

Aus der Klinik für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluß des arteriellen Hypertonus auf die
chronische Nierentransplantatdysfunktion.
Immunhistochemische Untersuchungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Kerstin Noack
aus Düsseldorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Schindler
2. Prof. Dr. med. K.H. Neumann
3. Priv. –Doz. Dr. med. A. Pascher

Datum der Promotion: 14.08.2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Transplantation und Abstoßung | 1 |
| 1.2. | Major Histocompatibility Complex | 2 |
| 1.3. | Die Chronische Transplantatdysfunktion (CTD) | 3 |
| 1.4. | Risikofaktoren | 6 |
| 1.4.1. | Alloantigen-abhängige Risikofaktoren | 7 |
| 1.4.2. | Alloantigen-unabhängige Risikofaktoren | 10 |
| 1.5. | Fragestellung | 12 |
| 2. | Material und Methoden | 15 |
| 2.1. | Versuchstiere | 15 |
| 2.2. | Nierentransplantationen. | 15 |
| 2.3. | Versuchsprotokoll (Teil eines Projektes) | 16 |
| 2.3.1. | Versuchsreihe A: Antihypertensiv behandelte Versuchstiere | 16 |
| 2.3.2. | Versuchsreihe B: keine antihypertensive Therapie | 17 |
| 2.4. | Funktionsmessungen | 18 |
| 2.5. | Gewebebegewinnung für die Immunhistologie | 18 |
| 2.5.1. | Paraffin-eingebettetes Nierengewebe | 18 |
| 2.5.2. | Schockgefrostetes Nierengewebe | 19 |
| 2.6. | Immunhistochemische Verfahren | 19 |
| 2.6.1. | Verwendete Primärantikörper | 19 |
| 2.6.1.1. | Antikörper zum Nachweis PCNA-exprimierender Zellen | 19 |
| 2.6.1.2. | Antikörper zum Nachweis MHC-exprimierender Zellen | 20 |
| 2.6.2. | Sekundärantikörper | 20 |
| 2.6.3. | Alkalische Phosphatase Substrat | 20 |
| 2.6.4. | Blockierungsseren | 21 |
| 2.7. | Chemikalien und Reagenzien | 21 |
| 2.8. | Einmal-Materialien | 22 |
| 2.9. | Geräte | 22 |
| 2.10. | Verwendete Puffer und Reaktionslösungen | 23 |
| 2.10.1. | Citratpuffer | 23 |
| 2.10.2. | Phosphate buffered salt solution (PBS einfach) | 23 |
| 2.10.3. | Neu-Fuchsin-Substrat | 24 |
| 2.10.4. | Tris-gepufferte Salzlösung (TBS in 10-facher Konzentration) | 24 |
| 2.11. | Versuchsprotokoll PCNA-Nachweis für Paraffinschnitte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 25 |
| 2.12. | Versuchsprotokoll MHC-Nachweis für Gefrierschnitte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 26 |
| 2.13. | Azan-Färbung | 27 |
| 2.14. | Versuchsprotokoll PCNA-Nachweis für Gefrierschnitte der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 27 |
| 2.15. | Versuchsprotokoll MHC-Nachweis für Gefrierschnitte der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 29 |
| 2.16. | Quantitative Auswertungen der positiven Reaktionen | 30 |
| 2.16.1. | PCNA | 30 |
| 2.16.2. | MHC | 30 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.16.3. | Interstitielle und glomeruläre Sklerose | 31 |
| 2.17. | Statistik | 31 |
| 3. | Ergebnisse | 32 |
| 3.1. | Allgemeines | 32 |
| 3.2. | Überlebensrate der Tiere der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 33 |
| 3.3. | Proteinurie der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) .. | 34 |
| 3.4. | Systolische RR-Werte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe ... | 36 |
| 3.5. | PCNA-Expression | 37 |
| 3.5.1. | Immunhistologische Beispiele der PCNA-Expression | 38 |
| 3.5.2. | PCNA-positive Zellen der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 39 |
| 3.6. | MHC-Expression | 40 |
| 3.6.1. | Immunhistologische Beispiele der MHC-Expression | 41 |
| 3.6.2. | MHC-Expression in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 42 |
| 3.7. | Nachweis der interstitiellen und glomerulären Sklerose | 43 |
| 3.7.1. | Histologische Beispiele der interstitiellen Sklerose (Gruppe A) | 44 |
| 3.7.2. | Glomeruläre Sklerose der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 45 |
| 3.7.3. | Interstitielle Sklerose der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 46 |
| 3.8. | PCNA-positive Zellen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach drei Monaten (Gruppe B) | 48 |
| 3.9. | PCNA-positive Zellen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach sechs Monaten (Gruppe B) | 49 |
| 3.10. | MHC-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach drei Monaten (Gruppe B) | 50 |
| 3.11. | MHC-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach sechs Monaten (Gruppe B) | 52 |
| 4. | Diskussion | 54 |
| 4.1. | PCNA-Expression | 57 |
| 4.1.1. | PCNA-Expression unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A) .. | 57 |
| 4.1.2. | PCNA-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 58 |
| 4.2. | MHC-Expression | 59 |
| 4.2.1. | MHC-Expression unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A) .. | 60 |
| 4.2.2. | MHC-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 60 |
| 4.3. | Interstitielle und glomeruläre Sklerose unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A) | 61 |
| 4.4. | Proteinurie (Gruppe A) | 64 |
| 4.5. | Kritik | 65 |
| 5. | Zusammenfassung | 66 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 67 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1 | Schematische Darstellung alloantigen-abhängiger und -unabhängiger Risikofaktoren | 12 |
| Abbildung 2 | Überlebensrate der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe | 33 |
| Abbildung 3 | Proteinurie der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe | 34 |
| Abbildung 4 | Systolische RR-Werte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe | 36 |
| Abbildung 5 | PCNA-Expression Allo-Tx + Hypertonus drei Monate post translationem (Gruppe B) | 38 |
| Abbildung 6 | PCNA-Expression Allo-Tx drei Monate post translationem (Gruppe B) | 38 |
| Abbildung 7 | PCNA-Expression Iso-Tx drei Monate post translationem (Gruppe B) | 38 |
| Abbildung 8 | PCNA-Expression der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 39 |
| Abbildung 9 | MHC-Expression nach drei Monaten post translationem (Gruppe B) | 41 |
| Abbildung 10 | MHC-Expression nach drei Monaten post translationem, Allo-Tx + Hypertonus (Gruppe B) | 41 |
| Abbildung 11 | MHC-Expression nach sechs Monaten, Allo-Tx + Hypertonus (Gruppe B) | 41 |
| Abbildung 12 | MHC-Expression der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 42 |
| Abbildung 13 | Interstitielle Sklerose Isograft (Gruppe A) | 44 |
| Abbildung 14 | Interstitielle Sklerose Allograft (Gruppe A) | 44 |
| Abbildung 15 | Interstitielle Sklerose Allograft + Amlodipin (Gruppe A) | 44 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 16 | Interstitielle Sklerose Allograft + Enalapril (Gruppe A) | 44 |
| Abbildung 17 | Glomeruläre Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 45 |
| Abbildung 18 | Interstitielle Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 47 |
| Abbildung 19 | PCNA-positive Zellen nach drei Monaten (Gruppe B) | 48 |
| Abbildung 20 | PCNA-Expression nach sechs Monaten post translationem (Gruppe B) | 49 |
| Abbildung 21 | MHC-Expression nach drei Monaten (Gruppe B) | 51 |
| Abbildung 22 | MHC-Expression nach sechs Monaten (Gruppe B) | 52 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Tabelle 1 | Tabellarische Darstellung der Gruppen 1 - 4 der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 17 |
| Tabelle 2 | Tabellarische Darstellung der Gruppen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 18 |
| Tabelle 3 | Proteinurie (mg/dl) in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe | 35 |
| Tabelle 4 | Systolischer Blutdruck (mmHg) in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe | 37 |
| Tabelle 5 | PCNA-Expression in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 40 |
| Tabelle 6 | MHC-Expression der antihypertensiv therapierten Reihe (Gruppe A) | 43 |
| Tabelle 7 | Glomeruläre Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 46 |
| Tabelle 8 | Interstitielle Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) | 47 |
| Tabelle 9 | PCNA-positive Zellen/Gesichtsfeld nach drei und sechs Monaten in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 50 |
| Tabelle 10 | MHC-Expression nach drei und sechs Monaten in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) | 53 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| A. | Arteria |
| Abb. | Abbildung |
| ACE-Hemmer | Angiotensin Converting Enzyme Hemmer |
| APAAP | Alkaline-Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase |
| bFGF | Fibroblastgrowthfactor |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | Beziehungsweise |
| CA | California |
| ca. | Circa |
| Ca-Antagonist | Calcium-Antagonist |
| CD | Cluster of differentiation (Zelloberflächenantigen) |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| CTD | Chronische Transplantatdysfunktion |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOCA | Desoxycorticosteronacetat |
| et al. | et alterae |
| F _{ab} -Fragment | ab: antigen-binding |
| FCXM | Flow-Cytometry-Crossmatch |
| HCL | Salzsäure |
| HLA | Human leukocyte antigen |
| i. d. R. | in der Regel |
| i.v. | Intravenös |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| kDA | Kilo Dalton |

| | |
|-----------|------------------------------------|
| LEW | Lewis |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute (n) |
| mM | milli Mol |
| MTA | Medizinisch Technische Assistentin |
| MW | Mittelwert |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PA | Pennsylvania |
| PBS | Phosphate buffered salt solution |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| pH | Pondus Hydrogenii |
| Pos. | Positiv |
| p.t.. | Post transplantationem |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RR | Riva-Rocci |
| s. | Siehe |
| s.c. | Subcutan |
| SD | Standarddeviation |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris buffered solution |
| TGF-beta | Tumor- Growth-Factor beta |
| TNF-alpha | Tumor-Nekrose-Faktor alpha |
| Tris-Base | Trizma®-Base |
| Tris-HCL | Trizma®-Salzsäure |
| Tx | Transplantat |

UW-Lösung

University of Wisconsin-Lösung

V.

Vena

VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor

vs.

Versus

1. Einleitung

1.1. Transplantation und Abstoßung

Im Jahre 1954 konnte die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen von Dr. Murray in Boston durchgeführt werden. Es wurde jedoch bald klar, dass erfolgreiche Transplantationen bei nicht-syngenen Gewebsmerkmalen nur durch eine Unterdrückung der Abstoßungsreaktion möglich werden (Humar et al. 1997). 1996 wurden weltweit 250.000 Nierentransplantationen durchgeführt, woraus die Relevanz dieser Organverpflanzung deutlich wird (Classen et al. 1998).

Durch den beachtlichen Fortschritt auf dem Gebiet der immunsuppressiven Therapie und durch die bessere Auswahl und Überwachung der Patienten lässt sich heutzutage das Problem der akuten Abstoßung meist zufriedenstellend beherrschen. Mit der Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A konnte die Einjahresüberlebensrate in nahezu jedem Transplantationszentrum um 20 Prozent gesteigert werden (Mihatsch et al. 1999). Transplantatfunktionsraten von ca. 90 Prozent nach einem Jahr können derzeit erzielt werden (Classen et al. 1998; Cosio et al. 1999; Frei et al. 1995; Staines et al. 1997).

Auf die Langzeitüberlebensrate haben diese Innovationen jedoch wenig Einfluss. Die 10-Jahrestransplantatfunktionsrate liegt bei unbefriedigenden 65 Prozent (Classen et al. 1998). Der späte Funktionsverlust wird allgemein als „chronische Abstoßung“ bezeichnet. Da ihre Pathogenese bis heute nicht gänzlich geklärt ist, jedoch als erwiesen gilt, dass es sich um ein Ereignis multifaktorieller Genese handelt, sollte man sich besser des Ausdrucks „chronische Transplantatdysfunktion“ (CTD), der sowohl immunologische als auch nicht-immunologische Faktoren als Ursache berücksichtigt, bedienen (Frei et al. 1995; Kusaka et al. 1999; Mihatsch et al. 1999; Pirsch et al. 1996; Varghese 1999).

Für die Entstehung einer CTD ist nicht allein das Immunsystem verantwortlich. Als Grundlage zur Sicherstellung der Organfunktion ist die Ernährung, der Abtransport von Stoffwechselprodukten und in einigen Fällen auch der nervale Anschluß ebenso wichtig. So werden parenchymatöse Organe über Gefässanastomosen an den Empfängerblutkreislauf angeschlossen (Gemsa et al. 1991). Sind diese aufgeführten Voraussetzungen nicht erfüllt, kommt es auch bei Isotransplantaten zu Reaktionen, die einer Abstoßung ähnlich sind (Ambrosius und Rudolph 1990).

Unmittelbar nach der Transplantation nehmen Nierentransplantate i. d. R. ihre Funktion zunächst für einige Tage auf, wobei es zu einer immunologischen Auseinandersetzung des Empfängers mit dem Transplantat kommt (Gemsa et al. 1991; Staines et al. 1997). Diese immunologische Auseinandersetzung wird durch das Erkennen der auf den Spenderzelloberflächen befindlichen MHC-Komplexe bewirkt.

1.2. Der Major Histocompatibility Complex

Wichtigster Faktor für das Auslösen einer Immunantwort ist der Major Histocompatibility Complex (MHC). Durch seinen genetisch determinierten Polymorphismus ist eine Identität von Spender und Empfänger bei Allotransplantationen so gut wie ausgeschlossen.

Die Immunogenität wird durch die zelluläre Zusammensetzung, das Ausmaß der Antigenexpression und das genetisch festgelegte Antigenmuster bestimmt (Gemsa et al. 1991). Durch den Kontakt mit dem körperfremden MHC-System des Spenders kommt es zu einer Sensibilisierung der T-Lymphozyten des Empfängers (Gemsa et al. 1991; Sun et al. 1995).

Über das Lymphsystem werden die als fremd erkannten Substanzen fortgeleitet. In den regionalen Lymphknoten werden T-Lymphozyten bereitgestellt, die im histologischen Bild nach Transplantatabstoßungen dominieren.

