

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Duale Wirkung einer Empfänger- und Spendertherapie mit dem
p75 TNFR:Fc Fusionsprotein Etanercept auf die Langzeitfunktion
marginaler Nierentransplantate im Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Fehlberg
aus Oldenburg i. O.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. J. Pratschke
 2. Priv.-Doz. Dr. C. Mönch
 3. Priv.-Doz. Dr. K. Kotsch

Datum der Promotion: 19.11. 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
1.1 Geschichte der Transplantation	5
1.2 Epidemiologie und Risiken der Transplantatfunktion	6
1.3 Chronische Abstoßung	8
1.4 Ischämie-/Reperfusionsschaden	11
1.4.1 Ischämie	11
1.4.2 Reperfusion	12
1.5 Hirntod	13
1.6 Tumornekrosefaktor-alpha	15
1.7 Nuklear Faktor-kappaB	16
1.8 Spendervorbehandlung	17
1.9 Anti-TNF-alpha-Therapie beim I/R-Schaden und bei Transplantation	18
1.9.1 TNFR:Fc Etanercept	19
2. Fragestellung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Versuchsaufbau	22
3.1.1 Gruppeneinteilung	23
3.2 Versuchstiere	24
3.2.1 Tierhaltung, Dokumentation und Kennzeichnung	24
3.2.2 Inzuchtstämme für das Fisher-344/Lewis-Modell	24
3.3 Therapie/Immunsuppressiva	25
3.3.1 TNFR:Fc Etanercept	25
3.3.2 Cyclosporin A	26
3.4 Operationsmethoden	26
3.4.1 Geräte, Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Medikamente	26
3.4.2 Anästhesie und perioperative Vorbereitung	28
3.4.3 Spendervorbehandlung und Empfängerbehandlung	29
3.4.4 Graduell induzierter Hirntod	29
3.4.5 Orthotope Nierentransplantation	30
3.4.6 Ischämie-/Reperfusionsmodell	33

3.5	Datenerhebung	34
3.5.1	Beobachtungszeitraum	34
3.5.2	Messung der Proteinurie und des Kreatininspiegels im Urin	34
3.5.3	Bestimmung des Serumkreatinins und der Kreatinin-Clearance	35
3.6	Histomorphologische Untersuchungen	35
3.7	Immunhistologische Untersuchungen	36
3.8	EMSA	37
3.9	Statistische Auswertung	38
4.	Ergebnisse	40
4.1	NTx-Modell der chronischen Abstoßung mit 4-stündiger Ischämie	40
4.1.1	Überleben	40
4.1.2	Proteinurie	41
4.1.3	Kreatinin-Clearance	42
4.1.4	Histomorphologische Untersuchungen	44
4.1.5	Immunhistologische Untersuchungen	49
4.2	NTx-Kurzzeitversuch mit graduell induziertem Hirntod	54
4.2.1	Überleben	55
4.2.2	Immunhistologische Untersuchungen	55
4.3	EMSA	58
5.	Diskussion	59
6.	Zusammenfassung	73
7.	Literaturverzeichnis	75
8.	Glossar	85
9.	Danksagung	87
10.	Lebenslauf	88
11.	Eidesstattliche Erklärung	90
12.	Publikationen	91

1. EINLEITUNG

1.1 Geschichte der Transplantation

Die Geschichte der Organtransplantation lässt sich bis auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurückdatieren (1). 1902 führte Emerich Ullmann die erste Nierentransplantation beim Hund durch. Zur selben Zeit entwickelten Alexis Carrel und Charles C. Guthrie die Technik von Gefäßnähten bei Transplantationen. 1954 gelang Joseph E. Murray am Brigham and Women's Hospital in Boston, USA, die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen; seither stehen die „Boston Twins“ als Meilenstein für die moderne klinische Organtransplantation.

Durch intensive Forschung wird die Transplantationsmedizin immer besser verstanden. Grundlagen der Transplantationsimmunologie wurden von Peter A. Gorer und George D. Snell in den 1930er Jahren entdeckt. Sie beobachteten, dass Fremdgewebe aufgrund genetischer Differenzen von Spender und Empfänger nicht angenommen wurde. Die hierfür verantwortlichen zellulären Oberflächenantigene bezeichneten sie als Major Histokompatibilitätskomplex (MHC) (2,3). Das humane Pendant des MHC, die humanen Leukozytenantigene (HLA) wurden 1958 von Jean Dausset erstmals beschrieben (4). Im Jahr 1944 prägte Sir Peter B. Medawar den Begriff der Abstoßungsreaktion, wobei er erkannte, dass es sich bei dieser Reaktion um einen Entzündungsprozess handelt (5,6).

Als Organquelle für Transplantationen dienten schon früh Organe von Verstorbenen. Nieren von hirntoten Patienten wurden nach Einführung der künstlichen Beatmung in den 1950er Jahren von belgischen und französischen Transplantateuren genutzt. Zu dieser Zeit galt das Konzept des „coma dépassé“, denn erst 1968 wurde eine Legalisierung in Form der „Harvard criteria of brain death“ erreicht. Der Begriff des „irreversiblen Komas“ wurde durch „Stillstand der Vitalfunktionen“ ersetzt und somit als ein Kriterium des Todes definiert (7). Als Definition für Hirntod gilt heute in Deutschland „ein Zustand des irreversiblen Erlöschenseins der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms. Dabei wird durch kontrollierte Beatmung die Herz-Kreislauffunktion noch künstlich aufrechterhalten.“ (8) Mit der ersten Beschreibung der mikrochirurgischen Nierentransplantation (NTx) im Rattenmodell von Benjamin F. Miller et al. 1962 (9) und der 1965 entwickelten klassischen Methode der NTx von Sun Lee (10) etablierte sich ein gängiges Modell mit weiteren Forschungsmöglichkeiten.

Die Einführung von Immunsuppressiva erbrachte erstmals eine effiziente Behandlung bei transplantierten Patienten. In den 1960er Jahren setzte man eine Kombination aus Azathioprin und Kortikosteroiden zur Therapie ein. In den 1970er und 1980er Jahren folgten Cyclosporin A und Tacrolimus (FK-506), womit eindeutig verbesserte Funktionen der Organtransplantate und somit längere Überlebenszeiten der Patienten erzielt werden konnten. Neuere Immunsuppressiva stehen mit Mycophenolat-Mofetil (CellCept) und Rapamycin (Sirolimus) zur Verfügung, und viele weitere Behandlungsoptionen befinden sich derzeit in experimentellen und klinischen Untersuchungen.

1.2 Epidemiologie und Risiken der Transplantatfunktion

Die Organtransplantation ist oftmals die letzte kurative Therapiemöglichkeit vieler Erkrankungen, und der Bedarf an Organen ist groß. Aufgrund verbesserter peri- und postoperativer Überwachungsmöglichkeiten (9-11) wird die Indikation immer großzügiger gestellt, jedoch bleibt die Spendebereitschaft der Bevölkerung gering. 2008 zeigte sich im Vergleich zum Vorjahr sogar ein Rückgang von 9% (12).

Im Falle der NTx standen 2008 10.681 Patienten bei Eurotransplant auf der Warteliste für eine „neue“ Niere, hingegen wurden nur 3.240 Transplantationen verzeichnet (13). In Deutschland wurden laut Deutscher Stiftung Organtransplantation (DSO) 2.753 Nierentransplantationen vorgenommen, während 8.473 Menschen auf eine Niere warteten. Über 3.000 neu registrierte niereninsuffiziente Patienten im Jahre 2008 und ein Rückgang der durchgeführten NTx verdeutlichen die immer weiter auseinander klaffende Schere zwischen Bedarf und Angebot (12). Um die Versorgungslücke nicht noch größer werden zu lassen, werden immer mehr Organe verminderter Qualität (Alter >60 Jahre oder >50 Jahre mit arterieller Hypertonie in der Anamnese, cerebrovasuklärer Todesursache und/oder einer terminalen Serumkreatininerhöhung >1,5mg/dl) zur Verfügung gestellt (14), was jedoch eine eingeschränkte Transplantatfunktion zur Folge hat (15).

Dennoch tragen die heutigen Behandlungsstrategien maßgeblich zu der aktuellen 1-Jahresüberlebensrate von 95% bei (13). Im Besonderen gilt dies für die Wirkung von Immunsuppressiva in der frühen Phase nach Transplantation. Akute Abstoßungs-episoden sind so meist gut beherrschbar. Jedoch muss davon ausgegangen werden,

dass subklinisch verlaufende Abstoßungsreaktionen weiterhin vorkommen und diese in Abhängigkeit von Häufigkeit und Schwere zur Entstehung von chronischen Transplantatdysfunktionen beitragen (16).

Die unbefriedigenden Langzeitergebnisse sind heute die größte Herausforderung in der Transplantationsmedizin. Die über Monate und Jahre bedingten Einbußen der Organfunktionen bedingen in vielen Fällen Retransplantationen, die wiederum die Organressourcen belasten. Laut DSO beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 84% bei Organen von Lebendspendern und 70% bei Organen von hirntoten Spendern (12). Nach 10 Jahren verschlechtert sich die Funktion des transplantierten Organs zunehmend. Nur 54,9% der Lebendspenderorgane und 42,5% der postmortal gespendeten Organe behalten ihre Funktion aufrecht (14). Die Folge ist eine Retransplantation oder wie im Falle der NTx eine erneute Dialyseabhängigkeit.

Neben dem Problem der akuten und chronischen Abstoßung wird immer deutlicher, dass spenderspezifische Risikofaktoren wie der Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) oder der Hirntod eine Erhöhung der Immunogenität mit sich bringen und einen bedeutenden Einfluss auf die Organqualität und die Abstoßungsreaktion ausüben (17,18). Die verzögerte postoperative Transplantatfunktion („delayed graft function“, DGF) ist definiert als eine transiente Unausgewogenheit zwischen der frühen Transplantatfunktion und der notwendigen physiologischen Funktion im Empfänger, was im Falle der NTx zu einer Dialysepflichtigkeit in den ersten Wochen nach Transplantation führen kann. Ursächlich ist die DGF auf den verlängerten I/R-Schaden und den dem Hirntod assoziierten Schaden zurückzuführen. Die DGF kommt mit einer Inzidenz von 20-30% vor und geht einher mit einer erhöhten Abstoßungsrate, die zu einem verringerten Überleben und zu einer schlechteren Langzeit-Transplantatfunktion beitragen kann (19-20).

Die meisten Organe werden hirntoten Patienten entnommen; in Europa stammen ca. 70% der Transplantate von verstorbenen Menschen und 30% von Lebendspendern (13). Dabei spielen auch hier die Ursache des Hirntods und die damit verbundenen Vorschädigungen der Organe eine bedeutende Rolle für die Kurzzeit- und Langzeitfunktion der Transplantate (21). Spenderorgane von jungen Menschen etwa, die an einem akuten Schädelhirntrauma verstarben, sind weniger vorgeschädigt als Organe von älteren Spendern mit einer cerebrovaskulären Todesursache.

Die Begrenzung des Ischämie-/Reperfusionsschadens besonders in Organen hirntoter Spender ist klinisch nur bedingt ausführbar. Durch sofortige Zuteilung eines Organs und

kurze Transportwege kann die kalte Ischämiezeit begrenzt werden, jedoch wird die warme Ischämie bei Ex- und Implantation bestehen bleiben. Daher steht im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten neben der Weiterentwicklung von Empfängertherapien auch die Eindämmung spenderspezifischer Risikofaktoren mit einer suffizienten Spenderbehandlung.

Allen Risikofaktoren und Abstoßungsreaktionen liegt ein Entzündungsprozess zu Grunde, in dem der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) eine Schlüsselrolle spielt. Experimentelle Daten sichern den Nachweis und die Bedeutung von TNF- α in der chronischen Abstoßung (24-28), dem Ischämie-/Reperfusionsschaden (45,46,58) und der Vorschädigung durch Hirntod (61,66,67).

1.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Transplantatabstoßung bezeichnet die immunologischen Prozesse, die über Monate bis Jahre zu einer Funktionseinbuße der Organe und somit zur chronischen Transplantatdysfunktion führen. Die histologischen Veränderungen, die der normalen Alterung sehr ähneln, werden auch als chronische Allotransplantat Nephropathie (CAN) bezeichnet. Die Beschreibung und Einteilung der Abstoßungsreaktion beruht aus historischen Gründen auf dem histopathologischen Bild und nicht auf dem zugrunde liegenden Pathomechanismus.

CAN ist durch morphologische Merkmale definiert, die durch proliferative Veränderungen und bindegewebigen Ersatz von normalen Organstrukturen zustande kommen. Hume beschrieb 1955 die für Nierentransplantate charakteristischen morphologischen Veränderungen wie zelluläre Infiltrate, Fibrose, Glomerulosklerose, tubuläre Atrophie und Arteriosklerose (22). 1997 erfolgte die Banff-Klassifikation, eine im internationalen Konsens aufgestellte histomorphologische Einteilung der Schweregrade für die akute und chronische Abstoßung (23). Funktionell ist die chronische Transplantatdysfunktion der Niere mit einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Plasmaflusses und der dadurch entstehenden Zunahme der Proteinurie und der Nierenretentionswerte gekennzeichnet.

Der Entzündungsmediator TNF- α spielt eine entscheidende Rolle in diesem Pathomechanismus (24-28). Dieser wurde traditionell als ein humorales Geschehen

angesehen, jedoch wiesen Tullius und Tilney die Wichtigkeit der zellulären Immunantwort nach und unterteilten die chronische Abstoßung in drei Phasen:

1. humorale und zelluläre Phase, 2. Ausschüttung und Wirkung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen und 3. Induktion und Wirkung von Wachstumsfaktoren. Ursächlich beruhen diese Entzündungsprozesse auf einem multifaktoriellen Geschehen, das sowohl von Alloantigen-abhängigen als auch -unabhängigen Risikofaktoren beeinflusst wird (29).

Zu den Alloantigen-abhängigen Faktoren gehört an erster Stelle die akute Abstoßung, in deren Prozess experimentell wie klinisch die Bedeutung von TNF- α mehrfach nachgewiesen wurde (30-34). TNF- α scheint in diesem Zusammenhang ein guter Prädiktor zu sein, da erhöhte Konzentrationen schon Tage vor der klinischen Manifestation bestehen (34-37). Immunsuppressiva können die akute Abstoßung weitgehend verhindern, dennoch ist zur Entstehung von Langzeitschäden von einer kontinuierlichen immunologischen Auseinandersetzung auszugehen, die im Sinne von subklinisch auftretenden akuten Abstoßungsepisoden das Transplantat schädigt (38). Dass nicht nur die Anzahl und Ausprägung akuter Abstoßungsreaktionen von Bedeutung sind, sondern auch die frühe und aggressive Behandlung eine wichtige Rolle spielt, konnten Tullius et al. in einem syngenen Rücktransplantationsmodell zeigen (26). Bis zu einem frühen Zeitpunkt waren akute morphologische und immunhistologische Veränderungen durch syngene Rücktransplantation reversibel, zu einem späteren Zeitpunkt konnte die immunologische Auseinandersetzung aber nicht mehr beeinflusst werden und mündete in progredienten Langzeitschäden.

Zu den Alloantigen-unabhängigen Risikofaktoren gehören das Alter von Spender und Empfänger, vaskuläre Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus), Infektionen und der Langzeiteinfluss von Immunsuppressiva (39). Besonders hervorzuheben sind aber der I/R-Schaden und der Hirntod, die wesentlich zu einer Schädigung beitragen (40,41). Im Sinne einer „response to injury“ lösen sie eine Immunantwort aus, die im Weiteren zu einer Transplantatdysfunktion führen kann (42). In experimentellen Untersuchungen und klinischen Studien ist die Beteiligung von TNF- α an der Langzeitschädigung mehrfach nachgewiesen worden (24-28), jedoch ist der genaue Mechanismus der TNF- α -Stimulation im renalen Abstoßungsprozess bisher nur unzureichend geklärt, insbesondere bezüglich der Entstehung einer chronischen Abstoßung.

Die spezifische Transplantatimmunantwort wird durch Aktivierung von T-Zellen eingeleitet. Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) prozessieren Fremdantigene und präsentieren diese über MHC-Klasse-I oder -II-Moleküle. Nach Bindung an die entsprechenden T-Zell-Rezeptoren von CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen und zusätzlicher simultaner Kostimulation kommt es zur Aktivierung der T-Zellen und anschließender klonaler Expansion antigenspezifischer Zellen.

Die Antigenerkennung kann auf zwei unterschiedliche Arten vermittelt werden. Die direkte Antigenpräsentation erfolgt über Spender-APZ, sogenannte passenger-Leukozyten (dendritische Zellen) oder aktivierte Endothelzellen, die zum regionalen Lymphknoten migrieren. Hierbei kommt es zur Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen, die zur Proliferation und Differenzierung (priming) der T-Zelle notwendig sind. Die „geprimten“ T-Lymphozyten können zurück im Transplantat direkt mit Spender-Antigenen in Form einer alloreaktiven Effektor-T-Zelle reagieren. Die indirekte Antigenerkennung findet über Empfänger-APZ statt, die nach Einwanderung in das Spenderorgan Fremdproteine phagozytieren und prozessieren. Das Priming findet ebenfalls im regionalen Lymphknoten statt. Während die direkte Antigenerkennung mit einer stärkeren Immunantwort in der frühen Phase der Abstoßung überwiegt, ist im Rahmen der chronischen Abstoßung die indirekte Antigenerkennung dominant. Durch indirekt geprimte T-Zellen, die zurück in das Transplantat wandern, werden Makrophagen aktiviert und führen zur Fibrosierung des Gewebes. Zusätzlich kommt es infolge der Endothelschädigung zur Aktivierung einer „Zytokin-Adhäsionskaskade“. Involviert sind u.a. IL-1, IL-6, IFN- γ und TNF- α sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (24-28,43,44). Dies führt zur Bindung von Lymphozyten an die aktivierte Endotheloberfläche und nachfolgender Transmigration ins Transplantat, was mit konsekutiver Expression von Zytokinen und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix einhergeht und eine Fibrosierung des Transplantats zur Folge hat.

TNF- α ist an der Bildung wesentlicher morphologischer Charakteristika wie der Transplantatarteriosklerose beteiligt, die durch Proliferation glatter Muskelzellen entsteht und im Falle der NTx als konzentrische Nierenarterienstenose auftritt; ebenso an der Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose, die hauptsächlich durch Makrophagen und deren Produkte wie TNF- α , IL-1 und IL-6 hervorgerufen werden (24-25,43,44).

1.4 Ischämie-/Reperfusionsschaden

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) ist nahezu unvermeidbar und nimmt als Alloantigen-unabhängiger Risikofaktor einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität des Transplantats. Morphologisch ist der I/R-Schaden charakterisiert durch Degeneration der extrazellulären Matrix, Infiltration von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie Sekretion ihrer Produkte wie beispielsweise TNF- α . Je nach Schweregrad mündet er in tubulärer Nekrose oder Apoptose (45). Klinisch sind Ischämie und Reperfusion untrennbar miteinander verbunden, dennoch handelt es sich um zwei unterschiedliche pathophysiologische Prozesse.

1.4.1 Ischämie

Im Zuge der Transplantation kommt es zu einer Unterbrechung der Blutzufuhr, die als Ischämie bezeichnet wird. Eine kalte Ischämie ist iatrogen verursacht und dient dem Organtransport. Eine warme Ischämie entsteht intraoperativ, aber auch in der Endphase des Hirntods. Zusammen führen sie zu einer grundlegenden Schädigung und zu einem massiven Zelltod. Die Kühlung der Organe dient der Herabsetzung des Stoffwechsels und minimiert Schäden, kann diese aber nicht gänzlich verhindern.

Die ischämische Schädigung im Nierengewebe betrifft vorwiegend tubuläre Epithelzellen. Die Hypoxie führt zum Verbrauch von energiereichem Adenosin-triphosphat (ATP) mit Umstellung des Metabolismus von aerob auf anaerob. Auf diesem Wege entsteht Lactatazidose, lytische Enzyme werden aktiviert, und es kommt zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen („reactiv oxygen specis“, ROS), die u.a. eine Aktivierung von NF- κ B (Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor-kappaB) und in der Folge eine gesteigerte TNF- α -Expression bewirken (46). Andererseits induziert TNF- α im Sinne einer positiven Rückkopplung wiederum die Aktivierung von NF- κ B (s.1.6).

In einem renalen I/R-Versuch konnten Dannahoo et al. sowie Li et al. zeigen, dass eine alleinige Ischämie zu einer erhöhten TNF- α -Expression und gesteigerten NF- κ B-Aktivität führt (47,48). TNF- α aktiviert Endothelzellen und steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen. Endothelzellen entwickeln darüber hinaus eine thrombogene Oberfläche, die durch veränderte Viskoelastizität von Leukozyten und durch die infolge des Zusammenbruchs von aktiven Ionen transportern mit Einstrom von Wasser

hervorgerufene Ödembildung zur Lumeneinengung führen. Diese bleibt auch nach Wiederherstellung des Blutflusses bestehen und bewirkt eine zusätzliche ischämische Schädigung.

TNF- α ist vor allem als ein proinflammatorisches und proapoptotisches Zytokin im I/R-Schaden bekannt (45), jedoch besitzt es auch eine weniger bekannte protektive Wirkung, die vornehmlich im Zusammenhang mit der Ischämie beschrieben ist. In einem Versuch mit einer TNF- α -Vorbehandlung konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber hypoxischen Schäden festgestellt werden, die mit einer anti-TNF- α -Therapie wieder aufgehoben werden konnte (49). Ebenso wurde in TNF- α -knockout-Mäusen nach myokardialer ischämischer Schädigung eine vermehrte Apoptoserate aufgezeigt und somit die benefizielle Wirkung von TNF- α unterstrichen (50).

Ursächlich hierfür wurden in mehreren Arbeiten u.a. NF- κ B induzierte antiapoptotische Gene nachgewiesen, die eine TNF- α -induzierte Apoptose verhindern können (51-56). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die Entscheidung, ob TNF- α eine schädliche oder protektive Funktion übernimmt, konzentrationsabhängig ist. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nur unzureichend erforscht (57).

1.4.2 Reperfusion

Obwohl die Reperfusion eigentlich der Reoxygenierung und Wiederherstellung des Gewebes dient, entsteht der I/R-Schaden vorrangig durch die Reperfusion, weshalb er auch als „reflow paradox“ bezeichnet wird. Es werden weiter freie Sauerstoffradikale gebildet, die unter normoxischen Bedingungen inaktiviert werden würden. Unmittelbar nach Reperfusion fehlt hierfür aber die zelluläre Kapazität, und es kann zu einer reaktiven Apoptose kommen (45, 58). Weiterhin verursacht der I/R-Schaden eine akute Inflammation, er ist aber auch nach einer relativen Phase der Ruhe durch Reexpression von Adhäsionsmolekülen, Makrophageninfiltraten und deren Produkte wie z.B. TNF- α sowie durch infiltrierende T-Zellen an den charakteristischen morphologischen Zeichen der Langzeitschädigung beteiligt (59).

TNF- α ist hierbei einer der potentesten Entzündungsmediatoren, der von Endothel- und Parenchymzellen und von infiltrierenden Makrophagen ausgeschüttet wird (45,46). Es konnte gezeigt werden, dass die Bioaktivität von TNF- α einen Höhepunkt nach 1 Stunde Ischämie gefolgt von 2 Stunden Reperfusion erreicht und mit einer direkt

zytotoxischen, aber auch vasokonstriktorischen Wirkung einhergeht. Mesangialzellen werden durch Stimulation von $\text{TNF-}\alpha$ angeregt, vasokonstriktive Mediatoren zu bilden und reduzieren somit den glomerulären Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsleistung. Eingewanderte Leukozyten bilden ROS, über die Transkriptionsfaktoren aktiviert und inflammatorische Gene exprimiert werden. ROS führen außerdem direkt zu einer Schädigung der glomerulären Barrierefunktion und damit zu einer erhöhten Albumin-Permeabilität (46).

Ebenso ist $\text{TNF-}\alpha$ an der Rekrutierung von Empfängerleukozyten wie Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen beteiligt (46). Direkt im Anschluss an die Reperfusion des ischämischen Nierengewebes produzieren spendereigene Endothel- und Parenchymzellen $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und IL-1 . Diese Zytokine aktivieren wiederum Endothel- und Parenchymzellen zur Produktion von Chemokinen, welche die Empfängerleukozyten entlang eines Gradienten aus der Blutbahn zum Ort der Entzündung locken (60). Dies geschieht in der späteren Phase der Reperfusion (innerhalb von 6-48 Stunden). Darüber hinaus induziert $\text{TNF-}\alpha$ vorab eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und Selektinen, insbesondere E- und P-Selektin, und erleichtert somit die Leukozytenmigration.

Die Reperfusionsphase bewirkt eine Erhöhung der Immunogenität der Spenderorgane, die mit einer $\text{TNF-}\alpha$ -abhängigen Induktion von MHC-Klasse-I und -II auf Endothel- und Parenchymzellen assoziiert ist (18,61). Aber auch die $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentration und Bioaktivität sowie die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität sind im Vergleich zur ischämischen Schädigung in der Reperfusionsphase deutlich erhöht und können zu einer vermehrten und aggressiveren Transplantatabstoßung führen (47,48).

1.5 Hirntod

Der hirntote Spender erleidet typischerweise ein plötzliches, irreversibles und massives zerebrales Trauma, durch das Funktion und Struktur peripherer Organe entscheidend beeinflusst werden. Der Hirntod ist zusammen mit dem I/R-Schaden ein bedeutender spenderspezifischer Alloantigen-unabhängiger Risikofaktor und führt zu vermehrten akuten Abstoßungen (62). Diese treten häufig in intensivierter und akzelerierter Form auf (63) und bedingen im Folgenden die chronische Transplantatdysfunktion (41).

Auch in klinischen Studien erwies sich, dass die erhöhte Immunogenität von hirntoten Spenderorganen im Vergleich zu Organen von Lebendspendern und unabhängig von der immunologischen Kompatibilität ein negativer Prädiktor für die Transplantatfunktion und das Überleben ist (64, 65).

