spielt dagegen bei der chronischen Transplantatabstossung eine wichtige Rolle (Auchincloss et al., 1993).

Aktivierete T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in den komplexen immunologischen Vorgängen der Transplantatabstoßung (Bolton et al., 1989; Bradley & Bolton, 1992). Sie stimulieren und aktivieren einerseits B-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und schütten andererseits ein bestimmtes je nach Art der T-Lymphozyten unterschiedliches Zytokinprofil aus. Man kennt mittlerweile zytotoxische (CD8+)-T-Zellen, (CD4+)-T-Helfer-Zellen und regulierende bzw. Suppressor-T-Lymphozyten, welche eine Subpopulation der (CD4+)-T-Zellen darstellt. Die T-Helferzellen können, unter anderem über Interleukin 2 (IL2), zytotoxische T-Lymphozyten sowie B-Zellen aktivieren. Sie werden in zwei Subtypen unterschieden, die sich durch unterschiedliche Rezeptorexpression auszeichnen und sich gegenseitig hemmen können (Mackay et al., 2000). Die Suppressor-T-Zellen tragen unter anderem Rezeptoren für IL2 (Demirkiran et al., 2005), was auf eine negative Rückkopplung bei Stimulation durch T-Helferzellen schließen lässt. Regulatorischen T-Zellen (Treg, CD4+CD25+) wird zunehmend eine entscheidende Rolle bei der Toleranzinduktion zugeschrieben (Sakaguchi, 2000).

Die Aktivierung von B-Zellen führt über deren Stimulierung und Wandlung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu einer humoralen spenderspezifischen Abstoßungsreaktion (Campbell & Halloran, 1996), welcher eine vergleichsweise geringe Rolle bei der primären Transplantatabstoßung unsensibilisierter Empfänger zugeschrieben wird (Carpenter & Abbas, 1976). Allerdings nehmen die humoralen Effektormechanismen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort. An die Zelloberfläche gebundene Antikörper (spezifische IgG) erhöhen die Zytotoxizität von NK-Zellen, so dass diese allogene Zielzellen verstärkt lysieren (Abbas et. al., 1997).

1.1. Immunsuppression

Nach wie vor ist eine immunsuppressive Therapie die einzige Möglichkeit einer Transplantatabstoßung vorzubeugen. Die Hauptpfeiler der klinisch eingesetzten Immunsuppressiva bilden die seit 40 Jahren verwendeten Kortikosteroide sowie die seit den

80er Jahren verwendeten Calcineurininhibitoren. Von den Letzteren sind insbesondere Ciclosporin A (CsA)- und das seit 1996 klinisch zugelassene Tacrolimus zu nennen.

Desweiteren werden Proliferationshemmer wie z.B. Mycophenolat Mofetil, Azathioprin und Sirolimus sowie lymphozytäre Antikörper wie z.B. ATG (Anti-T-Lymphozyten-Globulin), OKT3 (monoklonaler T-Lymphozyten-Antikörper), anti-CD52-Antikörper (Campath 1H) und IL-2-Rezeptorantagonisten (anti-CD25-Antikörper) eingesetzt (Chatenoud, 1995; Patlolla et al., 2006; Pallardo et al., 2007; Calne, 2009).

Tacrolimus (FK506) wurde 1983 in Japan erstmalig aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliert. Randomisierte Einzel- (Meiser et al., 1998) und Multicenterstudien (Reichart et al., 1998; Taylor, 1999) belegten die Gleichwertigkeit zu CsA nach Herztransplantationen. Es zeichnet sich in klinischen Studien im Vergleich mit CsA durch weniger akute Transplantatabstoßungen aus und führte zu einem verbesserten Transplantat- und Empfänger-Überleben (Fung et al., 1991; Demetris et al., 1992; Jain et al., 1991; Todo et al., 1991).

FK506 hemmt spezifisch die zelluläre Immunantwort durch Komplexbildung mit Calcineurin, welches für Produktion und Freisetzung von Interleukin 2 in T-Lymphozyten notwendig ist.

Die insgesamt in ihrer Schwere von Dosis und Dauer der Therapie abhängigen Nebenwirkungen dieser Immunsuppression beinhalten neben toxischen Effekten die Gefahr von opportunistischen Infektionen, die Induktion von Malignomen sowie Diabetes, Alopezie, Bluthochdruck, Hirsutismus, Gingivahyperplasie und Hyperlipidämie (Taylor, 1999), wobei vor allem die kardiovaskulären Nebenwirkungen die Morbidität und Letalität erhöhen (Boots et al., 2004). Dies ist bei Tacrolimus etwas weniger stark ausgeprägt als bei Ciclosporin A. Bei beiden ist eine vergleichbare Neuro- und Nephrotoxizität beschrieben, letztere trat nicht nur bei nierentransplantierten Patienten auf, sondern betraf auch zuvor renal gesunde Patienten nach Transplantation anderer Organe (Paul LC, 1999).

1.2. Spenderspezifische Toleranz

Spenderspezifische Toleranz bedeutet, das Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion nach allogener Organtransplantation.

1945 wurde von Owen et al. Transplantationstoleranz zwischen heterozygoten monoplazentaren Rinderzwillingen beschrieben. Der gemeinsame plazentare Blutkreislauf führte zur Akzeptanz von Allotransplantaten des jeweils anderen Tieres. Auch bei neugeborenen Tieren kann nach Injektion allogener Zellen spenderspezifische Toleranz induziert werden (Billingham et al., 1953). Aufgrund dieser und anderer Arbeiten wurde die Theorie der klonalen Selektion entwickelt (Burnet, 1962). Im Thymus als zentralem Organ

der Toleranzentstehung findet während der Differenzierung und Reifung der T-Zellen eine Auslese autoaggressiver Zellen durch positive und negative Selektion statt. Zunächst müssen die T-Zellen körpereigene Oberflächenantigene (MHC) erkennen können (positive Selektion), dann aber werden die Lymphozyten zerstört, deren Bindung an das selbst-MHC zu stark ist (negative Selektion, klonale Deletion).

Es existieren aber auch periphere immunmodulatorische Mechanismen, die autoaggressive T-Zellen inaktivieren (Delves, 2000).

1.3. Ansätze zur Toleranzinduktion

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten erfolgreich im Nagetiermodell spenderspezifische Toleranz induzieren bzw. das Organüberleben nach allogener Transplantation verlängern (Rossini, 1999; Chinen et al., 2010). Im Folgenden werden einige Beispiele genannt:

Durch intrathymale Injektion von Alloantigenen nach vorangegangener Elimination alloreaktiver T-Zellen lässt sich Toleranz gegenüber weiteren Organen desselben Spenders induzieren. Dieses Verfahren wurde erstmals 1990 bei der Transplantation von Inselzellen erfolgreich eingesetzt (Posselt et al., 1990). Ein mögliches Problem bei der klinischen Umsetzung ist allerdings die Involution des Thymus im Alter.

Die Applikation CD(4)(+)CD(25)(+) regulatorischer T-Zellen intraperitoneal und intravenös induzierte im Tierexperiment eine spenderspezifische Toleranz gegenüber allogenen Hauttransplantaten (Feng et al., 2004). Regulatorische T-Zellen sind eine Subgruppe der T-Helferzellen, deren Präsenz mit Langzeitüberleben von Transplantaten einhergeht (Sakaguchi, 2000) und deren Elimination zu protrahierter Abstoßung führt (Nishimura et al., 2004).

Durch die orale Applikation von Allopeptiden der MHC-Klasse I und II ließ sich aufgrund negativer Regulationsmechanismen eine spenderspezifische Toleranz induzieren (Sayegh, 1992).

Durch spenderspezifische Bluttransfusionen konnte das Transplantatüberleben verlängert und chronische Abstoßungen verhindert werden (Soulillou et al., 1984; Subbotin et al., 1997). Das zugrunde liegende Wirkprinzip ist bislang jedoch unklar.

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle immunkompetenter Zellen führte zu Langzeitüberleben transplantierte Inselzellen und Herzen bei Nagetieren. Eingesetzt wurden Anti-CD4 (Alters et al., 1991; Shizuru et al., 1987), Anti-CD45 (Auersvald et al., 1997), Anti-LFA (lymphocyte function antigen) und Anti-ICAM (intracellular adhesion molecule-1) (Isobe et al., 1992) sowie Anti-MHC-I

(Faustman & Coe, 1991) und Anti-MHC-II (Priestley et al., 1992; Smith et al., 1997), zudem Anti-CD52 (Campath 1H; Calne, 2009).

Eine Hemmung der für die Aktivierung von T-Zellen notwendigen Co-Stimulation gewisser Rezeptoren (B7-1/2 durch CD28, CD40 durch CD154) durch entsprechende Antikörper (CTLA4-Ig und anti-CD154) führt ebenfalls zu deutlich verlängerten Überlebenszeiten von Transplantaten (Larsen et al., 1996; Harlan et al., 1999).

Ein Konzept, welches die immunsuppressive Therapie nach klinischer Organtransplantation vollständig ersetzt, ist bislang noch nicht gefunden worden.

1.4. Spontane Toleranz und WOFIE

Allogene Lebertransplantate wurden in einigen MHC-disparenten Ratten- und Schweinekombinationen nicht abgestoßen, sondern spontan toleriert (Zimmermann et al., 1989; Calne et al., 1969).

Diese Toleranz war spenderspezifisch und schließt weitere Organe desselben Spenders ein, während Drittstammtransplantate akut abgestoßen werden (Calne, 1969; Kamada, 1981). Auch beim Menschen scheint die Leber eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Antikörper-induzierten Abstoßungen aufzuweisen als andere Organe (Ramos et al., 1995). Für dieses Leberphänomen scheinen eine Reihe von Faktoren eine Rolle zu spielen, darunter von der transplantierten Leber produzierte lösliche MHC-Klasse I Moleküle (Sriwatanawongsa et al., 1995), die Induktion von Mikrochimerismus über transferierte Stammzellen (Taniguchi et al., 1996; Dahmen et al., 1994), lebereigene Suppressionsfaktoren (Kamada et al., 1995), die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Knoop et al., 1995) und Zytokinen -insbesondere Interleukin 2 und Interferon- γ (Bishop et al., 1996)- sowie das Vorhandensein leberansässiger sogenannter „passenger leucocytes“ (Chiba et al., 1997; Lukomsa et al., 1997; Sun et al., 1996).

Basierend auf diesem Leberphänomen stellte R. Calne 1996 seine WOFIE-Hypothese auf (WOFIE = Window of opportunity for immunological engagement; Calne, 1996). Er beobachtete, dass spontan tolerierte allogene Spenderlebern direkt nach der Transplantation histologisch und biochemisch gesicherte Phasen von abstoßungsähnlichen Reaktionen zeigten, von denen sie sich spontan erholten (Sriwantnawongsa et al., 1995). Er folgerte, dass für die Ausbildung von Toleranz eine Interaktion immunkompetenter Zellen von Spender und Empfänger unmittelbar nach Transplantation notwendig ist. Durch den üblichen Gebrauch hochpotenter immunsuppressiver Substanzen wird diese wichtige Interaktion jedoch verhindert. Dahingegen würde ein immunsuppressives Fenster (WOFIE), in der initialen

Phase nach Organtransplantation, die frühe Interaktion zwischen Zellen des Spenders und Empfängers erlauben. In einem MHC-inkompatiblen Schweinemodell konnte Calne zeigen, dass die Unterbrechung einer kurzzeitigen ciclosporinbasierten Immunsuppression zu einer langfristigen Toleranz transplantierte Nieren führte (Calne et al., 1994). Diesen immunologischen Zustand ohne den Bedarf einer dauerhaften Immunsuppression nannte er „operational tolerance“ (Beinahe-Toleranz), da zweizeitig transplantierte Haut desselben Spenders abgestoßen wurde und somit keine klassisch spenderspezifische Toleranz induziert wurde.

Für den transplantierten Patienten bedeutet das WOFIE-Konzept die Möglichkeit einer niedrig dosierten dauerhafter Immunsuppression und somit eine deutliche Reduktion der mit den kardiovaskulären Nebenwirkungen assoziierten Komorbidität (Calne, 1999). Trotz erster erfolgreicher klinischer Anwendungen sind die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen bislang ungeklärt. Dies ist jedoch entscheidend für die sichere Etablierung des WOFIE-Konzeptes in der Klinik. Zudem ist bislang nicht geklärt, ob das WOFIE-Konzept auch unter Verwendung anderer Immunsuppressiva (z.B. Tacrolimus) Beinahe-Toleranz induziert oder ob es auf die Anwendung von Ciclosporin A beschränkt ist.

Die nachfolgende tierexperimentelle Arbeit untersucht zum einen am Beispiel der allogenen Herztransplantation in der Ratte die Gültigkeit des WOFIE-Konzeptes für den Calcineurininhibitor Tacrolimus. Zum anderen sollten die der operationalen Toleranz zugrunde liegenden immunologischen Effektormechanismen näher charakterisiert werden.

2. Fragestellung

Im Rattenmodell der allogenen Herztransplantation sollte die WOFIE (window of opportunity for immunological engagement)-Hypothese unter Verwendung des Immunsuppressivums FK-506 (Tacrolimus) untersucht werden. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Inwieweit beeinflusst eine initiale 72-stündige Unterbrechung einer 5-tägigen Immunsuppression mit FK-506 das Überleben allogenen transplantierten Herzen?
2. Welchen Einfluss hat die zusätzliche Applikation von Spenderantigen (Vollblut oder unprozessierte Milzzellen) innerhalb des immunsuppressiven Fensters auf das Transplantatüberleben und ist der beobachtete Effekt spenderspezifisch?
3. Ist der Zeitpunkt der Spenderantigenapplikation innerhalb des immunsuppressiven Fensters von Bedeutung für die Organüberlebenszeit?
4. Welche histomorphologischen Veränderungen finden sich in den Spenderherzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation?
5. Welcher zeitlichen Kinetik unterliegt die Infiltration allogener Herztransplantate durch immunkompetente Effektorzellen der adaptiven und non-adaptiven Immunantwort in Abhängigkeit vom gewählten immunsuppressiven Protokoll?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstierstämme, Tierhaltung und experimentelle Gruppen

Als Versuchstiere dienten männliche 12-16 Woche alte Ratten der Inzuchtstämme LEW (Lewis, [RT1.l]), DA (Dark Agouti, [RT1.avl]) und CAP [RT1.c] mit einem Gewicht zwischen 180 und 240g. Die Tiere stammten entweder aus der Weiterzucht der im Institut für Immunologie der Universität Kiel gehaltenen Inzuchtstämme oder es wurden entsprechende Tiere vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover erworben. Die Tierhaltung erfolgte unter Einhaltung eines 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22 (+/-2)°C Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 - 65 % in Makrolonkäfigen des Typs III. Sie erhielten Altromin® Pressfutter (Altromin GmbH, Lage) und Wasser *ad libitum*. Alle Untersuchungen erfolgten mit Genehmigung der Tierschutzkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (AZ: X330a-72241.121-7 (50-6/97), X252-72241.121-7 (11-2/99)).

Die in der folgenden Tabelle 3-1 aufgelisteten Tiergruppen wurden untersucht.

Tabelle 3-1 Experimentelle Gruppen

Gruppe	Spender	Empfänger	Immunsuppression	Spenderantigen	Anzahl
I	LEW	LEW	nein	Nein	8
II	DA	LEW	nein	Nein	8
III	DA	LEW	FK-506 T 0-4*	Nein	18
IV	DA	LEW	FK-506 T 0-4	DA-Blut 6h p. Tx ^o	6
V	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7 [§]	Nein	18
VI	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7	DA-Blut 6h p. Tx	18
VII	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7	DA-Blut 24h p. Tx	6
VIII	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7	CAP-Blut 6h p. Tx [^]	6
IX	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7	DA-MZ 6h p. Tx [#]	6
X	DA	LEW	FK-506 T 0, 4-7	DA-MZ 24h p. Tx	18

*: kontinuierliche Applikation von 2 mg/kg KG FK-506, Tag 0-4

§: Applikation von 2 mg/kg KG FK-506 Tag 0, Tag 4-7 (WOFIE)

^o: Applikation von 2 ml Spender (DA)- Blut

[^]: Applikation von 2 ml Drittstamm (CAP)-Blut

[#]: Applikation von 5×10^7 Spender (DA)-Milzzellen, gelöst in 2 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung

Die experimentellen Gruppen I und II dienten als syngene und allogene Kontrolle und erhielten keine weitere Therapie. LEW-Empfänger der allogenen Gruppen III und IV wurden kontinuierlich von Tag 0 bis 4 mit FK-506 in einer Dosierung von 2mg/kg Körpergewicht/Tag immunsupprimiert. Bei den Empfängertieren der Gruppen V bis X erfolgte die Immunsuppression mit FK-506 in gleicher Dosierung nach dem WOFIE-Protokoll. Hier wurde nach initialer Applikation an Tag 0 die Immunsuppression für 72 Stunden unterbrochen und anschließend von Tag 4 bis 7 fortgesetzt. In den Gruppen IV, VI und VII wurde den Empfängern 6 oder 24 Stunden nach Transplantation 2 ml Vollblut des Spenders intravenös appliziert, in der Gruppe VIII wurde nach 6 Stunden Drittstammblut von CAP-Ratten appliziert. Die intravenöse Gabe unprozessierter Spendermilzzellen (DA) erfolgte in den Empfängern der Gruppen IX und X.

3.2 Immunsuppression und Spenderantigene

Tacrolimus (FK-506) wurde in pulverisierter Form (Astellas, München) erworben und für den in vivo-Gebrauch in 250µl Ethanol (100%), 50µl Tween 80 (Polyoxethylensorbitan, Sigma, Deisenhofen) und 2200µl Kochsalzlösung gelöst und anschließend bei 4°C gelagert. Den Ratten wurde diese Lösung intramuskulär in einer Dosierung von 2mg/kg KG pro Tag entsprechend dem Versuchsprotokoll verabreicht.

Die Spenderantigene wurden in Form von Vollblut oder Milzzellen appliziert. Vollblut wurde vom Spenderstamm in einer heparinisierten Spritze gewonnen und in einer Menge von 2ml unmittelbar nach der Entnahme dem Empfänger über die Schwanzvene verabreicht. Für die Gewinnung der Milzellsuspension wurden die Milzen von DA-Spendern zunächst durch ein Sieb passiert. Nach Ermittlung der Zellzahl erfolgte die Lösung der Zellen in einer Konzentration von 5×10^7 in 2ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung (isotonische Kochsalzlösung, steril und pyrogenfrei, Braun, Melsungen) und die anschließende Verabreichung über die Schwanzvene des Empfängers entsprechend den unter 3.1 beschriebenen Protokollen.

3.3. Operationsverfahren

Alle an den Tieren vorgenommenen Eingriffe erfolgten in Ätherinhalationsnarkose (Äther, Carl Benz und Sohn, Frankfurt/Main) unter aseptischen, nicht sterilen Bedingungen. Für die Transplantation wurde ein mikrochirurgisches Instrumentarium verwandt. Die Gefäß-anastomosen wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Mentor III®, Fa. Codmann, Hamburg) fertiggestellt.

3.3.1 Technik der heterotopen Herztransplantation (HTx)

Die heterotope HTx wurde modifiziert nach der von Ono und Lindsey beschriebenen Methode durchgeführt (Ono und Lindsey, 1986).

Für die Transplantatentnahme wurde das Abdomen des Spenders median eröffnet. Es folgte nun die intravenöse Injektion von 0,1ml (250 IE) Heparin-Natrium (Liquemin®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) verdünnt in 0,5ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Braun, Melsungen) in die vorher freigelegte Vena cava inferior. Anschließend wurden das Zwerchfell rippennah und die Rippen im Bereich der mittleren Axillarlinie durchtrennt. Nach Ligatur beider Venae cavae superiores und der Vena cava inferior mit 5.0 Seide (NC-Seide, Braun-Dexon, Melsungen) erfolgten die bogennahe Durchtrennung der Aorta ascendens und die herzferne Absetzung der Arteria pulmonalis. Die Vv. pulmonales wurden nun ebenfalls ligiert. Nach Durchtrennung der Venen distal der Ligaturen konnte das Organ aus dem Thorax entfernt werden. Das sich noch kontrahierende Herz wurde bis zum Einbau (Dauer der kalten Ischämie im Mittel $5 (\pm 2)$ Minuten) bei 4°C in 0,9 %-iger NaCl-Lösung aufbewahrt.