In zahlreichen Experimenten konnte die durchaus wichtige Anwesenheit von T-Lymphozyten und ihre Bedeutung bewiesen werden. Bei Abschirmung des Gewebes von dem genannten Zelltyp kommt es zwar zur Bildung von Antikörpern gegen das implantierte Gewebe, eine akute Abstoßungsreaktion unterbleibt jedoch (Ambrosius und Rudolph 1990). Der zytopathogene Effekt der T-Lymphozyten beruht zum einen auf ihrer starken Vermehrung und zum anderen auf der Sekretion zyto- und chemotaktischer Mediatoren, welche die Entzündung unterhalten, indem primär unbeteiligte Zellen in den Abstoßungsprozess involviert werden.

In den ersten Tagen post transplantationem finden sich vornehmlich Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten in den perivaskulären Räumen. Plasmazellen sowie Lymphozyten der B-Zell-Reihe sind zunächst zahlenmässig deutlich unterlegen, zeigen jedoch eine ausgeprägte proliferative Tendenz (Ambrosius und Rudolph 1990).

Im Laufe der Zeit verschiebt sich das Verhältnis der Zellen eindeutig zu Gunsten der Killer/ Suppressor T-Lymphozyten und entzündliche Veränderungen der Gefäße treten auf. Hämorrhagien und Ödeme entwickeln sich, intravasal bilden sich Thromben aus. Durch die massive Invasion mononukleärer Zellen okkludieren die Gefäße, Kapillaren gehen zugrunde. Die Transplantate erreichen durch die ödematöse Schwellung das zwei- bis dreifache ihrer Größe. Ferner werden fibrinoide Nekrosen mit Thrombozyten- und Fibrinablagerungen gefunden. Immunglobulinablagerungen sind zunächst nicht imponierend, in der späteren Phase der Abstoßung findet man sie gehäuft in Zusammenhang mit Komplement (Ambrosius und Rudolph 1990; Gemsa et al. 1991). Diese Mechanismen können heute erfolgreich durch den Einsatz von Immunsuppressiva unterdrückt und somit ein akutes Abstoßungsereignis meist erfolgreich verhindert werden.

1.3. Die Chronische Transplantatdysfunktion (CTD)

Weit weniger erfolgreich als die Therapie der akuten Abstossung sind die bisherigen Versuche der CTD entgegenzuwirken. Dies ist von tragender Relevanz, da die chronische Transplantatdysfunktion den häufigsten Grund für den späten Transplantatverlust darstellt (Humar et al. 1999; Kusaka et al. 1999; Mannon et al. 1999; Szabo et al. 2000; Tullius et al. 1999).

Bei der CTD handelt es sich um einen langsam progredienten Prozess (Gemsa et al. 1991), bei dem es durch eine pathologisch gesteigerte Apoptose zum Untergang funktionell wichtiger Zellen und somit zur Organinsuffizienz kommt (Silbernagel und Lang 1998).

Klinisch macht sich die CTD durch eine zunehmende Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate bis hin zum kompletten Funktionsverlust bemerkbar.

Ursachen für diese Funktionseinbußen sind unter anderem in der Intimaproliferation und den obliterierenden Arteriopathien zu suchen. Durch den Verschluß der Gefäße kommt es zu einer Unterversorgung des Transplantats mit anschließender Atrophie und Abstoßung (Paul 1999a).

In die Pathogenese der CTD sind sowohl alloantigen-abhängige, zu denen das HLA-Matching und das Vorausgehen einer akuten Abstoßungsreaktion zählen, als auch alloantigen-unabhängige Faktoren verantwortlich, zu denen als wichtigste der vorherige

Hirntod des Spenders, Gewebeischämien sowie Reperfusionsschäden des Transplantates, die Hyperfiltration des Spenderorgans und der Hypertonus gehören.

Nierentransplantate mit CTD weisen histologisch sklerotische Veränderungen von Gefäßen, Glomeruli und dem tubulointerstitiellen Raum auf (Mihatsch et al. 1999) sowie fibröse Intimaverdickungen von Arteriolen und Arterien, Spaltungen der peritubulären Kapillarmembranen, interstitielle Sklerosen und Tubulusatrophien (Paul 1999a). Hierbei handelt es sich ausschließlich um unspezifische Reaktionen; die verschiedensten de novo, aber auch rezidivierenden Erkrankungen können zu sklerosierenden Veränderungen in allen Kompartimenten der Niere führen. Die histologische Trennung von CTD und sonstigen, zu morphologischen Veränderungen führenden Erkrankungen, ist folglich äußerst diffizil, da keine spezifischen histologischen Korrelate existieren (Mihatsch et al. 1999; Paul 1999a).

Eine klinische Definition der CTD könnte man über die Nierenfunktionsverschlechterung innerhalb von drei bis sechs Monaten post transplantationem bei Fehlen anderer Erkrankungen formulieren. Für die morphologische Charakterisierung sollte man die histologischen Termini nekrotisierend, infiltrierend oder proliferierend verwenden, da die Bezeichnungen „akut“ und „chronisch“ klinische Geschehen beschreiben (Mihatsch et al. 1999).

Die histologisch nachweisbare Sklerose ist das Ergebnis von wiederholten akuten Abstoßungsprozessen oder, wesentlich seltener, das Ergebnis eines einzigen akuten Abstoßungsereignisses.

Unabdingbar für die Diagnose CTD sind das Vorliegen von Veränderungen an den Gefäßen, den Glomeruli und die Modifikation der tubulointerstitiellen Räume. Gefäßveränderungen findet man fast ausschließlich in großen und kleinen Arterien, während Venen gewöhnlich nicht betroffen sind.

Anhand morphologischer Untersuchungen von abgestoßenen Transplantaten konnte festgestellt werden, dass eine Vaskulopathie, die spät nach der Transplantation auftritt, bevorzugt die großen Arterien betrifft, während die frühe Vaskulopathie, die in der Regel einen fulminanteren nekrotisierenden Verlauf hat, meist bis in die Peripherie des Gefäßbaumes reicht; auch Arteriolen und Glomeruli werden nicht verschont (Mihatsch et al. 1999).

Endotheliale Defekte in Form von Erweiterungen und Vakuolisierungen der Endothelzellen sowie fokale Loslösung der Endothelzellen von der Basalmembran stehen zunächst im Vordergrund. Einzelne Zellnekrosen lassen sich nachweisen. Schließlich

kommt es zur Invasion von Monozyten und Lymphozyten in das subendotheliale Gewebe (infiltrative Vaskulopathie).

Bei den infiltrierenden Zellen handelt es sich überwiegend um CD-8-positive Lymphozyten und Monozyten. Bei Fibrin- und Thrombozytenthrombenablagerungen in der Intima kommt es zu nekrotisierenden Vaskulopathien. Es kann zu einer fibrinoiden Nekrose der Media mit Destruktion der Lamina elastica interna kommen. Im späten Stadium werden die infiltrierenden mononukleären Zellen durch proliferative Myofibroblasten ersetzt, die eine neue Media im subendothelialen Raum bilden (proliferative Vaskulopathie).

Durch die Produktion von Kollagenfasern kann es schließlich zu einer konzentrischen Intimasklerose kommen (sklerosierende Vaskulopathie).

Das Spektrum der Vaskulopathien variiert von einer sehr milden infiltrativen, proliferativen und sklerosierenden Form bis hin zu schweren nekrotisierenden Vaskulopathien mit massiven intravasalen Koagulationen und raschem Transplantatverlust (Mihatsch et al. 1999).

Pilmore et al. (1999) konnten eine vermehrte VEGF-Expression, welches bei Inflammation und Vaskulopathie vermehrt ausgeschüttet wird, sowie eine Anreicherung von CD-68-positiven Makrophagen bei der CTD nachweisen. Ostendorf et al. (1999) zeigten, dass VEGF an den Reparaturvorgängen der Endothelzellen beteiligt ist.

Gaweco et al. konnten nachweisen, dass während der ablaufenden CTD infiltrierende Zellen der T-Zell-Reihe sowie CD-40 positive Zellen exprimiert werden. Ferner wies er nach, dass Glomerula- und Tubuluszellen während der CTD CD-154 positive Zellen produzieren. Der Interaktion von CD-40 und CD-154 positiven Zellen mit dem Parenchym des Transplantates wird eine Rolle bei der Entwicklung der CTD zugeschrieben (Gaweco et al. 1999).

Ebenso wie bei den vaskulären unterscheidet man bei den glomerulären Veränderungen späte und frühe Formen. Bei diesen Umgestaltungen handelt es sich um Glomerulopathien mit intravasalen Koagulationen und Transplantatglomerulitiden, die beide häufig mit Vaskulopathien assoziiert sind. Alleinige Glomerulitiden mit fokalen und segmentalen Zellinfiltraten und erweiterten Kapillarschleifen oder aber eine mit intraglomerulärem Fibrin bzw. Thrombozytenthromben assoziierte Glomerulitis münden häufig in einer Glomerulopathie, die man charakteristischer Weise bei der CTD morphologisch nachweisen kann. Sie zeichnet sich durch eine Verdickung - in schweren Fällen auch durch eine Duplikatur - der Basalmembran aus. Transplantatglomerulopathien und

Transplantatglomerulitiden können nebeneinander im gleichen Glomerulum beobachtet werden. In acht von zehn Fällen ist die Glomerulopathie mit einer sklerosierenden Vaskulopathie vergesellschaftet (Mihatsch et al. 1999).

Die in der Basalmembran platzierten Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten führen hier zu Zellschäden und/oder Nekrosen; immuntechnologisch lassen sich Immunglobuline und Komplement C3 nachweisen. Glomeruläre Schaumzellen lassen sich häufig beobachten (Mihatsch et al. 1999).

Im fortgeschrittenen Stadium mündet die Glomerulopathie meist in einer segmentale Glomerulosklerose (Mihatsch et al. 1999). Die häufigsten Ursachen, die zu einem Organverlust führen, sind die tubulointerstitiellen Veränderungen. Auch 20 Jahre post transplantationem können sie sich noch entwickeln. Es kommt zu fokalen oder diffusen mononukleären Zellinfiltrationen, die in gesunden Tubuli lokalisiert sind und hier zu tubulären Zellnekrosen führen. Hierbei handelt es sich um den Pathomechanismus der akuten Abstoßung, wobei noch nicht geklärt ist, ob seine langsame Progredienz zu einem irreversibeln Verlust von Nephronen führt, was letztlich einer chronischen Dysfunktion gleichzusetzen wäre. Eine Tubulitis ist, wenn überhaupt, in nur schwachem Ausmaß nachweisbar.

Es wird angenommen, dass die chronische Abstoßung entweder Folge einer besonders schweren akuten Abstoßungskrise oder häufig wiederholter - auch subklinischer - akuter Abstoßungsreaktionen ist (Mihatsch et al. 1999).

1.4. Risikofaktoren

Die Ursachen der CTD sind sowohl immunologischer wie auch nicht-immunologischer Genese. Die CTD initiiierenden Faktoren dürften zum Großteil immunologischen Ursprungs sein, während der Abstoßungsprozess eher von nicht-immunologischen Faktoren unterhalten wird (Varghese 1999). Ob immunologische Faktoren die Hauptrolle für das Auftreten der CTD spielen, ist derzeit nicht geklärt. Ob die Genese der Abstoßungsreaktionen nun auf alloantigen-abhängigen oder aber alloantigen-unabhängigen Faktoren beruht, stets führt sie zu Gewebeschäden und stereotypisch zur Infiltration von Leukozyten und Monozyten, die proinflammatorische Zytokine, Enzyme und Wachstumsfaktoren wie TGF-beta, PDGF, bFGF, IL-1 β , TNF- α und andere exprimieren (Habeicht et al. 1990). Auch durch das Transplantatparenchym und interstitielle Zellen des Transplantates werden inflammatorische Mediatoren produziert, die zelluläre Prozesse

vermitteln und Defektheilungen sowie narbige Umbildungen des Organs nach sich ziehen (Paul 1999a).

1.4.1. Alloantigenabhängige Risikofaktoren

Sowohl zell- als auch antikörpervermittelte Komplementaktivierungen und die vermehrte Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sind die Mechanismen der alloantigen-abhängigen Immunantwort, die schließlich zu einer Abstoßungsreaktion führen können (Varghese 1999).

Akute Abstoßungen scheinen richtungweisend für die Langzeitüberlebensrate des Transplantates zu sein (Agraz et al. 1999; Cosio et al. 1999; Flechner et al. 1996; Frei et al. 1995; Heaf und Ladefoged 1998; Ishikawa et al. 1999; Isoniemi et al. 1994; Matas 1994; Naftilan et al. 1989; Pirsch et al. 1996; Tullius et al. 1998; Varghese 1999).

Humar et al. (1999) konnten demgemäß zeigen, dass die Zehnjahresüberlebensrate bei 91 Prozent liegt, wenn kein akuter Abstoßungsprozess vonstatten gegangen ist, jedoch nur bei 45 Prozent, wenn die Transplantate zuvor eine akute Abstoßungsepisode durchlaufen haben. Die Ursache für das Absterben der Transplantate war bei Patienten ohne vorherige akute Abstoßung in 1,8 Prozent der Fälle eine chronische Transplantatdysfunktion; bei denen mit akuter Abstoßung war die chronische Transplantatdysfunktion in 23,8 Prozent der Fälle der Grund für den späten Organverlust.

Tullius et al. (1998) konnten zeigen, dass frühe akute Abstoßungsreaktionen bei effektiver Therapie (unter drei Monaten) kein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion darstellen. Späte akute Abstoßungsreaktionen hingegen führen sehr häufig zu einem späteren Organverlust. Eine besonders schlechte Langzeitprognose haben Transplantatempfänger, bei denen vaskuläre akute Abstoßungsreaktionen festzustellen sind. Sie haben eine deutlich schlechtere Ein- und Fünfjahresüberlebensrate als die Patienten mit interstitiellen bzw. keinerlei akuten Abstoßungsreaktionen, die sich in ihren Überlebensraten nicht unterschieden. Die von Tullius et al. (1998) formierte Studie bestand aus dem LEW→BNF1 Rattentransplantationsmodell, in dem die transplantierten Organe ihrem Empfänger wieder entnommen wurden, sobald dieser Anzeichen einer akuten Abstoßungsreaktion zeigte und in syngene Empfänger reimplantiert. Diese Reimplantation erfolgte entweder drei - vier Tage oder fünf - sieben Tage nach Auftreten des akuten Abstoßungsereignisses. Die bereits am dritten - vierten Tag reimplantierten Nieren

zeigten eine deutlich schwächer ausgeprägte Zellinfiltration und nur geringe Hinweise auf die Entwicklung einer Glomerulosklerose. Durch die frühe Reimplantation war der Abstoßungsprozess reversibel und die Transplantate nahmen ihre physiologische Funktion wieder auf. War der Abstoßungsprozess bereits weiter fortgeschritten (fünfter bis siebter Tag), so konnte ein weiteres destruierendes Geschehen auch durch die Retransplantation nicht aufgehalten werden; schließlich gipfelte es in einem Nierenversagen.