Nach Einsetzen des Hirntods kommt es zu verschiedenen physiologischen und hormonellen Veränderungen wie Hypothermie, Koagulopathien, Elektrolytverschiebungen, pulmonalen Veränderungen und endokrinen/metabolischen Entgleisungen (66-68). Vor allem der mit dem Hirntod assoziierte ischämische Schaden ist pathophysiologisch ein bedeutender Faktor, der wesentlich zur Organschädigung beiträgt (68,69). Ausgelöst wird die Ischämie durch hämodynamisch instabile Verhältnisse, die bereits 1902 von Cushing beschrieben wurde („Cushing reflex“). Dieser Reflex ist definiert als schneller Anstieg des mittleren arteriellen Perfusionsdrucks (MAP) und Abfall der Herzfrequenz infolge der Erhöhung des intrakraniellen Drucks (ICP) (70).

Im Prozess des Hirntods werden zwei Phasen unterschieden. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine massive Hypertonie infolge einer lokalen oder systemischen Katecholaminausschüttung. Die sympathische Stimulation, auch als „autonomer Sturm“ bezeichnet, führt wiederum zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands und trotz des erhöhten Perfusionsdrucks zu einer Minderdurchblutung. In der zweiten normo- oder hypotensiven Phase kommt es zu einer Remission der physiologischen Veränderungen mit Abnahme der Durchblutung peripherer Organe infolge der Senkung des Herzauswurfvolumens und des Gefäßtonus.

Histomorphologisch zeigen sich auch in der Niere dem I/R-Schaden ähnliche Organveränderungen. Nach sofortigem Auftreten einer glomerulären Hyperämie mit anschließender Glomerulitis und endothelialer Proliferation sowie Periglomerulitis werden Tage danach Degeneration, Atrophie und Nekrose der tubulären Zellen sichtbar (69).

In experimentellen Tx-Versuchen konnte die erhöhte Immunogenität von hirntoten Rattentransplantaten durch eine gesteigerte Anzahl von Lymphozyten und Makrophagen und deren Produkte (diverse Interleukine, Adhäsionsmoleküle und TNF- α) sowie durch erhöhte Expression von MHC-Klasse-I und -II belegt werden (62,67). Auch in klinischen Studien konnte vor Transplantation in hirntoten Spenderorganen eine Erhöhung von Adhäsionsmolekülen, HLA-Klasse-II (71) und proinflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF- α) aufgezeigt und damit bestätigt werden, dass der Hirntod den

folgenden I/R-Schaden vergrößert (72). Ebenfalls konnte im Vergleich zu Lebendspendern eine vermehrte Apoptoserate nach I/R-Schaden aufgezeigt werden (58). Neben proapoptischen Genen konnten aber auch zytoprotektive Gene, wie z.B. die mitochondriale Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) und die Hämoxigenase-1 nachgewiesen werden (73).

In der klinischen Akutphase des Hirntods steht die Stabilisierung der Hämodynamik mit Erhalt des peripheren Gefäßwiderstandes, der kardialen Auswurfleistung und des Perfusionsdrucks zur Vermeidung ischämischer Schäden im Vordergrund. Diese Stabilisierung konnten Pratschke et al. (74) auf experimenteller Ebene mit der Methode des „graduell induzierten Hirntods“, adaptiert an das Modell von Shivalkar und Mitarbeiter, erreichen (75).

1.6 Tumornekrosefaktor-alpha

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), dessen komplette DNA in den 1980er Jahren identifiziert wurde, ist mittlerweile gut erforscht. TNF- α besteht aus drei identischen, 17kDa großen Monomeren und besitzt ein pleiotropes Wirkspektrum mit vielen schädlichen, aber auch protektiven Eigenschaften. Hierzu zählen u.a. die Zytotoxizität, induziert durch Apoptose und Nekrose, und die Beteiligung an der Immunregulation. TNF- α induziert eine Reihe wichtiger proinflammatorischer Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, Interferon beta (IFN- β), Selektine, Adhäsionsmoleküle, NF- κ B und TNF- α selbst (76). Ebenfalls wird TNF- α eine protektive Funktion über NF- κ B induzierte anti-apoptotische Gene zugeschrieben (51-56).

Produziert wird TNF- α hauptsächlich von Leukozyten wie Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, aber auch von glomerulären Mesangialzellen im Nierengewebe (46). Die intrazelluläre TNF- α -Produktion erfolgt auf verschiedenen Wegen. Beispielhaft wird die TNF- α -Geninduktion im I/R-Schaden über ROS, insbesondere Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eingeleitet, die über die direkte Aktivierung der p38 MAP-Kinase (mitogen-aktivierte Protein-Kinase) und NF- κ B zur TNF- α -Produktion führen. Im Sinne einer positiven Rückkopplung kann TNF- α die eigene Induktion über Reaktivierung von NF- κ B durch Bindung an spezifische TNF- α -Membranrezeptoren erhöhen (46,77).

Seine biologische Aktivität wird über die Bindung an zwei Zelloberflächen-Rezeptoren ausgelöst, dem TNF-Rezeptor (TNFR)-55 mit einer molekularen Masse von 55 kDa, auch TNFR1, p55 oder CD120a genannt, und dem TNFR-75 (TNFR2, p75, CD120b) mit einer Größe von 75 kDa (78). Beide TNFR spielen eine bedeutende Rolle in Abstoßungsreaktionen; TNFR-55 ist an der T-Zell-Alloreaktivität bei Abstoßungen solider Organe und des Knochenmarks beteiligt (79). TNFR-75 wurde in mehreren experimentellen und klinischen Studien der akuten und chronischen Abstoßung nachgewiesen (30,80,81).

TNFR-55 ist der dominierende Signalrezeptor, der über ein TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (TRADD) Apoptose induziert, aber auch die Apoptoseaktivität von NF- κ B vermittelt. TNFR-75 spielt eine eher untergeordnete Rolle. Er dient der Feinabstimmung, ist aber auch eigenständig zur Aktivierung von NF- κ B befähigt. Der intrazelluläre Signalmechanismus findet über TNFR-assoziierte Faktoren (TRAF1 und 2) statt, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen als heterodimerer Komplex NF- κ B aktivieren. TRAF2 ist das am besten untersuchte Adapterprotein, das direkt mit TNFR-75 interagiert, für die Bindung mit TNFR-55 jedoch zusätzlich TRADD benötigt (78). Neben der Aktivierung von NF- κ B kommt es über TRAF2 auch zur Interaktion mit zellulären Inhibitoren der Apoptose (c-IAP). Durch eine NF- κ B induzierte Überproduktion von TRAF1 und 2 zusammen mit c-IAP-1 und -2 kann es zu einer maximalen Inhibition TNF- α -induzierter Apoptose kommen (82). A20, ein Zinkfingerprotein, das über eine TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung exprimiert wird, führt im Sinne einer negativen Rückkopplung über TRAF1 und 2 zur Inhibition von NF- κ B (55).

1.7 Nuklear Faktor-kappaB (NF- κ B)

Der Nuklear Faktor-kappaB (NF- κ B) ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt ist. NF- κ B besteht aus fünf bis sieben verschiedenen Proteinen, deren gemeinsames Kennzeichen eine Proteindomäne, die Rel-Homologie-Domäne, ist. Jeweils zwei Untereinheiten können durch unterschiedliche Bindung Dimere bilden.

Eine klassische Kombination ist das Heterodimer NF- κ B1 (p50)/RelA (p65), das aufgrund der Transaktivierungsdomäne des RelA aktivierend wirkt.

In nur wenigen Zellen wie den B-Lymphozyten und den dendritischen Zellen ist NF- κ B in seiner aktiven Form im Zellkern vorhanden. Meist findet sich NF- κ B in seiner inaktiven Form an I- κ B (Inhibitor of kappaB) gebunden im Zytoplasma der Zellen. Wie bereits erwähnt kann die Aktivierung von NF- κ B z.B. durch oxidativen Stress über den p38 MAP-Kinase-Signalweg oder auch durch die Bindung von TNF- α an spezifische Rezeptoren des NF- κ Bs, eingeleitet werden (46-48). Dies bewirkt eine Aktivierung des I- κ B-Kinase-Komplexes (IKK) und die Phosphorylierung von I- κ B mit folgender Auflösung des NF- κ B/I- κ B-Komplexes. Befreites NF- κ B transloziert aus dem Zytoplasma in den Zellkern und aktiviert die Transkription verschiedener Gene. Im Sinne einer positiven Rückkopplung kann auch TNF- α produziert werden.

Die NF- κ B-Aktivität erfüllt viele Funktionen, u.a. die des intrazellulären Vermittlers der TNF- α -Bioaktivität. Hierzu zählt ebenso wie die schädigende Wirkung auch der beschriebene protektive Effekt von TNF- α . Eine proinflammatorische Beteiligung von NF- κ B ist im Rahmen des I/R-Schadens (46-48) und der Abstoßungsreaktion (83,84) nachgewiesen. NF- κ B in der bedeutenden Rolle für die benefizielle Wirkung von TNF- α (s. 1.6) führt über die Aktivierung der genannten antiapoptotischen Gene zu einer negativen Rückkopplung mit Inhibition der NF- κ B-Aktivität, was wiederum eine Hemmung der TNF- α -induzierten Apoptose zur Folge hat (51-56,82).

1.8 Spendervorbehandlung

Um akute Abstoßungsreaktionen zu vermindern und die Langzeitqualität des Transplantates zu verbessern, zielt die Spendervorbehandlung auf die Reduzierung der Schäden durch Alloantigen-unabhängige Risikofaktoren, insbesondere die des I/R-Schadens und des Hirntods, ab.

In experimentellen NTx-Untersuchungen im Rattenmodell konnte unsere Arbeitsgruppe durch Induktion der Hämoxigenase-1 im Spendertier eine eindeutige Verbesserung des Langzeitüberlebens mit Reduktion der chronischen Transplantatschädigung, assoziiert mit einer signifikanten Reduktion von TNF- α , aufzeigen (85). Unter Einbeziehung des

Spenderalters als zusätzlichen klinisch relevanten Alloantigen-unabhängigen Risikofaktor wurden in weiteren experimentellen Untersuchungen Organe alter Tiere in junge Empfängertiere transplantiert und gängige Immunsuppressiva als Vorbehandlung eingesetzt. Eine verbesserte Transplantatfunktion konnte für FK-506 (Tacrolimus) und Prednisolon gezeigt werden. Die Gabe von Steroiden führte zudem zu einer signifikant verringerten TNF- α -Konzentration im Transplantat (86).

In der klinischen Anwendung besteht insbesondere für den I/R-Schaden die Schwierigkeit, eine Vorbehandlung zu einem passenden Zeitpunkt durchzuführen. Hingegen ist die Vorbehandlung von Organen hirntoter Spender besser zu terminieren. In experimentellen NTx-Versuchen mit induziertem Hirntod konnte mit einer Steroid-Spendervorbehandlung eine Reduzierung von proinflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF- α , IL-6) auf ein Level entsprechend dem von Lebendspendern erzielt werden (87, 88). In einer klinischen Lebertransplantations-Studie (LTx) konnte mit einer Steroid-Vorbehandlung hirntoter Spender eine Verringerung akuter Abstoßungsreaktionen verbunden mit reduzierten TNF- α - und IL-6-Konzentrationen nachgewiesen werden (89). Dennoch erbrachten nicht alle Untersuchungen diese positiven Ergebnisse; so zeigt eine aktuelle klinische Studie an der Charité Berlin im Rahmen des European Senior Programms (Spender und Empfänger >65 Jahre) keine Verbesserung der Funktion von Nierentransplantaten durch eine Spendervorbehandlung mit Steroiden (Pratschke et al., Charité Berlin, unveröffentlichte Ergebnisse).

1.9 Anti-TNF- α -Therapie beim I/R-Schaden und bei Transplantation

Eine immunsuppressive Therapie durch Inhibition von TNF- α wurde bisher mehrfach zur Verbesserung des I/R-Schadens und zur Verringerung von Abstoßungsreaktionen untersucht. Als Spendervorbehandlung konnten anti-TNF- α -monoklonale Antikörper (mAb) in einem intestinalen I/R-Modell eine Verlängerung des Überlebens (90) und in einem renalen I/R-Versuch, mit Gabe kurz vor Reperfusion, eine Reduktion des Schadens erreichen (91). Erste Anwendungen von TNF- α -mAb nach Herztransplantation zeigten verlängerte Überlebensraten und eine Verminderung akuter Abstoßungen (92,93). Coito et al. konnten in einem akuten renalen Abstoßungsmodell zeigen, dass die Gabe eines neutralisierenden anti-TNF- α -Serums zu einer Reduktion

der Fibronectin-Expression und der zellulären Infiltration führte. Diese Beobachtung war mit einer verminderten TNF- α -Konzentration im Blut und im Transplantat assoziiert (94). Infliximab, ein TNF- α -mAb, der ein ähnliches Spektrum in der klinischen Anwendung wie TNFR:Fc Etanercept besitzt, wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit eingesetzt; in einem chronischen Abstoßungsmodell der Maus zeigte sich nach Aortentransplantation eine Verminderung der Arteriosklerose (95). Pentoxifyllin, ein Wirkstoff, der klinisch zur Beeinflussung der rheologischen Eigenschaften des Bluts eingesetzt wird, aber auch eine antiinflammatorische Wirkung durch Inhibition von TNF- α besitzt, konnte in einer Pilotstudie bei Patienten mit bestehender CAN eine Stabilisierung der Nierenfunktion mit vorübergehender Reduzierung der Proteinurie erreichen (96).

1.9.1 TNFR:Fc Etanercept

Etanercept, ein 75kDa TNFR:Fc Fusionsprotein (Enbrel®), ist seit dem Jahr 2000 in Deutschland zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, der polyartikulären juvenilen chronischen Arthritis und der Psoriasis Arthritis zugelassen.

Das Wirkprinzip des TNFR:Fc Etanercept ahmt die Aktivität von endogenem löslichen sTNFR („soluble“ TNFR) nach und bindet in seiner dimeren löslichen Form zwei TNF- α -Moleküle. Auf diese Weise moduliert TNFR:Fc Etanercept die TNF- α -induzierte Immunantwort durch Unterbindung der Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-1 (97). In klinischen Studien wurde TNFR:Fc Etanercept bei verschiedenen Erkrankungen wie z.B. Myasthenia gravis, M. Alzheimer und Asthma bronchiale geprüft (98-100). In Kombination mit Kortikosteroiden führte es zu einer verbesserten Graft-versus-Host-Reaktion nach Knochenmarktransplantation (101). In der EFECT-Studie (Effect of Etanercept on cardiac transplantation) konnte eine verminderte Allotransplantat-induzierte Ventrikelhypertrophie nach 6 Monaten im Vergleich zu placebotherapierten Patienten festgestellt werden (102).

Experimentelle Daten liegen in diversen Bereichen vor, so auch in der Behandlung des I/R-Schadens und der Abstoßungsreaktionen. TNFR:Fc Etanercept in einem intestinalen I/R-Versuch als Spendervorbehandlung, kurz vor Reperfusion appliziert, konnte eine signifikante Reduzierung der infiltrierenden inflammatorischen Zellen und

der Transplantatschädigung erbringen (103). In einem caninen coronaren I/R-Modell bestätigte sich die Verminderung der myokardialen Schädigung, die mit signifikanter Reduzierung der NF- κ B-Aktivität und verminderter ICAM-1-Produktion assoziiert war (104).

Nur wenige und zudem kontroverse Ergebnisse liegen bisher zu Untersuchungen im chronischen Abstoßungsmodell vor. In Kombination mit einem CD4-Antikörper konnte TNFR:Fc Etanercept als Spender- und Empfängertherapie eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der chronischen Abstoßung nach Dünndarmtransplantation zeigen (105). In einem chronischen coronaren Abstoßungsmodell konnte jedoch durch die Behandlung von TNFR:Fc Etanercept kein positiver Effekt auf das Überleben und die Entwicklung einer Arteriosklerose nachgewiesen werden (81). Bisher liegt nur eine Arbeit vor, die TNFR:Fc Etanercept im Nierentransplantationsmodell untersuchte. In dieser Studie konnten Eason et al. in einem akuten Abstoßungsmodell in Primaten eine Verbesserung des Überlebens und eine Reduzierung zytotoxischer Effektorzellen nachweisen (106).

2. FRAGESTELLUNG

Die bekannte proinflammatorische und proapoptotische Wirkung von TNF- α im Rahmen der Abstoßung nach Transplantation, im Ischämie-/Reperfusionsschaden und im Prozess des Hirntods veranlasste uns, eine anti-TNF- α -Therapie mit dem p75 TNFR:Fc Fusionsprotein Etanercept (Enbrel®) im Nierentransplantationsmodell unter den folgenden Fragestellungen zu untersuchen:

- 1) Hat eine TNFR:Fc Etanercept Empfängerbehandlung einen positiven Effekt auf die späte Abstoßungsreaktion im Lebendspendermodell mit verlängerter kalter Ischämie?
- 2) Führt eine TNFR:Fc Etanercept Spendervorbehandlung über Reduzierung der Transplantatimmunogenität zu konsekutiv verbesserten Ergebnissen?
 - im Langzeit-Lebendspendermodell mit verlängerter kalter Ischämie
 - im Hirntodmodell

Unsere Ergebnisse zeigten im Gegensatz zur Empfängerbehandlung eine unzureichende Wirkung in der Spendervorbehandlung. Dies lässt auf eine bipolare Wirkung von TNF- α mit einer protektiven und einer schädlichen Komponente schließen. Unter der Annahme, dass eine Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept auch zu einer Inhibierung der NF- κ B vermittelten Zytoprotektion von TNF- α führen kann, schlossen wir zur weiteren mechanistischen Erklärung einen I/R-Versuch ohne nachfolgende Transplantation mit der Frage an:

- 3) Hat eine vor Ischämie applizierte Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept einen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität?
 - in kalter Ischämie
 - in warmer Ischämie

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsaufbau

In einem etablierten Rattenmodell untersuchten wir die Wirkung des p75 TNFR:Fc Fusionsproteins Etanercept auf die Langzeitfunktion von Nierentransplantaten nach verlängerter kalter Ischämie (4h). Zum einem wurde eine Empfängerbehandlung 24h nach NTx zur Minderung der Immunantwort durchgeführt, zum anderen eine Spendervorbehandlung 2h vor Explantation zur Reduzierung der Vorschädigung des Transplantats. Der Beobachtungszeitraum betrug 180 Tage. Um akute Abstoßungen zu vermeiden, erhielten die transplantierten Tiere eine 10-tägige low-dose-Behandlung mit Cyclosporin A (CyA). Am 10. Tag postoperativ wurde die kontralaterale Niere nephrektomiert, um im weiteren Verlauf die Transplantatfunktion isoliert beurteilen zu können. Es wurden Daten der Überlebenszeit, der sequentiellen Funktionsanalysen (Proteinurie und Kreatinin-Clearance) und der morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen erhoben.

Zusätzlich erfolgte eine Spendervorbehandlung in einem Kurzzeitversuch im Hirntodmodell mit anschließender NTx. Die TNFR:Fc Etanercept-Applikation erfolgte während des 6-stündigen graduell induzierten Hirntods 4 Stunden vor Explantation und anschließender NTx. Nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen erfolgten immunhistologische Untersuchungen der transplantierten Nieren.

Aufgrund der von uns erlangten Ergebnisse der Spendervorbehandlung schlossen wir zur weiteren mechanistischen Erklärung die Messung der NF- κ B-Aktivität mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) in einem alleinigen Ischämie-/Reperfusionversuch an. Die Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept erfolgte 2 Stunden vor I/R-Schaden. Es wurde eine kalte und eine warme Ischämie, für jeweils 60min, mit einer 30-minütigen Reperfusionphase durchgeführt.

In den jeweiligen Versuchsgruppen dienten Tiere ohne Behandlung als Kontrolle. Alle Tiere wurden am Versuchsende getötet.

Das Projekt wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Forschungsvorhabens „Strategien zur Verbesserung der Langzeitfunktion marginaler Spenderorgane“ (TU 63/5-1,2) durchgeführt.

3.1.1 Gruppeneinteilung

Die Aufteilung der Tiere in verschiedene Versuchsgruppen erfolgte randomisiert.

Modell der chronischen Abstoßung mit 4-stündiger kalter Ischämiezeit

- Empfängerbehandlung (TNFR:Fc 24h): n = 7
Die Empfänger erhielten 24 Stunden nach Transplantation eine Behandlung mit 0,125 mg TNFR:Fc Etanercept (Enbrel®) intravenös (i.v.)
- Spendervorbehandlung (TNFR:Fc 2h): n = 7
Die Spendertiere erhielten 2 Stunden vor Explantation eine Behandlung mit 0,125 mg TNFR:Fc Etanercept (Enbrel®) i.v.
- Kontrollgruppe (Kon): n = 7
Nierentransplantierte Tiere ohne TNFR:Fc Etanercept-Behandlung

Spendervorbehandlung im Hirntodmodell

- Spendervorbehandlung (TNFR:Fc 4h): n = 4
Die Donoren erhielten eine Vorbehandlung mit 0,125 mg TNFR: Fc Etanercept (Enbrel®) i.v. 4 Stunden vor Explantation
- Kontrollgruppe (Kon BD): n = 3
Nierentransplantierte Tiere ohne TNFR:Fc Etanercept-Behandlung

Ischämie-/Reperusionsmodell zur Bestimmung der NF-kB-Aktivität

Alle Tiere erhielten 2 Stunden vor einer 60-minütigen warmen oder kalten Ischämie eine Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept (Enbrel®) i.v. mit anschließender 30-minütiger Reperusionsphase.

Warme Ischämie:

- Vorbehandlung mit 0,125 mg TNFR:Fc Etanercept (TNFR:Fc 2hw): n = 5
- Kontrollgruppe ohne Behandlung (Kon w): n = 5

Kalte Ischämie:

- Vorbehandlung mit 0,125 mg TNFR:Fc Etanercept (TNFR:Fc 2hk): n = 5
- Kontrollgruppe ohne Behandlung (Kon k): n = 5

3.2 Versuchstiere

Zur Durchführung des Versuchs wurde das Rattenmodell gewählt. Zum einen besitzen Ratten ausreichend große Gefäße für die mikrochirurgische Anastomisierung, zum anderen sind Inzuchtstämme mit definiertem genetischen Hintergrund (HLA-Antigene) verfügbar, die eine geeignete Stammkombination von Spender und Empfänger für das gewünschte Abstoßungsmodell ermöglichen. Die ausschließlich männlichen Tiere wurden von Harlan/Winkelmann, Borcheln, Deutschland bezogen. Bei der Ankunft wogen die 3 Monate alten Ratten zwischen 180 und 220g.

Für die Operationen lag eine Genehmigung des Landesamts für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit vor (G0280/01).

3.2.1 Tierhaltung, Dokumentation und Kennzeichnung

Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin in artgerechter Haltung untergebracht und versorgt. Jeweils 5 Tiere lebten in einem Makrolon Typ-4-Käfig auf feiner Holzstreu. Sie wurden mit proteinreichem Alleinfutter in Pelletform zur Rattenhaltung (ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum ernährt. Eine Raumtemperatur von $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden trugen zur Anpassung an natürliche Lebensbedingungen bei. Bevor die Tiere einer Operation unterlagen, wurde eine 1-wöchige Eingewöhnungsphase zur Vermeidung von unnötigem Stress eingehalten.

Postoperative Begutachtungen erfolgten täglich. Auf einem individuellen Dokumentationsbogen wurden Operationsverlauf, Besonderheiten und Kontrolluntersuchungen protokolliert. Eine Lochmarkierung der Ohren diente zur Identifizierung und Kennzeichnung der Gruppenzugehörigkeit.

3.2.2 Inzuchtstämme des Fisher-344/Lewis-Modell

Die Nierentransplantation im Modell Fisher-344 (F-344) nach Lewis (Lew) ist aufgrund der schwachen Histokompatibilitätsdifferenzen zur Untersuchung der chronischen Abstoßung etabliert. Es eignet sich für experimentelle Studien, da die strukturellen und funktionellen Veränderungen des Organs vergleichbar mit humanen Transplantatlangzeitschäden sind (86,107). Erstmals wurde das Modell 1968 von White und

Hildemann beschrieben (108); 1989 wurde das Modell in Japan von Tanabe et al. (109) und 1992 in den USA von Diamond et al. (107) wieder aufgenommen.

Die Unterschiede der beiden Rattenstämme befinden sich in zwei MHC-Klasse-I-Loci und mehreren „minor histocompatibility“-Komplexen. Die MHC-Klasse-I befinden sich bei der Ratte auf dem RT1.A- (MHC-Klasse-Ia) und auf dem RT1.C- (MHC-Klasse-Ib) Antigen. Die MHC-Klasse-II ist auf dem RT1.B-, D- und H-Antigen zu finden.

F-344-Ratten weisen folgende Antigenausprägung auf: RT1^{lv1} (RT1.A^l B^l C^{lv1}), RT2^a, RT3^b, RT6^b, RT8^b.

Lewis-Ratten hingegen besitzen nachstehenden Genotyp: RT1^l (RT1.A^l B^l C^l), RT2^a, RT3^a, RT6^a und RT8^b (110).

Die Spender- und Empfänger-Kombination F-344 nach Lewis unterscheidet sich u.a. in dem RT1.C (Ib)- sowie in dem RT6-Antigen. Für die Bedeutung der Immunreaktivität ist die RT1-Region besonders wichtig, da sich 80% der MHC-Klasse-I-Gene auf dem RT1.C-Lokus befinden und dieser Genlocus für die chronische Abstoßung mitverantwortlich gemacht wird (111). Das RT6-Antigen ist von besonderer Bedeutung für die Alloreaktivität der T-Zellen. Die auf dem RT6.1- und RT6.2-Antigen produzierten Genprodukte sind spezifische Marker der Subpopulationen peripherer CD4+ und CD8+ T-Zellen (112). Die Regionen RT2 und RT3 können nicht als Histokompatibilitäts-Antigene angesehen werden. Auch das RT8-Antigen scheint nur eine untergeordnete Rolle in der chronischen Transplantatabstoßung zu spielen.

Ohne eine Immunsuppression sind in anderen Arbeiten Überlebenszeiten der Tiere von 14 und $14,5 \pm 2$ Tagen beobachtet worden (26,107). Morphologisch wurden charakteristische Zeichen einer akuten Abstoßung beschrieben.