Vor dem Einbau des Herztransplantates wurde das Abdomen des Empfängers rasiert und desinfiziert. Es erfolgte nun die Eröffnung des Abdomens mittels medianer Laparotomie. Aorta und Vena cava inferior wurden infrarenal freigelegt und über eine Segmentstrecke von 10 - 15mm ausgeklemmt. Die Gefäßvorderwand wurde nun längs inzidiert und die Gefäßlumina vorsichtig mit 0.9%-iger NaCl-Lösung von Blutresten gereinigt. Es erfolgte nun die Anastomosierung von Spender- und Empfängeraorta End-zu-Seit mit einem nicht-resorbierbaren monofilen Faden der Stärke 8-0 (Ethilon, Fa. Ethicon, Hamburg) in fortlaufender Nahttechnik. In analoger Weise wurde die Anastomose zwischen A. pulmonalis und Vena cava inferior fertig gestellt. Nach Öffnung der Gefäßklemmen setzte in der Regel nach 30 - 60 Sekunden die rhythmische Kontraktion der Vorhöfe, gefolgt von Kammeraktionen ein. Das Abdomen wurde nun zweireihig verschlossen.

Die durchschnittliche Operationszeit betrug $35 (\pm 10)$, die warme Ischämiezeit $15 (\pm 5)$ Minuten. Alle Tiere, die innerhalb der ersten 48 Stunden verstarben, wurden in der Ergebniswertung nicht berücksichtigt.

3.4. Klinische Verlaufskontrolle

Bei allen Versuchstieren erfolgten täglich Dokumentation des Gewichtes und Beurteilung des äußeren Aspektes. Das Herztransplantat wurde ebenfalls täglich durch die Bauchdecke palpirt und bezüglich Größe, Konsistenz und Rhythmus überprüft.

3.5. Organentnahme und Gewebeaufbereitung

Jeweils 4 Tiere pro Gruppe wurden elektiv an Tag 3, 7 und 14 nach Transplantation unter Ätherinhalationsnarkose getötet. Nach medianer Laparotomie erfolgten zunächst die makroskopische Beurteilung und Dokumentation von Spender- und Empfängerherz sowie von Milz, Leber, Thymus und Haut. Nach Entnahme der genannten Organe wurden aus jedem von diesem vier Gewebeblöcke entnommen, wobei jeweils zwei Blöcke zur Paraffineinbettung in 4%-igem Formalin fixiert und zwei Blöcke zwecks immunhistochemischer Aufarbeitung in Einbettmedium (Embedding[®], Reichert-Jung, Nußloch) platziert und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren wurden. Zur Kryokonservierung wurden die Gewebeblöcke in verschlossenen Röhrchen bei -80⁰C gelagert.

3.6. Histologie und Immunhistochemie

3.6.1. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Zur Beurteilung histomorphologischer Organveränderungen wurden nach Paraffineinbettung serielle Schnitte angefertigt, welche standardmäßig nach H.E. (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt wurden.

3.6.2. Immunhistochemie (APAAP-Methode)

Von den Gewebeblöcken der zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation entnommenen Spenderherzen wurden serielle Kryostatschnitte von 4 (\pm 1) μ m Dicke angefertigt, auf einen Objektträger gebracht und dann nach zweistündiger Trocknung für 10 Minuten in Aceton fixiert. Zur Identifikation der verschiedenen Zellpopulationen, welche im Verlauf das Transplantat infiltrieren, erfolgten immunhistochemische Färbungen nach der von Cordell et al. beschriebenen APAAP-Methode (alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase) (Cordell et al., 1984). In der folgenden Tabelle 3-6-2 sind die spezifischen monoklonalen Antikörper (Ak) aufgeführt, welche zur Markierung charakteristischer Zelloberflächenantigene der adaptiven (T- und B- Lymphozyten) und der non-adaptiven Immunantwort (NK-Zellen und Makrophagen) eingesetzt wurden.

Tabelle 3-6-2 *Verwendete monoklonale Antikörper (Immunhistochemie)*

monoklonale Antikörper	Spezies/ Isotyp	Verdünnung in Rattenserum	Spezifität	Herkunft
KiM2R	Maus-IgG1	1:2000	pan-Makrophagen	Wacker H.H.*
KiS3R	Maus-IgG1	unverdünnt	proliferierende Zellen	Kreipe,H •
KiB1R	Maus-IgG1	1:2000	B-Zellen	Wacker H.H.*
KiT1R	Maus-IgG2a	1:1000	pan-T-Zellen	Wacker H.H.*
anti-NKR- P1	Maus-IgG1	1:1000	natürliche Killerzellen	Chambers W.H. [∇]

*: Diese monoklonalen Antikörper wurden im Institut für Hämatopathologie des UK-SH, Campus Kiel von Prof. Dr. H.H. Wacker aus klonierten Maushybridomazelllinien gewonnen und spezifiziert (Wacker, 1994). Alle 3 mAk markieren Zelloberflächenantigene der entsprechenden Zellpopulation.

•: Der mAk KiSR3 wurde im Institut für Hämatopathologie des UK-SH, Campus Kiel von Dr. med. Kreipe aus klonierten Maushybridomazelllinien gewonnen und spezifiziert (Kreipe et al., 1993). Er markiert die Zellkerne proliferierender Zellen.

[∇]: W.H. Chambers Pittsburgh, PA (Chambers et al., 1989)

Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und umfasste die folgenden Inkubationsschritte, zwischen welchen die Präparate jeweils dreimal in Tris-NaCl-Pufferlösung (Zusammensetzung: 10mM Tris und 143mM NaCl/l in zweifach destilliertem H₂O, pH-titriert auf 7,4 mit 1 N HCl (Sigma, Deisenhofen)) gewaschen wurden:

1. Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen primären Maus-anti-Ratte Antikörper für 30 Minuten.
2. Inkubation mit dem sekundären (Brücken-) IgG Kaninchen-anti-Maus Antikörper (P 259, Dianova, Hamburg) in der Verdünnung 1:25 (in Rattennormalserum) für 30 Minuten.
3. Inkubation mit dem Tertiär- (APAAP-) Komplex für 30 Minuten. Dieser besteht aus einem Konjugat aus einem monoklonalem Antikörper gegen alkalische Phosphatase und dem aus Kalbsdarm gewonnenen Tertiärseserum (Sigma, Deisenhofen), welches sich aus 1,4g alkalischer Phosphatase und 200µl Aszites, 1:1000 in PBS (Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalzlösung) verdünnt, zusammensetzt.

Anschließend erfolgte die Färbung der markierten Zellen über 10 Minuten durch die Hydrolyse des Naphtol AS-BI Phosphates in seine Phosphat- und Phenolkomponenten durch die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes. Die Phenole wiederum koppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe (Boenisch, 1989). Die dazu verwendete Entwicklerlösung enthielt als Substrat 0,1%

(Gew./Vol.) Naphtol AS-BI Phosphat (Sigma, Deisenhofen) und 0,1% (Gew./Vol.) „Fast-Red-Salz“ (Fast Red TR, Sigma, Deisenhofen) als Kopplungssalz, welche beide in 0,5ml N,N-Dimethylformamid, DMF, (Merck, Darmstadt) gelöst wurden. Das Kopplungssalz wurde zusätzlich in Propandiolpuffer verdünnt: 5,25g Propandiol-2-amino-3-methylpropan-1,3-diol, 50ml 0,1 N HCL, aqua bidest. ad 1000ml, pH 9,4. Zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase wurde dem Inkubationsmedium 0,0025% (Gew./Vol.) Levamisol (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Abschließend erfolgten für 3 Minuten die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt) und nach Spülung der Schnitte unter Leitungswasser die Einbettung in Kaiser's Glycerin-Gelatine (Merck, Darmstadt). Bei den mitgeführten Negativkontrollen wurde anstelle des Primärantikörpers Pufferlösung eingesetzt.

3.7. Quantitative Auswertung

Die mikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte mit dem Lichtmikroskop der Firma Zeiss (Göttingen). Die histologischen Befunde wurden mittels einer an das Mikroskop der Firma Leitz (Wetzlar) angeschlossenen Digitalkamera Prog/Res/3008 (Fa. Kontron Elektronik) dokumentiert.

Die histologische Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines Rasterokulars (0,25mm Kantenlänge, entspricht $0,0625\text{mm}^2$ Gesamtfläche) bei 400-facher Gesamtvergrößerung durch Zählung der spezifisch positiv gefärbten Zellen im fokussierten Gesichtsfeld. Markierte Zellen, die sich auf dem Rand des Rasters befanden, wurden als positiv gewertet. Nach Mittelung wurde die Zahl spezifisch gefärbter Zellen als Zellzahl/mm² angegeben.

3.8. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad-Prism, Version 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwandt. Die Transplantatüberlebenszeiten wurden nach Kaplan-Meier analysiert und mit dem generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox verglichen. Die statistische Beurteilung der immunhistochemischen Ergebnisse beschränkte sich aufgrund der kleinen Fallzahlen auf eine deskriptive statistische Auswertung ($M \pm SD$).

4. Ergebnisse

4.1. Organüberlebenszeiten nach heterotoper Herztransplantation

4.1.1. Organüberlebenszeiten nach syngener und allogener Herztransplantation ohne Immunsuppression

In dem verwendeten Rattenmodell wurden allogene Herzen von DA-Spendern ohne weitere immunsuppressive Therapie des Empfängers im Mittel nach $6.5 \pm 0,55$ Tagen akut abgestoßen. Als Abstoßungszeitpunkt wurde das komplette Sistieren des palperten Herzschlages definiert. Syngen transplantierte Tiere wurden elektiv nach 150 Tagen getötet (Abbildung 4.1).

4.1.2. Organüberlebenszeiten allogener Herztransplantate unter Immunsuppression mit Tacrolimus (FK-506) (kontinuierliche Immunsuppression versus WOFIE-Protokoll)

Die Organüberlebenszeiten transplantiertter Herzen mit Tacrolimus immunsupprimierter Empfänger sind in Abbildung 4.1. graphisch dargestellt. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 8.1. des Anhangs zu entnehmen.

Abbildung 4.1. Überleben allogener Herztransplantate in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll (kontinuierliche Immunsuppression versus WOFIE)

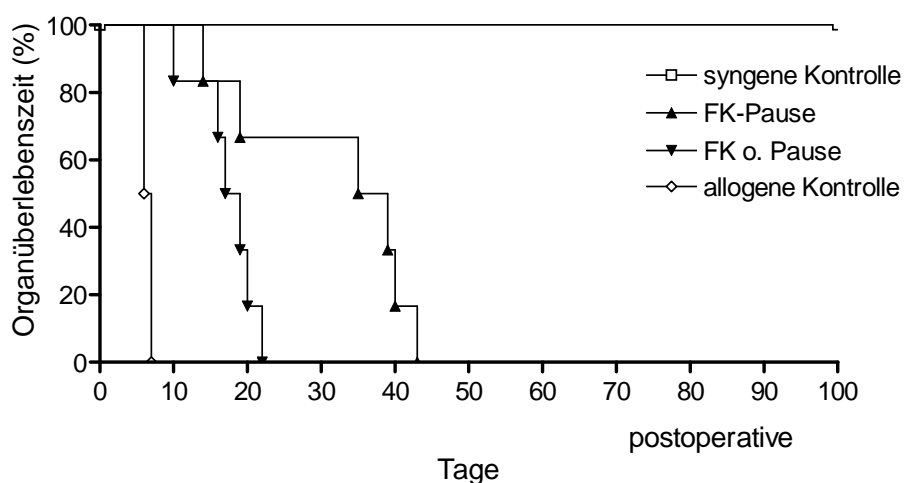


Abb. 4.1. zeigt die nach Kaplan-Meier analysierten Organüberlebensraten allogener DA-Herztransplantate in unbehandelten und mit FK-506 (2 mg FK/kg KGxTag) immunsupprimierten LEW-Empfängern (n=6/Gruppe). Die Abstoßung allogener DA-Herzen in nicht-immunsupprimierten LEW-Empfängern erfolgte nach $6.5 \pm 0,55$ Tagen. Eine kontinuierliche Immunsuppression mit FK-506 bis zum 4. postoperativen Tag verlängerte die Transplantatüberlebenszeit auf 17.33 ± 4.2 Tage. Wurde die Immunsuppression initial für 72 Stunden unterbrochen (WOFIE), so verzögerte sich die Transplantatabstoßung vergleichsweise signifikant bis 31.67 ± 12.13 Tage nach Transplantation ($p < 0.05$ versus kontinuierlich immunsupprimierte Gruppe).

Wurden die Empfänger kontinuierlich von Tag 0 bis 4 mit FK-506 (2mg/kgKG/Tag) immunsupprimiert, verlängerte sich das Transplantatüberleben auf 17.33 ± 4.2 Tage. Eine 72-stündige Unterbrechung der Immunsuppression nach initialer Gabe an Tag 0, entsprechend dem WOFIE-Protokoll, führte zu einer vergleichsweise signifikanten Verzögerung der Abstoßung allogener Transplantate bis im Mittel fast 32 Tage nach Transplantation (mittlere Organüberlebenszeit 31.67 ± 12.13 Tage in der WOFIE- versus 17.33 ± 4.2 Tage in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe, $p < 0.05$, signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox).

4.1.3. Beeinflussung des WOFIE-Effektes durch eine Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels spenderspezifischer Vollbluttransfusion

Zur Verstärkung der Transplantatimmunogenität erfolgte innerhalb des 72-stündigen immunsuppressiven Fensters die zusätzliche Applikation von Spenderantigen in Form von 2ml Spender (DA)-Vollblut entweder zu einem frühen (6 Stunden) oder späteren (24 Stunden) Zeitpunkt nach Transplantation. Zur Überprüfung der Spenderspezifität dienten LEW-Empfänger allogener DA-Herztransplantate, welche nach dem WOFIE-Protokoll behandelt wurden und 6 Stunden nach Transplantation Drittstamm (CAP)-Vollblut erhielten. Eine weitere Vergleichsgruppe (DA-Herztransplantat → LEW-Empfänger) wurde kontinuierlich mit Tacrolimus immunsupprimiert und erhielt nach 6 Stunden eine spenderspezifische DA-Vollbluttransfusion. Die entsprechenden Organüberlebenszeiten allogener Herztransplantate sind in Abbildung 4.2 A + B graphisch dargestellt und der Anhangstabelle 8.1. zu entnehmen. Erfolgte die Gabe von spenderspezifischem Vollblut zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb des immunsuppressiven Fensters, nämlich 6 Stunden nach allogener Herztransplantation, so wurde die Organüberlebenszeit transplantierten Herzen im Vergleich zur WOFIE-Gruppe, welche keine weitere spenderspezifische Antigenapplikation erhalten hatte, signifikant verlängert (Transplantatüberleben 44.83 ± 10.1 Tage in der WOFIE-Gruppe mit zusätzlicher spenderspezifischer Vollbluttransfusion 6 Stunden post transplantationem versus 31.67 ± 12.13 Tage in der WOFIE-Gruppe ohne zusätzliche Spenderantigenapplikation, $p < 0,03$, signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox). Eine spenderspezifische Vollbluttransfusion innerhalb des immunsuppressiven Fensters nach 24 Stunden hingegen beeinflusste das Transplantatüberleben nicht. Die Organüberlebenszeit allogener Herztransplantate betrug in dieser Gruppe 29.83 ± 14.27 Tage ($p > 0.05$ versus nicht-transfundierte WOFIE-Gruppe, nicht signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox).

Abbildung 4.2. Beeinflussung des *WOFIE*-Effektes durch Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels Vollbluttransfusion

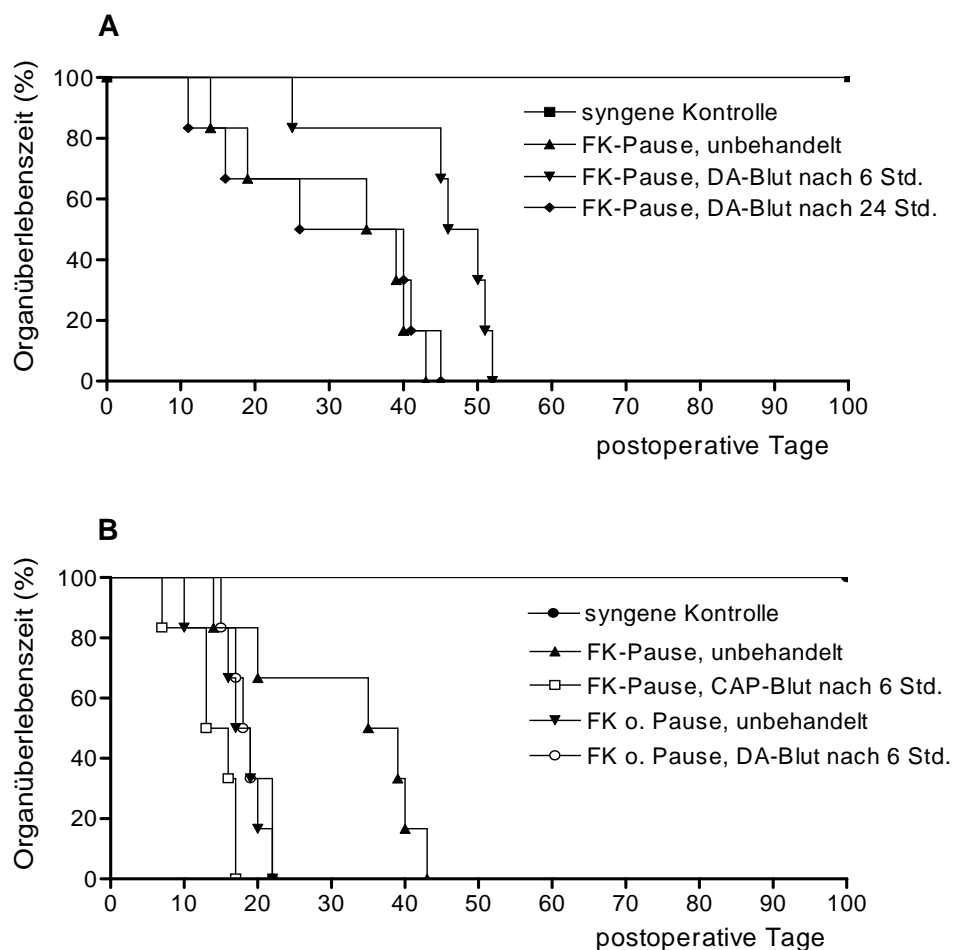


Abb. 4.2A zeigt die nach Kaplan-Meier analysierten und nach dem generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox verglichenen Transplantatüberlebenszeiten nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimierten LEW-Empfänger allogener DA-Herztransplantate, welche innerhalb des immunsuppressiven Fensters eine zusätzliche spenderspezifische Vollbluttransfusion erhalten haben ($n = 6$). Während eine frühe (6 Stunden nach Transplantation) Applikation von DA-Spenderblut innerhalb des immunsuppressiven Fensters zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens führte, blieb dieser Effekt aus, wenn die Transfusion zu einem späteren Zeitpunkt (24 Stunden nach Transplantation) erfolgte. Dieser Effekt war spenderspezifisch und fand sich nicht, wenn die Transfusion mit Drittstamm (CAP)-Blut durchgeführt wurde (**Abb.4.2B**). Eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit nach früher spenderspezifischer Bluttransfusion blieb ebenfalls aus, wenn die Immunsuppression in der initialen Phase nach Transplantation nicht unterbrochen wurde (**Abb. 4.2B**).