Basadonna et al. (1993) wiesen mittels Nierenbiopsaten die Korrelation von akuter Abstoßung und späterer CTD nach. Es ergab sich eine Inzidenz der chronischen Transplantatdysfunktion von null Prozent, wenn innerhalb von 60 Tagen post transplantationem keine akute Abstoßung nachweisbar war. Die Inzidenz der chronischen Transplantatdysfunktion lag hingegen bei 63 Prozent, wenn zuvor eine akute Abstoßung im genannten Zeitraum stattgefunden hat.

Die Anzahl, das Ausmaß und die Art der akuten Abstoßungsreaktionen sowie der Zeitpunkt ihres Auftretens sind entscheidende prädiktive Faktoren für das weitere Schicksal des Allotransplantates. Die Überlebensrate verschlechtert sich, je mehr akute Abstoßungsreaktionen innerhalb des ersten Jahres post transplantationem auftreten (Agraz et al. 1999). Negativ wirkt sich ferner eine Steroidresistenz des Geschehens aus (Agraz et al. 1999). Für die Entstehung einer CTD spielt die Persistenz geringfügiger Verletzungen durch akute Abstoßungen und die inflammatorische Antwort eine entscheidende Rolle. Durch Ischämien hervorgerufene Endothelschäden können ihrerseits zu einer immunologischen Antwort führen (Varghese 1999).

Zur Senkung des Risikos einer akuten Transplantatabstoßung ist ein ideales HLA matching unentbehrlich (Cosio et al. 2001; Flechner et al. 1996; Ishikawa et al. 1999; Matas 1994; Massy et al. 1995, Milford 1994). Für die Einjahresüberlebensrate ist das HLA-B und HLA-DR matching von tragender Bedeutung. Ein Einfluss auf die Dreijahresüberlebensrate konnte allerdings nur für HLA-B festgestellt werden, nicht jedoch für HLA-DR (Frei et al. 1995).

Promool et al. (2000) wiesen nach, dass das HLA-A, -B, und -DR-Matching großen Einfluss auf das Auftreten einer akuten Abstoßung haben, für die Entwicklung einer CTD jedoch eher eine untergeordnete Rolle spielt.

Kimikawa et al. (1999) konnten einen positiven Zusammenhang zwischen der Expression gegen B-Zellen des Spenders gerichteter Antikörper und des Serum-Kreatininwertes feststellen; für T-Zell-Antikörper konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden.

Erhöhte Serum-Kreatininwerte gelten als Risikofaktor für das Auftreten einer CTD (Cosio et al. 2001; Flechner et al. 1996; Pirsch et al. 1996).

Mannon et al. (1999) demonstrierten, dass die TGF- β Sekretion, ein Zytokin, welches eine bedeutende Rolle bei der Transplantatabstoßung spielt, in MHC-I und MHC-II defizienten Transplantaten deutlich abgeschwächt war. Die reduzierte MHC-I und MHC-II Expression konnte jedoch eine Abstoßung nicht verhindern. Das Ausmaß der CTD scheint folglich unabhängig der MHC-Disparität zwischen Spender und Empfänger zu sein.

Starzel et al. stellten die Hypothese auf, dass für die Organakzeptanz die Zellmigration transplantiert lymphatischer Organe eine entscheidende Rolle spielt (Starzl et al. 1992). Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass eine donorspezifische Immunantwort auf allogenetisches Herzgewebe bei gleichzeitiger Transplantation einer vaskularisierten Spendermilz ausblieb (Bitter-Suermann 1975). Die Verabreichung von Immunsuppressiva war entweder gar nicht oder nur in Form einer Kurzzeittherapie erforderlich. Gleiche Phänomene konnten bei der kombinierten Transplantation anderer lymphatischer Organe wie Leber und Lunge beobachtet werden (Starzl et al. 1992; Sun et al. 1995).

Die durch die immunsuppressive Therapie in ihrer Abwehr geschwächten Patienten tragen ein erhöhtes Infektionsrisiko. Besonders sei hier auf die Gefahr einer Cytomegalie-Infektion (CMV-Infektion) hingewiesen. Beim immunologisch gesunden Menschen hat sie i. d. R. keine Erkrankung zur Folge, beim immunsupprimierten oder immundefizienten Patienten hingegen führt sie zu einer zusätzlichen viralen Immunsuppression. Der Weg für bakterielle und mykotische Superinfektionen ist geebnet, es kann schließlich zu schweren Allgemeinerkrankungen kommen. Um eine Infektheilung zu ermöglichen, muß auf Immunsuppressiva verzichtet werden, was die Gefahr einer Abstoßungsreaktion deutlich begünstigt (Gemsa et al. 1991). Ferner begünstigt eine CMV-Infektion das Entstehen einer Arteriosklerose und führt zu einer signifikanten Funktionsverschlechterung des Transplantats (Varghese 1999).

1.4.2. Alloantigen-unabhängige Risikofaktoren

Einer der wichtigsten dieser Faktoren scheint der systemische Hypertonus zu sein; seine Prävalenz schwankt zwischen 6 - 80 Prozent post transplantationem. Er führt zu einem beschleunigten Abfall der Kreatinin-Clearance und schnellerer Dialysepflicht bis hin zum absoluten Funktionsverlust des Transplantates (Szabo et al. 1998).

Bereits vier Wochen post transplantationem konnten Kusaka et al. eine Intima-verdickung der kleinen Arterien bei hypertonen Transplantatempfängern nachweisen, 12 Wochen später fanden sie interstitielle Sklerosen und Glomerulosklerosen. 24 Wochen post transplantationem entwickelte sich eine ausgeprägte Intimaverdickung mit konsekutiven intensiven perivaskulären und interstitiellen Sklerosen. In dem Ausmaße konnte man die pathologischen Veränderungen bei normotensiven Empfängern noch nie beobachten (Kusaka et al. 1999).

Der Hypertonus induziert arteriosklerotische Veränderungen von Gefäßen. In der Niere führt er zur Schädigung der Arteriolen und Glomeruli (Nephrosklerose). In der Folge entwickelt sich eine renale Ischämie, die zur Aktivierung des Renin-Angiotensinsystems führt. Ein circulus vitiosus entsteht; aus dem primär extrarenalen Hypertonus hat sich eine renale Hypertonie entwickelt, bei dem sich Hypertonus und Ischämie gegenseitig begünstigen (Silbernagel und Lang 1998). Durch den Hypertonus kommt es zu einer Endothelaktivierung mit einer vermehrten Expression von immunologisch wirksamen Oberflächenmolekülen und Zytokinen. Auf diese Art vermag der Hypertonus die Reaktion der Abstoßung zu unterhalten (Kusaka et al. 1999).

Frei et al. (1995) wiesen nach, dass nicht nur der Hypertonus post transplantationem sondern vielmehr auch ein präexistenter Hypertonus vor der Transplantation die Überlebenswahrscheinlichkeit des Nierentransplantates deutlich herabsetzt, indem er das Auftreten einer chronischen Abstoßungsreaktion begünstigt. Ein Hypertonus in der Post-transplantationsphase führt zu einem schnelleren Anstieg der Kreatinin-Clearance, einer vermehrten Dialysepflicht und schließlich auch schneller zum Tode (Brazy et al. 1992).

Cosio et al. (2001) wiesen ein erhöhtes Risiko für eine akute Abstoßungsreaktion bei präexistentem Hypertonus nach. In der gleichen Studie lag das Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion bei hypertensiven Patienten bei 80 % wohingegen normotensive Patienten nur in 20 % der Fälle eine akute Abstoßungsreaktion erlitten.

Ischämien vor, während und/ oder nach der Transplantation des Spenderorgans führen zu einer verzögerten Funktionsaufnahme des Transplantats, die sich als Anurie aufgrund von Tubulusnekrosen bemerkbar machen (Gemsa et al. 1991). Diese ischämischen Zustände stellen einen weiteren nicht-immunologischen Risikofaktor, zum einen für eine akute Abstoßung, zum anderen für das Auftreten einer CTD, dar (Paul 1999a; Tullius et al. 1998).

Desgleichen wirken sich erhöhte Cholesterolspiegel, sowohl vor als auch nach der Transplantation ungünstig auf die Überlebenserwartung des Organs aus (Ammarguella et al. 2002, Isnoniemi et al. 1994, Paul 1999a, Varghese 1999). Transplantatempfänger weisen häufig Lipoproteinabnormalitäten auf. Es gilt als gesichert, dass Dyslipidämien für die Entwicklung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht werden können. So dürfte eine Hypertriglyceridämie wohl auch bei Transplantierten den genannten Effekt haben (Varghese 1999). Tatsächlich sind die histologischen Veränderungen der transplantierten Organe bei Patienten mit erhöhten Cholesterolspiegeln wesentlich stärker ausgeprägt (Paul 1999a). Bemerkenswert ist, dass lediglich die Transplantatgefäße, nicht jedoch die Empfängergefäße, von einer lipidassoziierten Arteriosklerose betroffen sind. Erklären ließe sich dieses Phänomen durch die Potenzierung der pathologischen Dyslipidämieauswirkungen durch immunologisch vermittelte Prozesse, die zu einem beschleunigten Auftreten einer Arteriosklerose führen (Varghese 1999).

Als Risikofaktor für die CTD gilt ferner die glomeruläre Hyperfiltration (Bochicchio et al. 1992; Frei et al. 1995; Modlin et al. 1996; Terasaki et al. 1994; Tullius et al. 1998; Varghese 1999). Durch eine inadäquat niedrige Nephronenzahl des gespendeten Organs entwickelt sich eine Überbelastung der verbleibenden Nephrone, die auf diese Beanspruchung mit Hypertrophien und Sklerosen antworten. Diese pathologischen Veränderungen führen schließlich zu einer stetigen Funktionsverschlechterung des Organs. Wie anhand von Untersuchungen an Ratten demonstriert werden konnte, führt eine unilaterale Nephrektomie nicht zum Zustand der Hyperfiltration; diese entwickelt sich erst, wenn die Masse der Niere auf 1/5 reduziert ist. Eine Hyperfiltration ist also besonders zu erwarten, wenn die transplantierte Niere für den Empfänger zu klein ist (z.B. Kinderniere in adulten Empfänger; Frauenniere in männlichen Empfänger) (Modlin et al. 1996); aber auch bei Schäden des Transplantates, wie sie z.B. durch Ischämien verursacht werden (Isnoniemi et al. 1994, Terasaki et al. 1994).

Eine nicht bald einsetzende Diurese post transplantationem (Agraz et al. 1999, Cosio et al. 2001, Paul 1999b), der Zustand des Transplantates vor Transplantation (Paul 1999b), das

Spenderalter (Flechner et al. 1996, Isoniemi et al. 1994, Paul 1999b, Varghese 1999), Reperfusionsverletzungen (Tullius et al. 1998, Varghese 1999), eine reduzierte funktionstüchtige Nierenmasse (Hyperfiltration) (Tullis et al. 1999, Wenzel et al. 1992), Diabetes mellitus (Varghese 1999), Nephrotoxizität der Immunsuppressiva (Amuchastegui et al. 1998, Frei et al. 1995, Paul 1999b, Staines et al. 1997, Tullius et al. 1998, Varghese 1999), der Hirntod des Spenders, welcher zu einer Vermehrung inflammatorischer Zellen in peripheren Organen führt und somit Abstoßungsreaktionen den Weg ebnet (Pratschke et al. 2000) sowie der Hypertonus sind erklärte Risikofaktoren, deren genauer Einfluss auf die CTD größtenteils noch zu klären ist.

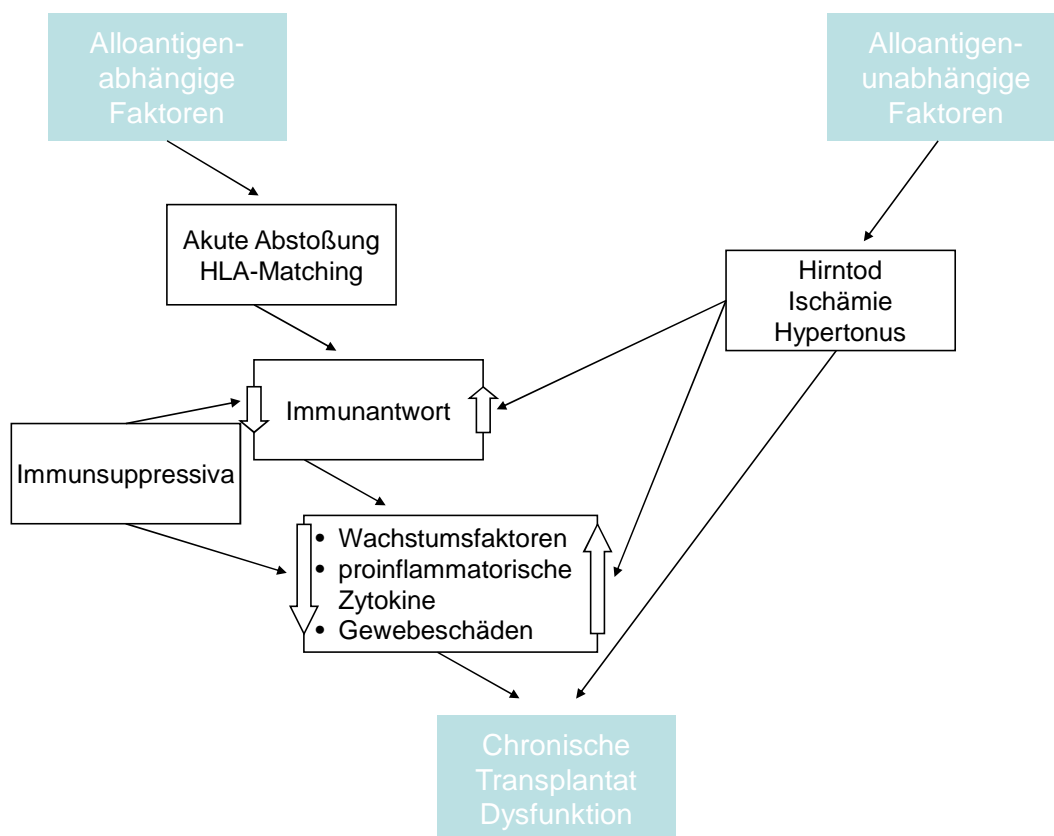


Abbildung 1: Schematische Darstellung alloantigenabhängiger und -unabhängiger Risikofaktoren

1.5. Fragestellung

Die multifaktorielle Genese der CTD erfordert eine separate Untersuchung der zahlreichen Risikofaktoren, um deren Relevanz für das Auftreten der chronischen Transplantatdysfunktion ausmachen zu können.