3.3 Therapie/Immunsuppressiva

3.3.1 TNFR:Fc Etanercept

Etanercept (Enbrel®, Wyeth/ Immunex Corporation, Seattle, Washington) ist eine dimere lösliche Form des p75 Tumornekrosefaktor-Rezeptors. Das Fusionsprotein besteht aus zwei extrazellulären Ligandenbindungsdomänen des humanen 75kDA schweren TNF-Rezeptors und der Fc-Region des menschlichen IgG1. Die Produktion des mittels DNA-Technologie hergestellten rekombinierten Proteins erfolgt in einer

Eierstockzelllinie des chinesischen Hamsters. Es besteht aus 934 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 150kDA. Aufgrund seiner dimeren Struktur neutralisiert Etanercept 1.000fach potenter als der monomere sTNF-Rezeptor. Die Eliminationshalbwertszeit ist wegen der Immunglobulin Fc-Region 5-mal länger als bei der natürlich vorkommenden Form der sTNF-Rezeptoren (97).

3.3.2 Cyclosporin A

Cyclosporin A (CyA) ist ein zyklisches Peptid, das durch Hemmung der Proteinphosphatase Calcineurin die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten eindämmt. Dies geschieht über negative Wirkung auf die Transkription des IL-2 Gens, welches wiederum für die T-Zell-Steuerung verantwortlich ist. CyA wird in der Klinik in Verbindung mit anderer Immunsuppressiva als Standardtherapie für transplantierte Patienten eingesetzt. In dieser Arbeit wurde ein etabliertes Modell der low-dose-Immunsuppression (1,5mg/kg/d) mit CyA über 10 Tage eingesetzt (107). Hierdurch wurde einer akuten Abstoßung vorgebeugt und die Nephrotoxizität als Nebenwirkung unterbunden, so dass die morphologischen Veränderungen auf die chronische Abstoßung zurückgeführt werden können (113).

3.4 Operationsmethoden

3.4.1 Geräte, Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Medikamente

a) Geräte

- Operationsmikroskop (Leica, M690 40fache Vergrößerung, Wetzlar, Deutschland)
- Sulla 808 Verdampfer (Fa. Dräger Werk AG, Lübeck, Deutschland)
- Narkosezylinder und Gesichtsmaske (Eigenbau)
- Kleintierwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Elektrorasierer, Heizdecke

Zusätzliche Geräte im Hirntodmodell

- Nagetier Beatmungsgerät (SAR-830/P, IITC Life Science, CA, USA)
- Nagetier Beatmungsmodell (Model 683, South Natick, Harvard Apparatus, MA, USA)
- EEG und Polygraph Datenaufnahmegerät (Model 79D, Grass Instrument, MA, USA)
- Arterieller P50 Katheter (22G, 0,9x25mm, 42ml/min; BD Venflon™Pro, Helsingborg, Sweden)
- EKG-Monitor (SIRECUST 1281, Siemens, Germany)
- Signalverstärker (Harvard Apparatus, MA, USA)
- Fogarty Embolektomie Katheter (3F-80 cm Baxter Healthcare Co., CA, USA)
- Intubationskanüle Nr. 13 (Luer Stub Adapter, Clay-Adams, Inc. NYC, NY)

b) Verbrauchsmaterialien

- zwei 20x20cm große Korkbretter
- sterile OP-Abdecktücher und Handschuhe
- unsterile Mullkompressen 10x10cm und Wattetupfer (Durchmesser 2mm)
- Venenverweilkanüle Optiva*2, 20/24G und Kanülen verschiedener Größe
- Plasma-Monovette (Li-Hep-Gel) mit Multi-Adapter
- Einmalspritzen: 1ml, 2ml, 5ml, 10ml und 20ml
- Urinbecher, steril, 50ml

c) Chirurgisches Instrumentarium

- Präparierschere BC 263 (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
- Splitterpinzette BD 577 (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
- Nadelhalter BM 13 (Codman, Norderstedt, Deutschland)
- Bauchhaken (Eigenbau)
- Einmalskalpelle Nr. 20 (Fa. Feather, Köln, Deutschland)

d) Mikrochirurgisches Instrumentarium

- Uhrmacherpinzetten, 12-414-21 (Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Castrov-Fino Nadelhalter, 20-285-14 (Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Nachstarschere, 35-840-08 (Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Gefäßclips, 4mm und 6mm (Martin, Tuttlingen, Deutschland)

e) Nahtmaterial

- Prolene blau, BV-4, 10-0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Vicryl-Viol, SH-Plus, 4-0 (Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Prolene Ligatur, Seide, 7-0 (Martin, Tuttlingen, Deutschland)

f) Medikamente, Infusionen und Lösungen

- Liquemin® N25000 (Heparin-Natrium, Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland)
- Sandimmun® (Cyclosporin A 50mg/ml, Novartis, Nürnberg, Deutschland)
- Penicillin G 5Mega (Grünenthal, Grünenthal, Deutschland)
- Fortral® (Pentazozin, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Alcon Pharma, Freiburg, Deutschland)
- Forene® (Isofluran, Abbot, Wiesbaden, Deutschland)
- 0,9% NaCl (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Via-Span®-UW-Lösung (University of Wisconsin-Solution, DuPont, Bad Homburg, Deutschland)
- Hautdesinfektionsmittel (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

3.4.2 Anästhesie und perioperative Vorbereitungen

Die Ratten wurden mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Isofluran gehört zu den Narkotika des Halothan-Typs und wirkt vermutlich über GABA-Rezeptoren. Ein niedriger Löslichkeitskoeffizient korreliert mit einem verminderten Abbau reaktiver Metabolite und führt zu sehr günstigen narkotischen Eigenschaften. Isofluran wurde mit den Trägersubstanzen O₂ und NO₂ in einen Kunststoffzylinder geleitet, bis das sich darin befindende Tier eingeschlafen war. Die Fortführung der Narkose wurde über eine Gesichtsmaske gewährleistet.

Es folgten die perioperativen Vorbereitungen mit kompletter Rasur und Desinfektion des Abdomens. In Rückenlage wurden die Tiere an den Extremitäten auf einem steril abgedecktes Korkbrett fixiert und das Abdomen mit einem sterilen Lochtuch bedeckt. Nach Abschluss des Eingriffes wurden die Tiere zum Ausgleich des Wärmeverlustes für 15-20min unter eine Wärmelampe in Einzelkäfige gelegt, wo sie 24h postoperativ verblieben. Prophylaktisch wurde eine einmalige intramuskuläre (i.m.) Gabe Penicillin G (25.000IE) und zur Analgesie Pentazocin 30mg/kg KG subcutan (s.c.) verabreicht.

Die Cornea wurde mit Dexpanthenol Augensalbe behandelt, um eine infolge des fehlenden Lidschlags mögliche Austrocknung zu verhindern.

3.4.3 Spendervorbehandlung und Empfängerbehandlung

Spendervorbehandlung

Im Modell der chronischen Abstoßung mit 4-stündiger Ischämie erfolgte die Injektion des TNFR:Fc Etanercept 2h vor Explantation der Spenderniere unter Sicht mittels eines Operationsmikroskops in die V. dorsalis profunda penis. Die anschließende Beobachtungszeit im Einzelkäfig betrug 30min, um bei eventuellen Folgeschäden schnell eingreifen zu können.

Die Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im Hirntodmodell wurde 2h nach Beginn der Induktion, entsprechend 4h vor Explantation, appliziert.

Empfängerbehandlung:

24h nach erfolgreicher NTx erfolgte die Empfängerbehandlung mit der TNFR:Fc Etanercept nach beschriebenem Prozedere.

3.4.4 Graduell induzierter Hirntod

Der graduell induzierte Hirntod wurde nach einem von Pratschke und Tilney et al. etabliertem Modell (74) durchgeführt.

Nach Narkose und Vorbereitung des Tieres, mit Rasur und Desinfektion des anterioren Halsbereiches wie unter 3.4.2 beschrieben, erfolgte die Trachektomie mit Präparation und vertikaler Spaltung der Halsmuskulatur und folgenden kurzen Schnitten, transversal und longitudinal entlang der vorderen Trachealwand. Über eine stumpf eingesetzte Kanüle mit Anschluss an das Beatmungsgerät erfolgte die mechanische Beatmung mit intermittierend positiven Drücken und einem Volumen von 2,0ml über 6 Stunden bei einer Atemfrequenz von ca. 105/min.

Zur Platzierung eines arteriellen Katheters in die A. femoralis der linken Inguinalregion wurde die Arterie vorsichtig freigelegt und am proximalen Abschnitt mit einer mikrochirurgischen Gefäßklemme okkludiert. Nach kurzer Inzision der vorderen Gefäßwand erfolgte die Einführung des Katheters. Nach Lösen der Klemme wurden dieser durch die zuvor proximal und distal um die Arterie gelegten 4/0 Ligaturen mit

jeweils 3 Knoten fixiert. Zur intraarteriellen Blutdruckmessung wurde der externe Teil des Katheters über einen Kochsalzgefüllten Schlauch an den Signalverstärker und den Blutdruckmonitor angeschlossen. Nur Tiere mit einem mittleren arteriellen Druck (MAP) >80mmHg wurden in den Versuch eingeschlossen, um durch Hypotension bedingte Schädigungen ausschließen zu können.

Zur Induktion des graduellen Hirntods wurde das Spendertier in Bauchlage auf einem Korkbrett und einer Heizdecke fixiert, um ein Verrutschen des Katheters durch mögliche tonisch-klonische Anfälle oder einen Ophistotonus zu vermeiden. Im Bereich des rechten dorsoparietalen Kopfes wurden nach Rasur, Desinfektion und Inzision der Haut die epikranialen Muskeln sowie das Periost freigelegt. Durch ein 1mm großes Bohrloch lateral der Sutura sagittales wurde ein Fogarty Katheter Nr. 3 nach intrakranial vorgeschoben und durch langsame Balloninflation mit NaCl der Hirntod induziert. Vorteil dieser graduellen Steigerung des ICP ist die längere Beibehaltung normotensiver Blutdruckwerte.

Nach Feststellung der klinischen Zeichen des Hirntods (fehlende Reflexe, beidseits maximal dilatierte Pupillen und fehlende Lichtreaktion) wurde dieser über 6 Stunden beibehalten, und es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der physiologischen Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Temperatur) und der Reflexe.

3.4.5 Orthotope Nierentransplantation

Explantation und Lagerung der linken Spenderniere

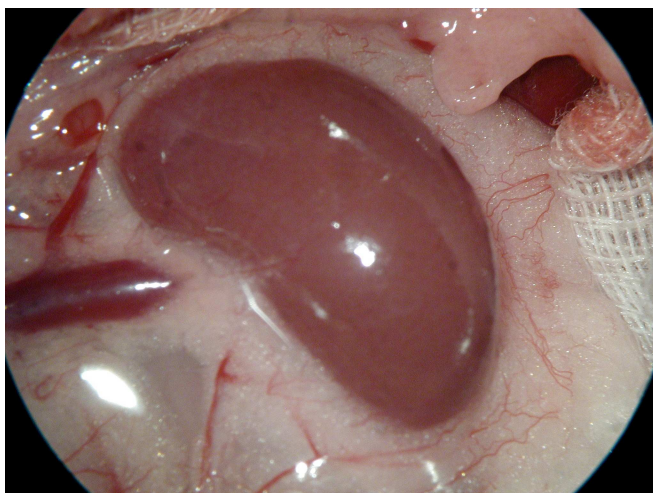


Abb. 1: exponierter Spendersitus

Mit einem medianen Schnitt vom Processus Xiphoideus bis zur Blase wurde die Bauchhöhle eröffnet. Das zur rechten Seite bewegte Darmpaket wurde in Mullkompressen eingewickelt und zum Schutz vor Auskühlung und Austrocknung dort unter Feuchthaltung mit warmer NaCl-Lösung während der gesamten Operation belassen. Nach Durchtrennung des Mesokolons mit Wattetupfern erfolgte die stumpfe Präparation der Nierengefäße aus dem Peritoneum und Fettgewebe. Danach wurden A. und V. renalis mit zwei Uhrmacherpinzetten

freipräpariert und um die hilären Gefäßverzweigung ein Rest Fett belassen. Der Ureter wurde zunächst stumpf, dann scharf präpariert und unter Belassung von etwas Fettgewebe distal abgesetzt. Eventuell mitführende Gefäße wurden ligiert, und anschließend wurde die Mobilisation der Niere durch Lösen aus ihrem Baufett vorgenommen.

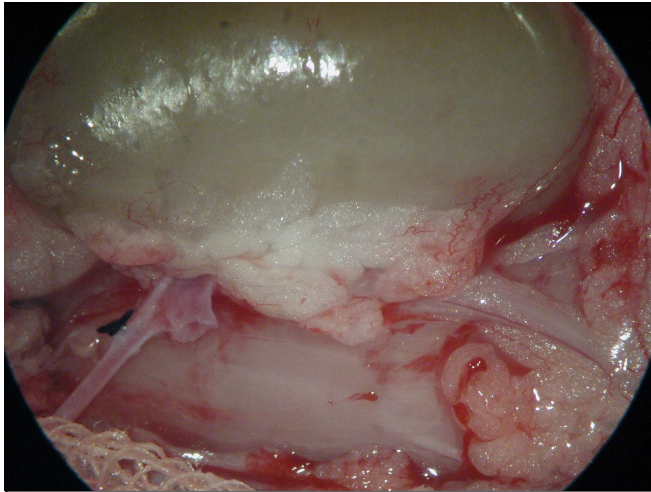


Abb. 2: perfundierte Spenderniere

Zur Perfusion wurde die Aorta abdominalis proximal und distal des Nierenarterienabgangs dargestellt und eine Venenverweilkanüle mit aufgesetzter 2ml Spritze mit UW-Lösung eingebracht. Vor Beginn der Perfusion wurden die zuvor unmittelbar subdiaphragmal um die Aorta und V. cava gelegten Ligaturen zugezogen und die V. renalis abgesetzt. Eine erfolgreiche Durch-

führung zeigte sich in einer gelb-weißlichen Färbung des Organs. Unmittelbar danach wurde die A. renalis aortennah und der Ureter auf Höhe der V. testicularis abgesetzt und das Organ entnommen. Für das Modell der chronischen Abstoßung wurde die Niere in einem mit UW-Lösung gefüllten Plastikbecher, versehen mit Datum und Uhrzeit, in einem Styroporkarton im Kühlschrank bei 4 °C für die vorgesehene kalte Ischämiezeit von 4 Stunden aufbewahrt.

Linksseitige Nephrektomie und Implantation im Empfängertier

Nach Narkotisierung des Empfängertiers wurde die linke Niere wie bei der Explantation beschrieben präpariert und mobilisiert. Nach Freilegung der Gefäße und des Ureters wurde die A. renalis mit einem 4mm Gefäßclip möglichst distal der Niere abgeklemmt. Der Blutfluss der V. renalis wurde mit einem 6mm Gefäßclip ebenfalls sehr weit distal der Niere unterbunden. Unter Beachtung von ausreichend vorhandener Gefäßwand zum Nähen erfolgte mit einer Nachstarschere das Absetzen der Gefäße. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das Gefäßende der V. renalis umgedreht auf eine Seite des Gefäßclips gelegt. Der Ureter wurde ebenfalls hilusnah durchtrennt.

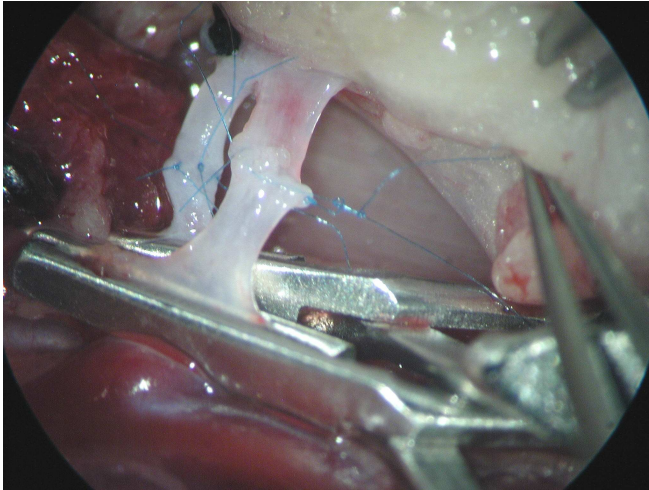


Abb. 3: Gefäßanastomosen

Direkt im Anschluss erfolgte die Implantation der Spenderniere in orthotoper Lage. Nach Zurechtlegen der jeweiligen Gefäßenden erfolgte die Anastomisierung. Zunächst wurde die Vorderwand der A. renalis mit 2 Ecknähten und folgenden 4-5 Einzelknopfnähten, dann die Rückwand End-zu-End anastomisiert. Die Anastomose der V. renalis erfolgte mit fortlaufender

Naht. 2 Eckknoten wurden so gesetzt, dass die Venenhinterwand geringgradig kürzer war als die Vorderwand und ohne Umdrehen des Gefäßes zum Nähen hervortrat. Von dem zweiten Eckknoten aus wurde der Faden durch Durchstechen des Gefäßes nach innen verbracht, um fortlaufend mit 3-4 Stichen die Rückwand bis zum Erreichen des ersten Eckknotens zu verbinden. Dort wurde das Gefäß von außen durchstoichen und die Vorderwand im selben Verfahren vernäht. Zur Vermeidung von Stenosen wurde die Vene durch vorsichtiges Ziehen an beiden Eckknoten maximal dilatiert und nachfolgend das Ende des Fadens in geringem Abstand zur Vene verknotet. Nun erfolgte das Öffnen der Gefäßklemmen, zunächst die der Arterie und dann die der Vene. Nachblutungen wurden mit einem vorsichtig angelegten Wattetupfer gestillt, größere Defekt mit hinzugefügten Nähten.

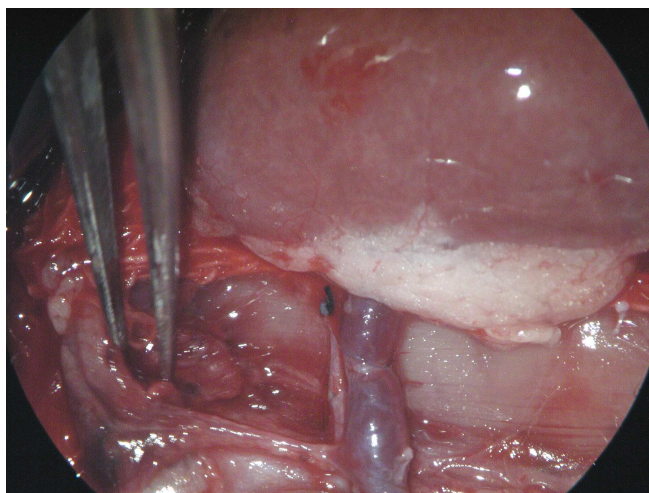


Abb. 4: Transplantat nach Reperfusion

Indikator einer erfolgreichen Reperfusion war die sofortige rot-bräunliche Färbung der Niere. Die warme Ischämiezeit betrug je nach Anatomie und Größe des Organs zwischen 30 und 45 Minuten. Die Anastomisierung des Ureters erfolgte, unter Verzicht der Ecknähte, ebenfalls mit 3-5 Einzelknopfnähten in End-zu-End Technik. Zum Abschluss wurden die Bauch-

haken und die Mullkompressen entfernt, und das Darpaket wurde wieder in die physiologische Lage gebracht. Die Muskulatur der Bauchdecke wurde mit einem 4,0 Vicryl Faden in fortlaufender Naht, die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen.

Nephrektomie der kontralateralen Niere

Mit einem minimal-invasiven Verfahren wurde am 10. Tag postoperativ die native rechte Niere entfernt. Unter Isoflurannarkose erfolgte ein kurzer abdomieller paramedianer Schnitt. Der Blick auf die Niere wurde mit feuchten Mullkompressen, die das Darmpaket und den rechten Leberlappen zur Seite drängten, freigegeben. Das Peritoneum wurde möglichst nah am Nierenhilus stumpf mit einem Wattetupfer inzidiert und die frei präparierten Gefäße und der Ureter kaudal der Niere mit einer 7-0 Ligatur abgebunden. Mit einer Nachstarschere wurden die Gefäße und Ureter abgesetzt und die Niere aus ihrer Kapsel entnommen. Nach Überprüfung der Festigkeit der Ligaturen und der Beurteilung der linken, transplantierten Niere wurden Wundhaken und Mullkompressen herausgenommen, und das Abdomen des Tieres wurde wieder verschlossen.

Probenentnahme und Tötung der Tiere

Zur Organentnahme wurden die Tiere wie beschrieben narkotisiert und der Bauchsitus freigelegt. Nach einer Gabe von 100IE Heparin i.v. erfolgte die Perfusion mit kalter NaCl Lösung und Entnahme des Transplantates wie oben beschrieben.

Die Niere wurde auf einer Petrischale transversal in fünf Scheiben geschnitten. Zwei der ca. 1cm dicken Scheiben wurden für die morphologische Begutachtung in 4% gepufferter Formalinlösung fixiert, zwei weitere wurden für die Immunhistologie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im Anschluss in einem -80 °C Kühler gelagert. Im Anschluss wurde das Tier mit einem Zwerchfellschnitt getötet.

3.4.6 Ischämie-/Reperfusionmodell

Zur Durchführung des Ischämie-/Reperusionsversuchs wurden die Operationsvorbereitungen und die Narkotisierung des Tieres sowie die Öffnung des Abdomens mit Freilegung der linken Nierengefäße wie oben beschrieben durchgeführt. Um eine komplette Unterbrechung der Blutzufuhr zu erreichen, wurde die Niere aus ihrem Baufett stumpf herausgelöst. Mit einem 4mm Gefäßclip wurde erst die A. renalis abgeklemmt; eine Grünfärbung der Niere bewies den Erfolg. Gleich darauf wurde der Rückfluss der V. renalis mit einem 6mm Gefäßclip unterbrochen. Der vorher frei präparierte Ureter wurde ebenfalls mit einer Venenklemme versehen, um den Zufluss aus periuretalen Blutgefäßen zu unterbinden.

Für den Versuch der warmen Ischämie wurde die Niere in feuchte Mullkompressen verpackt, die im Verlauf wiederholt mit warmer 0,9% NaCl Lösung beträufelt wurden. Im Modell der kalten Ischämie wurden kalte Kompressen verwendet und die Kühlung mit Eis fortgesetzt. Die Nephrektomie der kontralateralen Niere erfolgte kurz nach Beginn der Ischämiezeit und wurde wie unter 3.4.5 beschrieben durchgeführt. Für die Zeit der Ischämie wurde das Tier auf eine wohltemperierte Heizdecke gelegt, um es so vor einer Auskühlung zu schützen. Danach wurden die Wundhaken entfernt und das eröffnete Abdomen mit befeuchteten Mullkompressen abgedeckt. Nach Beendigung der 60-minütigen Ischämiezeit wurde das Tier wieder auf die Korkplatte gelagert und der Situs freigelegt. Mit Öffnen der Gefäßklemmen nahm die Niere durch die Reperfusion sofort eine rot-bräunliche-Färbung an. Die anschließende 30-minütige Reperfusion wurde zur Beobachtung genutzt, um Thrombosen zu erkennen; die Färbung der Niere diente hierbei als Indikator.

Im Anschluss wurde die Niere perfundiert, entnommen und in kleine Stücke zerteilt. Diese wurden in Kryoröhrchen bei -150 °C im Eisschrank aufbewahrt.

3.5 Datenerhebung

3.5.1 Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum betrug im Modell der chronischen Abstoßung 6 Monate (24 Wochen), im Modell der Spendervorbehandlung mit induziertem Hirntod betrug der Beobachtungszeitraum 10 Tage.

3.5.2 Messung der Proteinurie und des Kreatininspiegels im Urin

Die Bestimmung der Proteinurie und des Kreatininspiegels im Urin erfolgte im Modell der chronischen Abstoßung am Tag 14 sowie nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Monaten. Die Tiere blieben für 24h in einen metabolischen Käfig, in dem der ausgeschiedene Urin separat zum abgehenden Kot aufgefangen werden kann. Die Gesamtmenge (ml) des 24h-Sammelurins wurde vermerkt und ein Teil in Urinsticks aufgezogen und zur Analyse ins Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin gegeben. Hier wurden die Proteinkonzentration im Urin (Benzethoniumchloridreaktion; Hiatchi 911

Analyzer) und der Nierenretentionsparameter Kreatinin (modifizierte Jaffé-Reaktion) bestimmt.

3.5.3 Bestimmung des Serumkreatinins und der Kreatinin-Clearance

Zur Serumkreatininbestimmung im Modell der chronischen Abstoßung erfolgten Blutentnahmen (ca. 1ml Blut in eine Heparin-Monovette) unter Narkose aus dem jugulären Venenwinkel postoperativ nach 1, 3 und 6 Monaten. Die Bestimmung erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin nach einer modifizierten Jaffé-Reaktion.

Die Kreatinin-Clearance (Cl) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Cl (ml/min)} = \frac{\text{Urinkreatinin (mg/dl)} \times \text{Urinvolumen (ml)}}{\text{Serumkreatinin (mg/dl)} \times \text{Urinsammelzeit (min)}}$$

3.6 Histomorphologische Untersuchungen

Schnittanfertigung

Die in Formalin fixierten Nierenscheiben wurden über Nacht entwässert (Hypercenter XP, Fa. Shandon, Astorm, Runcorn, U.K.) und im Anschluss manuell in Paraffin einbettet (Einbettstation Microm, Walldorf, Deutschland). Auf einer Kühlplatte wurde das Paraffin verfestigt und im Anschluss an einem Schlittenmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) Schnitte in eine Stärke von 5µm angefertigt. Nach Auffalten der Schnitte in beheiztem destilliertem Wasser wurden sie auf Objektträgern (Superfrost Plus, Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland) fixiert.

Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Schnitte wurden in einem Paraclearbad (Xylolersatz, Quartett, Berlin, Deutschland) für 2x15min entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurde eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol, absolut vergällt, 5l, Berlin; 2x2min in 100%, 2min in 95%, 2min in 80%, 2min in 70% Alkohol) eingesetzt. Nach kurzer Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin über 20min auf einem Schüttler (Typ Harrys, 7g/l, Sigma Steinheim, Deutschland). Nach einer 5-10-minütigen Spülung mit Leitungswasser,

erfolgte die Eosin-Färbung (Sigma) über 1-2min und nachfolgend eine Spülung mit Aqua destillatum. Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe nochmals rehydriert (1min 80%, 1min 95% und 2x2min mit 100% Alkohol) und erneut für 2x15min in ein Paraclearbad gelegt.

Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung wurde zweimal ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit des Organs mit einer 200fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus, Bx 41, Fa. Serotec über Biozol, Deutschland) erhoben. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte in Anlehnung an die Banff-Klassifikation (23) durch Bewertung der tubulären Atrophie, interstitiellen Fibrose, zellulären Infiltrate und der Arterio- und Glomerulosklerose.

Der Schweregrad wurde anhand einer Skala von 0-5 eingestuft (0 = keine morphologischen Veränderungen; 5 = stärkste strukturelle Schädigung). Für die Beurteilung der Glomerulosklerose wurden alle Glomeruli im Gesichtsfeld ausgezählt und der prozentuale Anteil geschädigter/sklerosierter Glomeruli bestimmt.

3.7 Immunhistologische Untersuchungen

Anfertigung der Kryoschnitte

Die Organschnitte wurden nach der -80 °C-Lagerung in einem „tissue freezing medium“ eingebettet und manuell am Microtom in 4-5µm dicke Scheiben geschnitten. Die auf den Objektträgern platzierten Schnitte wurden für 10min in Aceton (SDS, 2,5l der Firma Peypin, France) fixiert, 24h luftgetrocknet und bis zur Färbung erneut kühl gelagert.

Immunhistologische Färbung

Die verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Sigma, die monoklonalen Antikörper von der Fa. Serotec bezogen.

Die zu färbenden Organschnitte wurden auf den Objektträgern mit einem Markierstift (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) umrandet, um ein Wegschwimmen der Antikörperlösung zu verhindern. Der Färbung ging eine Präinkubation (60min) mit einem Normal-Kaninchenserum (Kaninchen-Anti-Maus) voraus, um unspezifische Bindung und resultierende Hintergrundfärbungen zu verhindern. Als Primärantikörper (Maus-Anti-Ratte) wurden monoklonale Antikörper mit Spezifität für die Oberflächenantigene I-A

(Klon OX3; MHC-Klasse II), CD4 (Klon W3/25), ED1 (Klon ED1), CD8 (Klon OX8) sowie CD5 (Klon OX19) verwendet. Diese wurden in einer selbst hergestellten Waschpufferlösung (Tris-gepuffertes NaCl, pH 7,6) verdünnt aufgetragen und nach einer Einwirkzeit von 45min abgewaschen. Es folgte die Inkubation (45min) mit dem ebenfalls verdünnten Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-Antikörper). Nach dreimaligem Waschen wurde der APAAP-Komplex (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der Immunkomplexe (Färbungen) wurde eine Neu-Fuchsin-Substratlösung (Naphthol-AS-Biphosphat als Substrat der alkalischen Phosphatase und Neu-Fuchsin als Chromogen) verwendet, die nach Abwaschen durch Leitungswasser mit H&E gegengefärbt wurde. Die Eindecklung der Schnitte erfolgte mit Kaiser's Glyceringelantine (Merck, Darmstadt).

Auswertung

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden mindestens 15-20 Gesichtsfelder eines Schnitts unter einer 400fachen Vergrößerung ausgezählt und das arithmetische Mittel (Zellen/Gesichtsfeld) ermittelt.

3.8 EMSA

Um die Aktivierung von NF- κ B nachzuweisen, wurde die Gelshiftanalyse EMSA angewendet. Das Verfahren beruht auf der Beobachtung, dass feste Protein-DNA-Komplexe langsamer durch ein Polyacrylamid-Gel diffundieren als freie DNA-Fragmente. Hierfür wird die gewünschte DNA-Bindungssequenz (Oligonukleotide) radioaktiv markiert und mit der Proteinlösung inkubiert. Die Trennung von gebundener und ungebundener DNA erfolgt mittels Elektrophorese auf einem Polyacrylamid-Gel unter nicht denaturierten Bedingungen und die anschließende Detektion der DNA-Protein-Komplexe durch Autoradiographie.

Proteinisolierung

Die Kernextraktion aus dem Nierengewebe erfolgte in der Regel von 3×10^7 Zellen. Die Zellen wurden mit eiskühlem PBS (phosphat buffered saline) gewaschen und in 3ml eiskühlem hypotonem Puffer A (10mM hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer-Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 0,1mM ethylendiamintetraacetat-EDTA, 0.1mM

ethylene glycol tetraacetic acid-EGTA, 1mM dithiothreitol-DTT, 0,5mM phenylmethylsulfonyl fluoride-PMSF) homogenisiert. Eine Zellschwellung erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Zur Membranstabilisierung wurde 10% Triton-Puffer (Puffer A) hinzugegeben. Mit einer 10-minütigen Zentrifugation bei 15.000rpm wurden die Kerne im Sediment angereichert und abermals im Puffer A gewaschen. Zur Zellproteinextraktion wurde das Zellpellet in 100µg eisgekühltem Puffer B (20mM Hepes pH 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) aufgelöst und anschließend bei 4 °C für 30min geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen, bei 4 °C für 10min zentrifugiert und der so entstandene, Zellprotein enthaltende Überstand bei -150 °C gelagert. Durchschnittlich betrug die Proteinkonzentration der Extraktion zwischen 3 und 5µg|µl.

Radioaktive Markierung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit radioaktivem Phosphor [γ - 32] ATP (Hartmann, Braunschweig, Deutschland) und unter Zuhilfenahme eines Polynukleotidkinase Kits (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden Oligonukleotide mit der Sequenz für NF- κ B radioaktiv markiert, um später die Detektierbarkeit zu gewährleisten.

Zur Durchführung des EMSA wurden 9µg des Zellproteinextraktes mit 0,5-1,0ng radioaktiv markierter DNA (NF- κ B-Sonde) in 10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 5mM DTT, 10% Glycerol, 0,05% Nonidet P-40, 1µg poly(dI-dC)poly(dI-dC) (BandShift kit, Pharmacia LKB) bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellproteinextrakte, die vor Zugabe radioaktiver Oligonukleotiden mit einem 20-50fachen molarem Überschuss an nicht markierten Oligonukleotiden für 5min präinkubiert wurden.

Die Trennung der proteingebundenen und freien DNA erfolgte über 1 bis 2 Stunden bei einer Spannung von 200 Volt und einer Stromstärke von 35 Ampère auf einem 5%-Polyacrylamid-Gel mit TGE Puffer (40mM Tris-HCl ph 8.5, 190mM Glycin, 1mM EDTA). Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier überführt und in einem Gelrockner bei 80 °C getrocknet. Die Exposition der Filme erfolgte über Nacht bei -80 °C.

3.9 Statistische Auswertungen

Die erhobenen Daten wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben und grafisch dargestellt. Als signifikant wurden die Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit einem p-Wert $<0,05$ angesehen. Metrische, normal verteilte Daten wie die Proteinurie, die Kreatinin-Clearance und die erhobenen Zellzahlen der immunhistologischen Färbung wurden mit Hilfe des Students t-Test (ungepaart, zweiseitig) ausgewertet. Ordinal skalierte Daten wie der histologische Beurteilungsscore der chronischen Abstoßung wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Die kumulative Überlebenszeit unter Berücksichtigung der drop-outs wurde nach Kaplan-Meier dargestellt und die Signifikanz mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

4. ERGEBNISSE

Voraus ist anzumerken, dass eindeutige Nebenwirkungen von TNFR:Fc Etanercept bei keinem der behandelten Tiere beobachtet wurden.

4.1 Model der chronischen Abstoßung mit 4-stündiger kalter Ischämie

4.1.1 Überleben

Tiere, die vor Ende des Beobachtungszeitraums verstarben, wurden obduziert, um die Todesursache zu ermitteln. Die Nieren wurden in Formalin fixiert und histopathologisch, wie unter 3.6 beschrieben, untersucht, jedoch nicht in die Auswertungen mit einbezogen. Technische Fehler waren bei den Tieren anzunehmen, die bereits 1 bis 10 Tage nach Transplantation verstarben.

Zu späteren Zeitpunkten waren Entzündungen, Hydronephrosen oder Abstoßungsreaktionen ursächlich für das Versterben.

Kontrollgruppe (Kon)

In der Kontrollgruppe überlebten 5 von 7 Tieren (71%) den Beobachtungszeitraum. Ein Tier (#112) wurde an Tag 149 aufgrund eines akuten Nierenversagens infolge einer iatrogen verursachten Hydronephrose getötet. Ein anderes Tier (#108) starb an Tag 91 an den Folgen einer Peritonitis.

Spendervorbehandlung (TNFR:Fc 2h)

In der Versuchsgruppe mit TNFR:Fc Etanercept-Gabe 2h vor Explantation der Spenderniere verstarben 2 von 7 Tieren (29%). Ein Tier (#125) starb an Tag 90, ein weiteres (#122) an Tag 163. Technische Fehler als Todesursache waren auszuschließen.

Empfängerbehandlung (TNFR:Fc 24h)

In der Versuchsgruppe mit TNFR:Fc Etanercept Gabe 24h nach NTx überlebten 7 von 7 Tiere (100%) den geplanten Beobachtungszeitraum von 6 Monaten.

Die Ergebnisse sind in einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meyer in Abb. 5 dargestellt.

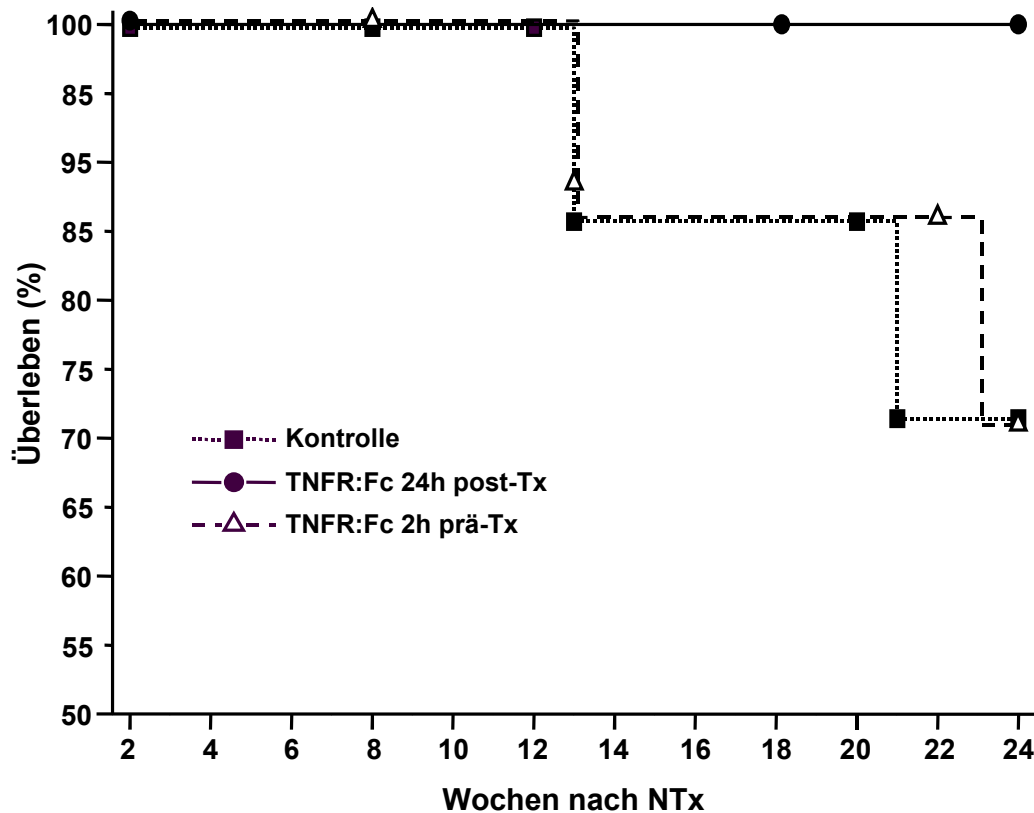


Abb. 5: kumulatives Überleben nach Kaplan-Meyer

Ergebnisse der sequentiellen Funktionsanalysen

Die folgenden Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4.1.2 Proteinurie

Die Proteinurie ist ein erster Indikator für die Reduktion der glomerulären Filtrationsleistung und dient als wichtiger Marker der chronischen Abstoßung (103).

Wie in Abb. 6 zu sehen, wiesen alle Tiere der verschiedenen Gruppen bis zur 16. Woche vergleichbare, sehr niedrige Proteinwerte auf. Erst ab diesem Zeitpunkt zeigte sich eine progrediente Funktionsverschlechterung durch Anstieg der Proteinkonzentration auf $62,9 \pm 12,7$ mg/24h in der Kontrollgruppe sowie $42,3 \pm 11,5$ mg/24h in der TNFR:Fc 2h-Gruppe (n.s.). Eine Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept bewirkte eine konstant niedrige Proteinurie über den gesamten Beobachtungszeitraum. Zum Versuchsende ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verbesserte Proteinfiltrationsleistung (Kontrolle vs. TNFR:Fc 24h, 20 Wochen: $58,1 \pm$

21,9 mg/24h vs. $14,3 \pm 1,3$ mg/24h; $p = 0,0317$; 24 Wochen: $62,9 \pm 12,7$ mg/24h vs. $25,0 \pm 4,4$ mg/24h; $p = 0,0135$).

Als Indikator für eine verminderte Transplantatfunktion erklärt die erhöhte Proteinurie der Kontroll- und spendervorbehandelten Gruppe die entsprechend geringere Überlebensrate in diesen Gruppen.

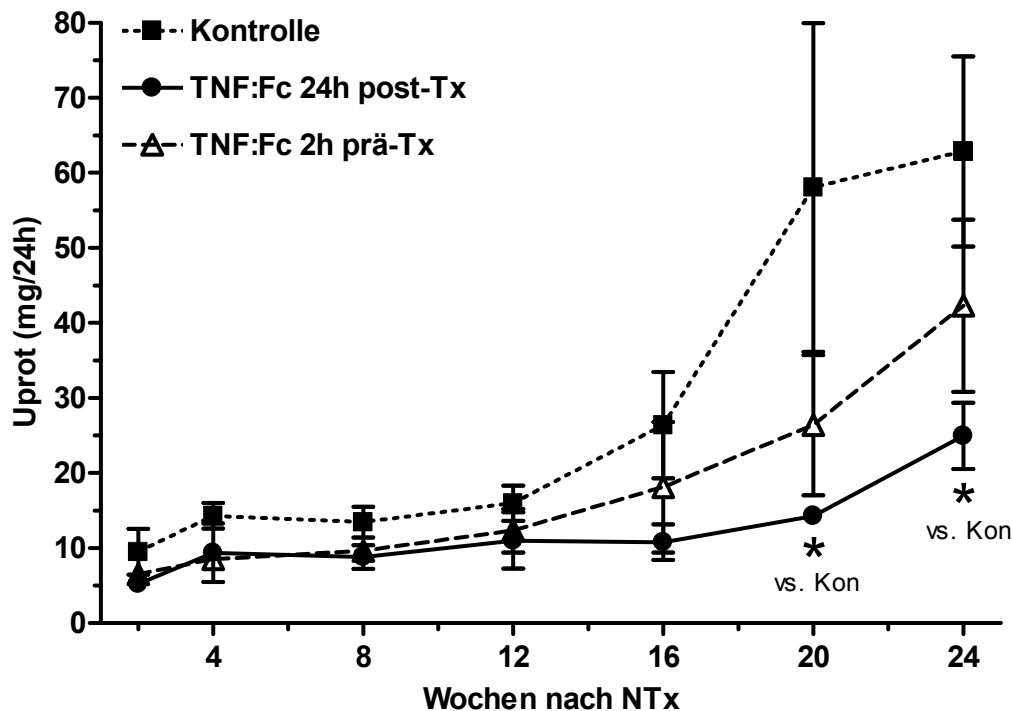


Abb. 6: Proteinurie

4.1.3 Kreatinin-Clearance

Die Kreatinin-Clearance ist zusätzlich zur Proteinurie ein weiteres Maß für die glomeruläre Filtrationsleistung.

Die Kontrollgruppe zeigte 2 Wochen nach NTx im Vergleich zu den behandelten Gruppen die niedrigste Kreatinin-Clearance (Kontrolle vs. TNFR:Fc 24h vs. TNFR:Fc 2h: $0,55 \pm 0,14$ ml/min vs. $0,79 \pm 0,20$; $p = 0,0635$; vs. $1,40 \pm 0,36$ ml/min; n.s.). Im Verlauf verbesserte sich die Nierenfunktion leicht, und die Kreatinin-Clearance stieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraums auf einen Wert von $1,10 \pm 0,27$ ml/min an.

Nach anfänglich guter Filtrationsleistung in der TNFR:Fc 2h-Gruppe (2 Wochen post NTx: $1,40 \pm 0,36$ ml/min) kam es zu einer rapiden Verschlechterung zwischen der 4. und der 12. Woche post NTx (4 Wochen: $0,80 \pm 0,06$ ml/min). Erst nach der 12. Woche verbesserte sich die Filtrationsfunktion kontinuierlich, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe am Ende des Beobachtungszeitraums (24 Wochen, Kontrolle vs. TNFR:Fc 2h: $1,08 \pm 0,26$ ml/min vs. $1,34 \pm 0,29$ ml/min; n.s.).

Entsprechend der Überlebensrate und der Proteinurie profitierte auch hier die TNFR:Fc 24h-Versuchsgruppe von der Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept. In dem Beobachtungszeitraum zeigte sich eine kontinuierlich steigende Filtrationsleistung, die am Ende in einer im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verbesserten Transplantatfunktion mündete ($1,08 \pm 0,26$ ml/min vs. $1,45 \pm 0,05$ ml/min; n.s.; Abb. 7).

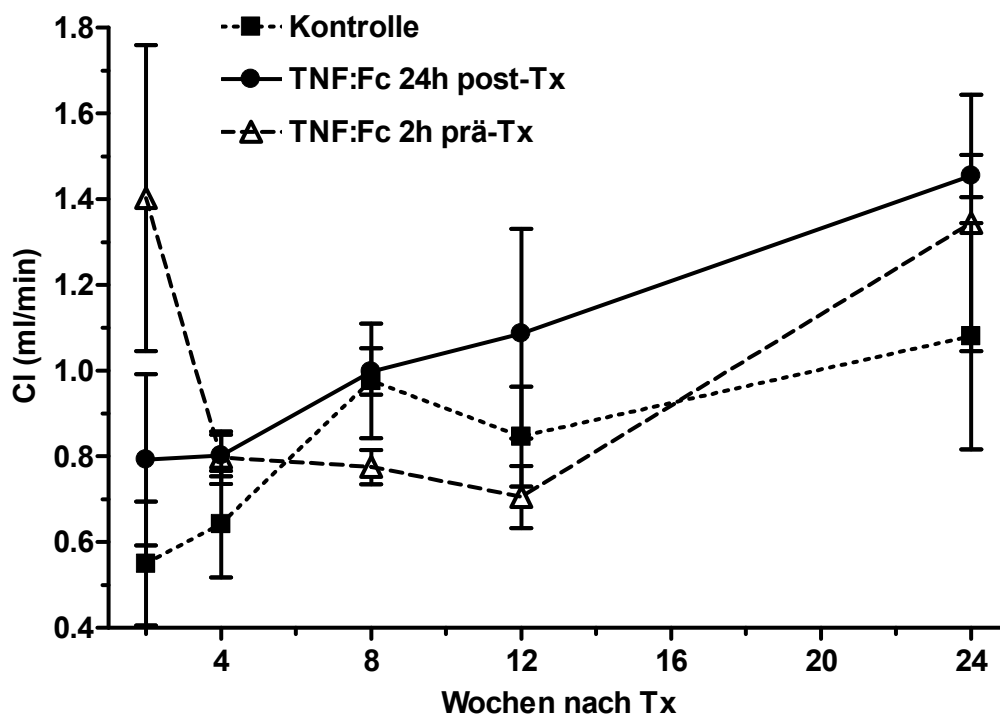


Abb. 7: Kreatinin-Clearance

4.1.4 Histomorphologische Untersuchung

Die auszuwertenden histologischen Charakteristika der chronischen Allotransplantatnephropathie umfassten die Parameter tubuläre Atrophie, zelluläre Infiltrate, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und Arteriosklerose. Zur Beurteilung der Pathomorphologie wurde der Schweregrad der chronischen Abstoßung nach der Banff-Klassifikation von 1997 herangezogen (23). Auf einer semiquantitativen Skala von 0 bis 5 wurden die Schnitte bewertet; 0 entspricht dem morphologischen Bild einer intakten Niere (Abb. 8a), 5 bezeichnet schwerste pathologische Veränderungen bis hin zur strukturellen Unkenntlichkeit (Abb. 8b).

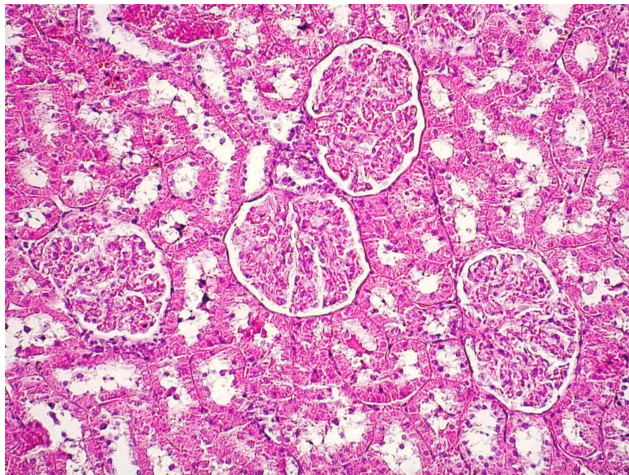


Abb. 8a: intakte Niere

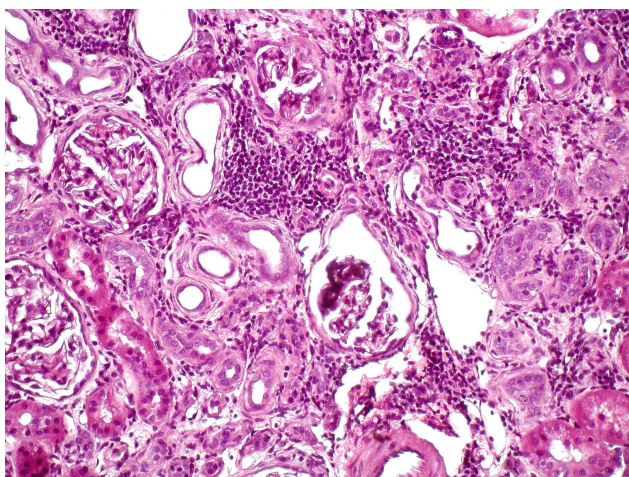


Abb. 8b: ausgeprägte strukturelle Veränderungen

Zelluläre Infiltrate

Wie in Abb. 9a zu erkennen, bewirkte eine TNFR:Fc Etanercept-Spendervorbehandlung nur eine geringfügige Reduzierung zellulärer Infiltrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,3 \pm 0,4$ vs. $1,8 \pm 0,15$; n.s.). Wie die Funktionsparameter bereits erwarten ließen, zeigte sich jedoch nach Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verringerung zellulärer Infiltrate ($0,8 \pm 0,2$ vs.; $p = 0,012$).

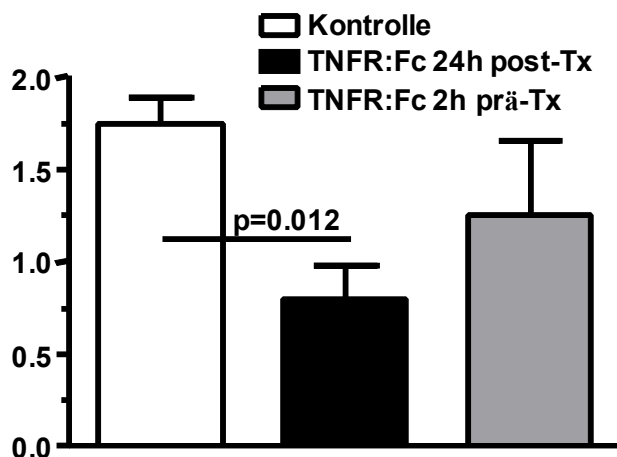


Abb. 9a: zelluläre Infiltrate

Glomerulosklerose

Zur Bestimmung des Glomerulosklerosegrades wurde die Anzahl sklerosierter/geschädigter Glomeruli als prozentualer Anteil der Gesamtzahl aller Glomeruli ermittelt. Kriterien der Glomerulosklerose im histologischen Schnitt sind die Zunahme der mesangialen Matrix, Verdickung der Bowman-Kapsel, Sklerosierung der glomerulären Kapillarschlingen und Vorhandensein rundzelliger Infiltrate.

Die Schädigung der Glomeruli war in den behandelten Spenderorganen der TNFR:Fc 2h-Tiere ähnlich ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe ($28,7\% \pm 6,9$ vs. $34,3\% \pm 3,2$; n.s.). Wieder bestätigte sich der positive Effekt der Empfängerbehandlung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Glomeruli in der TNFR:Fc 24h-Gruppe signifikant weniger sklerosiert ($22\% \pm 3,3$ vs. $34,3\% \pm 3,2$; $p = 0,049$; Abb. 9b).

Die Ergebnisse beider Gruppen korrelierten abermals mit denen der Funktionsparameter.