Zudem konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass der beobachtete Effekt spenderspezifisch war, da eine frühe (6 Stunden nach Transplantation) Applikation von Drittstamm (CAP)-Blut bei LEW-Empfängern, deren Immunsuppression in der initialen Phase für 72 Stunden unterbrochen wurde, zu einer beschleunigten Transplantatabstoßung nach 13.8 ± 3.8 Tagen

fürte ($p < 0.01$ versus nicht-transfundierte WOFIE-Gruppe, signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox). Der tolerogene Effekt einer frühen spenderspezifischen Bluttransfusion blieb aus, wenn die immunsuppressive Therapie in der initialen Phase nach Transplantation nicht unterbrochen wurde. Unter kontinuierlicher Immunsuppression konnte eine Applikation von DA-Vollblut das Transplantatüberleben nicht verlängern (Organüberlebenszeit allogener Herztransplantate 18.8 ± 2.8 Tage in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe mit spenderspezifischer Bluttransfusion nach 6 Stunden versus 17.33 ± 4.12 Tage in der nicht-transfundierte kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe, $p > 0.05$, nicht signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox).

4.1.4. Beeinflussung des WOFIE-Effektes durch eine Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels Applikation spenderspezifischer Milzzellen

Neben der Transfusion von Vollblut innerhalb des immunsuppressiven Fensters, wurde Spenderantigen mittels unprozessierten DA-Milzzellen (5×10^7 Zellen) zugeführt, welche dem LEW-Empfänger in entsprechender Weise entweder früh (6 Stunden) oder zu einem späteren (24 Stunden) Zeitpunkt nach allogenen Herztransplantation intravenös appliziert wurden (vergleiche Abbildung 4.3. und Anhangstabelle 8.1.).

Entgegen dem beobachteten tolerogenen Effekt einer frühen spenderspezifischen Vollbluttransfusion bei nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimierten LEW-Empfängern konnte durch die frühe Gabe von DA-Milzzellen das Überleben allogenen Herzen nicht verlängert werden. Es fand sich hier im Vergleich zur nicht-behandelten WOFIE-Gruppe eine Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit, welche jedoch kein Signifikanzniveau erreichte. Spenderherzen wurden nach Applikation von DA-Milzzellen 6 Stunden nach Transplantation im Mittel nach 27.2 ± 4.7 Tagen abgestoßen ($p > 0.05$ versus WOFIE-Gruppe ohne zusätzliche Spenderantigenapplikation, nicht signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox). Erfolgte die intravenöse Applikation unprozessierter spenderspezifischer Milzzellen zu einem späteren (24 Stunden) Zeitpunkt nach Transplantation, fand sich sogar eine signifikant beschleunigte Transplantatabstoßung nach 14.67 ± 2.25 Tagen ($p < 0.01$ versus WOFIE-Gruppe ohne zusätzliche Spenderantigenapplikation, signifikant im generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox).

Abbildung 4.3. *Beeinflussung des WOFIE-Effektes durch Verstärkung der Transplantatimmunogenität mittels Applikation spenderspezifischer Milzzellen*

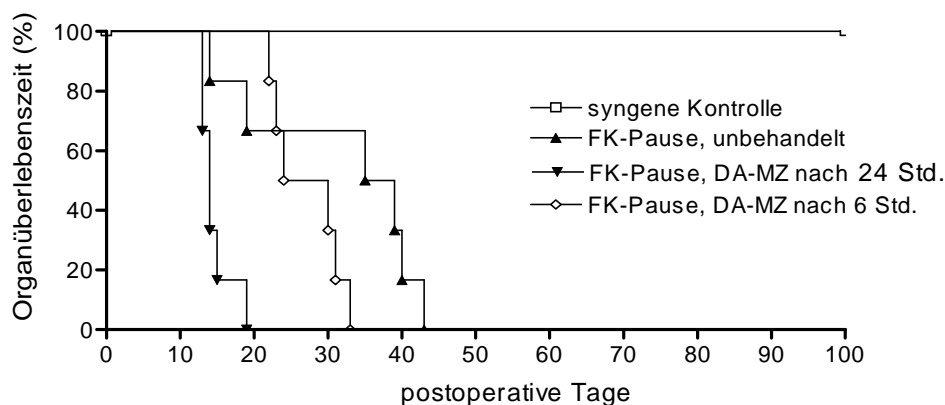


Abb. 4.3. zeigt die nach Kaplan-Meier analysierten und nach dem generalisierten log-rank-Test nach Mantel-Cox verglichenen Transplantatüberlebenszeiten nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimierten LEW-Empfänger allogener DA-Herztransplantate, welche innerhalb des immunsuppressiven Fensters zusätzlich unprozessierte DA-Milzzellen erhalten haben ($n = 6$). Entgegen dem beobachteten tolerogenen Effekt einer frühen spenderspezifischen Vollbluttransfusion konnte durch die Gabe von DA-Milzzellen 6 Stunden nach Transplantation das Überleben allogener Herzen nicht verlängert werden. Es fand sich hier im Vergleich zur nicht-behandelten WOFIE-Gruppe eine Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit, welche jedoch kein Signifikanzniveau erreichte. Erfolgte die intravenöse Applikation unprozessierter spenderspezifischer Milzzellen zu einem späteren (24 Stunden) Zeitpunkt nach Transplantation, fand sich sogar eine signifikant beschleunigte Transplantatabstoßung nach 14.67 ± 2.25 Tagen.

4.2. Pathomorphologie allogener Herztransplantate in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll

Drei, 7 und 14 Tage nach Transplantation wurden jeweils 4 Tiere/Gruppe elektiv getötet und die Herztransplantate der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung zugeführt. Die makroskopische Begutachtung syngener Transplantate zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten ein morphologisch unauffälliges, regelrecht kontrahierendes Spenderherz, welches aufgrund der fehlenden Kreislauffunktion jedoch im Vergleich zum empfängereigenen Herz leicht Größenreduziert erschien. Allogene Herztransplantate nicht immunsupprimierter LEW-Empfänger waren 3 Tage nach Transplantation makroskopisch unauffällig. Zum Zeitpunkt der Abstoßung, 7 Tage nach Transplantation, fanden sich ausgeprägte Adhäsionen mit dem Dünndarm des Empfängers. Spenderherzen dieser Gruppen waren deutlich vergrößert und verhärtet und zeigten keine Herzmuskelkontraktion. Unter kontinuierlicher Immunsuppression des Empfängers mit Tacrolimus bis zum vierten postoperativen Tag fanden sich 3 und 7 Tage nach Transplantation morphologisch unauffällige Transplantate mit regelmäßiger Kammeraktion. Nach 14 Tagen waren 3 von 4 DA-Spenderherzen dieser Gruppe bereits vergrößert, zeigten Herzrhythmusstörungen und

wiesen partiell fibrotische Veränderungen auf. Bei einem Tier fand sich lediglich eine Vergrößerung und Verhärtung des Herzmuskels bei noch regelrechter Kammeraktion. Unter Anwendung des WOFIE-Protokolls mit Pausierung der immunsuppressiven Therapie nach initialer Gabe für 72 Stunden zeigte sich bis einschließlich 14 Tage post transplantationem bei allen Tieren ein intaktes, gut durchblutetes Transplantat ohne Störungen des Herzrhythmus. Lediglich ein Tier dieser Gruppe zeigte nach 14 Tagen eine Herzmuskelvergrößerung ohne Nachweis von Fibrosen. Der pathomorphologische Transplantatbefund der WOFIE-Gruppe, welche nach 6 Stunden eine Transfusion mit spenderspezifischem Vollblut erhalten hatte, war zu allen Untersuchungszeitpunkten unauffällig. Nach Applikation unprozessierter spenderspezifischer Milzzellen 24 Stunden nach Transplantation innerhalb des immunsuppressiven Fensters, fand sich bei 2 Tieren bereits nach 7 Tagen eine deutliche Vergrößerung des Spenderherzens mit partiellen Fibrosen. Nach 14 Tagen waren 3 von 4 Spenderherzen bereits vollständig abgestoßen und fibrosiert.

4.3. Histomorphologie allogener Herztransplantate in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll

Zur Erfassung histomorphologischer Veränderungen erfolgten H.E.-Färbungen der entnommenen Spenderherzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. In der Bildtafel 1 im Anhang sind die erhobenen Befunde für die kontinuierlich mit Tacrolimus immunsupprimierte Gruppe sowie die WOFIE-Gruppe, deren Immunsuppression initial für 72 Stunden unterbrochen wurde fotografisch dargestellt (Anhang, Bildtafel 8.1.).

In der syngen Gruppe fanden sich ab dem 3. Tag nach Transplantation isoliert subendokardial Infiltrate mononukleärer Zellen. Dabei waren sowohl Myokard als auch der Perivasalraum zu jedem Untersuchungszeitpunkt unauffällig und intakt. Dahingegen zeigten allogene Spenderherzen nicht-immunsupprimierter Tiere bereits nach drei Tagen diffuse Zellinfiltrate im Myokard bei noch intakter Myokardstruktur. Subendokardial waren zu diesem Zeitpunkt bereits Nekrosen der kleinen Gefäße und disseminierte Areale mit Myozytolysen nachweisbar. Nach 7 Tagen war die Myokardstruktur zerstört und zu großen Teilen bereits bindegewebig umgebaut. Unter kontinuierlicher Immunsuppression mit Tacrolimus zeigte sich am 3. Tag nach Transplantation eine intakte Myokardstruktur. Erste Anzeichen einer akuten Abstoßungsreaktion manifestierten sich hier nach 7 Tagen. Mononukleäre Zellinfiltrate mit begleitenden Myozytolysen waren um die Gefäße konzentriert im gesamten Myokard nachweisbar und zeigten bis zum 14. Tag nach Transplantation eine deutliche Größenprogredienz. Zu diesem Zeitpunkt waren im Myokard

erste Gefäßnekrosen mit Erythrozytenextravasaten nachweisbar. Nach Einhaltung einer initialen immunsuppressiven Pause von 72 Stunden hingegen waren bis zum 14. postoperativen Tag keine Anzeichen einer akuten Transplantatabstoßung sichtbar. Auffallend war in dieser Gruppe jedoch eine frühe, ab dem 3. Tag nach Transplantation konstant nachweisbare Infiltration mononukleärer Zellen, welche sich gleichmäßig zwischen intakten Myozyten verteilten. Erhielten LEW-Empfänger, welche nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimiert wurden, eine spenderspezifische Bluttransfusion 6 Stunden nach Transplantation, so fand sich zu allen definierten Untersuchungszeitpunkten ein der nicht-transfundierten WOFIE-Gruppe vergleichbares histomorphologisches Bild allogener Spenderherzen. Dahingegen zeigte sich nach Applikation unprozessierter DA-Spendermilzzellen 24 Stunden nach Transplantation auch histomorphologisch eine akzelerierte Transplantatabstoßung mit ausgedehnten Myozytolysen und Gefäßnekrosen am 7. postoperativen Tag. Vierzehn Tage nach Transplantation war die Myokardstruktur in dieser Gruppe bereits in Bereichen bindegewebig umgebaut.

4.4. Infiltrationsmuster und -frequenz immunkompetenter Zellen in transplantierten Herzen in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll (Immunhistochemie)

Zur Untersuchung von Infiltrationsmuster und -frequenz immunkompetenter Effektorzellen der adaptiven (T- und B-Zellen) und non-adaptiven (Makrophagen und natürliche Killerzellen) Immunantwort in den nach 3, 7 und 14 Tage entnommenen Spenderherzen der verschiedenen Behandlungsgruppen erfolgten APAAP-Färbungen unter Verwendung der in Tabelle 3.2 aufgelisteten monoklonalen Antikörper. Von jeweils 4 Gewebeschnitten pro Gruppe wurden die Mittelwerte spezifisch markierter Zellen/mm² mit dazugehöriger Standardabweichung ermittelt (vergleiche auch Anhangstabelle 8.2.). In den Anhangsbildtafeln 2-4 sind die wichtigsten immunhistochemischen Befunde photographisch dokumentiert.

4.4.1. Infiltrationsmuster und -frequenz natürlicher Killerzellen

Die Infiltration natürlicher Killerzellen im Myokard allogener Herztransplantate (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper NKR-P1) während der ersten 14 Tage nach Transplantation ist in Abbildung 4.4. graphisch dargestellt (vergleiche auch Anhangstabelle 8.2. und –Bildtafel 8.3.). Nach syngener Herztransplantation waren zu allen Untersuchungszeitpunkten nur vereinzelt natürliche Killerzellen im Spendermyokard zu finden (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 17.8 ± 6.2 , 12.4 ± 4.1 und 14.2 ± 7.8 3, 7 und 14

Tage nach syngener Herztransplantation). Dahingegen zeigten allogene Spenderherzen nicht immunsupprimierter LEW-Empfänger nach 3 Tagen ausgedehnte Infiltrate dieser Zellpopulation (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 323.7 ± 30.4 Tag 3 nach allogener Herztransplantation). Zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung, 7 Tage nach Herztransplantation, wo histologisch bereits größere Anteile des Myokards bindegewebig umgebaut waren, war die Anzahl infiltrierender natürlicher Killerzellen deutlich rückläufig (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 201.1 ± 52.1 Tag 7 nach allogener Herztransplantation). Unter kontinuierlicher 5-tägiger Immunsuppression mit Tacrolimus fanden sich nach 3 Tagen im Vergleich zur allogenen, nicht immunsupprimierten Gruppe deutlich weniger natürliche Killerzellen im Transplantat (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 91.2 ± 17.4 unter kontinuierlicher Immunsuppression versus 323.7 ± 30.4 in der allogenen unbehandelten Gruppe 3 Tage nach Transplantation). Bis zum 14. postoperativen Tag nahm die Anzahl dieser Zellpopulation in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe in Korrelation mit den histologisch nachweisbaren Schädigungen im Myokard stetig zu (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 169.6 ± 33.1 und 257.6 ± 27.8 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 7 und 14 Tage nach Transplantation).

Abbildung 4.4. *Infiltration natürlicher Killer Zellen ins Myokard transplantiertes Herzen*

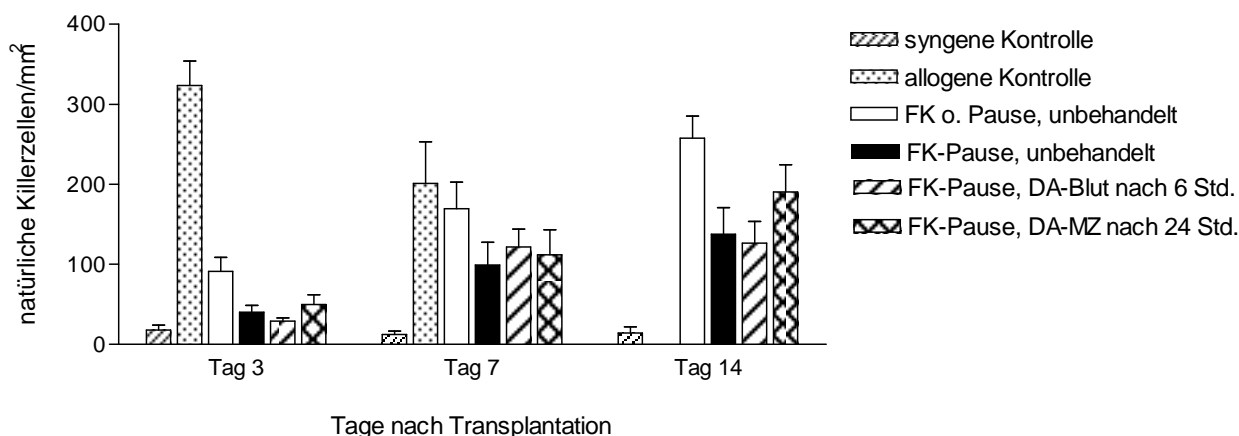


Abb. 4.4. zeigt die Frequenz infiltrierender natürlicher Killerzellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper NKR-P1) im Myokard transplantiertes Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Angegeben sind die Mittelwerte (± SD) positiv markierter Zellen/ mm² von je 4 Tieren/ Gruppe. Unter kontinuierlicher Immunsuppression mit Tacrolimus fanden sich nach 3 Tagen im Vergleich zur unbehandelten allogenen Gruppe deutlich weniger natürliche Killerzellen im Transplantat. Bis zum 14. postoperativen Tag nahm die Anzahl dieser Zellpopulation in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe in Korrelation mit den histologisch nachweisbaren Schädigungen im Myokard stetig zu. Wurde die Immunsuppression initial unterbrochen, so waren im Vergleich zu kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 3 Tage nach Transplantation deutlich weniger natürliche Killerzellen im Myokard der allogenen Transplantate nachweisbar. Sieben Tage und 14 Tage nach Transplantation war jeweils eine Zunahme infiltrierender NK-Zellen im Spendermyokard dieser Gruppe zu verzeichnen, diese lag aber zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich unter der für die kontinuierlich immunsupprimierte Gruppe ermittelten Zellzahl. Eine zusätzliche Transfusion mit spenderspezifischem Vollblut 6 Stunden nach Transplantation hatte im Vergleich zur nicht transfundierten WOFIE-Gruppe keinen Einfluss auf das

Infiltrationsverhalten natürlicher Killerzellen im Transplantat. Interessanterweise beeinflusste auch die Gabe unprozessierter DA-Milzzellen innerhalb des immunsuppressiven Fensters die Infiltrationskinetik dieser Zellpopulation im Transplantat zunächst nicht. Erst nach 14 Tagen war hier im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe eine Zunahme infiltrierender Zellen zu verzeichnen.

Wurde die Immunsuppression entsprechend dem WOFIE-Protokoll initial für 72 Stunden unterbrochen, so waren im Vergleich zu kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 3 Tage nach Transplantation deutlich weniger natürliche Killerzellen im Myokard der allogenen Transplantate nachweisbar (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 40.0 ± 8.6 in der WOFIE-Gruppe versus 91.2 ± 17.4 unter kontinuierlicher Immunsuppression 3 Tage nach Transplantation). Sieben Tage und 14 Tage nach Transplantation war zwar jeweils eine weitere Zunahme infiltrierender NK-Zellen im Spendermyokard dieser Gruppe zu verzeichnen (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 99.2 ± 28.3 und 137.6 ± 33.2 in der WOFIE-Gruppe 7 und 14 Tage nach Transplantation), diese lag aber zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich unter der für die kontinuierlich immunsupprimierte Gruppe ermittelten Zellzahl. Eine zusätzliche Transfusion mit spenderspezifischem Vollblut 6 Stunden nach Transplantation innerhalb des immunsuppressiven Fensters, welche klinisch zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens führte, hatte im Vergleich zur nicht transfunden WOFIE-Gruppe keinen Einfluss auf das Infiltrationsverhalten natürlicher Killerzellen im Transplantat (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 28.8 ± 4.2, 121.6 ± 22.5 und 126.4 ± 27.3 in der WOFIE-Gruppe mit zusätzlicher DA-Bluttransfusion nach 6 Stunden Tag 3, 7 und 14 nach Transplantation). Interessanterweise beeinflusste auch die Gabe unprozessierter DA-Milzzellen innerhalb des immunsuppressiven Fensters, 24 Stunden nach Transplantation, welche klinisch mit einer akzelerierten Transplantatabstoßung verbunden war, die Infiltrationskinetik dieser Zellpopulation im Transplantat zunächst nicht. Die für diese Gruppe ermittelten Zahlen 3 und 7 Tage nach Transplantation lagen bei 49.6 ± 12.2 und 112.0 ± 31.2 natürliche Killerzellen/mm² und unterschieden sich nicht von den für die unbehandelte Gruppe bestimmten Werten. Erst nach 14 Tagen war hier eine im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe deutliche Zunahme infiltrierender Zellen zu verzeichnen (Anzahl natürlicher Killerzellen/mm² 190.4 ± 34.1 in der mit DA-Milzzellen behandelten WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation).