Aufgrund der Erkenntnis, dass nicht allein immunologische Faktoren für diesen Prozess verantwortlich zu machen sind, soll die Aufmerksamkeit dieser Arbeit einem alloantigen-unabhängigen Risikofaktor, dem Hypertonus, gewidmet werden.

Welche Rolle der Hypertonus bei der chronischen Abstoßung spielt, ist noch nicht endgültig geklärt. Das vermehrte Auftreten eines Hypertonus post transplantationem lässt vermuten, dass er eher die Folge als die Ursache für die CTD ist.

Die Untersuchung von zwei verschiedenen Tiermodellen in dieser Arbeit erlaubt Rückschlüsse auf den Einfluss des Hypertonus auf die CTD.

Bei dem ersten Modell handelt es sich um identische Gruppen, die sich durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen eines arteriellen Hypertonus und der Transplantationsform (isoallo) von einander unterscheiden. Untersucht wurden diese Gruppen auf Unterschiede hinsichtlich der Expression von PCNA und MHC-Molekülen.

Im zweiten Modell wird neben dem Hypertonus ferner die Therapie desselbigen mittels eines ACE-Hemmers (Enalapril) bzw. Ca-Antagonisten (Amlodipin) und die Auswirkung dieser Therapie auf die Expression von PCNA, MHC, strukturelle Umbauvorgänge sowie Funktionalität der transplantierten Nieren mittels regelmäßiger Gesamtproteinbestimmung betrachtet.

Der Vergleich der Ergebnisse erlaubt Rückschlüsse auf die Beeinflussung der CTD durch den Hypertonus. Aufgrund von klinischen Beobachtungen, dass nicht-immunologische Faktoren wie der arterielle Hypertonus einen Risikofaktor für die CTD darstellen, soll der Einfluss des arteriellen Hypertonus auf die chronische Transplantatdysfunktion anhand des standardisierten und gut reproduzierbaren Transplantationsmodells Fisher→Lewis unter folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Akzeleriert der arterielle Hypertonus das Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion?
2. Hat der arterielle Hypertonus Einfluss auf die intrarenale Expression von PCNA, MHC und die Proliferation, die eine Abstoßungsreaktion begünstigen bzw. Ausdruck struktureller Umbauvorgänge sind?
3. Beeinflusst die Therapie des Hypertonus mit Antihypertensiva (ACE-Hemmer versus Ca-Antagonist) die Funktionsverschlechterung und das Transplantatüberleben sowie die Expression von PCNA und MHC sowie strukturelle Umbauvorgänge?

4. Unterscheidet sich die Therapie mit ACE-Hemmern von der Therapie mit Calciumantagonisten hinsichtlich der Überlebensrate, Funktionsrate und dem Ausmaß der chronischen Transplantatdysfunktion sowie der Expression von MHC und PCNA?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die im Folgenden geschilderten Untersuchungen wurden an dem Fisher→Lewis Ratten-nieren-Transplantationsmodell durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die orthotope Transplantation männlicher Fisher-Nieren (F344) in eine nephrektomierte Lewis-Ratte (Lew) (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Die Tiere waren bei Transplantation 10 Wochen alt und wogen zwischen 250 und 300 Gramm. Die Tiere wurden in einem handelsüblichen Plastikkäfig bei kontrollierter Raumtemperatur von 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % gehalten. Es wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten.

Die Tiere hatten je nach Gruppenzugehörigkeit Zugang zu herkömmlichen Wasser- und Futternäpfen bzw. erhielten Futter, das mit 5 % igem NaCl angereichert war. Sie erhielten ferner Leitungswasser ad libitum, bei den antihypertensiv behandelten Tieren wurde es mit 50 mg/l Enalapril bzw. 75 mg/l Amlodipin versehen.

Die Experimente wurden durch die zuständige Berliner Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit) bewilligt.

2.2. Nierentransplantationen

Die im Folgenden geschilderten operativen Schritte wurden durch Dr. med. Qun durchgeführt. Die Tiere wurden mir im Anschluß freundlicherweise zur Durchführung der folgend geschilderten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Als Donor fungierten Fisher-Ratten, deren linke Niere unter Äthernarkose präpariert, entfernt und mit kalter UW-Lösung (4 °C) perfundiert wurde. Es erfolgte die orthotope Transplantation in eine zuvor linksseitig nephrektomierte Lewis-Ratte (LEW).

Die A. renalis, V. renalis sowie der Ureter wurden mittels 10-0 Prolen-Nähten über eine End-zu-End-Anastomose verbunden. Die kontralaterale Niere der Empfängerratte wurde 10 Tage später entfernt, so dass ab diesem Tag nur noch das zuvor transplantierte Organ vorhanden war.

Zur Unterdrückung einer akuten Abstoßungsreaktion erhielten die Tiere 1,5 mg/kg/die s.c Cyclosporin A über 10 Tage. Ferner bekamen die Tiere post transplantationem eine

Einmalgabe Amoxicillin (20mg/kg s.c.). Im weiteren Verlauf wurden die Tiere dann je nach Gruppenzugehörigkeit nach 28 Tagen, nach drei bzw. nach sechs Monaten zur weiteren Untersuchung getötet und die transplantierten Nieren wieder entfernt.

Die Aorta wurde zur Entfernung des Transplantates unter Äther-Inhalationsnarkose und Ketaminnarkose (100 mg/kg i.v.) mit einer 16 G Nadel katheterisiert nachdem das Abdomen median geöffnet und der Retroperitonealraum freipräpariert wurde. Es erfolgte eine intravasale Blutdruckmessung und die Entnahme von 1 ml Blut, welches durch 1 ml PBS ersetzt wurde. Die Vena cava inferior wurde distal des Zuflusses der linken Vena renalis angeschlitzt und der Intravasalraum der Ratte mit 50 ml PBS gespült, anschließend wurden die Nieren in situ mit 50 ml 3 %-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zur Vermeidung von Druckspitzen erfolgten die Spülvorgänge unter intravasaler Blutdruckkontrolle. Die Transplantate wurden unverzüglich entfernt und in drei gleichgroße Teile unterteilt. 1/3 wurde für RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C aufbewahrt, 1/3 wurde am folgenden Tag für die konventionelle Histologie in Paraffin eingebettet und 1/3 wurde über Nacht in 3 % 100 mM Paraformaldehyd, 100 mM Sucroselösung und 100mM Cacodylatlösung eingelegt und am nächsten Tag für die immunhistologische Analyse schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

2.3. Versuchsprotokoll (Teil eines Projektes)

2.3.1. Versuchsreihe A: Antihypertensiv behandelte Versuchsreihe

Es wurden 4 Gruppen aus jeweils 7 Tieren gebildet, bei denen die Nierentransplantation in oben aufgeführter Weise durchgeführt wurde.

Bei den Gruppen 1-3 handelte es sich um Allotransplantate, Gruppe 4 umfaßte nicht-transplantierte Tiere.

Den Tieren der Gruppen 1-3 wurde ein Hypertonus mittels in Sesamöl aufgelöstem Desoxycorticosteronacetat (DOCA, Sigma 50 mg/Woche s.c.) bei gleichzeitiger Kochsalzbelastung (Trockenfutter mit Salzgehalt von 5 %) induziert.

Gruppe 1 erhielt eine antihypertensive Therapie mittels ACE-Hemmer (Enalapril 50 mg/l = 1,5 mg/d/Ratte bei einer Trinkleistung von ca. 30 ml/d).

Gruppe 2 erhielt eine antihypertensive Therapie mittels Ca-Antagonisten (Amlo-dipin 75 mg/l = 5,6 mg/d/Ratte bei einer Trinkleistung von 34 ml/d).

Bei Gruppe 3 erfolgte keine Therapie.

Bei Gruppe 4 handelte es sich um nicht transplantierte normotensive Tiere, die keinerlei Therapie erhielten.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Gruppen 1-4 der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); die Entnahme der transplantierten Nieren erfolgte 28 Tage post transplantationem

| Tiere Gruppe A | Tx | DOCA und Kochsalzbelastung | Enalapril | Amlodipin |
|----------------|------|----------------------------|-----------|-----------|
| 1 A | Allo | + | + | - |
| 2 A | Allo | + | - | + |
| 3 A | Allo | + | - | - |
| 4 A | Non | - | - | - |

2.3.2. Versuchsreihe B: Keine antihypertensive Therapie

Auch bei dieser Versuchsreihe wurden die Transplantationen in oben aufgeführter Weise durchgeführt.

Es wurden 4 Gruppen à 8 Ratten untersucht. Gruppe 1 und 2 bestanden aus isotransplantierten und Gruppe 3 und 4 aus allotransplantierten Tieren. Die Tiere der Gruppe 2 und 4 erhielten zur Induktion eines Hypertonus Desoxycorticosteronacetat (DOCA, Sigma 10 mg/Woche s.c.) bei gleichzeitiger Kochsalzbelastung (Trockenfutter mit einem Salzgehalt von 5 %).

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Gruppen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B); Vier Tiere pro Gruppe wurden drei Monate post transplantationem getötet (Drei- Monatstiere), die übrigen Tiere weitere drei Monate später (Sechs-Monatstiere)

| Tiere Gruppe B | Tx | DOCA und Kochsalzbelastung |
|----------------|------|----------------------------|
| 1 B | Iso | - |
| 2 B | Iso | + |
| 3 B | Allo | - |
| 4 B | Allo | + |

2.4. Funktionsmessungen

Da es sich bei dieser Arbeit um einen Teil eines größeren Projektes handelt, verweise ich auf die Promotion von Dr. med. Y. Tanriver, der an diesem Projekt mitarbeitete. Die folgend aufgeführten Funktionsmessungen wurden durch Dr. med. Y. Tanriver durchgeführt. Die Tiere wurden alle vier Wochen über 24 Stunden in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt. Hier wurde die Proteinurie mittels Bradford Methode (Biorad, CA) gemessen. Der systolische Blutdruck wurde alle vier Wochen unter leichter Äthernarkose mittels eines „tail-cuff“ gemessen. Die Proteinurie- sowie Blutdruckdaten der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie wurden in der Promotion von Herrn Dr. Y. Tanriver berücksichtigt.

2.5. Gewebegewinnung für die Immunhistologie

2.5.1. Paraffin-eingebettetes Nierengewebe

Für die Azan-Mallory-Methode und den PCNA-Nachweis (proliferating cell nuclear antigen) der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe wurde paraffineingebettetes Gewebe verwendet. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad entfaltet und auf Objektträger gesetzt und standen so der weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

2.5.2. Schockgefrostenes Nierengewebe

Für die Immunhistologie mit Nachweis von PCNA-positiven Zellen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie und für den Nachweis des Ausmaßes der MHC-II-Expression beider Versuchsreihen wurde in Paraformaldehyd eingebettetes schockgefrostenes Nierengewebe verwendet. Hierfür wurden an einem Kryotom (Microm HM 500 OM) Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und auf alkoholgereinigte Objektträger aufgebracht.

2.6. Immunhistochemische Verfahren

2.6.1. Verwendete Primärantikörper

2.6.1.1. Antikörper zum Nachweis PCNA-exprimierender Zellen

Für den immunhistochemischen Nachweis von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde ein von der Maus gewonnener monoklonaler Antikörper der IgG-Subklasse der Firma DAKO (monoclonal mouse anti-proliferating cell nuclear antigen) verwendet.

Der Antikörper reagiert mit proliferierenden Zellen vieler Gewebearten aller Vertebraten, Insekten und Schizosaccharomyces. Er ist für den Gebrauch an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Geweben geeignet.

PCNA ist ein 36 kDa umfassendes Molekül, das in großer Masse an Evolutionsvorgängen beteiligt ist. Es fungiert als Co-Faktor der DNA-Polymerase und spielt eine Rolle bei DNA-Reparaturvorgängen.

Das PCNA-Molekül besitzt eine sehr lange Halbwertszeit, so dass am Ende der M-Phase der Meiose Zellen mit PCNA-Immunreaktivität existieren. Ein PCNA-Nachweis gelingt auch kurz vor Beginn der Zellteilung. Die PCNA-Expression kann durch Wachstumsfaktoren in vitro wie in vivo hervorgerufen werden.

Der Antikörper wurde bei allen untersuchten Nierengeweben in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

2.6.1.2. Antikörper zum Nachweis MHC-exprimierender Zellen

Für den MHC II Nachweis fand ein von der Maus gewonnener monoklonaler Antikörper der IgG-Subklasse der Firma BioSource International (OX-3, mouse-anti-rat RT 1B^u) Verwendung. Dieser Antikörper wurde durch die Fusion von Milzparenchym von immunisierten BALB/c Mäusen mit Stammzellen von NS1 Mäusen gewonnen. Er erkennt polymorphe Determinanten des Ia-Antigen, welches von B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert, sowie verschiedenen Epithelzellen von Lewis-, Wistar- und AO-Ratten.

Der Antikörper wurde bei allen untersuchten Nierengeweben in einer Verdünnung von 1:50 angewendet.

2.6.2. Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper, mit alkalischer Phosphatase konjugiert, ist ein Brückenantikörper, d.h. er bindet sich sowohl an den Primärantikörper als auch an das zur Signalgebung applizierte Substrat und verbindet somit beide.

Dieser Antikörper wird im Überschuß zugefügt, so dass sich nur die Hälfte seines F_{ab}-Fragments (antigen-binding) an den Primärantikörper bindet und die andere Hälfte zur Bindung des signalgebenden Substrates frei bleibt.

Für den PCNA und MHC-Nachweis fand ein von der Ziege stammender Sekundärantikörper der Firma Jackson Immuno Research (alkaline-phosphatase-conjugat., affini pure-goat-anti-mouse-IgG) in einer Verdünnung von 1:25 Anwendung.