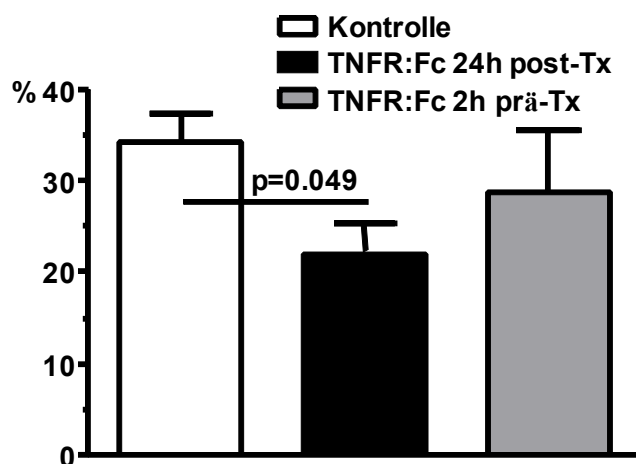


Abb. 9b: Glomerulosklerose (%)

Interstitielle Fibrose

Die Fibrose als ein Hauptmerkmal der chronischen Abstoßung konnte sowohl durch eine Spendervorbehandlung als auch durch eine Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept signifikant reduziert werden (Kontrolle vs. TNFR:Fc 2h: $0,7 \pm 0,2$ vs. $1,5 \pm 0,3$; $p = 0,049$; vs. TNFR:Fc 24h: $0,6 \pm 0,06$ vs.; $p = 0,007$; Abb. 9c).

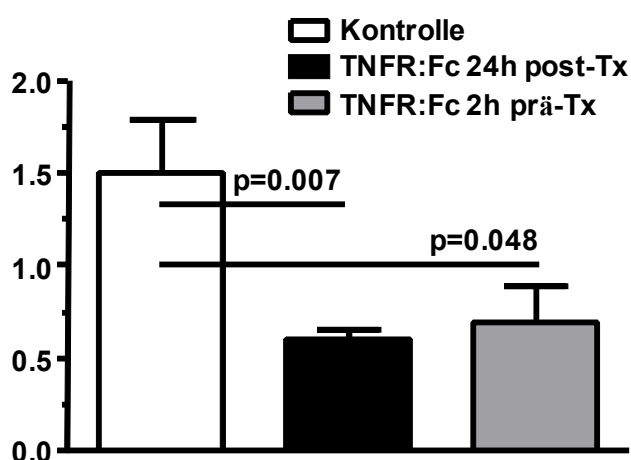


Abb. 9c: interstitielle Fibrose

Arteriosklerose

Die Arteriosklerose zählt ebenfalls zu den typischen Merkmalen der Langzeitschädigung von Transplantaten. Die durch die chronische Abstoßung hervorgerufene vaskuläre Veränderung wurde anhand der fibrösen Verdickung der Intima und der konzentrischen Verengung des Gefäßlumens bewertet. Wie zu erwarten, zeigte sich in der TNFR:Fc 24h-Gruppe eine deutlich reduzierte Schädigung ($2,0 \pm 0,5$ v.s. $3,0 \pm 0,0$; n.s.), jedoch ohne statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontroll-

gruppe. Kaum ein schützender Effekt konnte in der TNFR:Fc 2h-Gruppe beobachtet werden. Die pathologisch veränderten Gefäße wiesen einen nur geringen Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($2,5 \pm 0,3$ vs. $3,0 \pm 0,0$; n.s.; Abb. 9d).

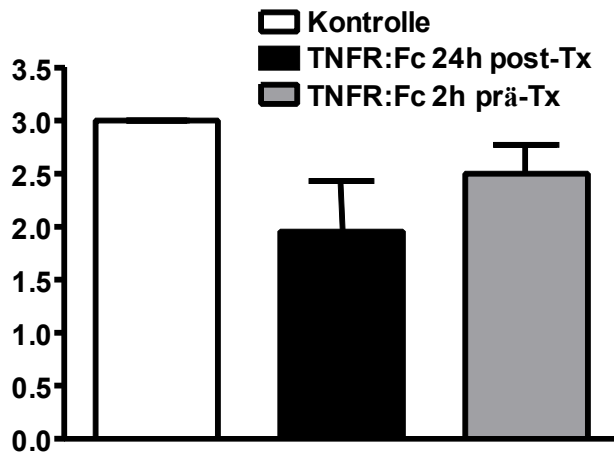


Abb. 9d: Arteriosklerose

Tubuläre Atrophie

Die tubuläre Atrophie war das einzige morphologische Charakteristikum, das nur in der spendervorbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung erkennen ließ ($1,2 \pm 0,4$ vs. $2,7 \pm 0,3$; $p = 0,039$). Zwar war auch hier die Ausprägung der tubulären Schädigung in der TNFR:Fc 24h-Gruppe deutlich geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2 \pm 0,5$ vs. $2,7 \pm 0,5$; n.s. Abb. 9e), erreichte jedoch keinen signifikanten Unterschied.

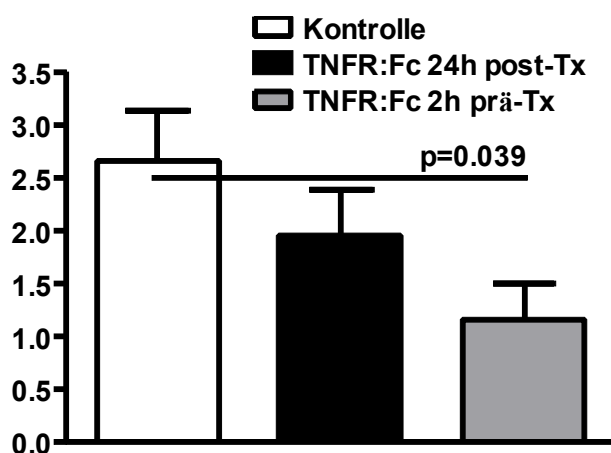
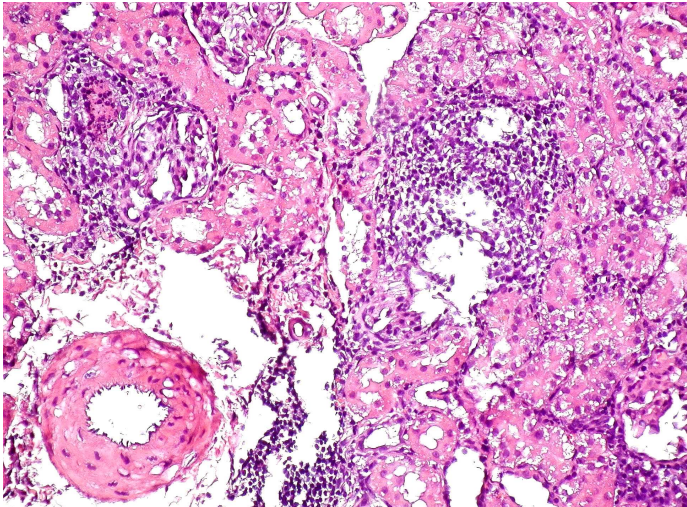
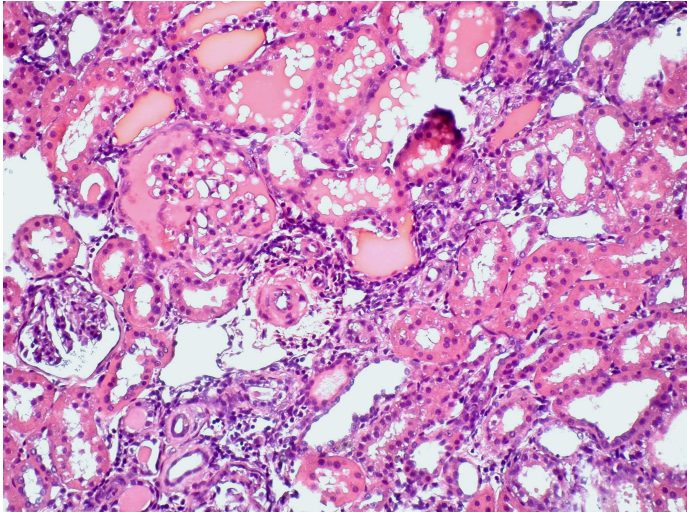


Abb. 9e: tubuläre Atrophie

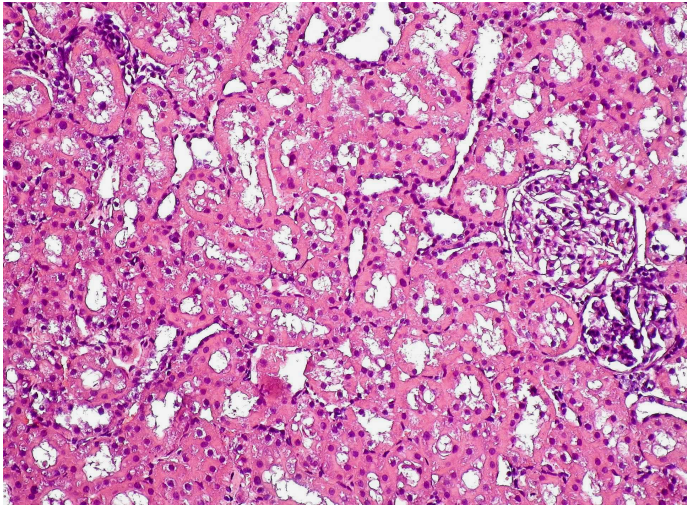
Die Abb. 10a-c zeigen repräsentative H&E-Färbungen der Paraffinschnitte.



a: Kontrolle



b: TNFR:Fc 2h



c: TNFR:Fc 24h

Abb. 10a-c: Histomorphologie/H&E-Färbungen der Paraffinschnitte (200x)

4.1.5 Immunhistologische Untersuchungen

Zur Differenzierung infiltrierender Leukozyten wurden die Gefrierschnitte der Transplantate mit monoklonalen Antikörpern im APAAP-Verfahren gefärbt. Hierfür wurden Antikörper gegen folgende Antigene verwendet:

CD4	Antigen CD4+ T-Helferzellen
CD8	Antigen zytotoxischer T-Zellen
CD5	Antigen T-Lymphozyten und B-1 Zellen
ED1	Antigen Monozyten/Makrophagen
OX3	MHC-Klasse-II-Molekül exprimiert auf antigenpräsentierenden Zellen

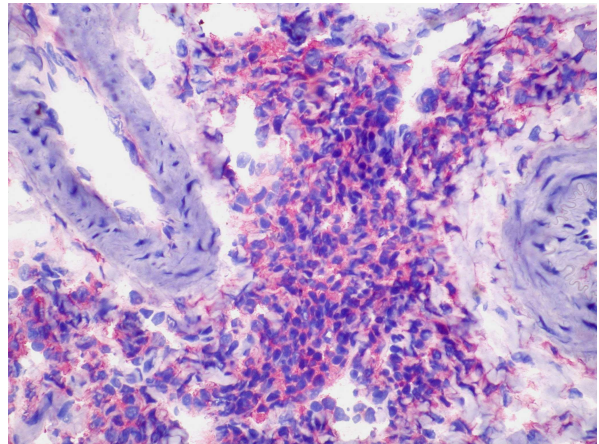
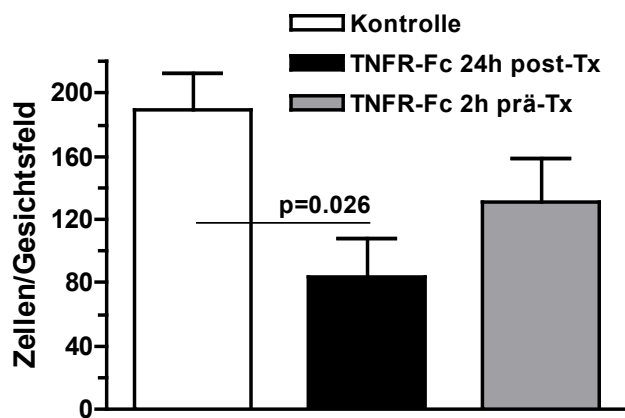
Die Anzahl der spezifisch angefärbten Zellen wurde lichtmikroskopisch ermittelt. Die Auswertung erfolgte verblindet. Mindestens 20 Gesichtsfelder pro Schnitt wurden ausgezählt und im Anschluss das arithmetische Mittel gebildet. Die Ergebnisse der Auszählungen sind in den Abb. 11a, 12a, 13a, 14a und 15a in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Abb. 11b-d bis 15b-d zeigen repräsentative Aufnahmen der APAAP-Färbungen.

MHC-Klasse-II-Expression

Die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf transplantatinfiltrierenden Zellen wird durch zahlreiche Mediatoren wie z.B. proinflammatorische Zytokine reguliert und ist während des chronischen Transplantatversagens auf antigenpräsentierenden Zellen deutlich erhöht.

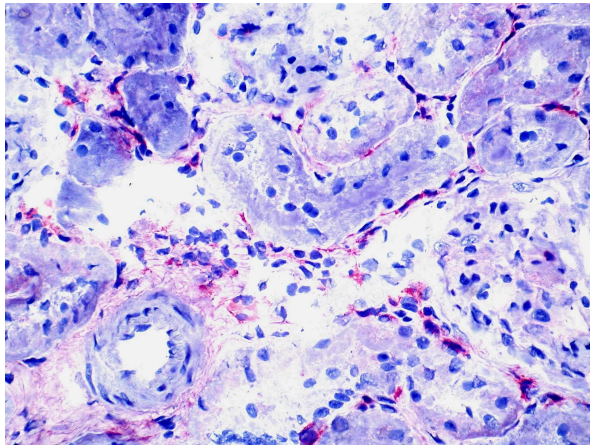
Die Gruppe der spendenvorbehandelten Tiere zeigte keine statistisch signifikante Verminderung der MHC-Klasse-II-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($131,5 \pm 27,5$ vs. $189 \pm 23,4$ Zellen/Gesichtsfeld; n.s.). Hingegen führte eine Empfängertherapie mit TNFR:Fc Etanercept zu einer signifikant reduzierten Anzahl MHC-Klasse-II exprimierender Zellen im Transplantat ($84 \pm 23,6$ vs. $189 \pm 23,4$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,026$; Abb. 11a-d).

MHC-Klasse-II

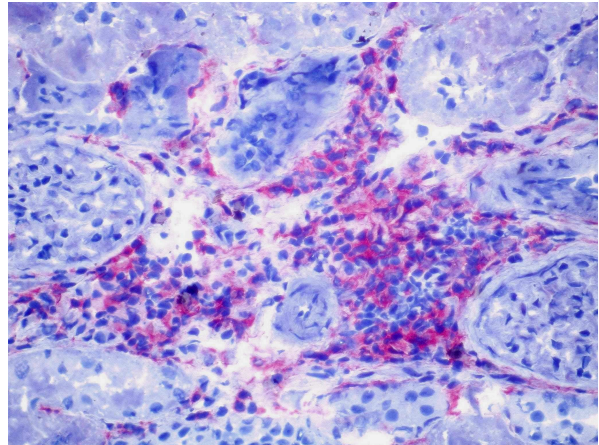


a: quantitative Bestimmung

b: Kontrolle, APAAP-Färbung (400x)



c: TNFR:Fc 24h, APAAP-Färbung (400x)



d: TNFR:Fc 2h, APAAP-Färbung (400x)

Abb. 11a-d: Immunhistologie/MHC-Klasse-II-Expression (400x)

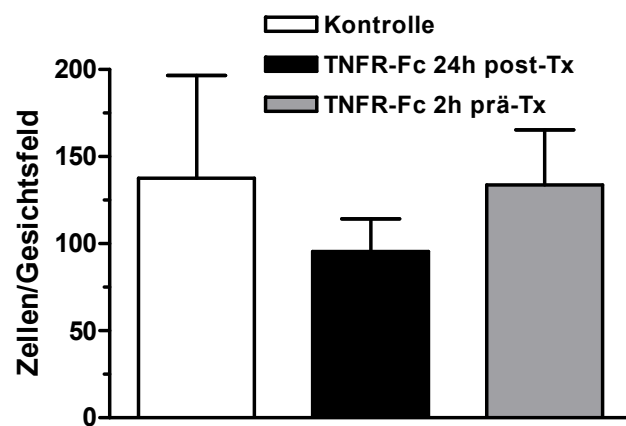
T-Zellen und Monozyten

In der akuten und frühen Phase der chronischen Abstoßung finden sich im zellulären Infiltrat zahlreiche T-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen, die maßgeblich an der Generierung der Intimaproliferation und dem fibrotischen Gewebeumbau und somit an der Entstehung der chronischen Allotransplantatnephropathie beteiligt sind. Es wurden daher monoklonale Antikörper mit Spezifität für CD4+ T-Helferzellen, zytotoxische CD8+ T-Zellen sowie ED1+ Monozyten/Makrophagen in der immunhistochemischen Färbung eingesetzt.

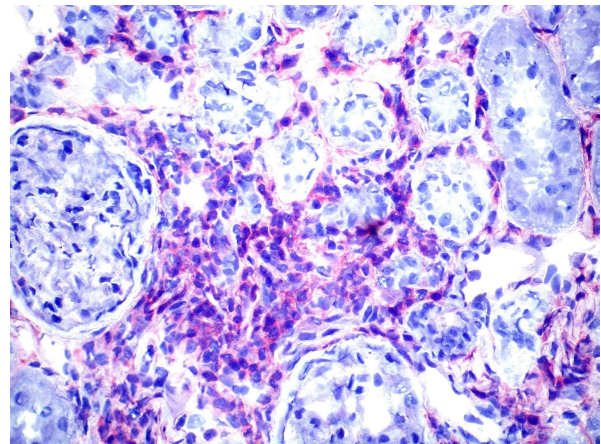
CD4+ T-Helferzellen

Den Vorergebnissen entsprechend profitierte die TNFR:Fc 24h-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe von der Behandlung mit TNFR:Fc Etanercept. Die Anzahl der CD4+ T-Zellen war deutlich reduziert, der Unterschied erreichte jedoch keine statische Signifikanz (TNFR:Fc 24h vs. Kontrolle: $95,4 \pm 19$ vs. $137,5 \pm 59,1$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,4307$; n.s.). Die Zahl CD4+ T-Zellen in der TNFR:Fc 2h-Gruppe war mit $133,8 \pm 31,6$ Zellen/Gesichtsfeld mit der Kontrollgruppe vergleichbar (n.s.; Abb. 12a-d).

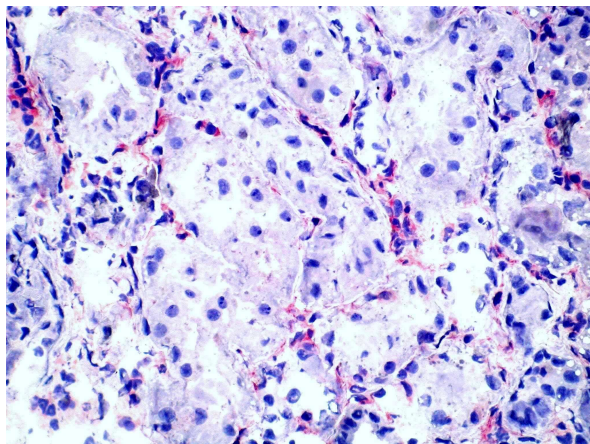
CD4+



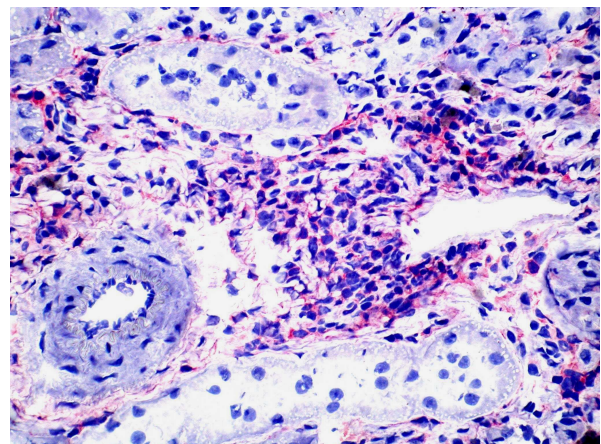
a: quantitative Bestimmung



b: Kontrolle, APAAP-Färbung (400x)



c: TNFR:Fc 24h, APAAP-Färbung (400x)



d: TNFR:Fc 2h, APAAP-Färbung (400x)

Abb. 12a-d: Immunhistologie/CD4+ T-Zellen (400x)

CD8+ zytotoxische T-Zellen

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen behandelte Gruppen niedrigere Zellzahlen auf. Eine Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept bewirkte eine Verminderung CD8+ T-Zellen im Infiltrat (TNFR:Fc 2h vs. Kontrolle: $36,5 \pm 10,3$ vs. $59,9 \pm 6,4$

Zellen/Gesichtsfeld; n.s.), jedoch zeigte sich auch hier nur nach Empfängerbehandlung eine signifikante Reduktion (TNFR:Fc 24h vs. Kontrolle: $34,1 \pm 6,6$ vs. $59,9 \pm 6,4$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,041$; Abb. 13a-d).

CD8+

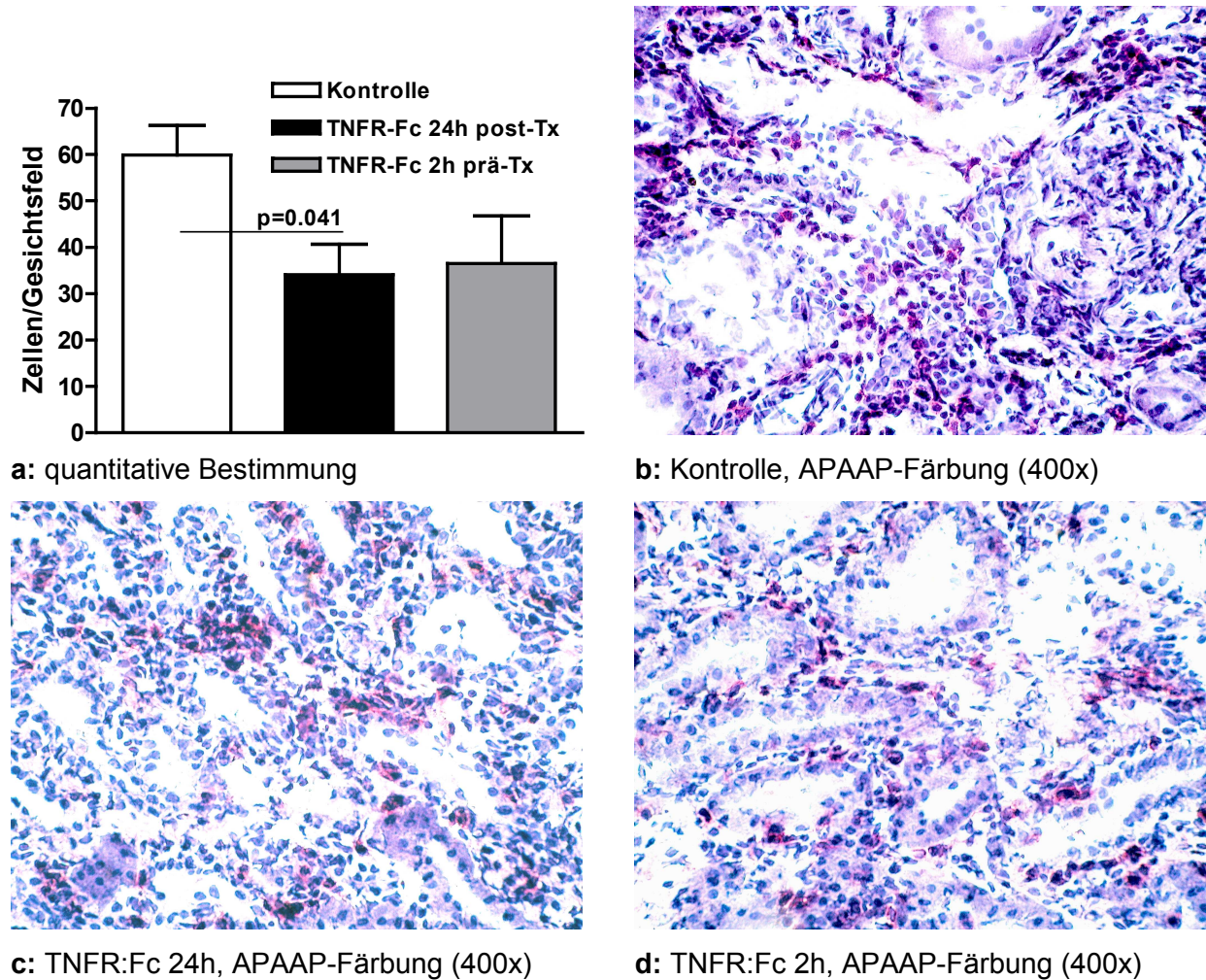
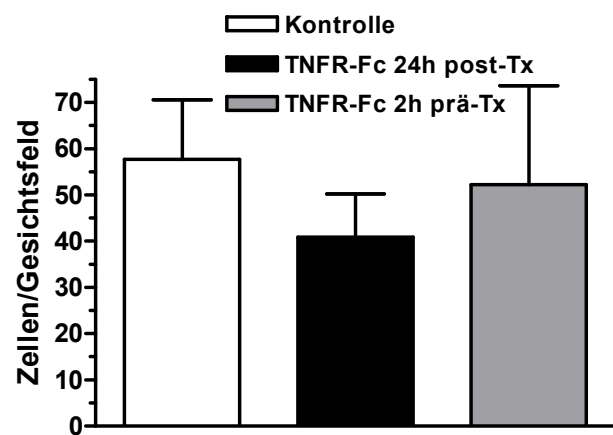


Abb. 13a-d: Immunhistologie/CD8+ T-Zellen (400x)

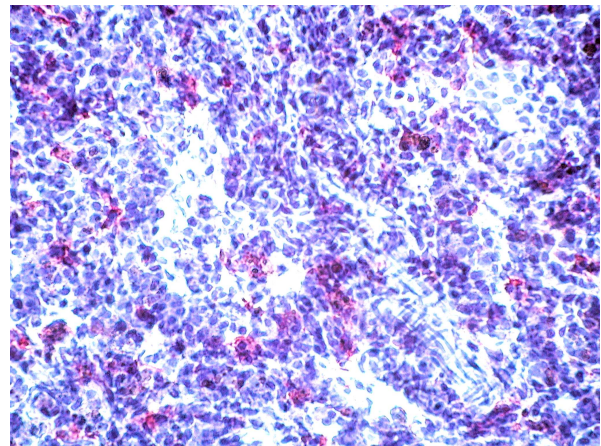
ED1+ Monozyten/ Makrophagen

Auch hinsichtlich der Anzahl ED1+ Monozyten/Makrophagen zeigte sich der positive Effekt einer Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept. In dieser Gruppe war die Anzahl der ED1+ Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe sowie zur spender-vorbehandelten Gruppe deutlich verringert (TNFR:Fc 24h vs. Kontrolle, vs. TNFR:Fc 2h: $40,92 \pm 9,3$ vs. $57,7 \pm 12,9$, vs. $52,2 \pm 21,4$ Zellen/Gesichtsfeld; n.s.; Abb. 14a-d).