4.4.2. Infiltrationsmuster und öFrequenz von Makrophagen

Abbildung 4.5. zeigt die mittels APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiM2R ermittelten Zellzahlen infiltrierender Makrophagen und Monozyten 3, 7 und 14 Tage nach allogener Herztransplantation in den verschiedenen Behandlungsgruppen (vergleiche

Anhangstabelle 8.1. und Bildtafel 8.2.). Nach syngener Transplantation ließ sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine gleichbleibende Population gewebeständiger Makrophagen zwischen den Myozyten nachweisen (Anzahl KiM2R⁺ Zellen/mm² 161.8 ± 13.4, 157.3 ± 32.8 und 163.4 ± 33.2 Tag 3, 7 und 14 nach syngener Herztransplantation). Dahingegen fanden sich in den allogenen Spenderherzen nicht-immunsupprimierter LEW-Empfänger entsprechend zum klinischen Abstoßungsprozess bereits nach 3 Tagen insbesondere perivascular größere Gruppierungen dieser Zellpopulation (Anzahl Makrophagen 480.0 ± 53.6 Tag 3 nach allogener Herztransplantation). Nach 7 Tagen war eine weitere Zunahme KiM2R⁺ Zellen zu verzeichnen und in den abgestoßenen Transplantaten zeigten sich ausgedehnte Zellinfiltrate (Anzahl KiM2R⁺ Zellen 655.6 ± 96.7 Tag 7 nach allogener Herztransplantation).

Abbildung 4.5 *Infiltration von Makrophagen in das Myokard transplantiertes Herzen*

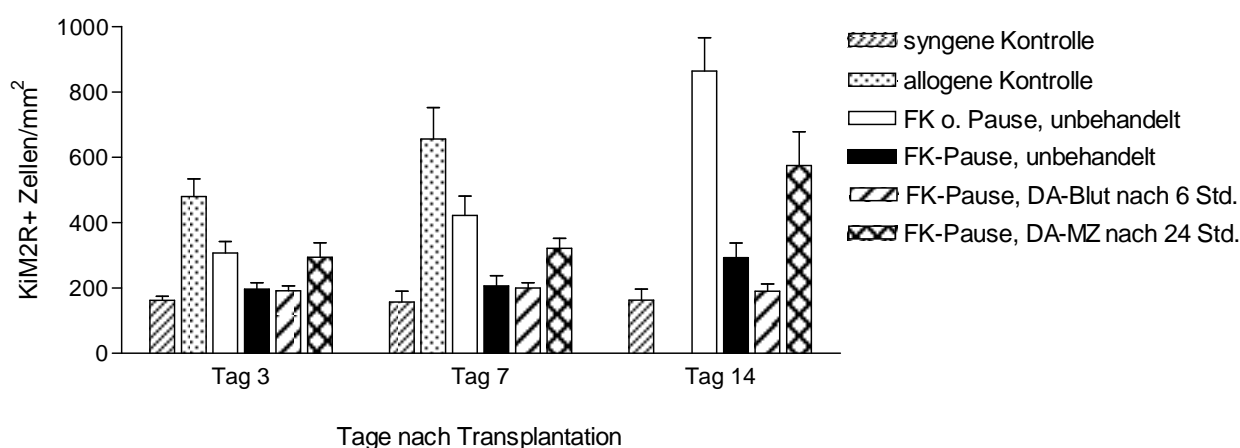


Abb. 4.5. zeigt die Frequenz infiltrierender Makrophagen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiM2R) im Myokard transplantiertes Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SD) positiv markierter Zellen/ mm² von je 4 Tieren/ Gruppe. Unter kontinuierlicher immunsuppressiver Therapie konnte während des Beobachtungszeitraumes ein Anstieg der Makrophagenpopulation beobachtet werden, welcher jedoch deutlich niedriger war als in der allogenen Kontroll-Gruppe. Nach 14 Tagen zeigten sich hier ausgedehnte Infiltrate. Dahingegen war die Anzahl KiM2R⁺ Zellen in den Herztransplantaten der WOFIE-Gruppe im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe bis zum 7. Tag nach Transplantation nur diskret höher. Erst 14 Tage nach Transplantation war ein geringfügiger Anstieg infiltrierender Makrophagen in den Spenderorganen dieser Untersuchungsgruppe zu verzeichnen. Dabei waren KiM2R⁺ Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraumes vornehmlich einzeln zwischen intakten Myozyten angeordnet. Die zusätzliche Gabe von Spenderblut innerhalb des immunsuppressiven Fensters beeinflusste bis zum 7. postoperativen Tag weder die Frequenz noch die Verteilung der Makrophagenpopulation. Der Anstieg KiM2R⁺ Zellen, welcher in der WOFIE-Gruppe ohne zusätzliche Spenderantigenapplikation nachzuweisen war, blieb hier jedoch aus. Entsprechend der klinisch beobachteten protrahierten Transplantatabstoßung nach Applikation von DA-Milzzellen fand sich hier bereits nach 3 Tagen eine verstärkte Infiltration von Makrophagen im Myokard des Spenderorgans.

Auch unter kontinuierlicher immunsuppressiver Therapie konnte während des Beobachtungszeitraumes ein Anstieg der Makrophagenpopulation beobachtet werden, welcher jedoch erwartungsgemäß deutlich niedriger war als in der allogenen nicht-immunsupprimierten Gruppe (Anzahl Makrophagen/mm² 307.2 ± 35.2 und 422.4 ± 59.1 in

der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe versus 480.0 ± 53.6 und 655.6 ± 96.7 in der allogenen nicht-immunsupprimierten Gruppe 3 und 7 Tage nach Transplantation). Dabei waren die Makrophagen am 3. postoperativen Tag vornehmlich zwischen den Myozyten zu finden und gruppierten sich nach 7 Tagen auch um die intramyokardialen Gefäße. Nach 14 Tagen zeigten sich ausgedehnte Infiltrate der untersuchten Zellpopulation in zerstörten Arealen des Myokards (Anzahl Makrophagen/mm² 864.0 ± 101.4 Tag 14 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe). Dahingegen war die Anzahl von Makrophagen in den Herztransplantaten der WOFIE-Gruppe im Vergleich zur syngenon Kontrollgruppe bis zum 7. Tag nach Transplantation nur diskret höher (Anzahl Makrophagen/mm² in der 196.8 ± 19.2 und 206.4 ± 39.2 in der WOFIE-Gruppe versus 161.8 ± 13.4 und 157.3 ± 32.8 in der syngenon Kontrollgruppe 3 und 7 Tage nach Transplantation). Erst 14 Tage nach Transplantation war ein geringfügiger Anstieg infiltrierender Makrophagen in den Spenderorganen dieser Untersuchungsgruppe zu verzeichnen (Anzahl Makrophagen/mm² 292.9 ± 44.2 in der WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation). Dabei waren KiM2R⁺ Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraumes vornehmlich einzeln zwischen intakten Myozyten angeordnet. Die zusätzliche Gabe von Spenderblut innerhalb des immunsuppressiven Fensters beeinflusste bis zum 7. postoperativen Tag weder die Frequenz noch die Verteilung der Makrophagenpopulation, welche dem Infiltrationsmuster der WOFIE-Gruppe entsprach (Anzahl Makrophagen/mm² 192.0 ± 14.1 und 200.0 ± 16.4 in der WOFIE-Gruppe mit DA-Bluttransfusion 3 und 7 Tage nach Transplantation). Der Anstieg KiM2R⁺ Zellen, welcher in der WOFIE-Gruppe ohne zusätzliche Spenderantigenapplikation innerhalb des immunsuppressiven Fensters nachzuweisen war, blieb nach spenderspezifischer Vollbluttransfusion jedoch aus (Anzahl Makrophagen/mm² 190.4 ± 21.8 in der WOFIE-Gruppe mit DA-Bluttransfusion 14 Tage nach Transplantation). Entsprechend der klinisch beobachteten protrahierten Transplantatabstoßung nach Applikation von DA-Milzzellen 24 Stunden nach Transplantation, fand sich hier im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe bereits nach 3 Tagen eine verstärkte Infiltration von Makrophagen im Myokard des Spenderorgans (Anzahl Makrophagen/mm² 294.4 ± 43.6 und 321.6 ± 29.8 in der WOFIE-Gruppe mit Applikation von DA-Milzzellen 3 und 7 Tage nach Transplantation). Nach 14 Tagen waren in dieser Gruppe bereits ausgedehnte Infiltrate nachweisbar (Anzahl Makrophagen/mm² 574.4 ± 103.7 in der WOFIE-Gruppe mit Applikation von DA-Milzzellen 14 Tage nach Transplantation).

4.4.3. Infiltrationsmuster und öFrequenz von T-Lymphozyten

Das Infiltrationsverhalten $CD3^+$ T-Zellen im Myokard allogener Spenderherzen der verschiedenen Untersuchungsgruppen wurde in der APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiT1R bestimmt (Abbildung 4.6.). Die 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation ermittelten Zellzahlen/mm² sind der Tabelle 8.2. des Anhangs zu entnehmen.

Abbildung 4.6. *Infiltration von T-Lymphozyten ins Myokard transplantiertes Herzen*

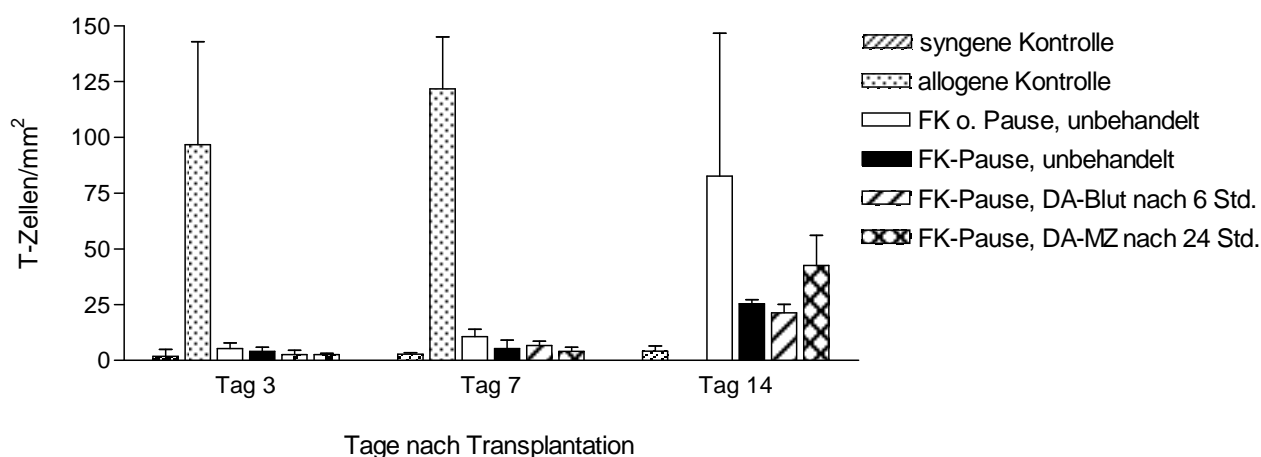


Abb. 4.6 zeigt die Frequenz infiltrierender T-Zellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiT1R) im Myokard transplantiertes Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SD) positiv markierter Zellen/ mm² von je 4 Tieren/ Gruppe. Unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll und einer zusätzlichen Spenderantigenapplikation waren KiT1R⁺ Zellen bis zum 7. Tag nach Transplantation nur vereinzelt nachweisbar. Vierzehn Tage nach Transplantation zeigte die kontinuierlich immunsupprimierte Gruppe einen deutlichen Anstieg infiltrierender T-Zellen in myozytolytischen Bereichen des Transplantates. Auch in Transplantaten von LEW-Empfängern, die nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimiert wurden, ließen sich vermehrt T-Zellen im Perivasalraum nachweisen. Eine zusätzliche spenderspezifische Bluttransfusion hatte keinen Einfluss auf das Infiltrationsverhalten der pan-T-Zellpopulation, während nach Applikation spenderspezifischer Milzzellen zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise mehr T-Zellen nachweisbar waren.

Syngen transplantierte Tiere zeigten innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation nur einzelne T-Lymphozyten im subendokardialen Bereich des Spenderorgans (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 1.8 ± 3.1 , 2.7 ± 0.8 und 4.1 ± 2.3 Tag 3, 7 und 14 nach syngener Herztransplantation). In der allogenen, unbehandelten Gruppe hingegen waren nach 3 Tagen bereits deutlich vermehrt T-Lymphozyten im Myokard des Herztransplantates nachweisbar (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 96.7 ± 46.3 in der allogenen Gruppe 3 Tage nach Transplantation). Zum Abstoßungszeitpunkt, Tag 7 nach Transplantation, fand sich ein weiterer Anstieg dieser Zellpopulation (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 121.8 ± 23.3 Tag 7 nach allogener Herztransplantation). Unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll und einer zusätzlichen Spenderantigenapplikation waren KiT1R⁺ Zellen bis zum 7. Tag nach Transplantation nur vereinzelt nachweisbar. Vierzehn Tage nach Transplantation zeigte die Gruppe, welche kontinuierlich mit Tacrolimus immunsupprimiert wurde, jedoch einen

deutlichen Anstieg infiltrierender T-Zellen in myozytolytischen Bereichen des Spenderorgans (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 142.4 ± 29.2 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 14 Tage nach Transplantation). Auch in Transplantaten von LEW-Empfängern, die nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimiert wurden, ließen sich vermehrt T-Zellen nachweisen, welche jedoch vornehmlich perivascular zu finden waren (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 24.0 ± 11.2 in der WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation). Eine zusätzliche spenderspezifische Bluttransfusion 6 Stunden nach Transplantation hatte im Vergleich zur nicht transfundierten WOFIE-Gruppe keinen Einfluss auf das Infiltrationsverhalten der pan-T-Zellpopulation (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 20.8 ± 5.4 in der mit DA-Blut transfundierten WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation). Dahingegen lag der Anteil infiltrierender T-Zellen nach Applikation spenderspezifischer Milzzellen zu diesem Zeitpunkt höher als in der nicht-transfundierten WOFIE-Gruppe (Anzahl KiT1R⁺ Zellen/mm² 42.6 ± 13.9 in der WOFIE-Gruppe mit Applikation spenderspezifischer Milzzellen 14 Tage nach Transplantation).

4.4.4. Infiltrationsmuster und öFrequenz von B-Lymphozyten

Der Nachweis infiltrierender B-Zellen im Myokard transplantierten Herzen nach 3, 7 und 14 Tagen erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper KiB1R (siehe Abbildung 4.7. und Anhangstabelle 8.1.). Während infiltrierende B-Zellen wie T-Zellen in syngenen Transplantaten zu allen Untersuchungszeitpunkten nur vereinzelt zu finden waren (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/mm² 4.4 ± 3.1, 5.3 ± 0.3 und 3.3 ± 3.7 Tag 3, 7 und 14 nach syngener Transplantation), waren in allogenen Transplantaten nach 3 Tagen größere Infiltrate dieser Zellpopulation nachweisbar (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/mm² 119.0 ± 10.5 Tag 3 nach allogener Transplantation), welche zum Abstoßungszeitpunkt leicht rückläufig waren (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/mm² 82.1 ± 34.2 Tag 7 nach allogener Transplantation). Kontinuierlich immunsupprimierte Tiere zeigten in ihren Transplantaten ab dem 7. postoperativen Tag eine stetig zunehmende Anzahl KiB1R⁺ Zellen (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/mm² 28.8 ± 5.4 und 107.2 ± 17.6 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 7 und 14 Tage nach Transplantation). Dahingegen waren B-Zellinfiltrate in allogenen Transplantaten von LEW-Empfängern, deren Immunsuppression in der initialen Phase unterbrochen wurde, erstmals 14 Tage nach Transplantation zu finden (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/mm² 62.4 ± 18.4 in der WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation).

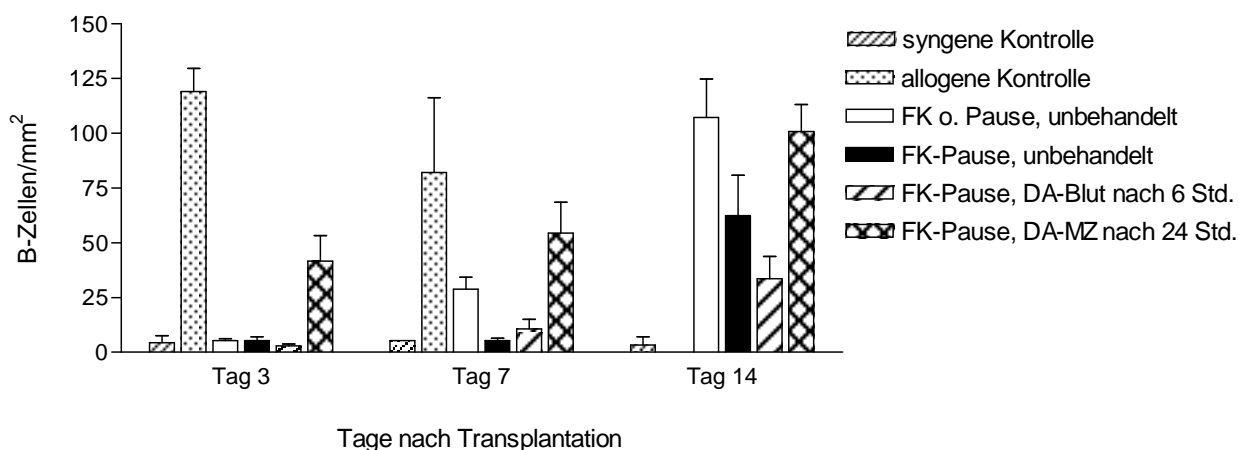
Abbildung 4.7. *Infiltration von B-Lymphozyten ins Myokard transplantiertes Herzen*

Abb. 4.7. zeigt die Frequenz infiltrierender B-Zellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiB1R) im Myokard transplantiertes Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SD) positiv markierter Zellen/ mm^2 von je 4 Tieren/ Gruppe. Kontinuierlich immunsupprimierte Tiere zeigten in ihren Transplantaten ab dem 7. postoperativen Tag eine stetig zunehmende Anzahl KiB1R⁺ Zellen, während B-Zellinfiltrate in Spenderherzen der WOFIE-Gruppe erstmals 14 Tage nach Transplantation zu finden waren. Wurde innerhalb des immunsuppressiven Fensters eine spenderspezifische Vollbluttransfusion durchgeführt, so war die Anzahl infiltrierender B-Zellen im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe deutlich vermindert, wohingegen die zusätzliche Applikation unprozessierter Spendermilzzellen mit einer frühen und im Verlauf deutlich zunehmenden Infiltration KiB1R⁺ Zellen verbunden war.

Wurde innerhalb des immunsuppressiven Fensters eine spenderspezifische Vollbluttransfusion durchgeführt, so war die Anzahl infiltrierender B-Zellen im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe deutlich vermindert (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/ mm^2 33.6 ± 10.1 in der WOFIE-Gruppe mit zusätzlicher DA-Bluttransfusion 14 Tage nach Transplantation). Interessanterweise war die zusätzliche Applikation unprozessierter Spendermilzzellen mit einer frühen und im Verlauf deutlich zunehmenden Infiltration KiB1R⁺ Zellen verbunden (Anzahl KiB1R⁺ Zellen/ mm^2 41.6 ± 11.7 , 54.4 ± 14.1 und 100.8 ± 12.3 in der WOFIE-Gruppe mit zusätzlicher Applikation von DA-Milzzellen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation).