2.6.3. Alkalische Phosphatase Substrat

Es detektiert die Aktivität des Enzyms „Alkalische Phosphatase“, welches in mit diesem Enzym konjugierten Sekundärantikörpern enthalten ist. Auf diese Weise kann der gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden. Zur Blockierung der endogenen Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde dem Substrat Levamisol zugefügt.

2.6.4. Blockierungsseren

Sie dienen dazu, eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern. Diese Hintergrundfärbung ist eine positive Anfärbung des Schnittes, die nicht dem Ergebnis einer Antigen-Antikörperreaktion entspricht.

Die häufigste Ursache einer solchen falsch positiven Reaktion ist die Anlagerung von Proteinen an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente des Gewebes. Wird der Primärantikörper als erste Lösung dem Präparat zugesetzt, so bindet dieser unspezifisch an diese geladenen Proteine.

Der nachfolgend zugesetzte Sekundärantikörper bindet sich an den unspezifisch gebundenen Primärantikörper und es kommt zu einer Färbereaktion an unspezifischer Lokalisation.

Am erfolgreichsten kann diese unspezifische Färbung durch Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung verhindert werden. Diese Proteine lagern sich an die des Primärantikörpers. Das Blockierungsserum richtet sich nach der Tierspezies, aus welcher der Brückenantikörper stammt. Es verhindert eine positive Anfärbung, bedingt durch die Bindung des Sekundärantikörpers an Komponenten der Proteinlösung.

2.7. Chemikalien und Reagenzien

Apotheke Uniklinikum Rudolph Virchow: Salzsäure (HCL) 2N

BDH Anala R® (BDH Chemicals, UK): Glycerol

DAKO (Hamburg, Deutschland): APAAP mouse monoclonal, Dako®Antibody diluent with Background Reducing Components, rabbit anti-mouse Immunglobulin

Dianova (Hamburg, Deutschland): normal rat serum

Herbeta-Arzneimittel (Berlin, Deutschland): Ethanol 100 Vol. % und 80 Vol. %

Leica Instruments (Nussloch, Deutschland): Tissue Freezing Medium

Merck KG aA (Darmstadt, Deutschland): Citronensäure, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat Natriumcitrat, Natriumchlorid, Natriumnitrit, Propandiol, Xylol Shandon (Pittsburgh, PA, USA): Immunomount Medium

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland): Dimethylformamid, Wasserstoffperoxid 30 %

Sigma Chemicals Co.(St. Louis, USA): Bovines-Serum-Albumin Fraction V Approx. 99 % (BSA), Fast Red TR/Naphtol AS-Mx, Hasenserum, Levamisol, Naphtol AS-TR Phosphate Tbl., Naphtol AS-Bi Phosphat, Neufuchsin-Substrat, Triton X-100, Trizma®-Hydrochloride, Trizma®-Base, Ziegenserum

2.8. Einmal-Materialien

Avon Medical (UK): Single Kwill Filling Tube

B/Braun injekt steril (B/Braun, Melsungen, Deutschland): B/Braun injekt steril Spritzen (verschiedene Größen)

Falcon® (Becton Dickinson , USA): Falcon-Röhren

Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland): Deckgläser 18 x 18 mm, Objektträger Super-Frost®Plus

Milipore S.A.S. (Div. BioPharmaceutical, Cedex, Frankreich): Sterilfilter Millex®-GS

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland): Pipettenspitzen unterschiedlicher Größe

Terumo Neolus Needels Nr. 1 Luer: Kanülen (steril)

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland): Eppendorf-Röhrchen

2.9. Geräte

Robert Bosch GmbH (Deutschland): Mikrowelle, Kühlschrank

DAKO (Hamburg, Deutschland): Dako-Pen (Fettstift)

Finnipipette Labsystems (Finnland): Pipetten

Heidolph Instruments GmbH & Co KG (Schwabach, Deutschland): Magnetrührer MR 3001 K

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG (Eberstadt, Deutschland): Elektro-Pipette pipetus®-akku

JD Instruments Inc.(Houston, TX, USA): julabo 12B Wasserbad

Knick (Berlin, Deutschland): Digital pH-Meter

Lenz Laborglas (Wertheim, Deutschland): Küvetten (50 & 100 ml)

Medizin & Labortechnik GmbH Engelbrecht (Edermünde, Deutschland): M.I.S.T 8 magnetic-immuno-staining-tray (feuchte Kammer)

Microm (Heidelberg, Deutschland): Kryotom HM 500 OM, (HM 330 für Paraffinschnitte)

Sartorius Universal, Mettler: Analysewaage AE 260 Delta Range

Schott (Mainz, Deutschland): Bechergläser verschiedener Größen

Waldner-Labor-Einrichtungen (Wangen, Deutschland): Abzug Variolab Mobilien W90

Carl Zeiss (Deutschland): Mikroskop und Okular Plan 40/0,65

Milipore S.A.S. (Div. BioPharmaceutical, Cedex, Frankreich): Anlage zur Gewinnung von Aqua destillata: Milipore Purification Pak, Mili-Q UF Plus

Meta View, Universal Imaging (West Chester, PA): Digitalkamera

Tiefkühltruhe C54285: Brunswick Scientific, Edison New

2.10. Verwendete Puffer und Reaktionslösungen

2.10.1. Citratpuffer

Stammlösung A: 0.1 M Citronensäure (21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$) in 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0.1 M Natriumcitrat (29,41 g $C_6H_5O_7Na \times H_2O$) in 1000 ml Aqua dest.

Zusammensetzung: 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B zu 450 ml Aqua dest. gießen und mischen

2.10.2. Phosphate buffered salt solution (PBS einfach)

NaCl 8 g/l und Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l

KCl 2 g/l und Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

2.10.3. Neu-Fuchsin-Substrat

Lösung A: im Kolben Spezial-Tris ansetzen:

Tris-Base: 0,515 g

Tris-HCl: 0,158 g

NaCl: 0,914 g

Aqua dest. ad 105 ml

dazugeben: Propandiol-Stamm 0,2 M (37,5 ml) und Levamisol (0,060 g)

Lösung B: im Gläschen unter einem Abzug lösen:

Naphtol AS-Bi-Phosphat: 0,075 g lösen in 900 µl Dimethylformamid

Lösung C: im Gläschen unter einem Abzug lösen:

Na-Nitrit (0,030 g) in Aqua dest. (750 µl); tröpfchenweise Neufuchsin (300 µl)

Herstellung des Neu-Fuchsin-Substrates:

Lösung C wird zu Lösung A gegeben und mittels Magnetrührer umgerührt. Dann wird Lösung B hinzugegeben. Der pH-Wert wird mit 2 N HCl auf pH 8,8 eingestellt. Die Lösung wird filtriert und sofort verwendet.

2.10.4. Tris-gepufferte Salzlösung (TBS in 10-facher Konzentration)

Lösung A: 87 g NaCl auf 1000 ml 0,5 mol Tris-HCl

Lösung B: 87 g NaCl auf 1000 ml 0,5 mol Tris-Base

Beide Lösungen zusammengeben, so dass ein pH-Wert von 7,6 erreicht wird.

2.11. Versuchsprotokoll PCNA-Nachweis für Paraffinschnitte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Als erster Schritt erfolgt das Entparaffinieren der entsprechenden Gewebe (2 Präparate/Tier).

Hierzu werden die Schnitte unter einem Abzug in Küvetten 2 x 15 Minuten in Xylol gewaschen. Danach werden die Präparate für 2 x 1 min in 100 % Alkohol gewaschen, im Anschluß erfolgt das Einbringen der Präparate in Alkoholbäder absteigender Konzentration (90 %, 80 %, 70 %, 30 %) für jeweils 1 x 2 Minuten. Die verwendeten Konzentrationen werden durch entsprechendes Verdünnen von 100 % igem Ethanol mit Acqua destillata hergestellt. Es folgt ein Waschvorgang für 4 x 2,5 Minuten in Acqua destillata und anschließend mit TBS-Puffer einfach für 10 min. Nach dieser Prozedur sind die Schnitte für die eigentliche immunhistochemische Färbung bereit.

Zur Reduktion von unspezifischen Hintergrundreaktionen wird die endogene Peroxidase blockiert. Hierzu werden die Präparate in Küvetten mit 3 % H₂O₂/TBS für 20 Minuten geblockt. Danach werden die Präparate 3 x 5 min mit TBS-Puffer einfach in einer Küvette gewaschen.

Nun wird das Gewebe mit 2 % Triton in TBS einfach für 15 Minuten angedaut. Es folgt das Waschen der Präparate in einer Küvette mit TBS-Puffer einfach für 3 x 5 Minuten.

Danach werden die Präparate zur Steigerung der Gewebeporosität in einer mit Citratpuffer (pH auf 6 titriert) gefüllten Küvette für 8 min in einer Mikrowelle gekocht. Nun erfolgt ein erneutes Waschen für 3 x 5 min in TBS-Puffer einfach in einer Küvette. Die Präparate werden - nachdem die Gewebepore zuvor mit einem Fettstift umkreist wurden - nun mit dem PCNA-Primärantikörper in einer 1:50 Verdünnung in Verdünnungspuffer (70 µl/ Schnitt) inkubiert.

Die Negativkontrollen werden lediglich mit Verdünnungspuffer (70 µl/Schnitt) beschichtet.

Die Inkubationszeit beträgt 90 Minuten bei 37 °C in einer Feuchtkammer.

Ein Waschvorgang für 3 x 5 min in TBS-Puffer einfach schließt sich an. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer 1:25 Verdünnung in 5 % BSA/TBS über Nacht bei Raumtemperatur. Danach werden die Präparate erneut für 3 x 5 min in TBS-Puffer einfach gewaschen.

Im Anschluß erfolgt die Signalgebung durch ein Substrat (Fast RedTR/Naphtol), welches an die Antigen-Antikörper-Komplexe bindet.

Zur Verhinderung von Artefakten wird das Substrat steril filtriert. Es werden 70 µl/Präparat aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert.

Zur rückstandslosen Entfernung des ungebundenen Farbstoffs erfolgt nun eine Waschung aller Präparate in Acqua destillata für 3 x 5 min. Die Präparate werden nun mit saugfähigem Zellstoff von Acqua destillata befreit und der begrenzende Fettring wird vorsichtig abgewischt.

Die Präparate werden mit Immunomount-Medium, welches zuvor für 5 Minuten in einem Wasserbad erwärmt wurde, luftblasenfrei eingedeckelt und stehen der mikroskopischen Analyse zur Verfügung.

Um falsch positive Signale als solche erkennen zu können, ist von jedem Gewebe zusätzlich eine Negativkontrolle angefertigt worden, die, abgesehen von der Inkubation mit DAKO-Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörper, dem gleichen Procedere unterzogen wurde.

2.12. Versuchsprotokoll MHC-Nachweis für Gefrierschnitte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Es werden erneut zwei Präparate pro Tier für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach werden die Schnitte für etwa 10 Minuten in TBS-Puffer einfach gewaschen. Die Gewebeareale auf den Objektträgern werden mit einem DAKO-Fettstift eingekreist, um das Auslaufen der aufgetragenen Reagenzien zu verhindern.

Zur Vermeidung von Fehlsignalen werden die Schnitte mit norm goat serum 1:5 verdünnt in 1 % BSA/TBS für 30 Minuten geblockt. Die Präparate werden in eine Feuchtkammer gelegt und mit dem Primärantikörper 1:50 verdünnt in DAKO-Verdünnungspuffer für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgt das Waschen für 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer einfach in einer Küvette.

Als nächster Schritt folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper 1:25 verdünnt in 5 % BSA/TBS für 1 Stunde bei 4 °C in einer Feuchtkammer.

Nach dieser Stunde werden die Präparate 3 x 5 Minuten in einer Küvette mit TBS-Puffer einfach gewaschen.

Es erfolgt die Signalgebung durch ein Substrat (Fast Red TR/Naphtol), welches an die Antigen-Antikörper-Komplexe bindet.

Zur Verhinderung von Artefakten wird das Substrat zuvor steril filtriert. Es werden 70µl/ Präparat aufgetragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur rückstandslosen Entfernung des ungebundenen Farbstoffs erfolgt nun eine Waschung aller Präparate in Acqua destillata für 3 x 5 min. Die Präparate werden mit saugfähigem Zellstoff von Acqua destillata befreit und der begrenzende Fettring wird vorsichtig abgewischt.

Schließlich werden die Präparate mit Immunomount-Medium, welches zuvor für 5 Minuten in einem Wasserbad erwärmt wurde, luftblasenfrei eingedeckelt und stehen der mikroskopischen Analyse zur Verfügung. 5 Minuten gewaschen und im Anschluß mit Immunomount-Medium, welches zuvor ca. 5 min im Wasserbad erwärmt wurde, eingedeckelt.

Um falsch positive Signale als solche erkennen zu können, ist von jedem Gewebe zusätzlich eine Negativkontrolle angefertigt worden, die, abgesehen von der Inkubation mit DAKO-Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörper, dem gleichen Procedere unterzogen wurde.

2.13. Azan-Färbung

Die Azan-Färbung erfolgte freundlicherweise nach der Azan-Mallory-Methode durch Frau Frauke Serowka, MTA, Charite/Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität Berlin.

2.14. Versuchsprotokoll PCNA-Nachweis für Gefrierschnitte der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B)

Es werden Gefrierschnitte einer Dicke von 5 µm verwendet.

Die Gefrierschnitte, die zur Lagerung bei -70 °C aufbewahrt wurden, werden zunächst eine Stunde luftgetrocknet und im Anschluß in Acqua destillata für 10 Minuten in die flüssige Phase überführt.

Für die weitere Bearbeitung wird zunächst mittels DAKO-Fettstift das Gewebe eingekreist, um das Auslaufen der aufgetragenen Reagenzien zu verhindern.

Anschließend wird die endogene Peroxidase mittels 1 %-igem Wasserstoffdioxid in TBS zur Verhinderung von Hintergrundreaktionen für 20 Minuten geblockt.

Darauf werden sie 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Nach diesem Schritt folgt das Kochen in der Mikrowelle in Citratpuffer (pH auf 6 titriert) für 5 Minuten. Nun werden die Schnitte erneut für 3 x 5 Minuten in TBS gewaschen. Im Anschluß werden die Schnitte mit dem Primärantikörper (mouse-anti-proliferating cells) beschichtet. Hierbei handelt es sich um eine 1:50 Verdünnung des Antikörpers in DAKO-Verdünnungspuffer, die für 40 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen wurde. Pro Schnitt werden 70 µl der Antikörperlösung mit einer Pipette aufgebracht.