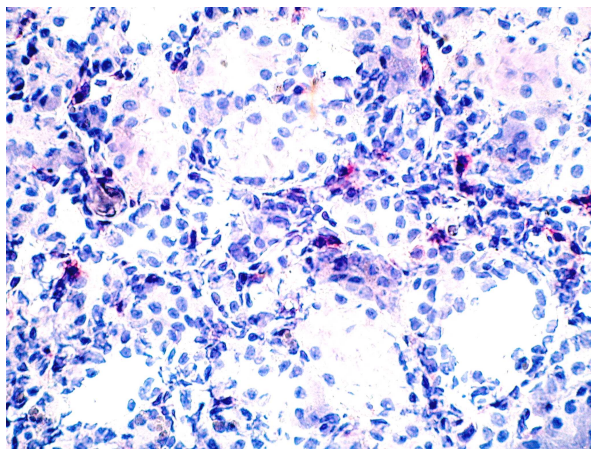
ED1+



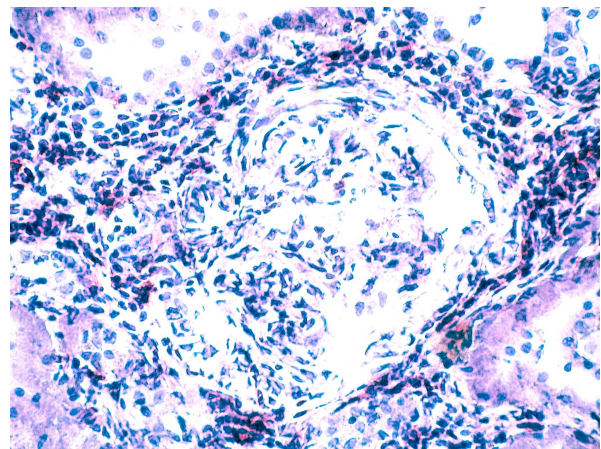
a: quantitative Bestimmung



b: Kontrolle, APAAP-Färbung (400x)



c: TNFR:Fc 24h, APAAP-Färbung (400x)



d: TNFR:Fc 2h, APAAP-Färbung (400x)

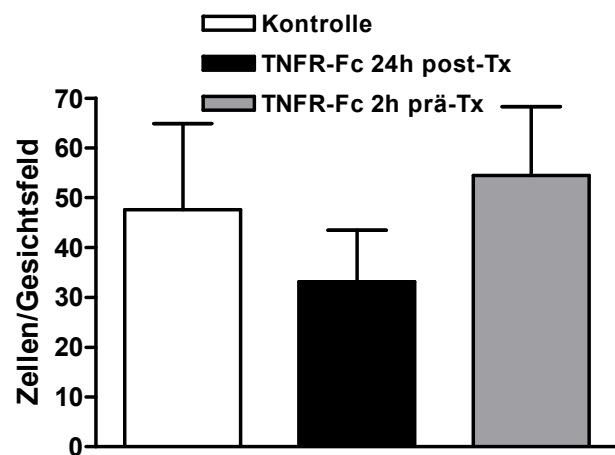
Abb. 14a-d: Immunhistologie/ED1+ Monozyten/Makrophagen (400x)

CD5+ T-/B-Zellen

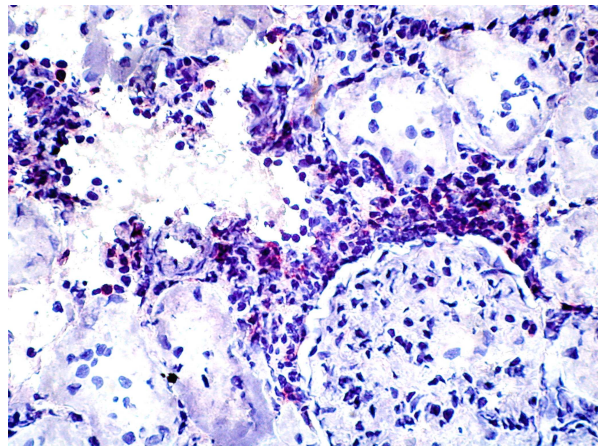
Der Oberflächenmarker CD5 wurde auf aktivierten T-Zellen sowie auf einer Subpopulation IgM-produzierender B-Zellen (B-1 Zellen) exprimiert.

Die höchste Anzahl CD5+ Zellen wurde in der TNFR:Fc 2h-Gruppe ermittelt, gefolgt von der Kontrollgruppe ($54,5 \pm 13,9$ vs. $47,6 \pm 17,3$ Zellen/Gesichtsfeld; n.s.). Die geringste Anzahl CD5+ Zellen wurde in der TNFR:Fc 24h-Gruppe gezählt ($33,1 \pm 10,4$ Zellen/Gesichtsfeld, n.s.; Abb.15 a-d).

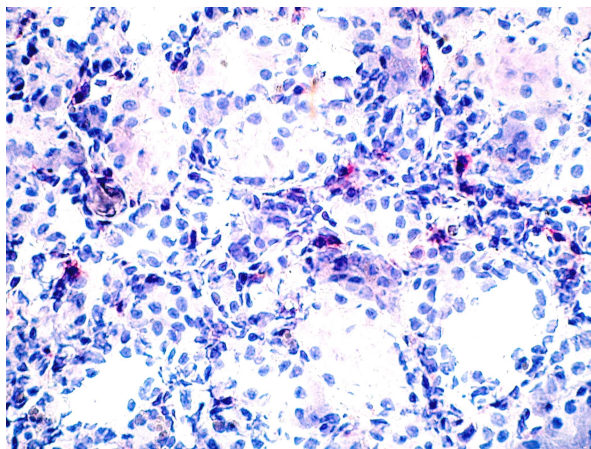
CD5+



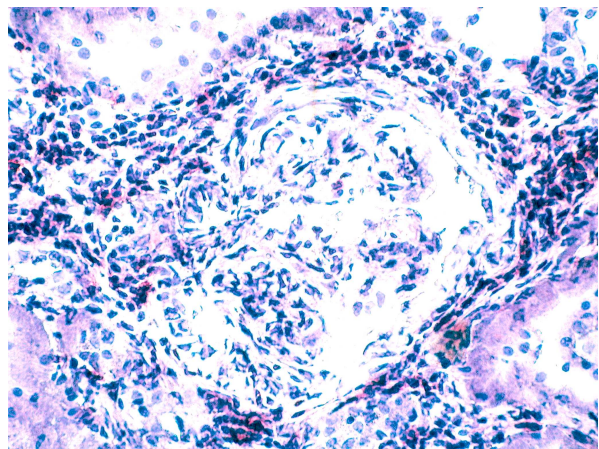
a: quantitative Bestimmung



b: Kontrolle, APAAP-Färbung (400x)



c: TNFR:Fc 24h, APAAP-Färbung (400x)



d: TNFR:Fc 2h, APAAP-Färbung (400x)

Abb. 15a-d: Immunhistologie/CD5+ T-/B-Zellen (400x)

4.2 NTx-Kurzzeitversuch mit graduell induziertem Hirntod

In diesem Versuchsmodell wurde aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums auf die sequentiellen Untersuchungen der Nierenretentionsparameter wie Proteinurie und Kreatinin-Clearance verzichtet. Die Transplantatimmunogenität von Organen hirntoter Spender nach einer Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept (TNFR:Fc 4h) erfolgte mittels immunohistochemischer Bestimmung transplantatinfiltrierender Zellen.

4.2.1 Überleben

Alle Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen, die transplantierte Niere wurde am Versuchsende entnommen, und es wurden Gefrierschnitte für die immunhistologischen Untersuchungen angefertigt.

4.2.2 Immunhistologische Untersuchung

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper und Verfahrensweise wie im Modell der chronischen Abstoßung.

Insgesamt zeigten Transplantate hirntoter Spendertiere eine deutlich höhere Immunogenität im Vergleich zu Organen von Lebendspendern. Die Anzahl transplantatinfiltrierender Zellen lag in der frühen Phase der Abstoßung in Folge der Hirntodinduktion im Spendertier um ein Vielfaches höher als in Transplantaten des chronischen Modells.

MHC-Klasse-II-Expression

Nach Transplantation von Nieren hirntoter Spender zeigte sich eine stark ausgeprägte MHC-Klasse-II-Expression, die sogar eine signifikante Vermehrung nach Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigte (Kontrolle vs. TNFR:Fc 4h: $378,24 \pm 46,34$ vs. $749,35 \pm 22,53$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,0005$; Abb. 16).

MHC-Klasse-II

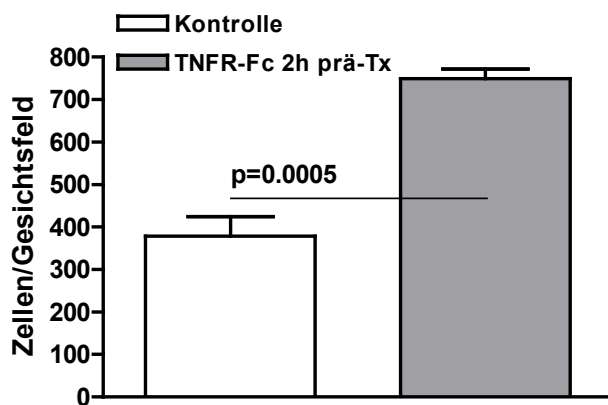


Abb. 16: Immunhistologie/MHC-Klasse-II-Expression

CD4+ T-Zellen

Ebenfalls war die Anzahl CD4+ T-Zellen nach Spendervorbehandlung gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle vs. TNFR:Fc 4h: $383,46 \pm 23,07$ vs. $692,71 \pm 38,95$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,002$; Abb. 17).

CD4+

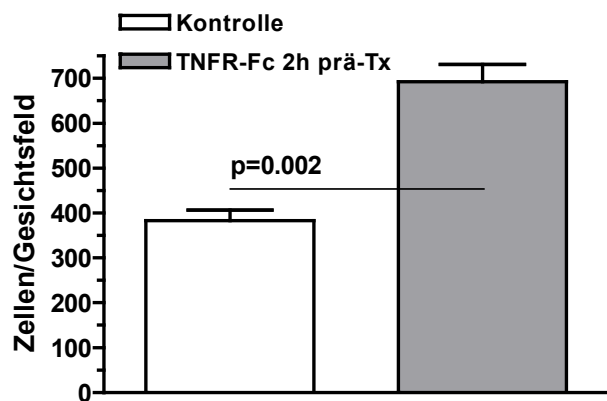


Abb. 17: Immunhistologie/CD4+ T-Zellen

CD8+ T-Zellen

Für die zytotoxischen CD8+ T-Zellen konnte nach Spendervorbehandlung kein Unterschied zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Kontrolle vs. TNFR:Fc 4h: $354,84 \pm 12,29$ vs. $355,16 \pm 30,93$ Zellen/Gesichtsfeld, n.s.; Abb. 18).

CD8+

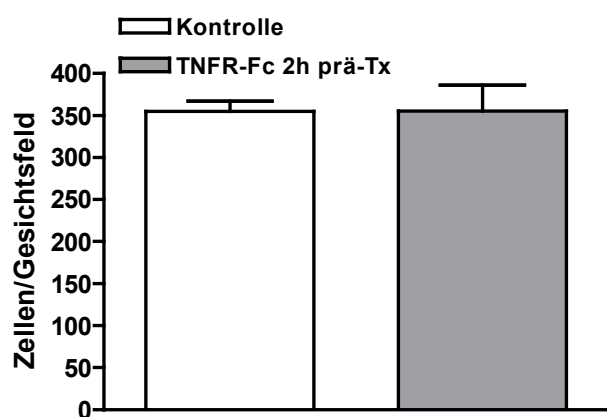


Abb. 18: Immunhistologie/CD8+ T-Zellen

ED1+Monozyten/ Makrophagen

Nach Auszählung der infiltrierenden Monozyten/Makrophagen zeigte sich eine deutlich erhöhte, wenn auch nicht signifikante Anzahl von ED1+ Zellen in spender-vorbehandelten Nieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle vs. TNFR:Fc 4h: $455,62 \pm 36,62$ vs. $608,53 \pm 60,20$ Zellen/Gesichtsfeld; n.s.; Abb. 19).

ED1+

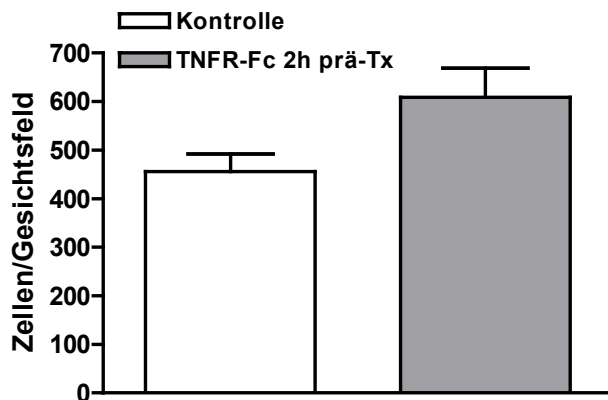


Abb. 19: Immunhistologie/ED1+ Monozyten/Makrophagen

CD5+ T- und B-Zellen

Die Zahl der CD5+ T- und B-Zellen war entsprechend den Ergebnissen der anderen Oberflächenmarker in der TNFR:Fc 4h-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle vs. TNFR:Fc 4h: $49,40 \pm 10,91$ vs. $98,03 \pm 9,33$ Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,0194$; Abb. 20).

CD5+

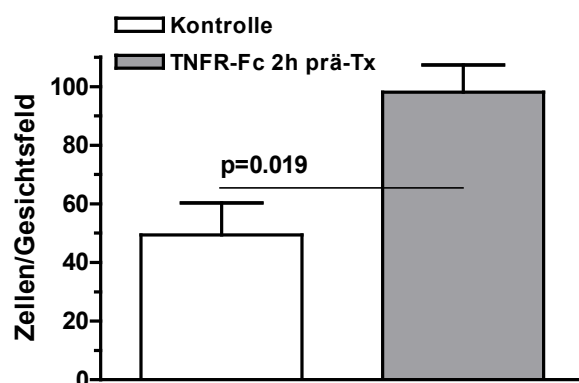


Abb. 20: Immunhistologie/CD5+ T-/B-Zellen

4.3 EMSA

Zur mechanistischen Erklärung unserer Hypothese der NF- κ B induzierten protektiven Wirkung von TNF- α bzw. der potentiell schädlichen Wirkung von TNFR:Fc Etanercept als Spendervorbehandlung wurde die Aktivität von NF- κ B nach Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept in einem I/R-Versuch ohne anschließende NTx mittels EMSA bestimmt. In Hinblick auf die klinische Relevanz erfolgte die Bestimmung nach warmer sowie kalter Ischämie.

Interessanterweise wirkte die Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept lediglich in der warmen Ischämie hemmend auf die NF- κ B-Aktivität. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich hier eine signifikante Reduzierung der Bindungsaktivität (TNFR:Fc 2hw vs. Kon w: $1027,3 \pm 193,4$ vs. $1714,26 \pm 200,6$ (od-Bkg)/mm²; $p < 0,05$).

In kalter Ischämie zeigte sich unter der TNFR:Fc Etanercept-Vorbehandlung zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch war eine leichte Erhöhung der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen (TNFR:Fc 2hk vs. Kon k: $1780,7 \pm 212,5$ vs. $1643,1 \pm 241,26$ (od-Bkg)/mm²; n.s.).

Abb. 21a und b zeigen repräsentative Gelelektrophorese-Auswertungen des EMSA. Nach Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept zeigte sich eine reduzierte NF- κ B-Bandenintensität im Modell der warmen Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe.

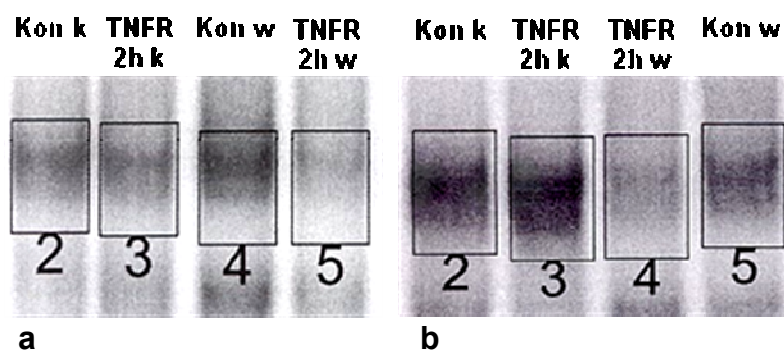


Abb. 21a,b: NF- κ B-Aktivität (Bandenintensität / EMSA)

Kontrolle/kalte Ischämie = Kon k

Kontrolle/warme Ischämie = Kon w

Etanercept-Spendervorbehandlung/kalte Ischämie = TNFR:Fc 2hk

Etanercept-Spendervorbehandlung/warme Ischämie = TNFR:Fc 2hw

5. DISKUSSION

In unserer Arbeit untersuchten wir die Wirkung des p75 TNFR:Fc Fusionsproteins Etanercept auf die Langzeitfunktion von Nierentransplantaten nach verlängerter kalter Ischämiezeit. Zum einem wurde eine Empfängerbehandlung zur Minderung der Immunantwort durchgeführt, zum anderen eine Spendervorbehandlung zur Reduzierung der Vorschädigung des Transplantates.

Die Empfängerbehandlung zeigte einen positiven Einfluss mit einem im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängerten Überleben, das mit einer verbesserten Transplantatfunktion assoziiert war. In einem der ersten NTx-Versuche mit TNFR:Fc Etanercept von Eason et al. zeigten Affen, die zusätzlich mit Cyclosporin A behandelt wurden, ebenfalls ein signifikant verlängertes Überleben (106). In zahlreichen anderen Versuchen, vorwiegend im Herztransplantationsmodell, wurde mit einer anti-TNF- α -Therapie ebenso eine deutliche Verbesserung akuter Abstoßungen, assoziiert mit einem verlängerten Transplantatüberleben, erreicht (92-94).

Die bedeutende Rolle von TNF- α im Rahmen der chronischen Abstoßung nach NTx ist mehrfach beschrieben worden (24-28). Die chronische Abstoßung beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen, an dem der Ischämie-/Reperfusionsschaden als ein Alloantigen-unabhängiger Risikofaktor maßgeblich beteiligt ist (29,40,43). Die Rolle von TNF- α in der Entwicklung des Ischämie-/Reperfusionsschadens ist vielfach untersucht worden (45,46). Als Produkt aktivierter Monozyten/Makrophagen ist TNF- α an den pathognomisch morphologischen Veränderungen beteiligt, insbesondere an der interstitiellen Fibrose und der progredienten Glomerulosklerose (44). Nach Untersuchungen von Diamond und Tilney et al. korreliert eine signifikant erhöhte Glomerulosklerose mit einer gesteigerten Proteinurie, die als erster Indikator einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate und damit als ein wichtiger Marker für die chronische Abstoßung im Rattenmodell gilt (107). Die Glomerulosklerose wiederum korreliert u.a. mit einer erhöhten TNF- α -Expression (44). Aber auch in der Pathogenese der Glomerulonephritiden, die in Langzeitstudien nach NTx beobachtet wurden, sind lösliche TNF- α -Rezeptoren vermehrt gefunden und als Marker der chronischen Abstoßung bewertet worden (113). Hribova et al. wiesen in Patienten mit Langzeitüberleben nach NTx eine erhöhte TNF- α -mRNA-Expression nach und stellten ebenfalls

eine Korrelation mit der Proteinurie und der daraus folgenden verminderten Organfunktion fest (28). Ebenso besteht eine Korrelation zwischen TNF- α und der eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (46).

Dies bestätigt sich auch in unseren Ergebnissen. Die Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept bewirkte eine signifikante Verbesserung der Proteinurie und eine deutlich gesteigerte Kreatinin-Clearance zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Einher geht dies mit einer signifikant reduzierten Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose. Weiterhin lässt sich, wie schon von Coito et al. in einem allogenen Herztransplantationsmodell gezeigt wurde (94), eine eindeutige Reduzierung der zellulären Infiltrate beobachten. Wesentliche, wenn auch nicht signifikante Reduzierungen der Schäden konnten für tubuläre Atrophie und Arteriosklerose gezeigt werden. Letztere ist ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum der chronischen Abstoßung; in einem erst kürzlich veröffentlichten Versuch im murinen Aortentransplantationsmodell konnte eine anti-TNF- α -Therapie eine Reduzierung der Arteriosklerose bewirken (95).

Die wirkungsvolle Empfängertherapie mit TNFR:Fc Etanercept spiegelt sich ebenso in der immunhistologischen Auswertung. Für die untersuchten Oberflächenmarker (CD4+, CD5+, ED1+) zeigten sich leicht verbesserte Ergebnisse; CD8+ T-Zellen und die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen waren signifikant reduziert. Das MHC-Klasse-II-Molekül ist bekannterweise in den Prozess der Organabstoßung und des Ischämie-/Reperfusionsschadens involviert, seine Expression wird u.a. durch TNF- α induziert (18,61,78). Die hier erzielte signifikante Reduzierung der zellulären Infiltrate und der MHC-Klasse-II-Expression verdeutlicht die positive Wirkung des TNFR:Fc Etanercept in der Empfängerbehandlung.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Effekten einer Empfängerbehandlung zeigte eine Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im chronischen Abstoßungsmodell mit verlängerter kalter Ischämie lediglich den Trend einer verbesserten Organfunktion und verminderten Schädigung.

Sogenannte marginale Spenderorgane sind durch unterschiedliche Faktoren wie Alter (>60 Jahre), vaskuläre Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus) und im Besonderen durch eine verlängerte Ischämiezeit und den Hirntod des Spenders vorgeschädigt (39). Die Vorschädigung fördert Alloantigen-abhängige und -unabhängige Prozesse im Empfänger, die zu einer erhöhten Rate von

akuten und chronischen Abstoßungen führen (26,38). Schon vor Transplantation ist in diesen vorgeschädigten Organen eine Aktivierung mit vermehrten zellulären Infiltraten und konsekutiv erhöhten Zytokinkonzentrationen zu verzeichnen. TNF- α gilt hier als ein Schlüsselmediator, der u.a. eine direkte Zytotoxizität und Vasokonstriktion, und die Reduzierung des glomerulären Blutflusses und der glomerulären Filtrationsleistung sowie die Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten zu verantworten hat (46).

In vorherigen Versuchen konnte ein günstiger Einfluss einer Vorbehandlung alter Spenderorgane auf die Organfunktion und das Langzeitüberleben im chronischen Rattenmodell gezeigt werden (86). Unter der Behandlung mit Prednisolon zeigte sich zudem eine signifikant verringerte TNF- α -Genexpression im Transplantat. In einem weiteren Versuch führte eine Spendervorbehandlung mit Cobalt Protoporphyrin (CoPP) zu einer signifikanten Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens. Durch Induktion des antiapoptotischen Faktors Hämoxxygenase-1 kam es zu einer verminderten Transplantatdestruktion und zu einem verlängerten Überleben. Diese Effekte waren mit einem signifikant verringerten TNF- α -Spiegel assoziiert (85).

Im Gegensatz zu den Vorarbeiten führte in unserer Arbeit eine Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept vor Schädigung durch I/R und anschließender NTx nicht zu einem verlängerten Empfängerüberleben. Es zeigte sich jedoch ein Trend zur verbesserten Transplantatfunktion mit reduzierter Proteinurie und gesteigerter Kreatinin-Clearance. Histologisch konnte lediglich für die tubuläre Atrophie und die Fibronisierung eine signifikante Verbesserung beobachtet werden. Der positive Effekt einer TNFR:Fc Etanercept-Spendervorbehandlung manifestierte sich deutlich in einer reduzierten Fibrosebildung, welche als pathogonomisches Kennzeichen des I/R-Schadens im Langzeitüberleben gilt und mit TNF- α assoziiert ist (107). Immunhistochemisch konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Dennoch führte TNFR:Fc Etanercept zu einer eindeutig, wenn auch nicht signifikant verringerten Infiltration von CD8⁺ Zellen und reduzierter MHC-Klasse-II-Expression im Transplantat, einhergehend mit einer insgesamt verminderten Anzahl transplantatinfiltrierender Zellen.

Da der größte Anteil der zur Transplantation zur Verfügung stehenden Organe von hirntoten Spendern stammt, ist der Hirntod neben dem I/R-Schaden ein weiterer klinisch besonders relevanter Faktor, der zur Erhöhung der Immunogenität von Spenderorganen beiträgt. Aus diesem Grund untersuchten wir in einem zusätzlichen

Kurzzeitversuch nach erfolgter Induktion des Hirntods den Effekt einer Spender-
vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept. Besonders hier scheint eine Spender-
vorbehandlung sinnvoll, um die durch den Hirntod ausgelösten und zusätzlich
perioperativ entstehenden entzündlichen Prozesse zu unterbinden.

Der Hirntod ist als eine zentrale Katastrophe mit unterschiedlichen physiologischen
Veränderungen assoziiert, u.a. mit einer hämodynamischen Instabilität. Der auch als
autonomer Sturm bezeichnete Effekt führt zu einer massiven Ausschüttung von
Katecholaminen, extremer arterieller Hypertension und Vasokonstriktion. Mit
Nachlassen der sympathischen Aktivität kommt es zu einer hypotensiven Phase, in der
die Organe durch eine transiente ischämische Phase geschädigt werden. Das hierdurch
aktivierte Immunsystem löst eine Entzündungskaskade mit der Expression von
proinflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF- α , NF- κ B) und Adhäsionsmolekülen aus, die
zu einer verstärkten Extravasation von Leukozyten in das geschädigte Gewebe führen
(64,68,71). Die hieraus resultierende Aktivierung von T-Zellen kann zur akuten
Abstoßung führen (62) und im Folgendem die chronische Abstoßung bedingen (41,63).
Hinzu kommt der perioperative I/R-Schaden, der zu einer zusätzlichen
proinflammatorischen Aufwallung führt (69). In einer Studie konnte anhand von
unterschiedlichen Biopsie-Zeitpunkten zwischen den durch Hirntod und die durch I/R
verursachten Schäden differenziert werden; direkt nach Laparatomie im Zuge der
Explantation konnte im Vergleich zu Biopsien von Lebendspendern eine signifikante
Erhöhung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, u.a. TNF- α , gezeigt werden, was
zu einem gesteigerten I/R-Schaden führte (72).