4.4.5. Infiltrationsmuster und öFrequenz proliferierender Zellen

Proliferierende Zellen wurden in den Spenderherzen aller Untersuchungsgruppen zu den festgelegten Zeitpunkten mit dem monoklonalen Antikörper KiS3R immunhistochemisch nachgewiesen (siehe auch Bildtafel 8.4. des Anhangs). Die ermittelten Zellzahlen sind in Abbildung 4.8. graphisch dargestellt und der Anhangstabelle 8.2. zu entnehmen. Infiltrierende proliferierende Zellen konnten in syngenen Transplantaten zu allen Untersuchungszeitpunkten

nur vereinzelt detektiert werden (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 39.1 ± 17.3, 21.3 ± 5.3 und 19.2 ± 8.9 Tag 3, 7 und 14 nach syngener Transplantation). In den Transplantaten der allogenen Gruppe hingegen war nach 3 Tagen eine hohe Anzahl proliferierender Zellen in den Infiltraten nachweisbar (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 495.3 ± 87.2 Tag 3 nach allogener Transplantation). Sieben Tage nach Transplantation war der Anteil KiS3R⁺ Zellen in dieser Gruppe in Korrelation mit dem bindegewebigen Umbau des Spenderorgans erneut abnehmend (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 317.2 ± 75.6 Tag 7 nach allogener Transplantation).

Abbildung 4.8. *Infiltration proliferierender Zellen ins Myokard transplantiertes Herzen*

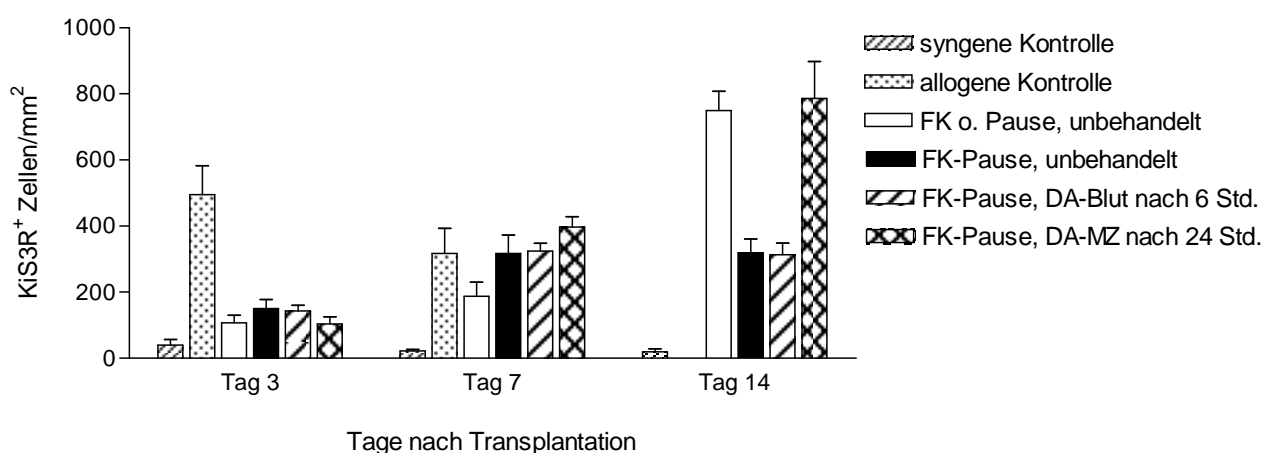


Abb. 4.8. zeigt die Frequenz infiltrierender proliferierender Zellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiS3R) im Myokard transplantiertes Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Angegeben sind die Mittelwerte (± SD) positiv markierter Zellen/ mm² von je 4 Tieren/ Gruppe. In allen mit Tacrolimus immunsupprimierten Gruppen war der Anteil KiS3R⁺ Zellen unabhängig vom Protokoll 3 Tage nach Transplantation im Vergleich zu syngenen Gruppe erhöht. Sieben Tage nach Transplantation war der Anteil proliferierender Zellen in den Transplantaten aller 3 nach dem WOFIE-Protokoll behandelten Untersuchungsgruppen weiter ansteigend und lag deutlich über der Anzahl KiS3R⁺ Zellen in den Spenderorganen kontinuierlich immunsupprimierter Tiere. Während sich proliferierende Zellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt in der nicht-transfundierte WOFIE- wie auch in der mit spenderspezifischen Vollblut behandelten Gruppe zwischen intakten Myozyten fanden, waren KiS3R⁺ Zellen in den Transplantaten von LEW, Empfängern, die zusätzlich DA-Milzzellen erhalten hatten, gruppiert perivasal und im Myokard nachweisbar. Nach 14 Tagen hatte der Anteil proliferierender Zellen in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe sowie in der mit spenderspezifischen Milzzellen behandelten WOFIE-Gruppe deutlich zugenommen, während sich Infiltrationsmuster und -Frequenz KiS3R⁺ Zellen in der nicht-transfundierte als auch der mit spenderspezifischem Vollblut behandelten WOFIE-Gruppe nicht veränderten.

In allen mit Tacrolimus immunsupprimierten Gruppen war der Anteil infiltrierender proliferierender Zellen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll und einer zusätzlichen Spenderantigenapplikation 3 Tage nach Transplantation im Vergleich zu syngenen Gruppe erhöht und vornehmlich zwischen den Myozyten angeordnet. Dabei zeigten die unbehandelte und die mit DA-Blut transfundierte WOFIE-Gruppe eine höhere Anzahl KiS3R⁺ Zellen in ihren Transplantaten als Tiere die Spendermilzzellen erhalten hatte sowie Tiere, deren Immunsuppression nicht unterbrochen wurde (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 150.4 ± 27.4 in der

nicht-transfunden WOFIE-Gruppe und 142.4 ± 17.1 in der WOFIE Gruppe mit zusätzlicher DA-Bluttransfusion versus 104.0 ± 20.5 in der WOFIE-Gruppe mit zusätzlicher Applikation von DA-Milzzellen und 107.2 ± 23.1 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 3 Tage nach Transplantation). Sieben Tage nach Transplantation war der Anteil proliferierender Zellen in den Transplantaten aller drei nach dem WOFIE-Protokoll behandelten Untersuchungsgruppen weiter ansteigend und lag deutlich über der ermittelten Anzahl KiS3R⁺ Zellen in den Spenderorganen der kontinuierlich mit Tacrolimus immunsupprimierten Gruppe (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 316.8 ± 55.2 in der nicht-transfunden WOFIE-Gruppe, 324.1 ± 23.9 in der zusätzlich mit DA-Blut transfunden WOFIE-Gruppe und 396.8 ± 31.1 in der zusätzlich mit DA-Milzzellen behandelten WOFIE-Gruppe versus 187.2 ± 43.1 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe 7 Tage nach Transplantation). Während sich proliferierende Zellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt in der nicht-transfunden WOFIE-Gruppe wie auch in der mit spenderspezifischen Vollblut behandelten Gruppe zwischen intakten Myozyten fanden, waren KiS3R⁺ Zellen in den Transplantaten von LEW-Empfängern, die zusätzlich DA-Milzzellen erhalten hatten, zu großen Anteilen in perivasalen Infiltraten sowie gruppiert im Myokard nachweisbar. Nach 14 Tagen hatte der Anteil proliferierender Zellen in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe sowie in der mit spenderspezifischen Milzzellen behandelten WOFIE-Gruppe deutlich zugenommen (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 748.8 ± 58.2 in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe und 785.6 ± 111.4 in der WOFIE-Gruppe mit Applikation von DA-Milzzellen 14 Tage nach Transplantation). Dahingegen fanden sich Infiltrationsmuster und -frequenz KiS3R⁺ Zellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt sowohl in der nicht-transfunden als auch der mit spenderspezifischem Vollblut behandelten WOFIE-Gruppe unverändert (Anzahl KiS3R⁺ Zellen/mm² 318.4 ± 41.7 in der nicht-transfunden und 312.6 ± 35.6 in der mit Spenderblut behandelten WOFIE-Gruppe 14 Tage nach Transplantation).

5. Diskussion

Durch die von R. Calne 1994 aufgestellte WOFIE-Hypothese wurde erstmals der Begriff der „operationalen“ oder „Beinah“ Toleranz geprägt, welcher im Gegensatz zur klassischen spenderspezifischen Toleranz eine Langzeitorganakzeptanz unter minimaler Immunsuppression bezeichnet (Calne et al., 2000; Calne et al., 2004). Die erste experimentelle und auch klinische Anwendung eines Protokolls, welches in der initialen Phase nach Organtransplantation die Immunsuppression für 48 Stunden pausiert, wurde unter Anwendung des Calcineurininhibitors Ciclosporin A durchgeführt (Calne et al., 1994). Die Auswahl des Immunsuppressivums erfolgte dabei vornehmlich aufgrund von historischen Gründen, da Calcineurininhibitoren neben Steroiden und Azathioprin bzw. Mycophenolatmofetil eine der 3 Säulen der Standardimmunsuppression in der klinischen Nierentransplantation darstellen (Ponticelli et al., 2000; European Multicentre Trial Group, 1983; Matas et al., 1995). Die Frage nach der im Rahmen von Toleranzprotokollen, insbesondere des WOFIE-Protokolls, optimalen Immunsuppression ist bislang jedoch noch nicht geklärt, da genauere Kenntnisse bezüglich der für den tolerogenen Effekt verantwortlichen immunologischen Effektormechanismen fehlen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gültigkeit der WOFIE-Hypothese am Beispiel der allogenen Herztransplantation im Rattenmodell für die immunsuppressive Substanz Tacrolimus untersucht. Tacrolimus oder FK506 gehört wie Ciclosporin A zu den Calcineurininhibitoren und führt über eine Bindung an das Immunophilin FKBP1A zu einer Inhibierung der calcineurinabhängigen Phosphatase und somit zu einer verminderten Produktion von Interleukin 2 (Brazelton et al., 1996). Dadurch unterbleibt die IL-2 abhängige T-Zellaktivierung (Morgan et al., 1976; Mule et al., 1985). Die Unterbrechung einer 5-tägigen Immunsuppression mit Tacrolimus in der initialen Phase nach Organreperfusion führte in dem hier verwendeten Tiermodell im Vergleich zu einer kontinuierlich applizierten Gabe der Immunsuppression zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit allogener Herztransplantate. Dabei erfolgte die Pausierung der Immunsuppression im Gegensatz zu dem von R. Calne beschriebenem Protokoll (Calne et al., 1994; Calne et al., 1999) nicht für 48 sondern für 72 Stunden. Untersuchungen zur Abstoßungskinetik nach allogener Herztransplantation zeigten, dass innerhalb der ersten 48 Stunden nur Zellen des non-adaptiven Immunsystems wie NK-Zellen und Makrophagen aktiviert werden, während T- und B-Lymphozyten die Transplantate erst nach 3 Tagen infiltrieren (Dresske et al., 1997). Dementsprechend wurde der Zeitraum des immunsuppressiven Fensters in dem WOFIE-Protokoll der vorliegenden Arbeit erweitert, um

sowohl eine Aktivierung der adaptiven als auch der non-adaptiven Immunantwort sicher zu gewährleisten. Die Gültigkeit der von R. Calne aufgestellten WOFIE-Hypothese konnte somit in der vorliegenden Arbeit eindeutig auch für den Calcineurininhibitor Tacrolimus belegt werden. Bereits vor Einführung des Ciclosporin A in der klinischen Organtransplantation wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Bluttransfusionen unter Dialysebehandlung das Überleben späterer Nierentransplantate günstig beeinflussen (Morris et al., 1968; Opelz et al., 1973). Auch wenn die präoperative Gabe von Blutprodukten unter modernen immunsuppressiven Regimen an Bedeutung verloren hat, ist der tolerogene Transfusionseffekt vor Nierentransplantation auch heute noch nachweisbar (Flye et al., 1995; Opelz et al., 1997). Dabei scheint das HLA-Matching zwischen Empfänger und Blutspender entscheidend. So zeigten die Gruppen von Lagaaij et al. und van Twuyver et al., dass die Übereinstimmung von mindestens einem HLA-DR Antigen notwendig ist, um das Überleben zweizeitiger Nierentransplantate zu verlängern (Lagaaij et al., 1989; van Twuyver et al., 1991). Eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit durch eine zusätzliche Bluttransfusion war in der vorliegenden tierexperimentellen Studie an folgende Voraussetzungen gebunden: 1. die Gabe spenderspezifischen Vollblutes, 2. die Unterbrechung der Immunsuppression in der initialen Phase nach Organreperfusion (WOFIE-Protokoll) und 3. eine frühe Applikation innerhalb von 6 Stunden nach Transplantation. Die Transfusion von Drittstammblood während der Pausierung der Immunsuppression führte zu einer protrahierten Abstoßung allogener Herztransplantate, die Applikation spenderspezifischen Vollblutes unter kontinuierlicher Immunsuppression zeigte keinen überlebensverlängernden Effekt. Die für den Transfusionseffekt verantwortlichen Zellpopulationen und immunfunktionellen Vorgänge sind bislang noch nicht im Detail geklärt. Verschiedene neuere Arbeiten sprechen jedoch für eine Induktion regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch eine spenderspezifische Bluttransfusion. So konnte die Gruppe von Bushell et al. zeigen, dass in einem Mausmodell durch multiple Bluttransfusionen alloreaktive CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen generiert werden (Bushell et al., 2003). Kitade et al. und Kataoka et al. demonstrierten in einem Toleranztransfermodell der allogenen Herztransplantation in der Ratte, dass die Generierung spenderspezifischer regulatorischer T-Zellen sowohl eine spenderspezifische Bluttransfusion als auch das Vorhandensein eines Transplantates voraussetzt. So versagten transferierte Splenozyten von transfundierten nicht transplantierten Spendern als auch Splenozyten transplantierten nicht transfundierter Spender bei der Induktion regulatorischer T-Zellen (Kataoka et al., 2003; Kitade et al., 2005). Diese Aussage konnte von der Gruppe von Abe bestätigt werden (Abe et al., 2009). Durch die Gabe

einer Bluttransfusion in einem hochalloge-nen Rattenmodell erfolgte die Induktion CD4⁺ T-Zellen, welche jedoch noch nicht den regulatorischen Marker Foxp3 exprimierten. Erst nach allogener Lebertransplantation gelang die Generierung Foxp3⁺ CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in der Milz, welche nach Transfer in einen zweiten Empfänger die Abstoßung allogener Lebertransplantate verhinderten und in vitro die alloreaktive Aktivierung naiver Empfänger T-Lymphozyten supprimierten. Spenderspezifische regulatorische T-Zellen waren nach Splenozytentransfer zunächst nach 5 Tagen in Milz und peripheren Lymphknoten, nach 14-30 Tagen auch im Herztransplantat selbst nachweisbar (Kitade et al., 2005). In der vorliegenden tierexperimentellen Studie war der tolerogene Effekt einer spenderspezifischen Vollblutapplikation an eine frühe Gabe unmittelbar nach Transplantation sowie an eine Pausierung der Immunsuppression initial nach Transplantation (WOFIE) gebunden. Eine spätere Transfusion von DA-Blut, 24 Stunden nach Transplantation, konnte den tolerogenen WOFIE-Effekt nicht verstärken. Diese Ergebnisse bestätigen die bei der Untersuchung spontaner Toleranz gewonnene Erkenntnis, dass der Zeitpunkt der Alloantigenpräsentation früh nach Transplantation gewählt werden muss (Sriwatanawongsa et al., 1995). Die Aktivierung CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen erfolgt im Wesentlichen über den indirekten Weg der Antigenpräsentation (Scully et al., 1994; Sánchez-Fueyo et al., 2007). Durch eine Inaktivierung des indirekten Weges der Antigenpräsentation bei MHC-Klasse II defizienten Mäusen wurde auch bei kostimulatorischer Blockade das Langzeitüberleben allogener Herztransplantate verhindert, selbst wenn dem Empfänger CD4⁺-T-Zellen nicht-MHC-Klasse II defizienter Mäuse zugeführt wurden (Yamada et al., 2001). Neuere experimentelle Studien demonstrierten zudem, dass eine vorangegangene retrovirale Transduktion regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit TCR-Genen, welche ein spezifisches Erkennungspotential für MHC-Klasse II Antigene des Spenders aufwiesen, zu einer Ausbildung von Langzeitorganakzeptanz allogener muriner Herztransplantate führt (Tsang et al., 2008). Eine Induktion regulatorischer T-Zellen nach Transfer von Spender MHC-Klasse II-Genen ins Knochenmark von Mausempfängern allogener Herztransplantate mit konsekutiver Ausbildung spenderspezifischer Toleranz gelang der Arbeitsgruppe von LeGuern (LeGuern et al., 2010). Eine Arbeit von Lee et al. untersuchte die der Rekrutierung regulatorischer T-Zellen zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge in einem Toleranzmodell der Maus nach Herztransplantation und konnte in den Transplantaten neben einer deutlich erhöhten Expression von Foxp3 und CCR4 auch eine erhöhte Expression des Makrophagen-assoziierten CCR4-Liganden CCL22 nachweisen (Lee et al., 2005). In den immunhistochemischen Färbungen allogener Herztransplantate in der vorliegenden Arbeit

dominierten ebenfalls bereits initial nach Transplantation in der WOFIE-Gruppe mit und ohne zusätzliche Spenderbluttransfusion monozytäre KiM2R⁺ Zellen. Diese waren im Gegensatz zur kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe nicht perivascular, sondern gleichmäßig zwischen den Myozyten gruppiert und nicht mit einer Schädigung der Myokardstruktur assoziiert. Dahingegen zeigten Untersuchungen im selben Rattenmodell der allogenen Herztransplantation unter Anwendung des Immunsuppressivums Rapamycin, welches den WOFIE-Effekt vergleichsweise deutlich abschwächte, eine fast komplette Deletion der intramyokardialen Monozyten-Makrophagenpopulation (Dresske et al., 2004). Diese Ergebnisse legen nahe, dass dem Monozyten-Makrophagensystem als antigenpräsentierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion operationaler Toleranz zukommt. Auch Gagne et al. demonstrierten die Bedeutung dendritischer Zellen bei der Induktion spenderspezifischer Toleranz (Gagne et al., 2001). So verhinderte die komplette Depletion dendritischer Zellen in Herztransplantaten die Ausbildung von Toleranz, die Gabe eines Anti-Spender MHC-Klasse II Antikörpers verkürzte die Transplantatüberlebenszeit. Arbeiten der eigenen Gruppe konnten zudem zeigen, dass aus Monozyten generierte TAIZ („Transplantat-Akzeptanz-Induzierende Zellen“) einen immunmodulatorischen Effekt besitzen und im Schweinemodell die Abstoßung allogener Lungentransplantate verhinderten (Warnecke et al., 2008). Die Proliferationsaktivität mitogenstimulierter alloreaktiver T-Lymphozyten wurde durch Ko-Kultur mit TAIZ effektiv supprimiert (Riquelme et al., 2009). Neben der frühen Präsenz monozytärer Zellen in den allogenen Herztransplantaten nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimierter Empfänger zeigten immunhistochemische Untersuchungen allogener Herzen zudem eine auffallend starke und frühe Infiltration proliferierender Zellen. Dichte zelluläre Infiltrate im Transplantat konnten auch in anderen Toleranzprotokolle gezeigt werden (Koshiba et al., 2003; Torrealba et al., 2004; Li et al., 2008) und stützen die von R. Calne für die Induktion operationaler Toleranz geforderte aktive Auseinandersetzung von Spender- und Empfängerimmunsystem in der frühen Phase nach Transplantation (Calne et al., 2004). Interessanterweise hob die Gabe unprozessierter Spender-Milzzellen innerhalb des immunsuppressiven Fensters den tolerogenen WOFIE-Effekt in dem vorliegenden Tiermodell auf und führte zu einer protrahierten Transplantatabstoßung. Immunhistochemische Untersuchungen der Herztransplantate zeigten dabei neben einer frühen Infiltration monozytärer KiM2R⁺ Zellen, welche im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe nicht zwischen den Myozyten, sondern perivascular lokalisiert waren und mit einer Schädigung der Myokardstruktur einhergingen, insbesondere eine auffällige frühe B-Zellinfiltration. B-Zellen können die Funktion regulatorischer T-Zellen blockieren und führen in einem Morbus

Crohn-Modell der Maus zu einer Exazerbation der TH1-vermittelten Darmentzündung (Olson et al., 2004). Die genauen immunologischen Mechanismen, welche in dem vorliegenden Modell der Applikation unbehandelter Spendermilzzellen zu einer protrahierten Transplantatabstoßung führten, können bislang nicht abschließend geklärt werden und beruhen wahrscheinlich auf der starken Präsenz antigenpräsentierender Zellen und einer dadurch getriggerten Aktivierung der Empfängerimmunantwort. Andere Arbeiten hierzu sind nicht direkt vergleichbar, da sie meist mit vorbehandelten (z.B. bestrahlten) oder selektierten (z.B. CD47⁺) Milzzellen durchgeführt wurden (Cheng et al., 2009, Wang et al., 2010).