Folgend werden die Objektträger zunächst mittels Spritzflasche, gefüllt mit TBS, anschließend in einer Küvette in TBS 3 x 5 Minuten gewaschen.

Der Sekundärantikörper (goat-anti-mouse IgG) wird in einer 1:25 Verdünnung in 5 % BSA/TBS und ein 1:8 verdünntes norm rat serum, das eine unspezifische Bindung des Antikörpers an elektrisch geladene Gewebelemente verhindern soll, auf die Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Sowohl die Inkubation des Primärantikörpers als auch die des Sekundärantikörpers erfolgt in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag werden die Objektträger erneut für 3 x 5 Minuten in TBS gewaschen. Zur spezifischen Färbung der Antigen-Antikörper-Komplexe wird ein Neu-Fuchsin-Substrat angesetzt und die Objektträger für 10 Minuten in einer Küvette in diesem Substrat inkubiert. Es folgt eine Waschphase in Acqua destillata (3 x 5 Minuten) in einer Küvette zur rückstandslosen Entfernung des ungebundenen Farbstoffs bevor die Präparate eingedeckelt werden.

Die Präparate werden mit saugfähigem Zellstoff von Acqua destillata befreit und der begrenzte Fettring wird vorsichtig abgewischt.

Die Präparate werden mit Immunomount-Medium, welches zuvor für 5 Minuten in einem Wasserbad erwärmt wurde, luftblasenfrei eingedeckelt und stehen der mikroskopischen Analyse zur Verfügung.

Um falsch positive Signale als solche erkennen zu können, ist von jedem Gewebe zusätzlich eine Negativkontrolle angefertigt worden, die, abgesehen von der Inkubation mit DAKO-Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörper, dem gleichen Procedere unterzogen wurde.

2.15. Versuchsprotokoll MHC-Nachweis für Gefrierschnitte der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B)

Bis zum Auftragen des Primärantikörpers sind die Schritte der immunhistochemischen Färbungen mit denen des MHC-Nachweises der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe identisch.

Der Primärantikörper wird 1:50 in DAKO-Verdünnungspuffer verdünnt für 40 Minuten bei Raumtemperatur auf die in einer Feuchtkammer befindlichen Präparate aufgetragen. Zur Entfernung ungebundener Reagenzlösungen werden die Schnitte dann 3 x 5 Minuten in TBS-Puffer einfach gewaschen.

Es erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper 1:25 verdünnt in 5 % BSA/TBS über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer.

Die BSA/TBS-Lösung wird vor ihrer Verwendung zur Artefaktverhinderung steril filtriert. Die Schnitte werden erneut 3 x 5 Minuten in TBS einfach gewaschen.

Es erfolgt die Signalgebung durch ein Substrat (Fast Red TR/Naphtol), welches an die Antigen-Antikörper-Komplexe bindet. Zur Verhinderung von Artefakten wird das Substrat zuvor steril filtriert. Es werden 70 µl/ Präparat aufgetragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur rückstandslosen Entfernung des ungebundenen Farbstoffs erfolgt nun eine Waschung aller Präparate in Acqua destillata für 3 x 5 min. Die Präparate werden nun mit saugfähigem Zellstoff von Acqua destillata befreit und der begrenzende Fettring wird vorsichtig abgewischt.

Die Präparate werden mit Immunomount-Medium, welches zuvor für 5 Minuten in einem Wasserbad erwärmt wurde, luftblasenfrei eingedeckelt und stehen der mikroskopischen Analyse zur Verfügung.

Um falsch positive Signale als solche erkennen zu können, ist von jedem Gewebe zusätzlich eine Negativkontrolle angefertigt worden, die, abgesehen von der Inkubation mit DAKO-Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörper, dem gleichen Procedere unterzogen wurde.

2.16. Quantitative Auswertungen der positiven Reaktionen

2.16.1. PCNA

Die Präparate wurden mikroskopisch mit einem Standardmikroskop mit 40-facher Vergrößerung ausgewertet.

Pro Präparat wurden 10 Gesichtsfelder, die per Zufall und ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgewählt wurden, ausgezählt.

Als positiv wurden Zellen bewertet, die sich von der Hintergrundaktivität abheben. Die ausgezählten positiven Zellen wurden für jedes ausgezählte Gesichtsfeld notiert und nach der Auszählung dem Tier der entsprechenden Gruppe zugeordnet.

2.16.2. MHC

Für die Auswertung der MHC-positiven Zellen fand eine digitale Kamera (Meta-View, Universal Imaging, West Chester, PA), die freundlicherweise von Prof. Dr. Sebastian Bachmann (Institut für Anatomie, Charite/Campus Virchow Klinikum, Humboldt-Universität Berlin) zu Verfügung gestellt wurde, Anwendung.

Mit Hilfe des Computerprogramms Meta-View der Firma Visitron Systems führte ich eine quantitative Bildanalyse durch.

Pro Präparat wurden 10 Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgemessen. Auch hier erfolgte die Wahl des auszuwertenden Areals per Zufall.

Die Messung mit dem Meta-View-Programm erfolgte wie folgt: Zunächst wird ein Bild des auszuwertenden Präparates mit der digitalen Kamera gewonnen. Die Bildbearbeitung erfolgt im Weiteren über den Monitor.

Die als positiv gewerteten Areale wurden mit dem „Color Threshold Tool“ farblich unterlegt, wobei die Schwelle der als positiv zu erkennenden Zellen durch mehrmaliges Aktivieren der farblichen Markierung verfeinert werden konnte. Mittels computerunterstützter Analyse durch das Meta-View-Programm erfolgte nun die quantitative Auswertung der gekennzeichneten Areale.

2.16.3. Interstitielle und glomeruläre Sklerose

Die Bewertung der Azan-Präparate erfolgte durch die freundliche Unterstützung von Dr. Jan Steffen Jürgensen, Abteilung für Nephrologie, Charite/ Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität Berlin.

Es wurde ein Standardmikroskop mit 40-facher Vergrößerung verwendet.

Bei der Auszählung wird die Verteilung der positiven Zellen berücksichtigt: es werden interstitielle sowie glomeruläre Areale getrennt voneinander beurteilt und mindestens 5 Gesichtsfelder pro auszuwertenden Arealen beurteilt. Als positiv wurden Zellen bewertet, die sich von der Hintergrundaktivität abheben. Es erfolgte eine semiquantitative Bewertung anhand einer 4-Punkte-Schätzungsskala:

0 = keine Matrixvermehrung

+ = etwas Matrixvermehrung

++ = mässige Matrixvermehrung

+++ = hohes Ausmaß an Matrixvermehrung

2.17. Statistik

Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm SPSS for Windows V. 11.5, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA. Die einzelnen Gruppen wurden mittels dem Oneway ANOVA Tests einer Varianzanalyse unterzogen und mittels des Bonferroni-Test auf signifikante Unterschiede in dem Ausmaß der PCNA- und MHC-Expression, Proteinurie, Matrixvermehrung untersucht. Zur statistischen Auswertung der Überlebensraten wurde der nicht parametrische Wilcoxon-Test verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde konventionsgemäß bei 5 % ($p < 0,05$) festgelegt. Neben der Signifikanz wurde der arithmetische Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (Standarddeviation, SD) errechnet.

Die graphische Darstellung erfolgte mittels Microsoft Excel sowie mit Corell Presentations 6.0.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

Um die Bedeutung des arteriellen Hypertonus auf die chronische Transplantatdysfunktion untersuchen zu können, bedienten wir uns des oben erwähnten Fisher-Lewis Transplantationsmodells. Anhand immunhistochemischer Untersuchungen der Nieren wurde das Ausmaß der PCNA- und MHC-Expression in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen untersucht. Die Proteinurie als Ausdruck des Grades der Organschädigung sowie die Azan-Färbung als Maßstab für die strukturelle Organschädigung wird bei der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) durch Herrn Dr. Tanriver, der ebenfalls an diesem Projekt mitarbeitete, abgehandelt. Für die antihypertensiv behandelte Versuchsreihe werde ich die entsprechenden Daten in meiner Ergebnispräsentation darlegen.

3.2. Überlebensrate der Tiere der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Zu Beginn des Experimentes umfaßten abgesehen von der Non-Tx-Gruppe alle Gruppen jeweils sieben Tiere. In der Non-Tx-Gruppe waren über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen drei Tiere.

In der Enalapril-Gruppe verstarb eine Ratte vier Wochen post transplantationem, so dass die Gruppe dieser Tiere bis zur geplanten Tötung nach 28 Wochen sechs Tiere beinhaltete. Die Unterschiede für die Tiere unter Enalapriltherapie im Vergleich zu denen unter Amlodipin bzw. zu den Tieren ohne Transplantation waren signifikant.

In der Amlodipin-Gruppe verstarb ein Tier nach zwei Wochen, jeweils ein weiteres nach acht, neun und 12 Wochen, so dass die Gruppe nach 28 Wochen noch drei Tiere beinhaltete.

In der Gruppe der nicht-antihypertensiv behandelten hypertensiven Tiere befanden sich nach drei Wochen noch sechs, nach 9 Wochen noch fünf und nach 11 Wochen bis zur Tötung noch vier Tiere (siehe Abbildung 2).

Die Ursache des Versterbens bleibt im einzelnen Fall unklar.

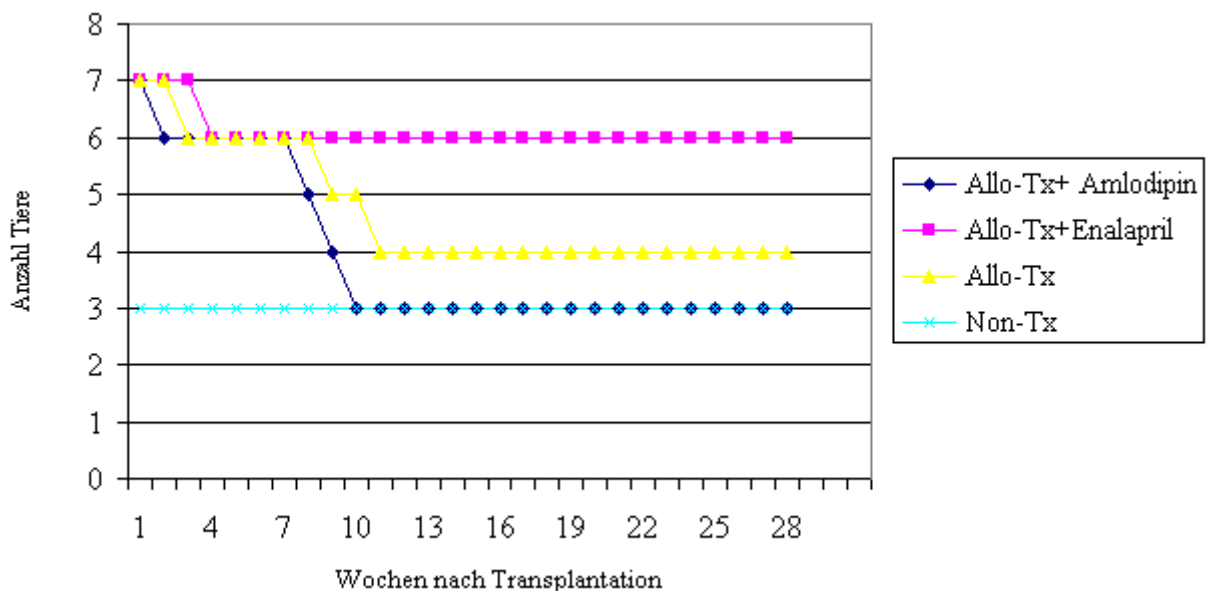


Abbildung 2: Überlebensrate der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe.
Woche 1: Amlodipin n = 7; Enalapril n = 7; keine Therapie n = 7; Non-Tx n = 3.
Woche 28: Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; keine Therapie n = 4; Non-Tx n = 3.
 $p < 0,05$ für Allo-Tx + Enalapril vs. Allo-Tx + Amlodipin sowie Non-Tx

3.3. Proteinurie der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Die Gruppe der nicht antihypertensiv therapierten Tiere (Allo-Tx) zeigte im zeitlichen Verlauf eine stetige Zunahme der Proteinausscheidung und das Ausmaß der Proteinurie überstieg am Ende des Beobachtungszeitraumes die Proteinurie der mit Amlodipin bzw. Enalapril therapierten Tiere, so dass nach sechs Monaten die Proteinurie bei dieser Gruppe am höchsten war. Die Unterschiede der Proteinausscheidung waren im Vergleich zu den unter Enalapriltherapie stehenden Tieren signifikant.

Das im Vergleich zu den mit Amlodipin behandelten Tieren sowie zu den nicht antihypertensiv behandelten Tieren signifikant geringste Ausmaß der Proteinurie konnte für die Gruppe der mit Enalapril therapierten Tiere festgestellt werden. Eine diskrete Zunahme der Proteinurie konnte jedoch auch bei dieser Gruppe im Verlauf bestimmt werden.

Die mit Amlodipin therapierten Tiere zeigten einen Spitzenwert der Proteinurie 3 Monate post transplantationem, der das Ausmaß der Proteinurie der unbehandelten Gruppe zum genannten Zeitpunkt deutlich überstieg. Im Weiteren war die Proteinausscheidung zunächst rückläufig. Nach sechs Monaten war jedoch auch bei diesen Tieren ein dezent er neuer Anstieg festzustellen (siehe Abbildung 3 und Tabelle 3).