Erfolgreiche Vorbehandlungen von Organen hirntoter Spender wurden in
verschiedenen Experimenten durchgeführt, u.a. mit einer Steroidvorbehandlung in
einem Nierentransplantationsmodell der Ratte, was zur Verhinderung einer akuten
Abstoßung führte (88). Bestätigend konnte in einer klinischen Studie eine Reduzierung
der proinflammatorischen Zytokine, u.a. TNF- α , in der frühen Phase der Leber-
transplantation nach einer Steroidvorbehandlung festgestellt werden (87).

In unserem Versuch der Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept nach
induziertem Hirntod konnte kein positiver Effekt von TNFR:Fc Etanercept aufgezeigt
werden. Hingegen führte die Vorbehandlung zu einer eindeutigen Verschlechterung der
Transplantatfunktion. Zwar überlebten alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, den
vorgegebenen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen, jedoch zeigten die

immunhistologischen Auswertungen aller Versuchsgruppen für die untersuchten Oberflächenmarker im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höhere Zellzahlen; signifikant erhöht waren CD4+ und CD5+ Zellen sowie die Expression von MHC-Klasse-II.

In der Zusammenschau der hier vorliegenden Ergebnisse konnte unsere Arbeitshypothese nur im Falle der Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept belegt werden. Hier zeigte sich ein protektiver Einfluss auf das Transplantat mit Eindämmung der proinflammatorischen Wirkung von TNF- α , assoziiert mit eindeutig verbesserten Langzeitergebnissen.

Die Spendervorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im NTx-Langzeitmodell mit verlängerter kalter Ischämie hatte keinen entscheidenden Effekt; es konnten lediglich geringfügige Verbesserungen der Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte die Vorbehandlung hirntoter Tiere sogar einen potentiell schädlichen Effekt mit einer eindeutigen Verschlechterung und massiven Zerstörung der Organe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um diese unzureichende Wirkung des TNFR:Fc Etanercept in der Spendervorbehandlung erklären zu können, postulieren wir, dass TNFR:Fc Etanercept sowohl „protektive“ als auch „schädliche“ Effekte ausüben kann. Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass TNF- α als ein pleiotropes Zytokin eine bipolare Wirkung mit sowohl proinflammatorischen und proapoptotischen als auch protektiven Eigenschaften besitzt.

Bekannt ist vorwiegend die proinflammatorische und proapoptotische Komponente von TNF- α , deren Wirkung in zahlreichen klinischen und experimentellen Untersuchungen für den I/R-Schaden (45-47), den Risikofaktor Hirntod (58,62,66,67) und für die chronische Abstoßung (24-28) belegt ist. In zahlreichen experimentellen Versuchen konnte durch eine direkte Inhibition von TNF- α eine Verbesserung des I/R-Schadens (90,91,103,104) und der Transplantatfunktion gezeigt werden (92-95,102,105,106).

TNF- α wird über die Aktivierung von NF- κ B während der ischämischen Phase und in der frühen Phase nach Reperfusion exprimiert (47), was infolge der proinflammatorischen und proapoptotischen Wirkung zu einer Schädigung des Nierengewebes führt.

NF- κ B als ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor liegt meist in seiner inaktiven Form im Zytoplasma vor. Zur Aktivierung kommt es durch Ablösung von I- κ B und Translokation in den Nukleus. In dieser aktivierten Form ist NF- κ B zur Transkription verschiedener Gene, u.a. TNF- α , befähigt. Im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus kann sezerniertes TNF- α über spezifische membrangebundene TNF- α -Rezeptoren die Signaltransduktion der p38 MAP-Kinase einleiten und wiederum die Aktivierung von NF- κ B bewirken (46). Mit Hilfe dieses Mechanismus induziert TNF- α eigenständig die Transkription und Expression weiterer proinflammatorischer Mediatoren bzw. begünstigt den proinflammatorischen Phänotyp der an der Immunantwort beteiligten Zellen. TNF- α besitzt zudem ein proapoptotisches Potential und ist desweiteren an der Expression von MHC-Molekülen auf dem Spenderendothel beteiligt. Dies führt infolge einer gesteigerten Leukozyteninfiltration und einer verstärkten direkten oder indirekten Alloantigenerkennung durch dendritische Zellen mit anschließender Aktivierung von T-Zellen zu einer Erhöhung der Transplantatimmunität (18,61,78).

TNF- α verfügt aber auch über eine weniger bekannte protektive Wirkung. Diese phylogenetisch wichtig erscheinende Funktion wurde in zahlreichen überwiegend coronaren Studien aufgedeckt. Eddy et al. zeigten erstmalig, dass eine Vorbehandlung mit TNF- α eine Hochregulierung der mitochondrialen Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) bewirkt und sich dies protektiv auf den I/R-Schaden auswirkt (115). Nakano et al. beschrieben eine durch TNF- α -Vorbehandlung aufgetretene Resistenz gegenüber hypoxischen Schäden der Herzmuskelzelle. Diese Befunde bestätigend, verhinderte die Applikation eines anti-TNF- α -Antikörpers den protektiven Effekt (49). Letztendlich zeigten Kurrelmeyer et al. in einem knockout-Modell für beide TNF- α -Rezeptoren, dass sowohl TNFR-55 als auch TNFR-75 eine protektive Wirkung gegenüber einer Ischämie-induzierten Apoptose im Myocard besitzen (50).

Der genaue Mechanismus dieser zytoprotektiven Wirkung von TNF- α ist jedoch noch unzureichend erforscht. Hypothetisch wird angenommen, dass TNF- α über eine von beiden Rezeptoren vermittelte protektive Wirkung verfügt (50). Hierbei ist TRAF2 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor 2) als Adapterprotein von besonderer Bedeutung. Während eine Bindung von TRAF2 an den TNFR-75 direkt erfolgen kann, interagiert der TNFR-55 über eine TNFR assoziierte Todesdomäne (TRADD) mit

TRAF2. Zusammen mit TRAF1 bildet TRAF2 einen heterodimeren Komplex, der zur Aktivierung von NF- κ B führt (78).

NF- κ B induziert u.a. die Expression des mitochondrialen Proteins MnSOD, das eine antiapoptotische Eigenschaft besitzt (115), und die des zytoprotektiven Zinkfingerproteins A20 (55). Die zytoprotektive Wirkung von A20 kommt im Sinne einer negativen Rückkopplung über die TNF- α -Signaltransduktion mit TRAF1 und 2 zustande, welche die NF- κ B-Aktivität inhibieren. In renalen tubulären Epithelzellen, die vornehmlich durch Ischämie geschädigt wurden, konnte bestätigt werden, dass A20 über eine NF- κ B-Blockade schützend wirken kann (56). Eine maximal inhibierende Wirkung auf die TNF- α -induzierte Apoptose konnte ebenfalls über eine NF- κ B kontrollierte Expression von TRAF1 und 2 zusammen mit den zellulären Apoptoseinhibitoren cIAP-1 und -2 aufgezeigt werden (82). Darüberhinaus sind weitere antiapoptotische Gene bekannt, die durch Aktivierung von NF- κ B vermehrt exprimiert werden. Indirekt konnte dies in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden. Durch Inhibition der NF- κ B-Aktivität bzw. durch eine fehlende NF- κ B-Untereinheit bei knockout-Mäusen konnte eine TNF- α -induzierte Apoptose ausgelöst werden (51-54). Zu den antiapoptotischen Genen gehören z.B. Bcl-xL und Bcl-A1/bfl-2 als Mitglieder der Bcl-2 Familie (B-cell lymphoma-2).

Es stellt sich nun die Frage, von welchen Faktoren es abhängt, dass TNF- α im Rahmen des I/R-Schadens eine protektive oder schädigende Wirkung ausübt und in welchen Zusammenhang dies mit unseren Versuchen der Spendervorbehandlung im Transplantationsmodell gebracht werden kann.

In der Durchsicht der Literatur fällt auf, dass der über die Aktivierung von NF- κ B ausgeübte protektive Effekt von TNF- α in Arbeiten mit alleiniger Ischämie ohne Reperfusionsschaden und postischämischer Inflammation beschrieben ist.

Im direkten Vergleich kann dies in Versuchen mit TNF- α -knockout-Mäusen verdeutlicht werden. Maekawa et al. zeigten in einem I/R-Versuch eine deutliche Reduktion der Herzinfarktgröße, verbunden mit einer reduzierten NF- κ B-Aktivität (116); hingegen stellten Kurrelmeyer et al. in einem reinen Ischämieversuch eine Zunahme der Herzinfarzierung fest (50).

Zur Erklärung zeigten bereits andere Autoren, dass TNF- α in seiner Grundproduktion oder in niedrigen Konzentrationen eine zytoprotektive Wirkung gegen hypoxische

Schädigungen besitzt (49,115). Nach anhaltender oder massiver Schädigung wie im Falle der Reperfusion scheint die erhöhte TNF- α -Expression für die proinflammatorische Wirkung verantwortlich zu sein. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der zeitlichen Regulierung im I/R-Schaden und die unterschiedliche Wirkung von TNF- α in Abhängigkeit der Konzentration (57,104).

Ischämie und Reperfusion sind zwei unterschiedliche Ereignisse mit eigenen Schädigungsmechanismen. Klinisch sind Ischämie und Reperfusion jedoch nicht voneinander zu trennen und sind als I/R-Schaden einer der wichtigsten Alloantigen-unabhängigen Risikofaktoren, gerade in Hinblick auf die erhöhte Immunogenität der Spenderorgane.

Dass eine alleinige Ischämie ausreicht, um die TNF- α -Expression zu induzieren, konnten Donnhoo et al. in einem renalen Ischämie-Modell mit oder ohne Reperfusion feststellen (47). Hier zeigte sich auch eine erhöhte NF- κ B-Aktivität, die darauf hindeutet, dass die Produktion von TNF- α schon durch den ischämischen Schaden initiiert wird. Der ischämische Schaden der Niere entsteht vorrangig in tubulären Epithelzellen und wird bedingt durch den Sauerstoffverlust. Neben der ATP-Depletion und der Störung der Ionenhomöostase mit folgender Ödembildung und Störung der Mikrozirkulation kommt es auch zur Bildung von ROS. Diese freien Sauerstoffradikale, insbesondere H₂O₂, können über die p38-MAP-Kinase NF- κ B aktivieren und so die TNF- α -Produktion initiieren.

Die sich an die Ischämie anschließende Reperfusion hat nicht nur den positiven Effekt der Reoxygenierung, sondern erhöht auch die gesamte Immunogenität des Organs, weshalb sie auch als „reflow-paradox“ bezeichnet wird. Minuten nach Reperfusion beginnt die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch spendereigene Endothel- und Parenchymzellen sowie Makrophagen, die eine Entzündungskaskade einleiten und zu einer nochmaligen Erhöhung der TNF- α -Expression führen. Bereits nach einer Stunde Reperfusion ist dies deutlich zu erkennen; ein Maximum ist nach 2 Stunden Reperfusion erreicht. Gemessen wurde hier die TNF- α -Bioaktivität, die über die Schädigung der Niere, verursacht durch direkte Zytotoxizität, Apoptose oder Leukozyten- und Monozyteninfiltration, definiert wird. (47).

NF- κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der an der Expression zahlreicher Gene beteiligt ist. Daher ist es nicht überraschend, dass er sowohl in schädlichen als auch protektiven Prozessen involviert ist.

Die NF- κ B-Aktivität gilt als intrazellulärer Vermittler der TNF- α -Bioaktivität und ist wie bereits erwähnt schon nach alleiniger Ischämie erhöht (47). Dies konnten Li et al. bestätigen (48). Wie erwartet zeigte sich in den unterschiedlichen Untersuchungen der verschiedenen Arbeitsgruppen eine nochmalige Erhöhung während der Reperfusionphase. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass diese Erhöhung „nur“ auf der vorausgegangenen Ischämie-induzierten Bindungsaktivität im Nukleus beruht. Dies lässt annehmen, dass die Ischämie-induzierte NF- κ B-Aktivierung ein wichtiger Regulator der Genexpression während der Ischämie-Reperfusionphase ist.

Angenommen wird, dass die über die NF- κ B-Aktivität gesteuerte Zytoprotektion von TNF- α auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus beruht (56). Zunächst ist aber die NF- κ B-Aktivität Grundvoraussetzung zur Expression von protektiven Genen wie A1 und A20 in renalen Epithelzellen. Als endogene NF- κ B-Antagonisten sind sie Teil dieses komplexen negativen Rückkopplungsmechanismus, der einen antiapoptotischen bzw. antiinflammatorischen Effekt durch Hemmung der NF- κ B Aktivität bewirkt. In einem Ischämie-Versuch im Mausmodell mit defekter NF- κ B-Aktivität konnte die Notwendigkeit der NF- κ B-Aktivität zur Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und c-IAP-1 und der damit verhinderten ischämischen Schädigung verdeutlicht werden (54).

Beruhend auf dieser Hypothese und in Anbetracht unserer Ergebnisse einer nur unzureichenden Wirkung der Spendervorbehandlung in den NTx-Versuchen, schlossen wir zur weiteren mechanistischen Klärung eine Messung der NF- κ B-Aktivität in einem alleinigen I/R-Versuch ohne nachfolgende Transplantation mit einer TNFR:Fc Etanercept-Spendervorbehandlung an.

Auch unter dem Aspekt, dass eine NF- κ B induzierte Zytoprotektion von TNF- α vorwiegend bei reiner Ischämie ohne Reperfusion beobachtet wurde (54-57,115), führten wir die Versuche dennoch mit einer Reperfusionphase durch, da unter klinischen Bedingungen und gerade in Hinblick auf die Transplantation keine Trennung dieser beiden Mechanismen möglich ist. Mit einer Behandlung vor Eintritt des ischämischen Schadens sollte die Frage geklärt werden, ob eine Spender-vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept zu einer verminderten NF- κ B-Aktivität mit Hemmung der protektiven Wirkung führt und somit nicht einer Schädigung entgegenwirken, sondern diese sogar verstärken kann. Hierfür wurde wie im NTx-

Modell die TNFR:Fc Etanercept-Gabe 2 Stunden vor Ischämie vorgenommen. Um die klinische Relevanz zu verdeutlichen, wurde in einer Versuchsgruppe eine 60-minütige warme, in einer anderen Gruppe eine gleich lange kalte Ischämie durchgeführt. Nach 30 Minuten der Reperfusion erfolgte die sofortige Entnahme der Nieren mit anschließender Messung der NF- κ B-Aktivität.

Die Ergebnisse erwiesen sich als interessant, da sie in Abhängigkeit der Ischämieform (warm oder kalt) unterschiedliche NF- κ B-Aktivitäten aufzeigten. In kalter Ischämie konnte kein signifikanter Unterschied der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Hingegen wurde in warmer Ischämie eine signifikante Reduzierung der NF- κ B-Aktivität gemessen.

Bei Transplantationen führen eine warme und eine kalte Ischämie zu grundlegenden Organschäden mit massivem Zelltod. Eine warme Ischämie entsteht intraoperativ, tritt aber auch in Organen hirntoter Spender auf. Zwischen Explantation und Kühlung sowie in der Aufwärmphase bei Implantation kommt es zu einer gemischt warm-kalten Ischämie; rein kalte Ischämiezeiten entstehen durch Kühlung der Transplantate für die Transportwege. Diese kalte iatrogen verursachte Ischämie dient der Verlangsamung des Stoffwechsels und dadurch der Minimierung der I/R-Schädigung. Dennoch sind verlängerte kalte Ischämiezeiten einer der stärksten Prädiktoren für eine DGF mit folgenden akuten und chronischen Abstoßungen (19-20).

Wie in warmer Ischämie kommt es auch in kalter Ischämie zur extra- und intrazellulären Ödementwicklung mit Einschränkung des Membrantransports und folgender Zellnekrose. Ein vollständiger ATP-Verlust, wie er schon nach 40 Minuten warmer Ischämie auftreten kann, ist hierbei jedoch nicht zu verzeichnen (117). Bis auf die Tatsache, dass die Kühlung den Stoffwechsel heruntersetzt und damit den Grad der Schädigung vermindern kann, sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen warmer und kalter Ischämie bekannt. Erst in der Phase der Reperfusion ist entscheidend, ob die weiterführende Schädigung auf den Folgen einer kalten oder warmen Ischämie beruht (118). So sind z.B. in warmer Ischämie primär tubuläre Zellen Ort der Schädigung, während in kalter Ischämie vorwiegend Endothelzellen und glomeruläre Podozyten betroffen sind. Ein weiterer entscheidender Unterschied ist die wahrscheinlich nur nach kalter Ischämie einsetzende Apoptose. Die kalte ischämische Schädigung mit folgender Reperfusion kann zu einer Störung der Eisenhomöostase in tubulären Zellen führen, die für die Apoptose verantwortlich gemacht wird (118). Ebenfalls kommt es abhängig von

der Ischämieform zur Bildung verschiedener ROS; in warmer Ischämie ist dies vorwiegend das Peroxynitrit (ONOO^-), hingegen überwiegt in kalter Ischämie das dismutierte Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (117).

Takada et al. konnten in einem experimentellen I/R-Versuch mit 45-minütiger warmer und kalter Ischämie das unterschiedliche Maß der Schädigung in Abhängigkeit der Ischämieform veranschaulichen (119). Nach warmer I/R-Schädigung wurde im Gegensatz zum kalten I/R-Schaden eine deutlich erhöhte Immunogenität, assoziiert mit einer vermehrten Anzahl CD4+ und ED1+ Zellen und einer gesteigerten MHC-Klasse-II-Expression, beschrieben.

Eine schädliche Wirkung von NF- κ B, die mit einer erhöhten NF- κ B-Aktivität assoziiert ist, konnte sowohl in warmer (46) als auch in kalter (120,121) Ischämie nachgewiesen werden. Hingegen konnten Kuboki et al. Konzentrationsunterschiede von NF- κ B in I/R-Versuchen in Abhängigkeit von Hypo- und Normothermie feststellen. Ihre Ergebnisse zeigten einen zytoprotektiven Effekt der NF- κ B-Aktivität in Hepatozyten, die durch hypotherme Ischämie gesteigert werden konnte (122). Auch hier war die erhöhte NF- κ B-Aktivität assoziiert mit einer verminderten TNF- α -Expression. Invers stellten sich hierzu die Ergebnisse der warmen ischämischen Schädigung dar, die eine verminderte NF- κ B-Aktivität, einhergehend mit einer gesteigerten TNF- α -Produktion, zeigten.

Unsere Ergebnisse des I/R-Versuches mit warmer Ischämie zeigten, dass eine Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept zu einer signifikanten Reduzierung der NF- κ B-Aktivität führt. Daraus folgend könnte die über TNF- α -induzierte potentielle Zytoprotektion vermindert worden sein.

Grundsätzlich bindet TNFR:Fc Etanercept freies TNF- α , interagiert mit membranständigen TNFR und verhindert die folgende Signalkaskade zur Aktivierung von NF- κ B (97). Dies konnten auch Gu et al. in ihrem Versuch mit warmer I/R-Schädigung zeigen. Die Gabe von TNFR:Fc Etanercept vor Okklusion einer Koronararterie erbrachte eine Verbesserung des I/R-Schadens, assoziiert mit einer erniedrigten NF- κ B-Aktivität (104). Die im Gegensatz zu unseren Versuchen aufgezeigte „protektive“ Funktion von TNFR:Fc Etanercept kann möglicherweise durch den Zeitpunkt der Applikation erklärt werden. Die Behandlung erfolgte in diesem Versuch kurz vor Beginn der Ischämie mit anschließender Reperfusion, so dass sich die Wirkung eher auf den postischämischen und durch Reperfusion ausgelösten Schaden beziehen könnte. In unserem Versuch der warmen Ischämie verabreichten wir

TNFR:Fc Etanercept hingegen in zeitlichem Abstand vor Ischämie. Hierdurch könnte eine Hemmung der protektiven Funktion induziert worden sein, was sich in der erniedrigten NF- κ B-Aktivität äußerte. Dass die NF- κ B-Aktivität bei isolierter warmer Ischämie einen protektiven Effekt haben kann, fußt auf den bereits vorgestellten Ergebnissen von Misra et al. (54).

In Hinblick auf unsere NTx-Versuche kann der Hirntod in seiner Endphase mit einer warmen Ischämie verglichen werden. Die Ischämie wird durch instabile Perfusionsverhältnisse hervorgerufen und führt zusammen mit anderen Mechanismen zu einer im Vergleich mit Organen von Lebendspendern erhöhten Immunogenität mit vermehrten akuten und chronischen Abstoßungen (17,41,62,68,69,71). Auch während des Hirntods wurden im Rahmen der Stressabwehr protektive Gene nachgewiesen, die zwar den I/R-Schaden nicht aufhalten können, aber in der Phase der frühen Protektion eine Rolle zu spielen scheinen (73). Die eindeutige Verschlechterung der Transplantate in unserem NTx-Modell mit induziertem Hirntod könnte demnach durch die erhöhte Immunogenität und das durch die Spendervorbereitung verursachte frühe Fehlen protektiver Mechanismen zu erklären sein.

In hypothermer Ischämie zeigten die Ergebnisse von Kuboki et al. eine gesteigerte Zytoprotektion, einhergehend mit einer erhöhten NF- κ B-Aktivität (122). Dies konnte in einem LTx-Versuch mit kalter Ischämie durch Inhibition von NF- κ B im Spendertier und der daraus resultierenden vermehrten Schädigung und erhöhten Immunogenität bestätigt werden (123). Andererseits wurde in einem NTx-Versuch mit verlängerter kalter Ischämie und Blockierung von NF- κ B mit einem NF- κ B-decoy-oligodeoxynucleotid im Spendertier eine Verbesserung der Transplantatfunktion mit verminderter Immunogenität demonstriert (83).

In unseren kalten I/R-Versuchen mit TNFR:Fc Etanercept-Vorbereitung zeigte sich zwar keine signifikante Veränderung der NF- κ B-Aktivität, doch könnte die leichte Erhöhung der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe darauf hindeuten, dass eine zuvor erhöhte Aktivität unvollständig inhibiert wurde.

Unsere Ergebnisse im NTx-Modell mit Spendervorbereitung und verlängerter kalter Ischämie lassen vermuten, dass der beobachtete Trend einer verbesserten Transplantatfunktion der leichten Erhöhung der NF- κ B-Aktivität im I/R-Versuch entspricht und somit auf die protektive Wirkung von NF- κ B in kalter Ischämie hinweist.

Die Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept im NTx-Modell der chronischen Abstoßung nach verlängerter kalter Ischämie konnte unsere zugrunde liegende Arbeitshypothese einer Reduzierung der proinflammatorischen bzw. proapoptotischen Wirkung von TNF- α im NTx-Modell der chronischen Abstoßung mit verlängerter kalter Ischämie bestätigen. TNF- α spielt sowohl in der frühen (30-34) als auch in der späten Abstoßung (24-28) von Nierentransplantaten eine wichtige Rolle. Beruhend auf der erörterten Theorie, dass eine erhöhte TNF- α -Konzentration im Zuge der Reperfusion (116) mit einer schädlichen Wirkung assoziiert ist (57), zeigt TNFR:Fc Etanercept in diesem Versuch einen wirkungsvollen protektiven Effekt, der sich sowohl im Überleben als auch in der Transplantatfunktion mit signifikanten Verbesserungen spiegelt.

Während Eason et al. schon vor einigen Jahren den positiven Effekt von TNFR:Fc Etanercept im akuten Abstoßungsmodell zeigen konnten (106), können wir diesen Effekt im chronischen Abstoßungsmodell nun bestätigen. Eine positive Wirkung der TNF- α -Inhibition in Tx-Langzeitversuchen ist weiterhin in einem Dünndarmtransplantationsmodell mit einem anti-CD4-Antikörper als kombinierte Spender- und Empfängerbehandlung beschrieben worden (105). Ergebnisse einer erst kürzlich erschienenen Untersuchung konnten eine Reduzierung der Arteriosklerose in einem murinen Aortentransplantationsmodell durch eine Empfängertherapie mit Infliximab aufzeigen (95). In einer anderen Pilotstudie wurde bei nierentransplantierten Patienten mit nachgewiesener CAN durch Inhibierung von TNF- α mit Pentoxifyllin eine vorübergehend verringerte Proteinurie und bei mehr als der Hälfte der Patienten eine Stabilisierung der Nierenfunktion erreicht (96).

Abschließend können unsere Ergebnisse der Spendervorbehandlung, die vermutlich in Abhängigkeit der Schwere der Schädigung eine unzureichende bis potentiell schädliche Wirkung der TNFR:Fc Etanercept-Therapie zeigten, unsere Arbeitshypothese nicht bestätigen, geben aber mögliche Hinweise auf eine bisher noch wenig untersuchte NF- κ B-induzierte protektive Wirkungsweise von TNF- α .

Nicht nur in unseren eigenen Versuchen kam es zur Wirkungslosigkeit bis hin zu einer schädlichen Auswirkung der TNFR:Fc Etanercept-Therapie; in klinischen Studien zur Behandlung der Herzinsuffizienz mit TNFR:Fc Etanercept zeigte sich eine Verschlechterung der bestehenden Erkrankung, was möglicherweise durch Hemmung von TNF- α in niedrigen Konzentrationen und durch den damit unterdrückten positiven Effekt verursacht sein könnte (124,125).

Da unsere Theorie einer dualen Wirkungsweise von TNF- α in Abhängigkeit der Konzentration vorwiegend auf experimentellen Versuchen am Herzen basiert, erscheint es sinnvoll, entsprechende Untersuchungen auch in anderen Organen wie der Niere durchzuführen.

Sollte sich unsere Hypothese der bipolaren Wirkung von TNF- α bestätigen, ist in weiteren Versuchen der genaue Mechanismus zu klären, unter welchen Bedingungen es zu einer protektiven oder schädigenden Wirkung von TNF- α und NF- κ B kommt. Dies sollte gerade in Hinblick auf eine Therapie von Organen mit I/R-Schaden oder von Transplantaten hirntoter Spender weiter untersucht werden, um die therapeutischen Effekte der Spendervorbehandlung genauer differenzieren zu können.