Die Frage nach der optimalen Immunsuppression für das WOFIE-Protokoll bleibt offen. Der Zusatz von Calcineurininhibitoren, wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tacrolimus, verhinderte in der gemischten Lymphozytenkultur die Induktion von Foxp3 mRNA (Baan et al., 2006). Auch in vivo konnte entsprechend in der Maus demonstriert werden, dass die Behandlung mit Ciclosporin A nicht nur die Generierung regulatorischer T-Zellen im Thymus beeinträchtigt, sondern ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung dieser Zellpopulation in den peripheren Kompartimenten des Immunsystems führt (Coenen et al., 2007). Eigene Arbeiten nach humaner Nierentransplantation zeigten jedoch eine Induktion regulatorischer Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T-Zellen bei Anwendung des WOFIE-Protokolls und konnten diese Aussage nicht stützen (Dresske et al., 2006). Ein Anstieg regulatorischer T-Zellen bei operational toleranten und klinisch stabilen Patienten wurde auch von anderen Gruppen unter Verwendung von Calcineurininhibitoren gezeigt (Salama et al., 2003; Li et al., 2004; Pons et al., 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die von R. Calne aufgestellte WOFIE-Hypothese unter Anwendung des Calcineurininhibitors Tacrolimus bestätigen. Der tolerogene Effekt ließ sich durch eine spenderspezifische Bluttransfusion verstärken, wenn diese zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation appliziert wurde, während die Gabe spenderspezifischer Milzzellen den WOFIE-Effekt aufhob. Die frühe Präsenz proliferierender Zellen im Transplantat spricht für eine aktive Auseinandersetzung zwischen Spender und Empfänger. Die genauen immunologischen Effektormechanismen innerhalb des immunsuppressiven Fensters, insbesondere unter Berücksichtigung regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und des Monozyten-Makrophagensystems, muss in zukünftigen experimentellen Studien geklärt werden.

6. Zusammenfassung

Ausgehend von Beobachtungen nach spontaner Toleranz nach Lebertransplantation postulierte R. Calne in der WOFIE- („window of opportunity for immunological engagement“)-Hypothese, dass für die Ausbildung spenderspezifischer Toleranz eine Unterbrechung der Immunsuppression in der initialen Phase nach Organtransplantation notwendig sei, um eine Interaktion immunkompetenter Zellen zwischen Empfänger und Spender zu ermöglichen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zum einen die Überprüfung der WOFIE-Hypothese am Beispiel der allogenen Herztransplantation in der Ratte unter Verwendung des Calcineurininhibitors Tacrolimus, zum anderen wurde der Einfluss einer zusätzlichen Gabe von Spenderantigen in Form von Vollblut bzw. Milzzellen auf den WOFIE-Effekt untersucht. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Transplantate nach 3, 7 und 14 Tagen dienten der Klärung immunologischer Effektormechanismen bei der Induktion operationaler Toleranz.

Die Unterbrechung einer 5-tägigen Immunsuppression mit Tacrolimus für 72 Stunden führte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Gabe zu einer signifikanten Verlängerung der Organüberlebenszeit. Eine frühe spenderspezifische Bluttransfusion nach 6 Stunden konnte die Abstoßungsreaktion weiter verzögern, während eine Transfusion nach 24 Stunden das Transplantatüberleben nicht verlängerte. Dieser Effekt war nach Gabe von Drittstammblood und unter kontinuierlicher Immunsuppression nicht nachweisbar. Die Applikation von Spendermilzzellen hingegen hob den WOFIE-Effekt auf und führte zu einer protrahierten Abstoßung. Histomorphologisch zeigten sich in Transplantaten kontinuierlich immunsupprimierter Empfänger bereits nach 7 Tagen perivasal mononukleäre Infiltrate mit Myozytolysen, während in der WOFIE-Gruppe mit und ohne Bluttransfusion bis 14 Tage nach Transplantation keine Anzeichen von Gewebeschädigungen auftraten. Auffallend war in diesen Gruppen jedoch eine frühe Infiltration mononukleärer Zellen, welche sich gleichmäßig zwischen intakten Myozyten verteilten. Dahingegen fand sich nach Applikation unprozessierter DA-Spendermilzzellen histomorphologisch eine akzelerierte Transplantatabstoßung. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll ein ähnliches Infiltrationsverhalten von Effektorzellen der adaptiven Immunantwort (T- und B-Lymphozyten), welche bis zum 7 postoperativen Tag nur vereinzelt zu finden waren und 14 Tage nach Transplantation in Abhängigkeit detektierbarer Myokardschädigungen vermehrt die Transplantate infiltrierten. Auffallend war jedoch eine frühe und im Verlauf fortschreitende B-Zellinfiltration in der WOFIE-Gruppe, welche zusätzlich mit Spendermilzzellen behandelt wurde. Dahingegen fand sich in den

Behandlungsgruppen eine unterschiedliche Infiltrationskinetik und –frequenz immunkompetenter Effektorzellen der non-adaptiven Immunantwort. Transplantate der WOFIE-Gruppe zeigten mit und ohne Spenderblutapplikation während der ersten 14 Tage deutlich weniger infiltrierende NK-Zellen als unter kontinuierlicher Immunsuppression. Interessanterweise beeinflusste auch die Gabe von Spender-Milzzellen die Infiltrationskinetik dieser Zellpopulation zunächst nicht. Erst nach 14 Tagen waren hier im Vergleich zur nicht-transfunden WOFIE-Gruppe vermehrt NK-Zellen zu verzeichnen. Während unter kontinuierlicher Immunsuppression eine stete Zunahme infiltrierender Makrophagen zu beobachten war, war die Anzahl KiM2R⁺ Zellen in den Transplantaten der WOFIE-Gruppe mit und ohne zusätzliche Spenderblutapplikation im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe bis zum 7. Tag nur diskret erhöht. Makrophagen waren hier vornehmlich vereinzelt zwischen intakten Myozyten angeordnet. Während der Anteil KiM2R⁺ Zellen in der nicht-transfunden WOFIE-Gruppe nach 14 Tagen deutlich zunahm, zeigte sich nach spenderspezifischer Bluttransfusion eine gleichbleibende Infiltrationsfrequenz. Nach Applikation von DA-Milzzellen fand sich bereits nach 3 Tagen eine verstärkte Makrophageninfiltration. Auffallend war eine frühe Infiltration proliferierender KiS3R⁺ Zellen in allen 3 WOFIE-Gruppen, welcher nach 7 Tagen deutlich über der Anzahl in kontinuierlich immunsupprimierten Tiere lag. Während sich proliferierende Zellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt in der nicht- sowie der bluttransfunden WOFIE-Gruppe gleichmäßig zwischen intakten Myozyten anordneten, waren diese nach Applikation von Spender-Milzzellen wie auch unter kontinuierlicher Immunsuppression in größeren Gruppen perivascular zu finden.

Die Befunde der vorliegenden experimentellen Arbeit konnten die Gültigkeit des WOFIE-Konzeptes für die Anwendung des Calcineurininhibitors Tacrolimus belegen. Die Verstärkung des tolerogenen WOFIE-Effektes durch eine frühe spenderspezifische Bluttransfusion spricht für die von R. Calne postulierte Interaktion immunkompetenter Effektorzellen von Spender und Empfänger. Die nach Unterbrechung der Immunsuppression zu beobachtende Infiltration proliferierender Zellen in das Spendermyokard spricht eine Aktivierung regulatorischer immunologischer Prozesse. Vergleichende Studien mit Rapamycin sowie der Nachweis regulatorischer T-Zellen im Blut nach dem WOFIE-Protokoll behandelte nierentransplantierte Patienten unterstreichen zum einen die Bedeutung monozytärer Zellen, welchen eine zunehmende Rolle bei der Induktion spenderspezifischer Toleranz zugeschrieben wird.

Literaturverzeichnis

- Abbas K, Lichtman AH, Pober JS:
Cellular and Molecular Immunology.
WB Saunders, Philadelphia, 1997
- Abe Y, Urakami H, Ostanin D, Zibari G, Hayashida T, Kitagawa Y, Grisham MB:
Induktion of Foxp3-Expressing Regulatory T-Cells by Donor Blood Transfusion is required
for Tolerance to Rat Liver Allografts.
PLoS ONE 4(11): e7840. doi:10.1371/journal.pone.0007840 (2009)
- Almond PS, Matas AJ, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P et al.:
Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients.
Transplantation 1993; 55: 752.
- Alters SE, Shizuru JA, Ackerman J, Grossman D, Seydel KB, Fathman CG:
Anti-CD4 mediates clonal anergy during transplantation tolerance induction.
J Exp Med 1991; 173: 491-494
- Anderson CB, Brennan D, Keller C, Goss J, Shenoy S, Burton K, Sicard G, Flye MW:
Beneficial effects of donor-specific transfusions on long-term renal allograft function.
Transplant Proc. 1995 Feb;27(1):991-4
- Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH:
The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major
histocompatibility complex class II-deficient mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; Apr 15;90(8):3373-7.
- Auersvald LA, Rothstein DM, Oliveira SC, Kuhong CQ, Onodera H, Lazarovits AI,
Basadonna GP:
Indefinite islet allograft survival in mice after a short course of treatment with anti-45
monoclonal antibodies.
Transplantation 1997; 63: 1355-1358
- Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AM, Korevaar SS, Balk AH,
Weimar W:
Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the
induction of FOXP3 in human T cells.
Transplantation. 2005 Jul 15;80(1):110-7.
- Billingham R.E., Brent R.E., Medawar, P.B.:
Acquired immunological tolerance.
Nature 1953; 172: 603-604
- Bishop GA, Sun J, DeCruz DJ, Rokhar KL, Sedgwick JD, Sheil AG, Gallagher ND,
McCaughan GM (1996) Tolerance to rat liver allografts. III. Donor cell migration and
tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissue. J Immunol
156:4925-4931.

Boenisch T:

Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden.

Naish SJ (Hrsg.).

Dako Corporation, USA, 1996

Bolton E.M., Gracie J.A., Briggs D., Kampinga J., Bradley J.A.:

Cellular requirements for renal allograft rejection in athymic nude rats.

J. Exp. Med. 1989, 169: 1931-1946

Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM:

Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection.

Immunol Today, 13(11): 434-8 (1992)

Brazelton TR, Morris RE:

Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide.

Curr Opin Immunol 1996; 8;5: 710-20

Burnet, FM :

The Integrity of the body. A Discussion of Modern Immunological Ideas.

Harvard Univ. Press 1962

Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ:

Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect.

Transplantation. 2003 Aug 15;76(3):449-55.

Calne R, Moffatt SD, Friend PJ, Jamieson NV, Bradley JA, Hale G et al.:

Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients.

Transplantation 1999; 68:1613.

Calne R:

WOFIE Hypothesis: Some thoughts on an approach toward tolerance induction.

Transplant Proc 1996; 28:1152.

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davies DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA:

Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.

Nature 1969; 223:472-476

Calne RY, Watson CJE, Brons IGM, Makisalo H, Metcalfe SM, Sriwatanawongsa V et al.:

Tolerance of porcine renal allografts induced by donor spleen cells and seven days' treatment with cyclosporine.

Transplantation 1994; 57: 1433.

Calne RY:

Prope tolerance--the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic.

Transpl Immunol. 2004; Sep-Oct;13(2):83-6. Review.

- Carpenter, Abbas AK:
The role of antibodies in the rejection and enhancement of organ allografts.
Adv Immunol 1976; 22:1-65
- Chambers WH, Vujanovic NL, Deleo AB, Olszowy MW, Gerberman RB, Hiserodt JC:
Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adheret lymphokine-activated killer cells.
J Exp Med 1989; 169: 1373-1389
- Chatenoud L, Waldmann H, Emrich F:
Tolerance induction in the adult: 'danger' at Le Bischenberg.
Immunol Today. 1995 Mar;16(3):121-3. Erratum in: *Immunol Today* 1995 Apr;16(4):172.
- Cheng J, Zhou L, Qin YS, Wang Y, Xie HY, Feng XW, Zheng SS:
Donor apoptotic lymphocyte transfusion-induced liver allograft tolerance by up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood.
Transplant Proc. 2009 Nov;41(9):3893-7.
- Chiba S, Goto S, Shimizu Y, Vari F, Lord R, Edwards-Smith C, Kobayashi S, Ochiai T, Isono K:
The characterization of reconstituted passenger leucocytes on the induction of tolerance in rat liver transplantation.
Transpl Int 1997; 10:350-356.
- Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I:
Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells.
Bone Marrow Transplant. 2007 May;39(9):537-45.
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Gosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason, DY:
Immunzytomatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
J. Histochem. Cytochom. 1984; 32, 219-229
- Dahmen U, Qian S, Rao AS, Demetris AS, Fu F, Sun H, Gao L, Fung JJ, Starzl T:
Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice.
Transplantation 1994; 58:1-8.
- Dausset, J.:
Iso-leuco-anticorps.
Acta. Haematol. 1958; 20, 156-66
- Delves PJ, Roitt IM:
The Immune System.
Advances in Immunology 2000; Vol 343, Number 1 and 2

Demetris AJ, Abu-Elmaged K, Allesiani M, Fung JJ, McCauley J, Starzl TE, Takaya S, Todo S, van Thiel DH:

Conversion of liver allograft recipients from ciclosporine to FK506 immunosuppressive therapy – a clinicopathologic study of 96 patients.

Transplantation 1992; 53:1056-1062

Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ :

Decrease of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood after liver transplantation: association with immunosuppression.

Transplant Proc 2005; 37(2): 1194-6

Dresske B, Haendschke F, Lenz P, Ungefroren H, Jenisch S, Exner B, El Mokhtari NE, Lu T, Zavazava N, Faendrich F:

WOFIE stimulates regulatory T cells: a 2-year follow-up of renal transplant recipients.

Transplantation. 2006; Jun 15;81(11):1549-57.

Dresske B, Rohlfing H, Zavazava N, Mokhtari L, Thode MC, Kremer B, Fändrich F:

Comparative analysis of the immunosuppressive potency of rapamycin and tacrolimus after allogeneic heart transplantation in the rat

Deut Ges Chir 2004, Chirurgisches Forum bd.33:371-373 2004

Dresske B, Zavazava N, Jenisch S, Exner B, Lenz P, El Mokhtar NE, Kremer B, Faendrich F.:

WOFIE synergizes with calcineurin-inhibitor treatment and early steroid withdrawal in kidney transplantation.

Transplantation 2002; Vol. 75 ;8: 1286-1291

Dresske B, Zhu X, Peters J, Brötzmann K, Fändrich F:

Impact of natural killer cells and macrophages on the course of acute graft rejection following allogeneic heart transplantation in the rat.

Transplant P 1997; 28: 3259-3260.

European multicentre trial group:

Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial.

Lancet. 1983; Oct 29;2(8357):986-9.

Fändrich F, Jahnke T, Peters J, Exner B, Papachrysanthou A, Zavazava N:

Circumvention of natural killer cell and T cell mediated target killing with tacrolimus (FK506) in small bowel transplantation related graft-versus-host disease.

Transplant Int 1996; 9(1):263-268

Faustman D, Coe C:

Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens.

Science 1991; 252: 1700-1702

Feng NH, Wu HF, Wu J, Zhang W, Sui YG, He HG, Zhang CL, Zheng JS :

Transplantation tolerance mediated by regulatory T cells in mice.

Chin Med J (engl) 2004; 117(8): 1184-9

Fung J, Abu-Elmagd K, Jain A, Gordon R, Tzakis A, Todo S, Takaya S, Alessiani M, Demetris A, Bronster O:
A randomized trial of primary liver transplantation under immunosuppression with FK506 vs cyclosporine.
Transplant Proc 1991; 23(6): 2977-83

Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP:
TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation.
Eur J Immunol. 2001; Oct;31(10):3111-20. Erratum in: Eur J Immunol. 2004 Dec;34(12):3732. Souillou, JP [corrected to Souillou, JP].

Goldstein DR, Thomas JM, Kirklin JK, George JF:
An essential role for natural killer cells in augmentation of allograft survival mediated by donor spleen cells.
Transplantation 2001; Sep 15;72(5):954-6.

Groth CG, Brent LB, Calne RY, Dausset JB, Good RA, Murray JE, Shumway NE, Schwartz RS, Starzl TE, Terasaki PI, Thomas ED, van Rood JJ:
Historic landmarks in clinical transplantation: conclusions from the consensus conference at the University of California, Los Angeles.
World J Surg. 2000; Jul;24(7):834-43.

Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D:
Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996.
N Engl J Med 2000; 342:605-612.

Harlan DM, Kirk AD:
The future of organ and tissue transplantation: can T-cell costimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection?
JAMA 1999; Sep 15;282(11):1076-82.

Huang X, Moore DJ, Mohiuddin M, Lian MM, Kim JI, Sonawane S, Wang J, Gu Y, Yeh H, Markmann JF, Deng S:
Inhibition of ICAM-1/LFA-1 interactions prevents B-cell-dependent anti-CD45RB induced transplantation tolerance.
Transplantation 2008; Mar 15;85(5):675-80.

Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A:
Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1.
Science 1992; 255: 1125-1127

Jain AB, Abu-Elmagd KM, Alessiani M, Bryant J, Day R, Fung JJ, Takaya S, Todo S, Tzakis A, Venkataramanan R:
Correlation of rejection episodes with FK506 dosage, FK506 level, and steroids following primary orthotopic liver transplant.
Transplant Proc 1991; 23:3023-3025

Juffe A, Rodriguez MA, Caputo E, Cuenca J, Crespo M:
Long-term results of cardiac transplantation,
Journal of cardiac surgery 2003; 18: 183-189

Kamada N, Davies H, Roser B:
Reversal of transplantation immunity by liver grafting.
Nature 1981; 292:840-842.

Kasiske BL, Chakkera HA, Roel J:
Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1735-1743.

Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW:
Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation.
J Immunol. 2003; Jul 1;171(1):204-11.

Kitade H, Kawai M, Rutgeerts O, Landuyt W, Waer M, Mathieu C, Pirenne J:
Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion.
J Immunol. 2005; Oct 15;175(8):4963-70.

Knoop M, Neumann U, Neuhaus P:
Immunologic tolerance after experimental liver transplantation.
Langenbecks Arch Chir 1995; 380:281-287.

Koshiba T, Giulietti A, Van Damme B, Overbergh L, Rutgeerts O, Kitade H, Waer M, Mathieu C, Pirenne J:
Paradoxical early upregulation of intragraft Th1 cytokines is associated with graft acceptance following donor-specific blood transfusion.
Transpl Int. 2003; Mar;16(3):179-85.

Lagaaij EL, Hennemann IP, Ruigrok M, de Haan MW, Persijn GG, Termijtelen A, Hendricks GF, Weimar W, Claas FH, van Rood JJ:
Effect of one-HLA-DR-antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts.
N Engl J Med. 1989; Sep 14;321(11):701-5.

Larsen CP, Austyn JM, Morris PJ:
The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation.
Ann Surg. 1990; Sep;212(3):308-15; discussion 316-7.

Larsen CP, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC:
Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways.
Nature 1996; 381: 434-438

Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW:
Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor.
J Exp Med. 2005; Apr 4;201(7):1037-44.

LeGuern C, Akiyama Y, Germana S, Tanaka K, Fernandez L, Iwamoto Y, Houser S, Benichou G:
Intracellular MHC class II controls regulatory tolerance to allogeneic transplants.
J Immunol. 2010; Mar 1;184(5):2394-400.

Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K:
Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation.
Am J Transplant. 2004; Dec;4(12):2118-25.

Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, Sakaguchi S, Tanaka K, Uemoto S, Koshiba T:
The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients.
Transplantation. 2008; Dec 27;86(12):1837-43.

Lukomska B, Winnock M, Balabaud C, Saric J, Polanski J, Olszewski WL:
Human liver passenger cells suppress autologous and allogeneic blood lymphocytes proliferation.
Transplant Proc 1997; 29:1105-1107.

Mackay CR, Andrian UH:
T-Cell function and migration - two sides of the same coin.
Advances in Immunology 2000; 1020-1034

Matas AJ, Almond PS, Moss A, Gillingham KJ, Sibley R, Payne WD, Dunn DL, Gruessner RW, Sutherland DE, Manivel C et al.:
Effect of cyclosporine on renal function in kidney transplant recipients: a 12-year follow-up.
Clin Transplant. 1995; Dec;9(6):450-3.

Meiser BM, Fuchs UA, Schmidt D et al.:
Single-center randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in the prevention of acute myocardial rejection.
J Heart Lung Transplant 1998; 17: 782-788

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R:
Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow.
Science 1976; 193:1007-1009

Morris PJ, Ting A, Stocker J:
Leukocyte antigens in renal transplantation. 1. The paradox of blood transfusions in renal transplantation.
Med J Aust. 1968; Dec 14;2(24):1088-90

Mule JJ, Shu S, Rosenberg SA:
The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo.
J Immunol 1885; 135, 646-652.

Müller-Ruchholz, W.:
Grundlagen der Immunbiologie. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 5. Aufl
H.J. Otte und H. Brandis (Hrsg.). G.-Fischer-Verlag 1984; Stuttgart S. 40-77

Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S:
Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells
Int Immunol 16: 1189-1201

Olson TS, Bamias G, Naganuma M, Rivera-Nieves J, Burcin TL, Ross W, Morris MA, Pizarro TT, Ernst PB, Cominelli F, Ley K:
Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease.
J Clin Invest. 2004; Aug;114(3):389-98.

Ono, K., Lindsey, E.S.:
Improved technique of heart transplantation in rats.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1968; 57, 225-229

Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, Terasaki PI:
Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants.
Transplant Proc. 1973; Mar;5(1):253-9.

Opelz G, Vanrenterghem Y, Kirste G, Gray DW, Horsburgh T, Lachance JG, Largiader F, Lange H, Vujaklija-Stipanovic K, Alvarez-Grande J, Schott W, Hoyer J, Schnuelle P, Descoedres C, Ruder H, Wujciak T, Schwarz V:
Prospective evaluation of pretransplant blood transfusions in cadaver kidney recipients.
Transplantation. 1997; Apr 15;63(7):964-7.

Pallardó LM, Oppenheimer F, Guirado L, Conesa J, Hortal LJ, Romero R, Rivero M, de Bonis E, Muñoz ML, Esforzado N:
Calcineurin inhibitor reduction based on maintenance immunosuppression with mycophenolate mofetil in renal transplant patients: POP study.
Transplant Proc. 2007 Sep;39(7):2187-9.PMID: 17889133

Parsons RF, Vivek K, Redfield RR, Migone TS, Cancro MP, Naji A, Noorchashm H:
B-cell tolerance in transplantation: is repertoire remodeling the answer?
Expert Rev Clin Immunol. 2009; Nov;5(6):703.

Patlolla V, Zhong X, Reed GW, Mandelbrot DA:
Efficacy of anti-IL-2 receptor antibodies compared to no induction and to antilymphocyte antibodies in renal transplantation.
Am J Transplant. 2007; Jul;7(7):1832-42.PMID: 17564638

Paul LC:

Chronic allograft nephropathy: an update.
Kidney Int 1999; 56:783.

Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, Robles R, Rios A, Aparicio P, Parrilla P:
FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal.
Transplantation. 2008; Nov 27;86(10):1370-8.

Ponticelli C:

Calcineurin-inhibitors in renal transplantation. Too precious to be abandoned.
Nephrol Dial Transplant. 2000 Sep;15(9):1307-9.

Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF; Choti MA, Naji A:
Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation.
Science 1990; 249: 1293-1295

Priestley, CA, Spencer SC, Sawyer GJ, Fabre JW:

Suppression of kidney allograft rejection across full MHC barriers by recipient-specific antibodies to class II MHC antigens.
Transplantation 1992; 53: 1024-1032

Ramos HC, Reyes J, Abu-Elmagd K, Zeevi A, Reinsmoen N, Tsakis A, Demetris AJ, Fung JJ, Flynn B, McMichael J:
Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients.
Transplantation 1995; 59:212-217.

Reichart BR, Meiser BM, Vigano M et al.:

European multicenter tacrolimus (FK506) heart pilot study: one-year results – European Multicenter Heart Study Group.
J Heart Lung Transplant 1998; 17: 775-81

Riquelme P, Gövert F, Geissler EK, Fändrich F, Hutchinson JA:

Human transplant acceptance-inducing cells suppress mitogen-stimulated T cell proliferation.
Transpl Immunol. 2009; Jul;21(3):162-5.

Roitt I, Male D, Brostoff J:

Immunology.
Mosby-Year Book 1991; 5. Auflage S. 1

Rossini A.A., Greiner D.L., Mordes J.P.:

Induction of Immunologic Tolerance of Transplantation.
Physiological Reviews 1999; Jan, 79: 99-141

Sakaguchi S.:

Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.
Cell 2000; 101: 455-458.

Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH.:
Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients.
J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1643-948

Sánchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX, Strom TB:
Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4+CD25+ regulatory T-cell
function in transplantation.
Transpl Int. 2007; Jun;20(6):534-41. Epub 2007 Mar 16.

Sayegh MH, Khoury SJ, Hanock WW, Weiner HL, Carpenter CB:
Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility
complex allopeptides in the rat.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 1992; 89: 7762-7766

Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H:
Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction,
antigen dependency and role of regulatory T cells.
Eur J Immunol. 1994 Oct;24(10):2383-92.

Shizuru JA, Gregory AK, Chao CT, Fathman CG:
Islet allograft survival after a single course of treatment of recipient with antibody to L3T4.
Science 1987; 237: 278-280

Smith RM, Chen ZK, Foulkes R, Metcalfe SM, Wraith DC:
Prolongation of murine vascularized heart allograft survival by recipient-specific anti-major
histocompatibility complex class II antibody
Transplantation 1997; 64: 525-528

Soulillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V:
Genetic of the blood transfusin effect on heart allograft in rats.
Transplantation 1984; 38: 63-67

Sriwatanawongsa V, Davies HS, Calne RY:
The essential roles of parenchymal tissues and passenger leucocytes in the tolerance induced
by liver grafting in rats.
Nat Med 1995; 1:428-432.

Sriwatanawongsa V, Davies HF, Calne R:
The essential roles of parenchymal tissues and passenger leucocytes in the tolerance induced
by liver grafting in rats.
Nat Med 1995; 1:428.

Subbotin V, Sun H, Aitouche A, Valdivia LA, Fung JJ, Starzl TE, Rao AS:
Abrogation of chronic rejection in a murine model of aortic allotransplantation by prior
induction of donor-specific tolerance.
Transplant 1997; 64: 690-695

Sun J, Sheil AG, Wang C, Wang L, Rokhar K, Sharland A, Jung SE, Li L, McCaughan GW, Bishop GA:

Tolerance to rat liver allografts: IV. Acceptance depends on the quantity of donor tissue and on donor leucocytes.

Transplantation 1996; 62:1725-1730.

Takaya S, Bronsther O, Todo S, Abu-Elmagd K, Jain A, Alessiani M, Madariaga J, Marino IR, Selby R, Fung JJ:

Retransplantation of liver: a comparison of FK 506- and cyclosporine-treated patients.

Transplant Proc 1991; 23:6:3026-8

Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM:

Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation.

N Engl J Med 2000; 343:1078-1084.

Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H:

Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver.

Nat Med 1996; 2:198-203.

Taylor DO, Barr ML, Radovancevic B, Renlund DG, Mentzer RM, Smart FW et al.:

A randomized multicenter comparison of tacrolimus and cyclosporine immunosuppressive regimens in cardiac transplantation: decreased hyperlipidemia and hypertension with tacrolimus.

J Heart Lung Transplant 1999; 18: 336-345

Te Velde A:

Interactions between cytokines and monocyte/ macrophages. The Handbook of Immunopharmacology.

Bruojnzeel-Koomen, Hoefsmit (Hrsg.) Academic Press London 1994

Torrealba JR, Katayama M, Fechner JH Jr, Jankowska-Gan E, Kusaka S, Xu Q, Schultz JM, Oberley TD, Hu H, Hamawy MM, Jonker M, Wubben J, Doxiadis G, Bontrop R,

Burlingham WJ, Knechtle SJ:

Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates.

J Immunol. 2004; May 1;172(9):5753-64.

Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF:

Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using the Banff grading schema.

Transplantation 1996; 61;11: 1586-92

Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Xue SA, Ratnasothy K, Chen D, Stauss HJ, Bucy RP, Lombardi G, Lechler R:

Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice.

J Clin Invest. 2008; Nov;118(11):3619-28. Epub 2008 Oct 9.

Tzakis AG, Reyes J, Todo S, Green M, Ohya T, Jain A, Abu-Elmagd K, Alessiani M, Fung JJ, Starzl TE:

FK 506 versus cyclosporine in pediatric liver transplantation.

Transplant Proc 1991; 23:6: 3010-5

van Twuyver E, Mooijaart RJ, ten Berge IJ, van der Horst AR, Wilmink JM, Kast WM, Melief CJ, de Waal LP:

Pretransplantation blood transfusion revisited.

N Engl J Med. 1991; Oct 24;325(17):1210-3.

Wang H, Wu X, Wang Y, Oldenburg PA, Yang YG:

CD47 is required for suppression of allograft rejection by donor-specific transfusion.

J Immunol. 2010; Apr 1;184(7):3401-7.

Warnecke G, Hutchinson JA, Riquelme P, Kruse B, Thissen S, Avsar M, Zehle G, Steinkamp T, Peters C, Baumann R, Gövert F, Ungefroren H, Länger F, Simon AR, Karstens JH, Kaefer V, Haverich A, Fändrich F, Strüber M:

Postoperative intravenous infusion of donor-derived transplant acceptance-inducing cells as an adjunct immunosuppressive therapy in a porcine pulmonary allograft model.

Transpl Int. 2009; Mar;22(3):332-41.

Yamada A, Chandraker A, Laufer TM, Gerth AJ, Sayegh MH, Auchincloss H Jr:

Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade.

J Immunol. 2001; Nov 15;167(10):5522-6.

Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, Contag CH, Negrin RS:

Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production.

Blood. 2006; Jul 1;108(1):390-9.

Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, Gokel JM, Schmidt T:

Orthotopic liver allografts in the rat: the influence of strain combination on the fate of the graft.

Transplantation 1984; 27:406-410.

8. Anhang

Tabelle 8.1. *Überlebenszeiten transplantiertes Spenderherzen in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll*

Tiergruppe	Organüberlebenszeiten (in Tagen)	Organüberlebenszeit (in Tagen, Mittelwert \pm SD)
syngene Kontrolle (n=6)	> 100 x 6*	> 100
allogene Kontrolle (n=6)	6, 6, 6, 7, 7, 7	6,5 \pm 0,55
FK o. Pause, unbehandelt	10, 16, 19, 22, 17, 20	17,33 \pm 4,179
FK o. Pause, DA-Blut nach 6 Std.	15, 17, 18, 19, 22, 22	18,8 \pm 2,8
FK-Pause, unbehandelt	14, 19, 35, 39, 43, 40	31,67 \pm 12,127
FK-Pause, DA-Blut nach 6 Std.	25, 45, 46, 50, 51, 52	44,83 \pm 10,10
FK-Pause, DA-Blut nach 24 Std.	11, 16, 26, 40, 41, 45	29,83 \pm 14,275
FK-Pause, CAP-Blut nach 6 Std.	7, 13, 13, 16, 17, 17	13,83 \pm 3,82
FK-Pause, DA-MZ nach 6 Std.	23, 24, 30, 31, 33, 22	27,2 \pm 4,7
FK-Pause, DA-MZ nach 24 Std.	13, 14, 15, 14, 19, 13	14,67 \pm 2,251

SD = Standardabweichung, MZ = Milzzellen

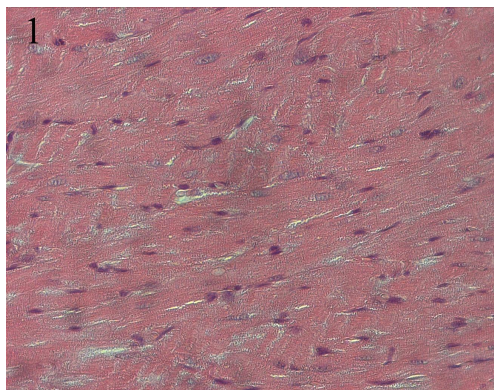
* Tiere dieser Gruppe wurden nach 150 Tagen getötet

Tabelle 8.2. *Verteilung immunkompetenter Effektorzellen im Myokard transplantiertes Herzen (Immunhistochemie)*

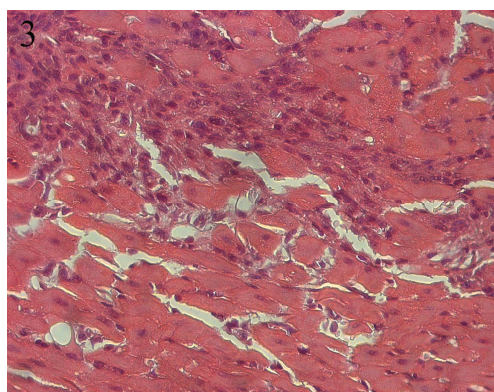
Gruppe/ Zeit p. Tx	NKR-P1 M ± SD	KiM2R M ± SD	KiT1R M ± SD	KiB1R M ± SD	KiS3R M ± SD
Kontr.	11.7 ± 5.5	58.7 ± 6.3	2.7 ± 2.7	1.1 ± 1.5	9.0 4.8
3 Tage					
Syngen	17.8 ± 6.2	161.8 ± 13.4	1.8 ± 3.1	4.4 ± 3.1	39.1 ± 17.3
Allogen	323.7 ± 30.4	480.0 ± 53.6	96.7 ± 46.3	119.0 ± 10.5	495.3 ± 87.2
FK o. P	91.2 ± 17.4	307.2 ± 35.2	9.6 ± 2.3	5.3 ± 0.8	107.2 ± 23.1
FK-Pause	40.0 ± 8.6	196.8 ± 19.2	5.3 ± 3.3	5.3 ± 1.7	150.4 ± 27.4
FK-P, B	28.8 ± 4.2	192.0 ± 14.1	2.6 ± 2.1	2.8 ± 0.9	142.4 ± 17.1
FK-P, MZ	49.6 ± 12.2	294.4 ± 43.6	2.6 ± 0.4	41.6 ± 11.7	104.0 ± 20.5
7 Tage					
Syngen	12.4 ± 4.1	157.3 ± 32.8	2.7 ± 0.8	5.3 ± 0.3	21.3 ± 5.3
Allogen	201.1 ± 52.1	655.6 ± 96.7	121.8 ± 23.3	82.1 ± 34.2	317.2 ± 75.6
FK o. P	169.6 ± 33.1	422.4 ± 59.1	37.3 ± 8.7	28.8 ± 5.4	187.2 ± 43.1
FK-Pause	99.2 ± 28.3	206.4 ± 31.2	8.0 ± 3.3	5.3 ± 1.1	316.8 ± 55.2
FK-P, B	121.6 ± 22.5	200.0 ± 16.4	5.3 ± 0.9	10.6 ± 4.4	324.1 ± 23.9
FK-P, MZ	112.0 ± 31.2	321.6 ± 29.8	2.6 ± 1.8	54.4 ± 14.1	396.8 ± 31.1
14 Tage					
Syngen	14.2 ± 7.8	163.4 ± 33.2	4.1 ± 2.3	3.3 ± 3.7	19.2 ± 8.9
Allogen	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
FK o. P	257.6 ± 27.8	864.0 ± 101.4	142.4 ± 29.2	107.2 ± 17.6	748.8 ± 58.2
FK-Pause	137.6 ± 33.2	292.9 ± 44.2	24.0 ± 11.2	62.4 ± 18.4	318.4 ± 41.7
FK-P, B	126.4 ± 27.3	190.4 ± 21.8	20.8 ± 5.4	33.6 ± 10.1	312.6 ± 35.6
FK-P, MZ	190.4 ± 34.1	574.4 ± 103.7	42.6 ± 13.9	100.8 ± 12.3	785.6 ± 111.4

Bildtafel 8.1. *Histomorphologische Veränderungen allogener transplantierte Herzen mit und ohne Anwendung eines immunsuppressiven Fensters (§ WOFIEö)*

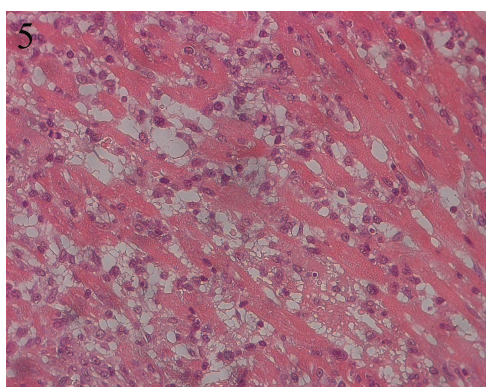
FK-506, ohne Pause



3 Tage nach Transplantation

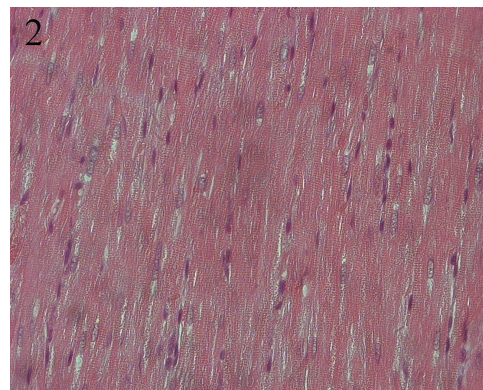


7 Tage nach Transplantation

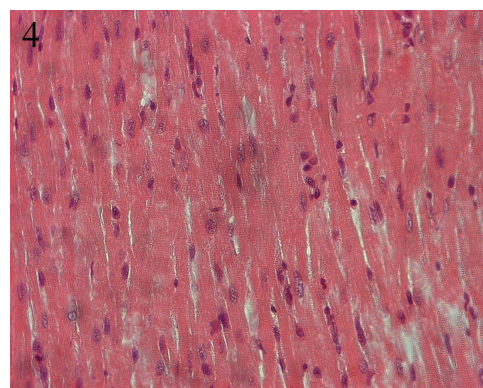


14 Tage nach Transplantation

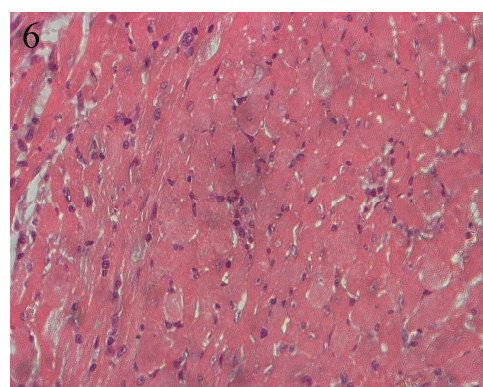
FK-506, Pause (§ WOFIEö)



3 Tage nach Transplantation



7 Tage nach Transplantation

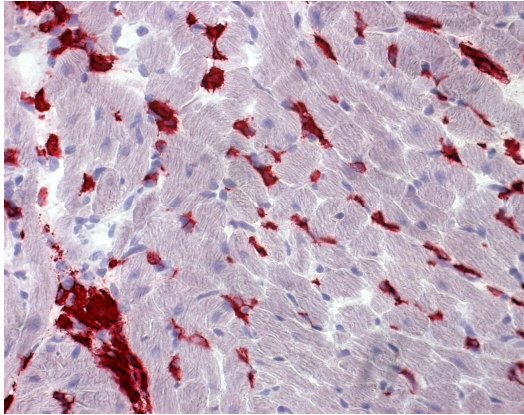


14 Tage nach Transplantation

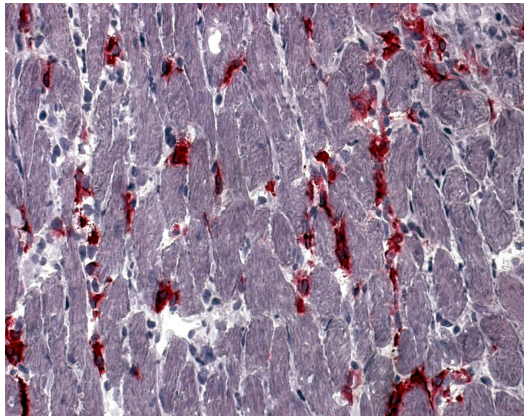
Bildtafel 8.1. zeigt H.E.-Färbungen allogener Herztransplantate immunsupprimierter Empfänger mit und ohne Anwendung eines 72-stündigen immunsuppressiven Fensters (Vergrößerung x 400). Unter kontinuierlicher Immunsuppression und nach initialer immunsuppressiver Pause zeigte sich am 3. Tag nach Transplantation eine intakte Myokardstruktur. Erste Anzeichen einer akuten Abstossungsreaktion zeigten sich in der kontinuierlich immunsupprimierten Gruppe bereits nach 7 Tagen in Form von v.a. perivasalen mononukleären Zellinfiltraten mit begleitenden Myozytolysen im gesamten Myokard und nahmen bis zum 14. Tag nach Transplantation deutlich zu. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich im Myokard erste Gefässnekrosen. Nach immunsuppressiver Pause hingegen waren bis zum 14. postoperativen Tag keine Anzeichen einer akuten Transplantatabstossung sichtbar, obwohl hier auch nach drei Tagen gleichmäßig zwischen intakten Myozyten angeordnete mononukleäre Zellen nachweisbar waren.