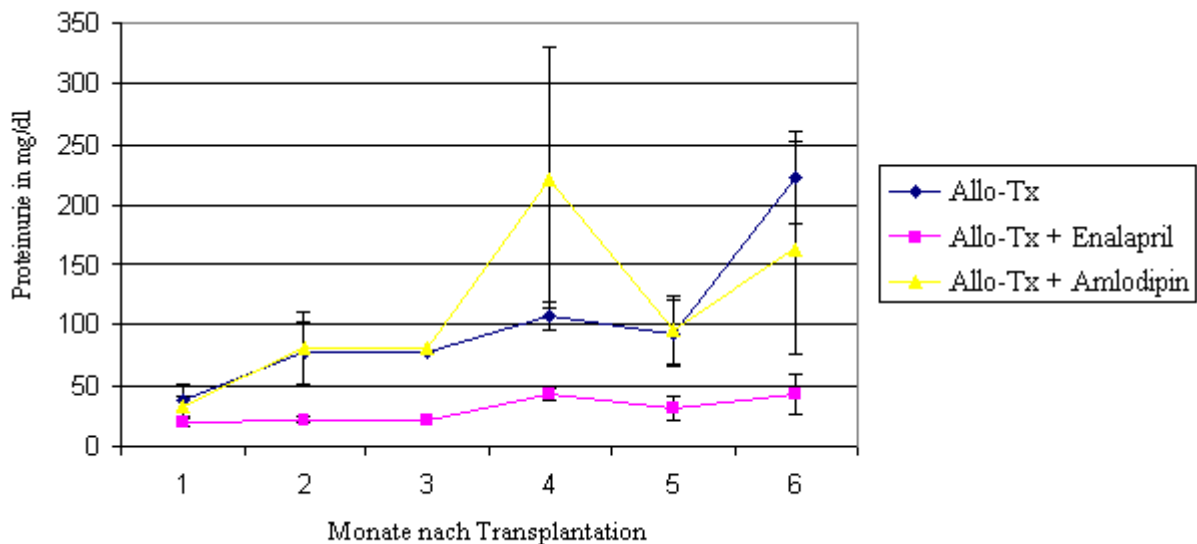


Abbildung 3: Proteinurie der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe.

Woche 1: Amlodipin n = 7; Enalapril n = 7; Allo-Tx n = 7.

6 Monate: Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; Allo-Tx n = 4.

$p < 0,05$ für Allo-Tx vs. Allo-Tx + Enalapril

$p < 0,05$ für Allo-Tx + Enalapril vs. Allo-Tx + Amlodipin

Tabelle 3: Proteinurie (mg/dl) in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe; Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), n = Anzahl Tiere.

| Monat | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin |
|-------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 38 ± 13 n = 7 | 20 ± 3 n = 7 | 33 ± 8 n = 7 |
| 2 | 77 ± 25 n = 6 | 22 ± 3 n = 7 | 81 ± 30 n = 6 |
| 4 | 107 ± 12 n = 6 | 43 ± 5 n = 6 | 222 ± 108 n = 5 |
| 5 | 93 ± 27 n = 5 | 32 ± 10 n = 6 | 96 ± 28 n = 4 |
| 6 | 223 ± 38 n = 4 | 43 ± 17 n = 6 | 164 ± 88 n = 3 |

p < 0,05 für Allo-Tx vs. Allo-Tx + Enalapril

p < 0,05 für Allo-Tx + Enalapril vs. Allo-Tx + Amlodipin

3.4. Systolische RR-Werte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe

Bei der systolischen Blutdruckbestimmung zeigten die Tiere mit DOCA/Kochsalzbelastung ohne Therapie die höchsten systolischen Blutdruckwerte.

Signifikant höhere Werte für die Gruppe der nicht antihypertensiv behandelten Tiere mit DOCA/Salzbelastung konnten im Vergleich zu den Allotransplantierten unter Enalapriltherapie festgestellt werden. Die mit Enalapril behandelten Tiere zeigten im Mittel niedrigere systolische Blutdruckwerte als die normotensiven Tiere der Non-Tx Gruppe.

Der Unterschied zwischen den Gruppen der antihypertensiv behandelten Tiere war nicht signifikant (s. Abbildung 4 und Tabelle 4).

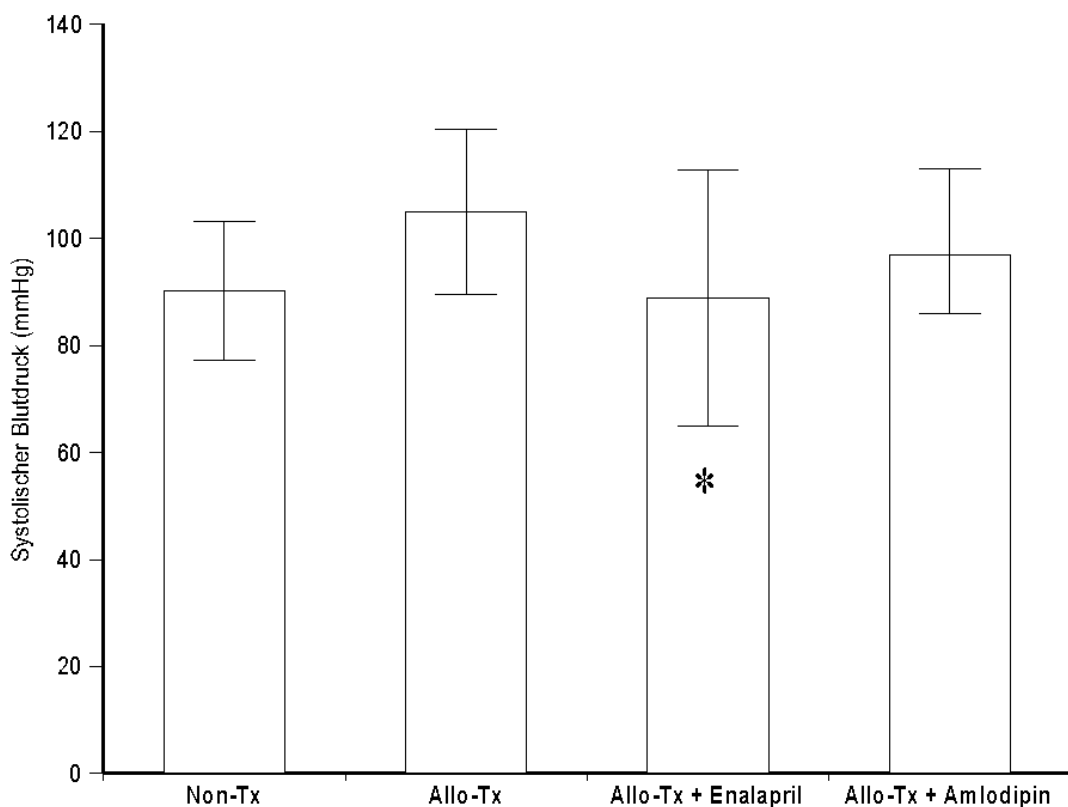


Abbildung 4: Systolische RR-Werte der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); * = $p < 0,05$ vs. Allo-Tx

Tabelle 4: Systolischer Blutdruck (mmHg) in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe; Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD)

| | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin | Non-Tx |
|------------------------|------------|---------------------|---------------------|------------|
| Systolischer Blutdruck | 105 ± 15,5 | 88,91 ± 24 * | 97 ± 16 | 90,25 ± 13 |

* = $p < 0,05$ vs. Allo-Tx

3.5. PCNA-Expression

PCNA-positive Zellen stellen sich nach immunhistochemischer Färbung als im Vergleich zur Hintergrundaktivität signalintensivere Areale im Lichtmikroskop dar. Bei allen Gruppen - sowohl in der antihypertensiv therapierten (A), als auch in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (B) - ließen sich PCNA-exprimierende Zellen nachweisen. Insgesamt war die PCNA-Expression der nicht antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (B) nach drei Monaten höher als nach sechs Monaten (siehe auch Tabelle 5 in Kapitel 3.5.2.).

3.5.1. Immunhistologische Beispiele der PCNA-Expression

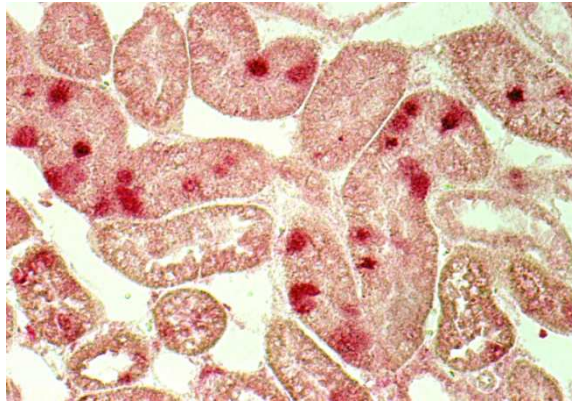


Abbildung 5: PCNA-Expression Allo-Tx + Hypertonus drei Monate post transplantationem (Gruppe B)

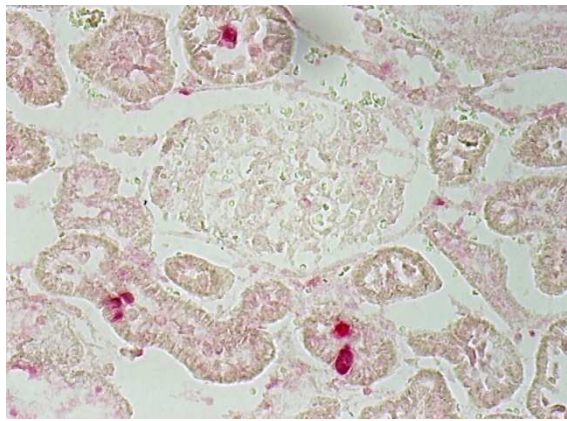


Abbildung 6: PCNA-Expression Allo-Tx drei Monate post transplantationem (Gruppe B)

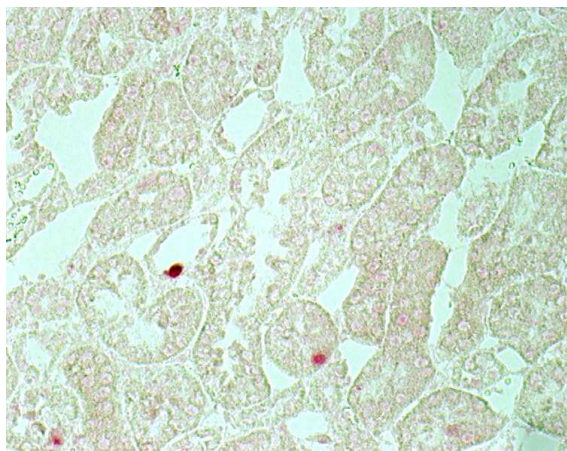


Abbildung 7: PCNA-Expression Iso-Tx drei Monate post transplantationem (Gruppe B)

3.5.2. PCNA-positive Zellen der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Bei der Auswertung der PCNA-positiven Zellen der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe konnte ein signifikant höheres Ausmaß der PCNA-Expression zwischen den mit Enalapril therapierten Tieren und den Allotransplantaten ohne antihypertensive Therapie zu den Tieren der Non-Tx-Gruppe festgestellt werden ($p < 0,05$). Das größte Ausmaß der Expression zeigten die nicht antihypertensiv behandelten Allotransplantate.

Die mit Amlodipin therapierten Tiere zeigten kein signifikant höheres Maß der PCNA-Expression im Vergleich zu den Tieren der Non-Tx-Gruppe sowie eine geringere PCNA-Expression im Vergleich zu den unter Enalapriltherapie stehenden Tieren ohne jedoch das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zu erreichen.

Der Unterschied zwischen den nicht therapierten Tieren und denen unter Amlodipintherapie Tieren war ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 8 und Tabelle 5).

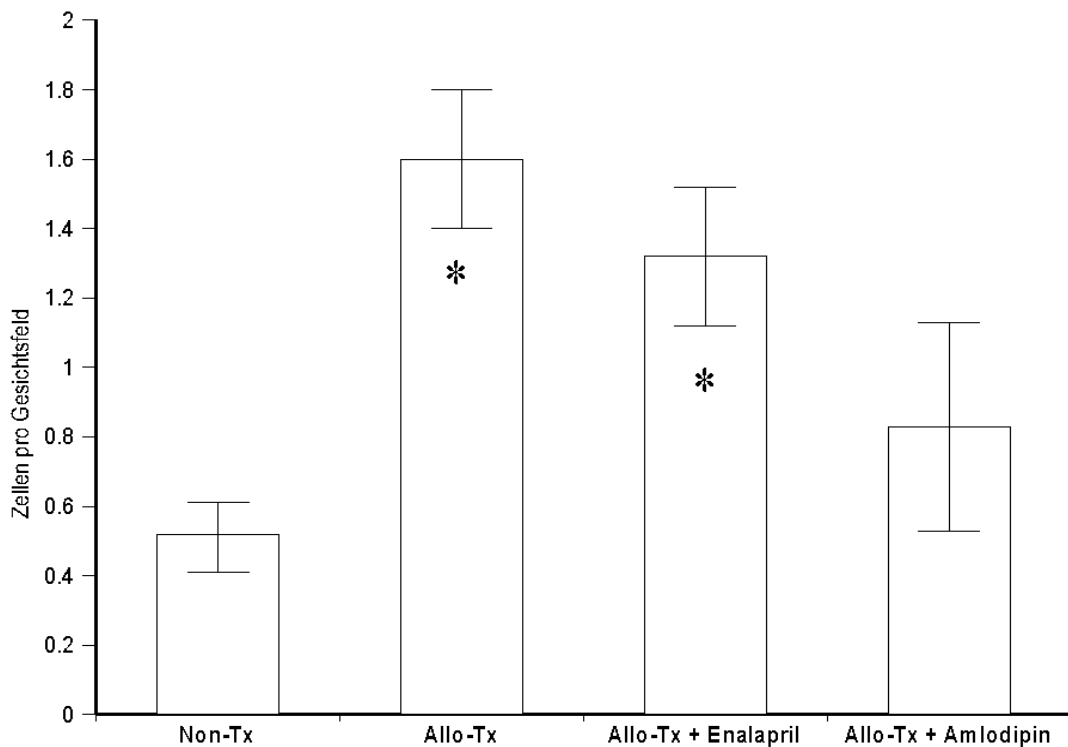


Abbildung 8: PCNA-Expression der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe.
Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; Allo-Tx n = 4; Non-Tx n = 3.
* = $p < 0,05$ vs. Non-Tx

Tabelle 5: PCNA-Expression in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin | Non-Tx |
|--|-------------|------------------------|------------------------|------------|
| PCNA-positive Zellen pro Gesichtsfeld | 1,6 ± 0,2 * | 1,32 ± 0,2 * | 0,83 ± 0,3 | 0,52 ± 0,1 |

* = p < 0,05 vs. Non-Tx

3.6. MHC-Expression

MHC-positive Zellen stellen sich nach immunhistochemischer Färbung als im Vergleich zur Hintergrundaktivität signalintensivere Areale im elektronischen Lichtmikroskop dar. Bei allen Gruppen - sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Versuchsreihe - ließen sich MHC-exprimierende Zellen nachweisen.