Die Empfängerbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept kann als ein neuer Ansatz zur Therapie von chronischen Abstoßungen gewertet werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Organtransplantation ist mittlerweile ein etabliertes Verfahren mit guten 1-Jahresüberlebensraten. Allerdings stellt die Therapie der chronischen Abstoßung nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die Verschlechterung der Langzeitfunktion des Transplantats beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen. Maßgeblich daran beteiligt sind Alloantigen-abhängige Faktoren wie akute Abstoßungsepisoden und Alloantigen-unabhängige Faktoren wie der Ischämie-/Reperfusionsschaden und der Hirntod.

In vielen experimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass TNF- α mit seiner proinflammatorischen und proapoptotischen Wirkung im Prozess der akuten und chronischen Abstoßung sowie im Rahmen des I/R-Schadens und des Hirntods eine bedeutende Rolle spielt. TNF- α wird über einen NF- κ B vermittelten Signalweg exprimiert und steht mit diesem in positiver Rückkopplung. Beide Faktoren sind vor allem als wichtige Entzündungsmediatoren beschrieben, die zu einer Transplantatschädigung und Erhöhung der Immunogenität des Spenderorgans führen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung des p75 TNFR:Fc Fusionsproteins Etanercept auf die Langzeitfunktion von Nierentransplantaten nach verlängerter kalter Ischämiezeit. Zum einem wurde eine Empfängerbehandlung (24h nach NTx) zur Minderung der Immunantwort durchgeführt, zum anderen eine Spendervorbehandlung (2h vor Explantation) zur Reduzierung der Vorschädigung des Transplantats. Ergänzend untersuchten wir in einem Kurzzeitversuch die Wirkung einer Spendervorbehandlung (4h vor Explantation) nach graduell induziertem Hirntod. Die Beobachtungszeit betrug im chronischen Abstoßungsmodell 6 Monate, im Kurzzeitversuch 10 Tage. Sequentielle Analysen dienten der Funktionsbestimmung der transplantierten Niere. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes erfolgte die histologische und immunhistologische Auswertung der Transplantate.

In der Empfängerbehandlung zeigten die Ergebnisse eine signifikante Verlängerung des Überlebens und eine verbesserte Organfunktion, assoziiert mit einer signifikanten Reduktion der Glomerulosklerose, Fibrose und Zellinfiltration. Bestätigend zeigte sich in der immunhistologischen Auswertung eine verminderte Zahl infiltrierender Zellen und eine signifikant reduzierte MHC-Klasse-II-Expression.

Hingegen zeigte die Spendervorbehandlung im chronischen Abstoßungsmodell lediglich eine tendenziell verbesserte Organfunktion mit verminderten strukturellen

Veränderungen und reduzierter Transplantatinfektion. Im Kurzzeitversuch unter Verwendung hirntoter Spender erbrachte die TNFR:Fc Etanercept-Spendertherapie sogar eine verstärkte Schädigung mit zum Teil signifikant erhöhter Zellinfiltration im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Unsere Arbeitshypothese konnte nur in Bezug auf die Empfängerbehandlung belegt werden. Dort zeigte sich ein protektiver Einfluss auf das Transplantat, assoziiert mit eindeutig verbesserten Langzeitergebnissen.

Um den mangelnden bzw. potentiell schädlichen Effekt der Spendervorbehandlung erklären zu können, wurde das Modell der dualen Wirkung von TNF- α herangezogen. Im Fall höherer TNF- α -Konzentrationen, wie z.B. nach Reperfusion, könnte die schädigende Wirkung des Zytokins im Vordergrund stehen. Bei niedrigen TNF- α -Konzentrationen, wie bei alleiniger ischämischer Schädigung, könnte die zytoprotektive Komponente von TNF- α zum Tragen kommen. Vermittelt wird die Zytoprotektion über eine NF- κ B-induzierte antiapoptotische Geninduktion, die eine TNF- α -vermittelte schädigende Wirkung verhindern kann.

Zur weiteren mechanistischen Untersuchung führten wir eine Messung der NF- κ B-Aktivität in einem I/R-Versuch mit einer TNFR:Fc Etanercept-Vorbehandlung (2h vor I/R) durch. In Anlehnung an die NTx-Versuche unter Verwendung von Lebendspendern (kalte Ischämie) bzw. von hirntoten Spendern (warme Ischämie) wurden die I/R-Versuche analog in kalter und warmer Ischämie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit von der Ischämieform. blieb die NF- κ B-Aktivität in kalter Ischämie nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnte in warmer Ischämie eine signifikante Reduzierung gezeigt werden. Bezogen auf das Modell der NF- κ B-induzierten Zytoprotektion könnte eine Korrelation dieser Ergebnisse mit denen der Transplantationsversuche angenommen werden. Die nach einer Vorbehandlung mit TNFR:Fc Etanercept nahezu unveränderte NF- κ B-Aktivität im I/R-Versuch mit kalter Ischämie korreliert mit der leicht verbesserten Organfunktion im NTx-Modell mit verlängerter kalter Ischämie. Hingegen steht die signifikante Reduzierung der NF- κ B-Aktivität und die damit unterbundenen protektiven Mechanismen im I/R-Versuch mit warmer Ischämie in Korrelation zu der massiven Schädigung im Hirntodmodell.

Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass der therapeutische Effekt einer TNFR:Fc Etanercept-Behandlung entscheidend vom Zeitpunkt der Applikation und darüber hinaus von der Ischämieform abhängt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surg* 2000;24:759-782.
- (2) Gorer PA. The antigenic basis of tumor transplantation. *J Path Bacteriol* 1938;47:231.
- (3) Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet* 1948;49:87.
- (4) Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta haematol* 1958;20:156.
- (5) Medawar PB. The behavior and fate of skin autograft and skin homograft in rabbits. *J Anat* 1944;78:176.
- (6) Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 1943;77:299.
- (7) Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to examine the definition of braindeath. A definition of irreversible Coma. *Jama*, 1968;205(6):85-88.
- (8) Bundesärztekammer. Feststellung des Hirntods. *Dt Ärzteblatt* 1998;95(30):1861-72.
- (9) Miller BF, Gonzales E, Wilchins LJ, Nathan P. Kidney transplantation in the rat. *Nature* 1962;194:309-10.
- (10) Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965;58:904-14.
- (11) Oesterwitz H, Althaus P, May G, Strobel V, Kaden J. Microvascular surgery in experimental and clinical kidney transplantation. *Int Urol Nephrol* 1983;15(4):347-57.
- (12) Deutsche Gesellschaft für Organtransplantation, Daten und Graphiken, Nierentransplantation 2008. (<http://www.dso.de/>.)
- (13) Annual Report 2007. Leiden, The Netherlands: Eurotransplant International Foundation, 2007. (Accessed August, 18th 2008 at http://www.eurotransplant.nl/files/annual_report/AR2007_def.pdf.)
- (14) United States Renal Data System, Annual Data Report, ADR/Atlas 2008. (<http://www.usrds.org/atlas.html>.)
- (15) Tullius SG, Neuhaus P. The marginal kidney donor. *Curr Opin Urol* 2002;12:101-7.
- (16) Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtekin U, Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transpl* 1992;53(2):323-8.

- (17) Pratschke J, Wilhelm MJ, Kuska M, et al. Brain death and its influence on donor quality and outcome after transplantation. *Transpl* 1999;67(3):343-48.
- (18) Shokes DA, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transpl* 1990;49(1):201-7.
- (19) McLaren AJ, Jassem W, Gray DW, Fuggle SV, Welsh KI, Morris PJ. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clinic Transpl* 1999;13(3):266-72.
- (20) Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transpl* 1995;59(7):962-8.
- (21) Busson M, Benoit G, N'Doye P, Hors J. Analysis of cadaver donor criteria on the kidney transplant survival rate in 5,129 transplantations. *J Urol* 1995;154:356-60.
- (22) Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thron GW. Experience with renal homotransplantations in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 1955;34(2):327-82.
- (23) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55(2):713-23.
- (24) Azuma H, Heemann UW, Tullius SG, Tilney NL. Cytokines and adhesion molecules in chronic rejection. *Clin Transpl* 1994;8:168-80.
- (25) Hancock WW, Whitley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transpl* 1994;56:643-50.
- (26) Tullius SG, Nieminen M, Bechstein WO, et al. Contribution of early acute rejection episodes to chronic rejection in a rat kidney retransplantation model. *Kidney Int* 1998;53(2):465-72.
- (27) Krams SM, Falco DA, Villanueva JC, et al. Cytokine and T-cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transpl* 1992;53(1):151-6.
- (28) Hribova P, Lacha J, Kotsch K, et al. Intrarenal cytokine and chemokine gene expression and kidney graft outcome. *Kidney Blood Press Res* 2007;30(5):273-82.
- (29) Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transpl* 1995;59(3):313-8.

- (30) Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest* 2001;81:1503-1515.
- (31) Maury CP, Teppo AM. Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection. *J Exp Med* 1987;166(4):1132-7.
- (32) McLaughlin PJ, Aikwa A, Davies HM, et al. Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients. *Transpl* 1991;51(6):1225-9.
- (33) Morel D, Normand E, Lemoin C, et al. Tumor necrosis factor alpha in human kidney transplant rejection—analysis by in situ hybridization. *Transpl* 1993;55(4):773-7.
- (34) Wiggins MC, Bracher M, Mall A, et al. Tumor necrosis factor levels during acute rejection and acute tubular necrosis in renal recipients. *Transpl Immunol* 2000;8(3):211-5.
- (35) Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha rejection following orthotopic liver transplantation. *Transpl* 1990;50(2):219-25.
- (36) Keil M, Pec MK, Schenn G, et al. Value of serum soluble necrosis factor concentrations in the diagnosis and prognosis of renal graft rejection. *Nephrol Dial Transpl* 1994;9(7):815-9.
- (37) Oliveira JG, Xavier P, Sampaio SM, Mendes AA, Pestana M. sTNFR1 and sTNFR2 synthesis in fine-needle aspiration biopsy sample cultures is significantly associated with acute rejection in kidney transplantation. *Transpl* 2001;71(12):1835-39.
- (38) Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, et al. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transpl* 2000;70(7):1098-100.
- (39) Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche HU, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:589-97.
- (40) Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P. Chronic rejection of rat kidney allografts. II. The impact of prolonged ischemia. *Transpl* 1992;(53):823-27.

- (41) Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, et al. The Influence of donor brain death on long-term function of renal allotransplants in rats. *Transpl Proc* 2001;(33):693-4.
- (42) Halloran PF, Homik J, Goes N, et al. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplantation outcome. *Transpl Proc* 1997;29(1-2):79-81.
- (43) Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transpl* 1997;64(2):190-7.
- (44) Azuma H, Heemann U, Tullius SG, Tilney NL. Host leukocytes and their products in chronic kidney allograft rejection in rats. *Transpl Int* 1994;7(1):S325-7.
- (45) Daemen MARC, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transpl* 2002;73(11):1693-700.
- (46) Donahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. The role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999;162:196-203.
- (47) Donahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R. Early renal ischemia with or without reperfusion activates NF κ B and increases TNF- α bioactivity in the kidney. *J Urol* 2000;63:1328-32.
- (48) Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999;276:H543-52.
- (49) Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor- α confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circul* 1998;97(14):1392-400.
- (50) Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *PNAS* 2000;97:5456-61.
- (51) Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappa-B in preventing TNF alpha-induced cell death. *Science* 1996;274:782-4.
- (52) Van Anwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;274:787-9.
- (53) Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-alpha and cancer therapy-induces apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-7.

- (54) Misra A, Haudek SB, Knueffermann P, et al.: Nuclear Factor- κ B protects the adult cardiac myocyte from ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circul* 2003;108:3075-78.
- (55) Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(13):6721-5.
- (56) Kunter U, Daniel S, Arvelo MB, et al. Combined expression of A1 und A20 achieves optimal protection of renal proximal tubular epithel cells. *Kidney Int* 2005;68:1520-32.
- (57) Sack MN, Smith RM, Opie LH. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia - an anti-apoptotic perspective. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):688-95.
- (58) Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allograft after ischemia-reperfusion injury. *Tanspl* 2003;76(1):50-54.
- (59) Ascon M, Ascon DB, Liu M, et al. Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int* 2009;75(5):526-35.
- (60) Fuggle S, Koo DH. Cell adhesion molecules in renal transplantation. *Transpl* 1998;65(6):763-9.
- (61) Shoskes DA, Halloran PF. Ischemic injury induces altered MHC gene expression in kidney by an interferon-gamma-dependent pathway. *Tranpl Proc* 1991;23:599.
- (62) Pratschke J, Kusaka M, Wilhelm MJ, et al. Accelerated rate of acute rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Annal Surg* 2000;232(2):263-271.
- (63) Wilhelm MJ, Pratschke J, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat chronic allografts. *Transpl Proc* 1999;31:1008-9.
- (64) Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J* 1995;333:333-6.
- (65) Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Cadaveric versus living-donors livers: differences in inflammatory markers after transplantation. *Transpl* 2003;76:1599-603.

- (66) Power BM, Heerden v. PV. The physiological changes associated with brain death-current concepts and implications for treatment of the brain dead donor. *Anaest Intens Care* 1995;23:26-36.
- (67) Takada M, Nadeau K, Hancock WW, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transpl* 1998;65(12):1533-42.
- (68) Hoeven van der JAB, Ploeg RJ, Postema F, et. al. Induction of organ dysfunction and upregulation of inflammatory markers in the liver and kidney of hypotensive brain dead rats; a model to study marginal organ donors. *Transpl* 1999;68(12):1884-90.
- (69) Pratschke J, Tullius SG, Neuhaus P. Brain death associated ischemia/reperfusion injury. *Ann of Transpl* 2004;1(9):78-80.
- (70) Cushing, H. Some experimental and clinical observations concerning states of increased intracranial tension. *Am J Med Sci* 1902;124:373.
- (71) Koo DDH, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidney: Impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int* 1999;56:1551-9.
- (72) Weiss S, Kotsch K, Francuski M, et al. Brain death activates donor organs and is associated with worse I/R Injury after liver transplantation. *Am J Transpl* 2007;7:1-10.
- (73) Schuurs TA, Gerbens F, Hoeven van der JAB et al. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the process of brain death. *Am J of Transpl* 2004;4:1972-1981.
- (74) Pratschke J, Wilhelm MJ, Kuska M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transpl* 2000;69(3):427-30.
- (75) Shivalkar B, Vaan Loon J, Wieland W, et al. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circul* 1993;87(1):230-239.
- (76) Pascher A, Klupp J. Biologics in the treatment of transplant rejection and ischemia/reperfusion injury-new applications for TNF- α inhibitors? *Biodrugs* 2005;19(4):211-231.
- (77) Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, et al. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfusion heart and kidney. *J Biol Chem* 1997;272:19943-50.

- (78) Goeddel DV. Signal transduction by tumor necrosis factor. *Chest* 1999;116:69S-73S.
- (79) Hill GR, Teshima T, Rebel VI, et al. The p55 TNF- α receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 2000;164:656-63.
- (80) Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, et al. Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am J Transpl* 2009;9:675-686.
- (81) Pulkkinen VP, Shivola RK, Koskinen PK, Lemström KB. Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α does not prevent cardiac allograft arteriosclerosis in the rat. *Transpl Proc* 2001;33:341.
- (82) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281(1583):1680-3.
- (83) Azuma H, Tomita N, Kaneda H, et al. Transfection of NF κ B-decoy oligodeoxynucleotids using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidney prolonged survival of rats renal allograft. *Gene Th* 2003;10(5):415-25.
- (84) Vos IHC, Govers R, Gröne H-J, et al. NF κ B decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts. *FASEB J* 2000;14(5):815-22.
- (85) Tullius SG, Nieminen-Kelhä M, Buelow R, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transpl* 2002;74(5):591-8.
- (86) Reutzel-Selke A, Zschockelt T, Denecke C, et al. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transpl* 2003;15(11):1786-92.
- (87) Kuecuk O, Matouvalou R, Klemz K, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transpl Proc* 2005;37:387-8.
- (88) Pratschke J, Kofla G, Wilhelm M, et al. Improvement in early behavior of the kidney allograft after donor treatment. *Tranpl. Proc.* 2002;34(6):2213-4.
- (89) Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, et al. Methylprednisolon therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome

- after liver transplantation: a prospective controlled trial. *Ann Surg* 2008;248(6):1042-50.
- (90) Yao YM, Bahrami S, Redl H, Schlag G. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuates hemodynamic dysfunction secondary to intestinal ischemia/ reperfusion in rats. *Crit Care Med* 1996;24:1547-53.
- (91) Han SL, Yu LX, Ma JJ, et al. Effect of anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in alleviating renal ischemia-reperfusion injury. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003;23(4):332-4.
- (92) Bolling SF, Kunkel SL, Lin H. Prolongation of cardiac allograft survival in rats by anti-TNF and cyclosporine combination therapy. *Transpl* 1992;53(2):283-6.
- (93) Imagawa DK, Millis JM, Seu P, et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. III. Evidence that anti-TNF antibody prolongs allograft survival in rats with acute rejection. *Transpl* 1991;51(1):57-62.
- (94) Coito AJ, Binder J, Brown LF, de Sousa M, Van de Water L, Kupiec-Weglinski JW. Anti-TNF-alpha treatment down-regulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J Immunol* 1995;154(6):2949-58.
- (95) Wollin M, Abele S, Bruns H, et al. Inhibition of TNF-alpha reduces transplant arteriosclerosis in a murine aortic transplant model. *Transpl Int* 2009;22(3):342-9.
- (96) Shu KH, Wu MJ, Chen Ch, Lian JD, Lu YS. Effect of pentoxifylline on graft function of renal transplant recipients complicated with chronic allograft nephropathy. *Clin Nephrol* 2007;67(3):157-63.
- (97) Enbrel® (Etanercept) Fachinformation, Seattle, Washington, U.S. license 1999; Number 1132, Immunex Corporation and Weyth-Ayerst Pharmaceutical.
- (98) Rowin J. Etanercept in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:300-4.
- (99) Griffin WS. Perispinal Etanercept: potential as an Alzheimer therapeutic. *J Neuroinflamm* 2008;10(5):3.
- (100) Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(1):5-10.
- (101) Levine JE, Paczesny S, Mineishi S, et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008;111(4):2470-5.
- (102) Torre-Amino G, Wallace CK, Young JB, et al. The effect of Etanercept on cardiac transplant recipients: a study of TNF- α antagonism and cardiac allograft hypertrophy. *Transpl* 2007;84(4):480-3.

- (103) Espositos E, Mazzon E, Muia C, Meili R, Sessa E, Cuzzocrea S. Splanchnic ischemia and reperfusion injury is reduced by genetic or pharmacological inhibition of TNF- α . *J of Leuc Biol* 2007;81:1032-43.
- (104) Gu Q, Yang, XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF- α reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48(6):320-28.
- (105) Langrehr JM, Gube K, Hammer MH, et al. Short term anti-CD4 plus anti-TNF- α receptor treatment in allogeneic small bowel transplantation results in long-term survival. *Tranpl* 2007;84(5):639-46.
- (106) Eason JD, Wee S, Kawai T, et al. Inhibition of the effects of TNF in renal allograft recipients using recombinant human dimeric tumor necrosis factor receptors. *Transpl* 1995;59(2):300-5.
- (107) Diamond JR, Tilney NL, Frye J, et al. Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transpl* 1992;19(54):710-6.
- (108) White E, Hildemann WH, Mullen Y. Chronic kidney allograft reaction in rats. *Transpl* 1969;8(5):602-17.
- (109) Tanabe K, Toma H, Sagara R, Takahashi K, Teraoka S, Ota K. Experimental model of chronic renal allograft rejection in rats and therapeutic efficacy of a new selective thromboxane A2 (TXA2) synthetase inhibitor (CV-4151). *Transpl Proc* 1989;21(1Pt1):293-5.
- (110) Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland: Informationsmaterial.
- (111) Klempnauer J, Steiniger B, Marquardinger E, et al. Effects of the RT1.C Region in Rat Allotransplantation. *Tranpl Proc* 1987;19(1):713-15.
- (112) Lubaroff DM, Rasmussen GT, Hunt HD. The R6 T-cell antigen: It's role in the identification of functional subsets and in T-cell activation. *Transpl Proc* 1989;21(2):3251-4.
- (113) Beckingham IJ, O'Rourke JS, Stubington SR, Hinwood M, Bishop Mc, Rigg KM. Impact of cyclosporin on the incidence and prevalence of chronic rejection in renal transplants. *Ann R Coll Surg Engl* 1997;79(2):138-42.
- (114) Lambert C, Berthoux P, Vindimian M, Hacini J, Berthoux F. Natural serum TNF antagonists in end-stage renal failure and following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9(12):1791-6.

- (115) Eddy LJ, Goeddel DV, Wong GHW. Tumor necrosis factor- α pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;30,184(2):1056-9.
- (116) Maekawa N, Wada H, Kanda T, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1229-35.
- (117) Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transpl Proc* 2008;40:3279-88.
- (118) Groot de H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: a review. *Transpl Proc* 2007;39:481-4.
- (119) Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Maruette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesions molecule cascade in ischemia-reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997;99(11):2682-90.
- (120) Roberts JR, Rowe PA, Demaine AG. Activation of NF- κ B and MAPkinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells. *Cryobiol* 2002;44(2):161-9.
- (121) Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, et al. Role of NF- κ B on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1175-84.
- (122) Kuboki S, Okaya T, Schuster R, et al. Hepatic NF- κ B activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;292:G201-7.
- (123) Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurmann RG, Brenner DA. Activation of nuclear factor- κ B during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells. *Liver Transpl and Surg* 1999;5(4):282-93.
- (124) Krum H. Tumor necrosis factor-alpha blockade as a therapeutic strategy in heart failure (RENEWAL and ATTACH): unsuccessful to be specific. *J Card Fail* 2003;8:365-8.
- (125) Louis A, Cleland GFJ, Crabbe S, et al. Clinical trials update: CAPRICORN, COPERNICUS, MIRACLE, STAF, RITZ-2, RECOVER and RENAISSANCE and cachexia and cholesterol in heart failure. Highlights of the scientific sessions of the American College of Cardiology, 2001. *Eur Heart Fail* 2001;3:381-7.

8. GLOSSAR

APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APZ	antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Cl	creatinin clearance
CAN	chronic allograft nephropathy
CD	cluster of differentiation
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis
CyA	Cyclosporin A
DGF	delayed graft function
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	deoxyribonucleid acid
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
F-344	Fisher-344-Rattenstamm
h	hour(s)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM-1	intracellular cell adhesion molecule-1
ICP	intracranial pressure
IFN- γ	Interferon gamma
IFN- β	Interferon beta
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
I- κ B	inhibitor of kappaB
IL	Interleukin
I/R	Ischämie-/Reperfusion
kDa	Kilodalton
Lew	Lewis-Rattenstamm
LTx	Lebertransplantation
mAb	monoclonal antibody

MAP	mitogen aktiviertes Protein
MAP	Hirntodmodell: middle arterial pressure
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MHC	major histocompatibility complex
NF- κ B	Nuklear Faktor-kappaB
NTx	Nierentransplantation
od-Bkg	optical density-background
PBS	phosphat buffered saline
rpm	revolutions per minute
ROS	reactive oxygen species
sTNFR	soluble TNFR
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNFR-associated protein death domain
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierter-Faktor
Uprot	urinary protein
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

9. DANKSAGUNG

Für die Ermöglichung dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. P. Neuhaus, dem Direktor der Klinik für Allgemein-, Vizeral- und Transplantationschirurgie, Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin, bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. J. Pratschke und Herrn Prof. Dr. med. SG Tullius gilt mein ausdrücklicher Dank für die sehr gute Betreuung.

Für die Bereitstellung des p75 TNFR:Fc Fusionsproteins Etanercept (Enbrel®) danke ich Frau Prof. Dr. med. P. Reinke, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin, Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin.

Ebenfalls danke ich Herrn PD Dr. med. vet. C. Große-Siestrup für die Einführung und Nutzung der Räumlichkeiten im Tierhaus.

In Gedenken möchte ich Frau Prof. Dr. med. S. Prösch, Institut für Medizinische Virologie, Campus Charité Mitte, Berlin, für die freundliche Einführung und Unterstützung bei den EMSA-Versuchen danken.

Darüberhinaus gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. medic. A. Reutzel-Selke und Herrn Dr. med. C. Denecke, die mir fachlich und freundschaftlich über all die Zeit mit viel Geduld und Wissen zur Seite standen.

Hierbei war auch Frau A. Jurisch eine große Hilfe, die mich in die einzelnen Methoden der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen einführte sowie Frau Dr. med. M. Francuski, die mir tatkräftig bei den Versuchen der Hirntodinduktion half.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich gerade in der Endphase sehr unterstützten. Dies gilt auch für meinen Freund C. Moeskes, dem ich für die Mithilfe und Rücksichtnahme bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken möchte.

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Julia Fehlberg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel: „Duale Wirkung einer Empfänger- und Spendertherapie mit dem p75 TNFR:Fc Fusionsprotein Etanercept auf die Langzeitfunktion marginaler Nierentransplantate im Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Julia Fehlberg

12. PUBLIKATIONEN

Pratschke J, **Fehlberg J**, Kordic M, Pascher A, Proesch S, Kotsch K, Volk H-D, Tullius SG, Neuhaus P, Reinke P. Protective and adverse effects of perioperative TNF- α neutralization in experimental living and brain-dead donor kidney transplantation. Am J Transpl 2003;3(suppl5):949.

Pratschke J, Kordic M, **Fehlberg J**, Pascher A, Kotsch K, Volk H-D, Tullius SG, Neuhaus P, Reinke P. Protective and adverse effects of perioperative TNF- α neutralization in experimental living and brain-dead donor kidney transplantation. Nephrol Dial Transpl 2003;18(suppl4):492.

Pratschke J, **Fehlberg J**, Kordic M, Pascher A, Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P, Reinke P. Der Therapieeffekt mit TNF- α Fusionsproteinen ist durch den Zeitpunkt der Gabe determiniert. Transplantationsmedizin 2002;Suppl.102.