Bildtafel 8.2. *Infiltrationsfrequenz und Verteilung von Makrophagen im Myokard transplantiertter Herzen unter Anwendung von FK506 mit und ohne initiale Unterbrechung der Immunsuppression*

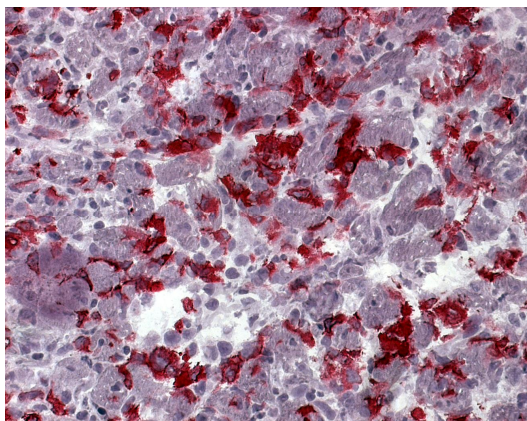
FK ohne Pause



3 Tage nach Transplantation

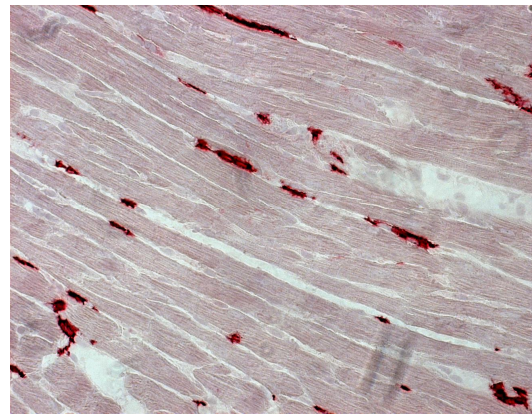


7 Tage nach Transplantation

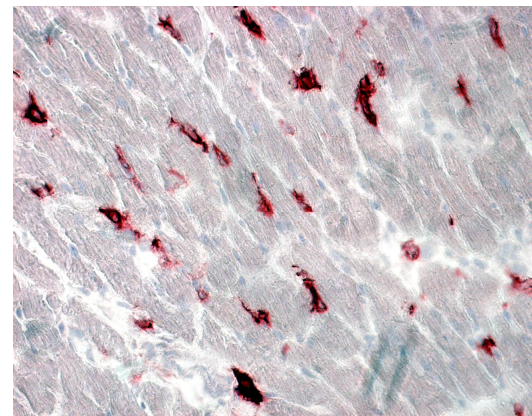


14 Tage nach Transplantation

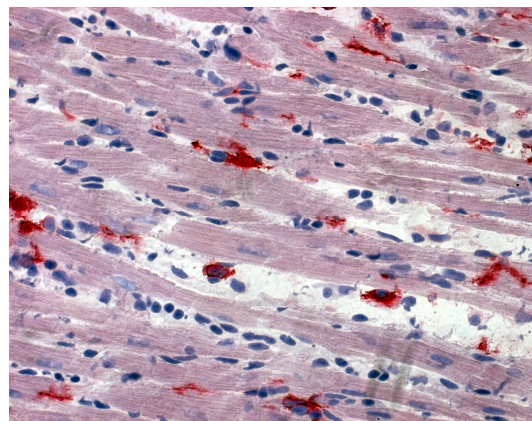
FK Pause (šWOFIEö)



3 Tage nach Transplantation



7 Tage nach Transplantation

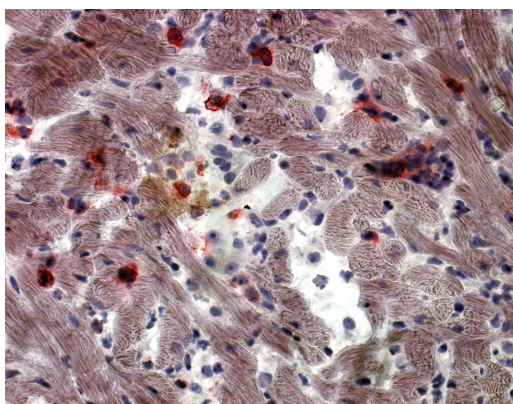


14 Tage nach Transplantation

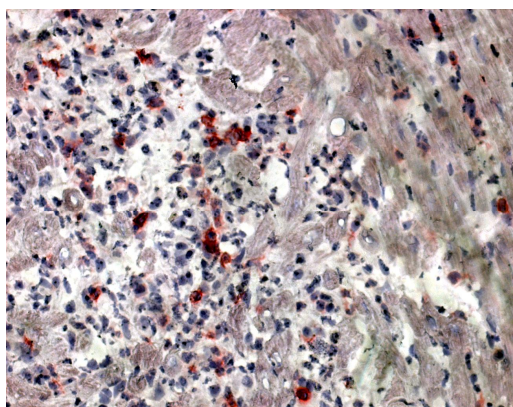
Bildtafel 8.2. zeigt das Infiltrationsverhalten von Makrophagen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiM2R, Vergrößerung x 400) im Myokard transplantiertter Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Unter kontinuierlicher immunsuppressiver Therapie konnte während des Beobachtungszeitraumes ein Anstieg der Makrophagenpopulation beobachtet werden bis hin zu ausgedehnten Infiltraten nach 14 Tagen. Die Anzahl KiM2R⁺ Zellen in den Herztransplantaten der WOFIE-Gruppe war dagegen deutlich geringer und stieg erst an Tag 14 leicht an bei weiterhin intakter Myokardstruktur.

Bildtafel 8.3. Infiltrationintensität und Verteilung von *natürlichen Killerzellen* im Myokard transplantierte Herzen unter Anwendung von FK506 mit und ohne initiale Unterbrechung der Immunsuppression

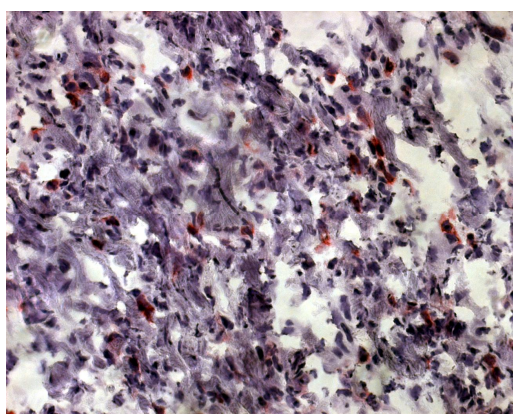
FK ohne Pause



3 Tage nach Transplantation

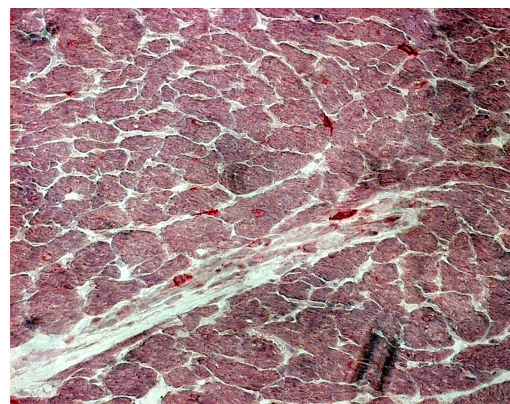


7 Tage nach Transplantation

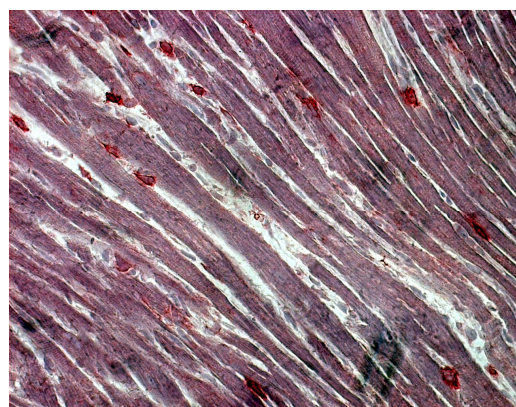


14 Tage nach Transplantation

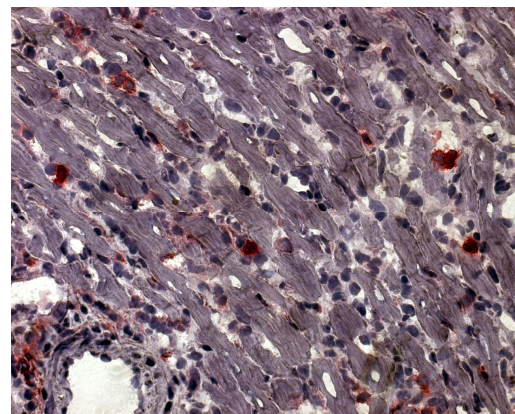
FK Pause (šWOFIEö)



3 Tage nach Transplantation



7 Tage nach Transplantation

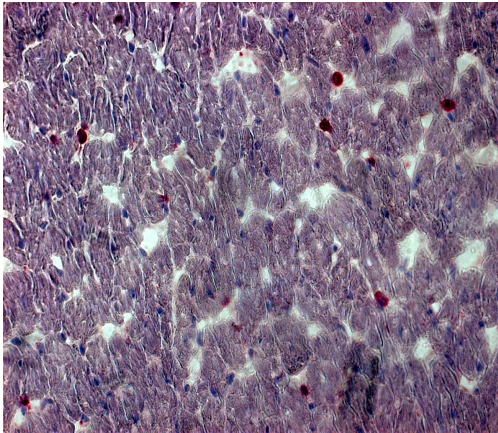


14 Tage nach Transplantation

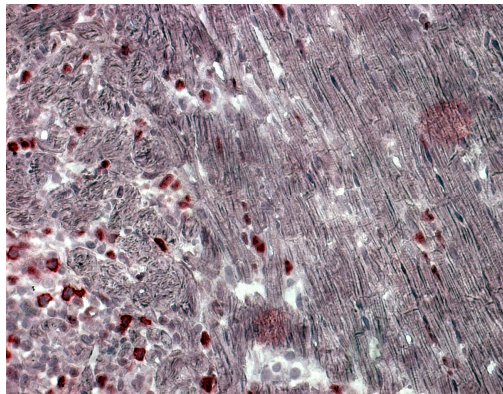
Bildtafel 8.3. zeigt das Infiltrationsverhalten von natürlichen Killerzellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper NKR-P1, Vergrößerung x 400) im Myokard transplantierte Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. Unter kontinuierlicher Immunsuppression fanden sich zu allen Zeitpunkten deutlich mehr natürliche Killerzellen im Transplantat als in der WOFIE-Gruppe. Bis zum 14. postoperativen Tag nahm deren Anzahl in beiden Gruppen kontinuierlich zu, wobei diese Zunahme unter kontinuierlicher Immunsuppression mit den histologisch nachweisbaren Schädigungen im Myokard korrelierte, während das Myokard in der WOFIE-Gruppe intakt erscheint.

Bildtafel 8.4. Infiltrationintensität und Verteilung von *proliferierender Zellen* im Myokard transplantierte Herzen unter Anwendung von FK506 mit und ohne initiale Unterbrechung der Immunsuppression

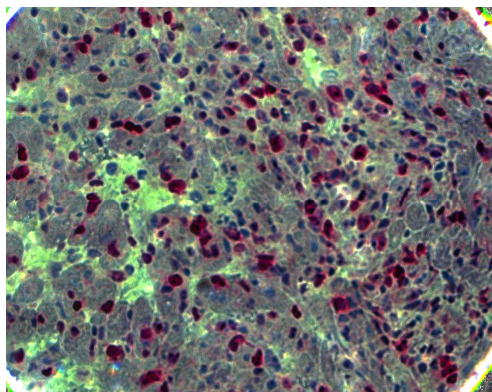
FK ohne Pause



3 Tage nach Transplantation

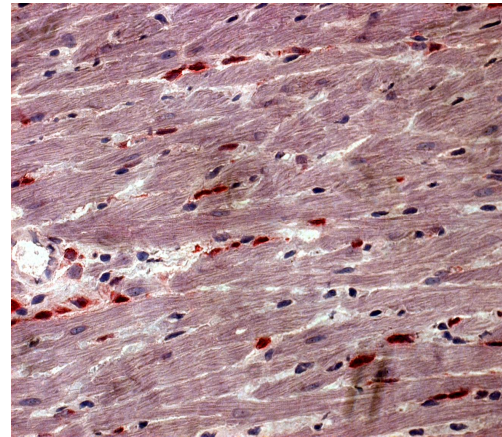


7 Tage nach Transplantation

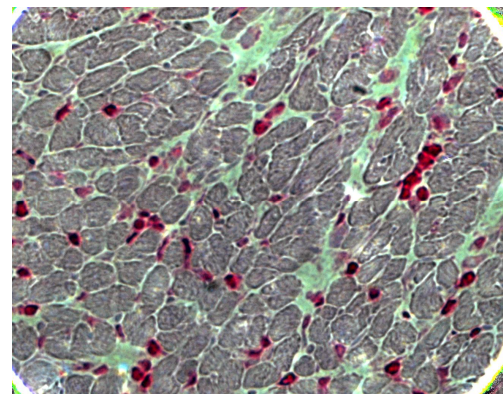


14 Tage nach Transplantation

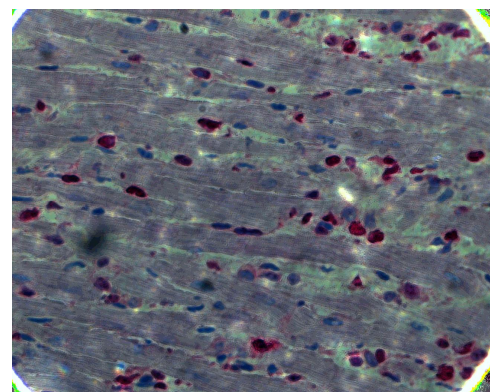
FK Pause (šWOFIEõ)



3 Tage nach Transplantation



7 Tage nach Transplantation



14 Tage nach Transplantation

Bildtafel 8.4. zeigt das Infiltrationsverhalten proliferierender Zellen (APAAP-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper KiS3R, Vergrößerung x 400) im Myokard transplantierte Herzen 3, 7 und 14 Tage nach Transplantation. In der WOFIE-Gruppe ist die Infiltration des intakten Myokards durch KiS3R⁺ Zellen höher als in den Herzen kontinuierlich immunsupprimierter Tiere. An Tag 14 sieht man bei letzteren eine massive Zunahme KiS3R⁺ Zellen mit eihergehender Zerstörung des Myokards, während in der WOFIE-Gruppe deren Anzahl konstant bleibt bei weiter intaktem erscheinendem Myokard.

9. DANKSAGUNG

Frau Priv. Doz. Dr. med. Bettina Dreßke, Oberärztin in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und ihre Unterstützung bei der experimentellen Durchführung und der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit. Sie stand mir immer hilfreich zur Seite und zeigte großes persönliches Engagement.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. med. Bernd Kremer, ehemaliger Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH (Campus Kiel) und jetziger Klinikdirektor des Krebszentrums Nord, Herrn Prof. Dr. med. Fred Fändrich, ehemaliger ständiger stellvertretender Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie und jetziger Direktor der Klinik für angewandte Zelltherapie des UK-SH (Campus Kiel) sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter C. Bröring, kommissarischer Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH (Campus Kiel) für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Förderung meiner Promotionsarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH (Campus Kiel) Frau Kerstin Marx und Frau Petra Krüger für die Einführung in die mikrochirurgischen Operationstechniken und die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen. Außerdem möchte ich mich bei meiner Frau Astrid und meinen Töchtern Annalina und Tuula für ihre stetige und geduldige Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit bedanken. Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Großeltern, die mir den Weg für meinen Beruf geebnet haben.

10. LEBENS LAUF

Am 18.03.1976 wurde ich, Malte-Christian Thode als erstes von 2 Kindern des ehemaligen Leiters der Stabsstelle Neumünster Rolf Thode und der Oberstudienrätin Margit Pelzer in Kiel geboren. Ich bin mit Frau Dr. med. Astrid Thode, geborene Beier verheiratet. Am 14.01.2006 wurde unsere Tochter Annalina Luise und am 20.01.2009 unsere Tochter Tuula Marlene geboren.

Von 1982 bis 1986 besuchte ich die Brüder-Grimm-Grundschule in Kronshagen und wechselte anschließend auf die Humboldt-Schule in Kiel, wo ich 1995 meine Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Von 1995 bis 1996 absolvierte ich meinen Zivildienst als Rettungssanitäter bei den Maltesern in Kiel.

Im Wintersemester 1996/97 nahm ich an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mein Studium der Humanmedizin auf. Hier absolvierte ich 1998 das Physikum und 1999 das 1. Staatsexamen. Im Jahr 2002 legte ich den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Mein Praktisches Jahr verbrachte ich in Kiel, in Toronto, Kanada und in der Schweiz in Bern. Im Juni 2003 erhielt ich nach bestandenem 3. Staatsexamen (Gesamtnote 2,16) die Teilapprobation und schließlich im Oktober 2004 die Approbation als Arzt.

Meine ärztliche Tätigkeit begann ich am 01.01.2004 zunächst als Arzt im Praktikum und ab Oktober 2004 als Assistenzarzt in der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums Stuttgart. Von März bis Dezember 2006 wechselte ich in Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Klinikums Stuttgart. Anschließend setzte ich meine Facharztausbildung in der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums Stuttgart fort. Am 21.01.2009 legte ich meine Prüfung zum Facharzt für Dermatologie und Venerologie ab. Seit dem 01.05.2009 bin ich als Oberarzt in der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums Stuttgart tätig.

Die Experimente der vorliegenden Dissertation wurden von 1996 bis 2002 im mikrochirurgischen Labor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie sowie im Institut für Immunologie des UK-SH (Campus Kiel) durchgeführt. Die Auswertung und Niederschrift der Ergebnisse der Arbeit waren im Dezember 2009 abgeschlossen.