Die MHC-Expression konnte sowohl für glomeruläre, interstitielle und tubuläre sowie für perivaskuläre Zellen nachgewiesen werden. Die größte MHC-Expression konnte im perivaskulären Bereich nachgewiesen werden während die vaskulären Zellen keine MHC-Expression zeigten (siehe Abbildung 9 - 11 in Kapitel 3.6.1.).

3.6.1. Immunhistologische Beispiele der MHC-Expression

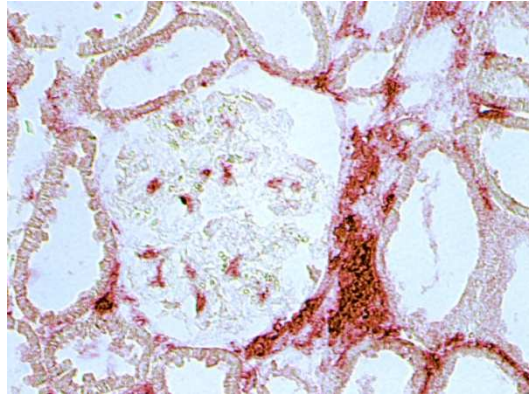


Abbildung 9: MHC-Expression nach drei Monaten post transplantationem (Gruppe B)

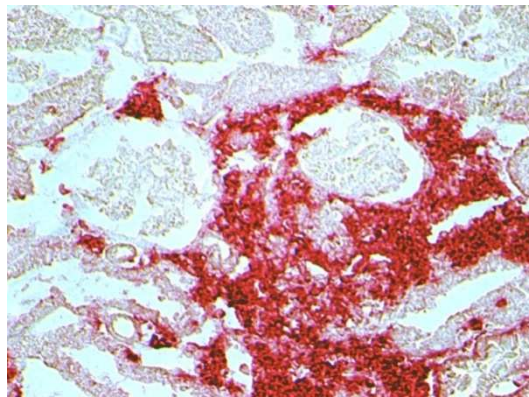


Abbildung 10: MHC-Expression nach drei Monaten post transplantationem: Allo-Tx + Hypertonus (Gruppe B)

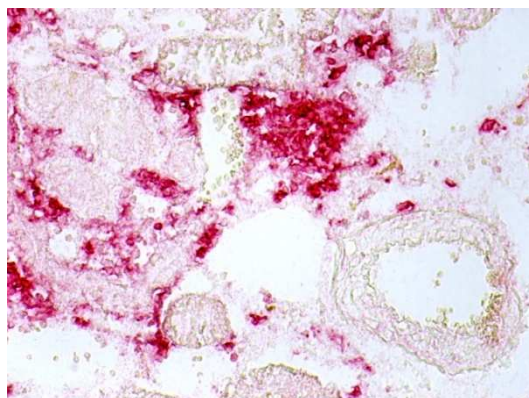


Abbildung 11: MHC-Expression nach sechs Monaten post transplantationem: Allo-Tx + Hypertonus (Gruppe B)

3.6.2. MHC-Expression in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Bei der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe ließ sich eine signifikant niedrigere MHC-Expression für die Gruppe der nicht transplantierten Tiere im Vergleich zu allen Gruppen feststellen ($p < 0,05$).

Die größte Menge MHC-positiver Zellen konnte bei den nicht therapierten Allotransplantaten festgestellt werden.

Es bestand ferner ein signifikanter Unterschied zwischen den hypertensiven wahlweise mit Enalapril oder Amlodipin therapierten Tieren zu den nicht therapierten hypertensiven Tieren ($p < 0,05$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medikamenten bezüglich der Reduktion der MHC-Expression bestand nicht; jedoch war das Ausmaß der MHC-Expression der mit Amlodipin therapierten Tiere geringer als das der mit Enalapril behandelten Tiere - siehe Abbildung 12 und Tabelle 6.

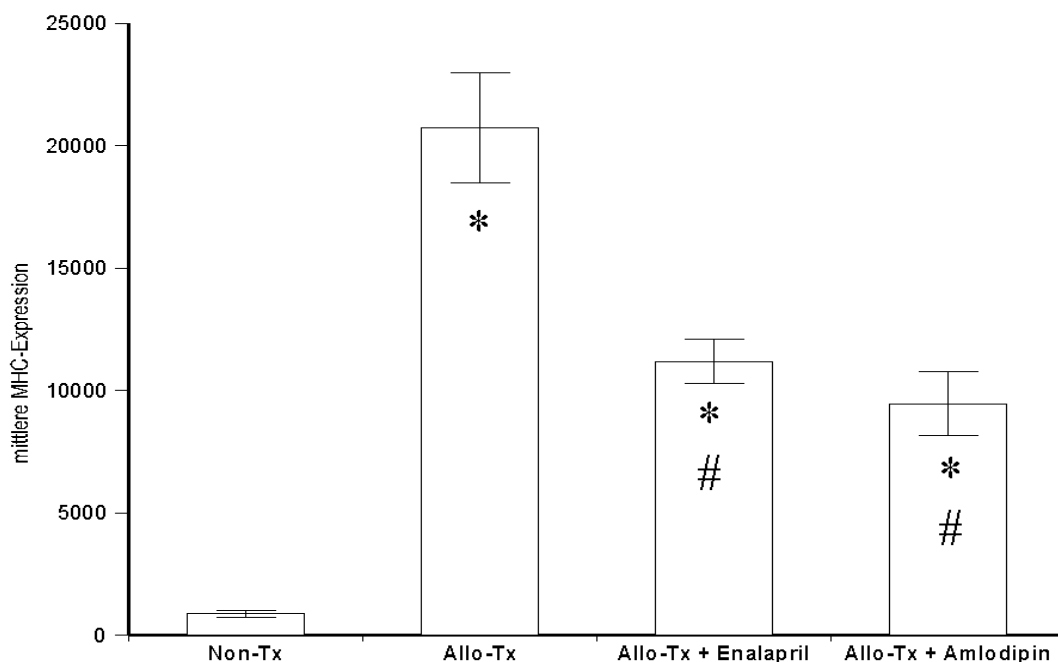


Abbildung 12: MCH-Expression der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A). Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; Allo-Tx n = 4; Non-Tx n = 3.
* = $p < 0,05$ vs. Non-Tx ; # = $p < 0,05$ vs. Allo-Tx,

Tabelle 6: MHC-Expression in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin | Non-Tx |
|----------------|-------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| MHC-Expression | 20725 ± 2251 * | 11189 ± 908 *# | 9469 ± 1288 *# | 879 ± 132 |

* = p < 0,05 vs. Non-Tx ; # = p < 0,05 vs. Allo-Tx

3.7. Nachweis der interstitiellen und glomerulären Sklerose

Die Ausdehnung der interstitiellen und glomerulären Sklerose der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) wird in der Dissertation von Herrn Dr. med. Y. Tanriver abgehandelt.

Als interstitielle und glomeruläre Sklerose wurden Areale erfaßt, deren Aktivität sich deutlich von der Hintergrundaktivität abhebt (siehe Kapitel 3.7.1.)

3.7.1. Histologische Beispiele der interstitiellen Sklerose (Gruppe A)

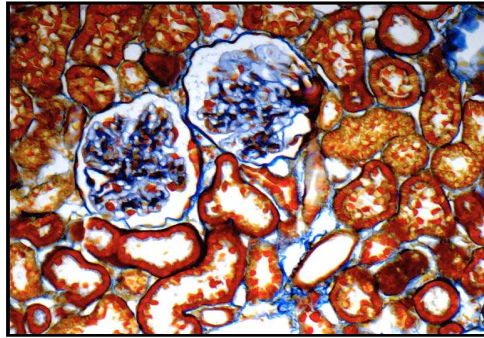


Abbildung 13: Interstitielle Sklerose: Isograft (Gruppe A)

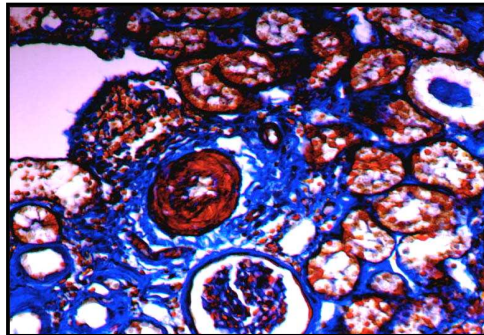


Abbildung 14: Interstitielle Sklerose: Allograft (Gruppe A)

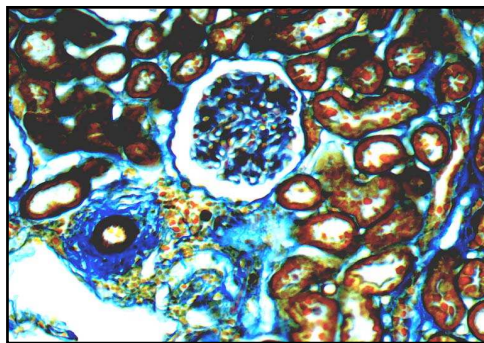


Abbildung 15: Interstitielle Sklerose: Allograft + Amlodipin (Gruppe A)

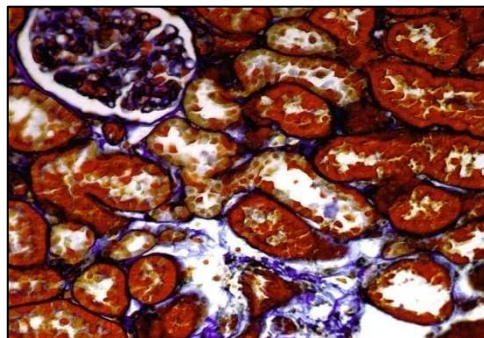


Abbildung 16: Interstitielle Sklerose: Allograft + Enalapril (Gruppe A)

3.7.2. Glomeruläre Sklerose der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Bei der Untersuchung der glomerulären Sklerose konnte ein signifikanter Unterschied im Ausmass der Sklerosebildung aller Gruppen im Vergleich zu der Gruppe der nicht transplantierten Tiere festgestellt werden ($p < 0,05$).

Über dies hinaus zeigten die Gruppen der Allotransplantate mit und ohne Amlodipintherapie gegenüber der Gruppe unter Enalapriltherapie ein signifikant höheres Ausmaß der glomerulären Sklerose ($p < 0,05$) (s. Abbildung 17 und Tabelle 7).

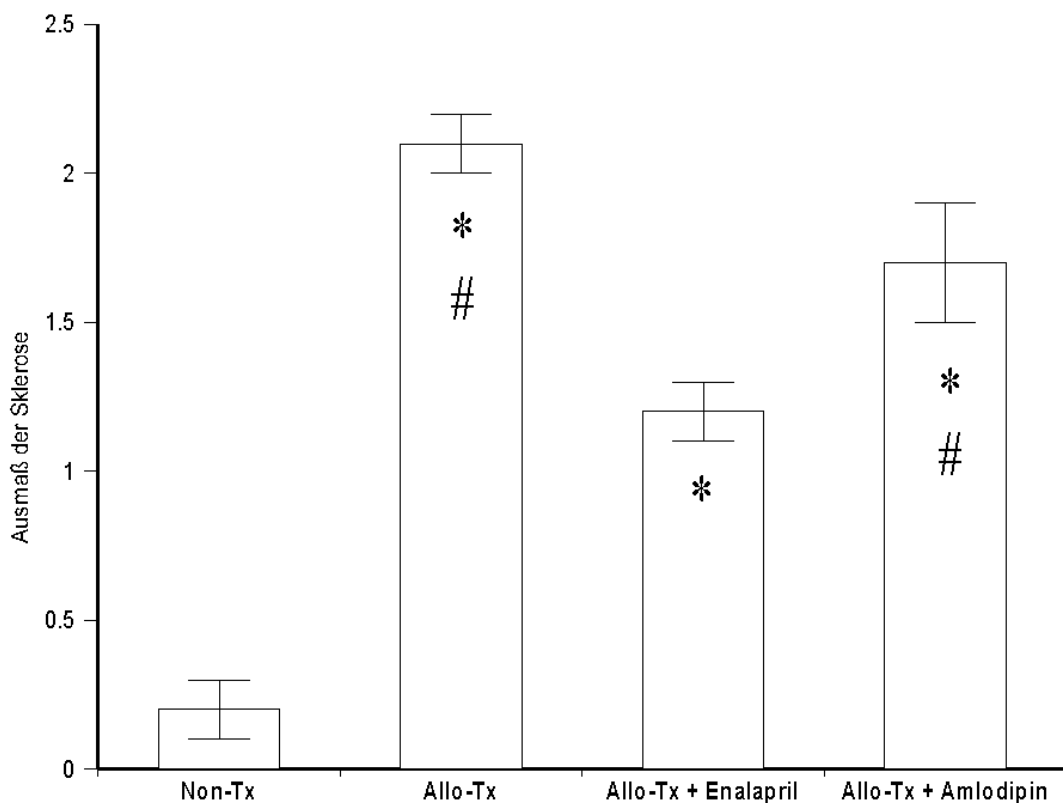


Abbildung 17: Glomeruläre Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A). Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; Allo-Tx n = 4; Non-Tx n = 3. * = $p < 0,05$ vs. Non-Tx # = $p < 0,05$ vs. Allo-Tx + Enalapril

Tabelle 7: Glomeruläre Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin | Non-Tx |
|---------------|--------------|---------------------|---------------------|-----------|
| Sklerosescore | 2,1 ± 0,1 *# | 1,2 ± 0,1 * | 1,7 ± 0,2 *# | 0,2 ± 0,1 |

* = $p < 0,05$ vs. Non-Tx; # = $p < 0,05$ vs. Allo-Tx + Enalapril

3.7.3. Interstitielle Sklerose der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A)

Bei der Beurteilung der Vermehrung der interstitiellen Sklerose konnte erneut ein signifikanter Unterschied der Matrixvermehrung aller Gruppen im Vergleich zur Gruppe der Non-Tx Tiere festgestellt werden.

Ferner konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Enalapril therapierten zu den nicht therapierten Tieren (Allo-Tx) nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Amlodipin- und der Enalapril-Gruppe ließ sich nicht bestimmen (s. Abbildung 18 und Tabelle 8). Die größte interstitielle Sklerosevermehrung zeigten die nicht antihypertensiv behandelten Allotransplantate.

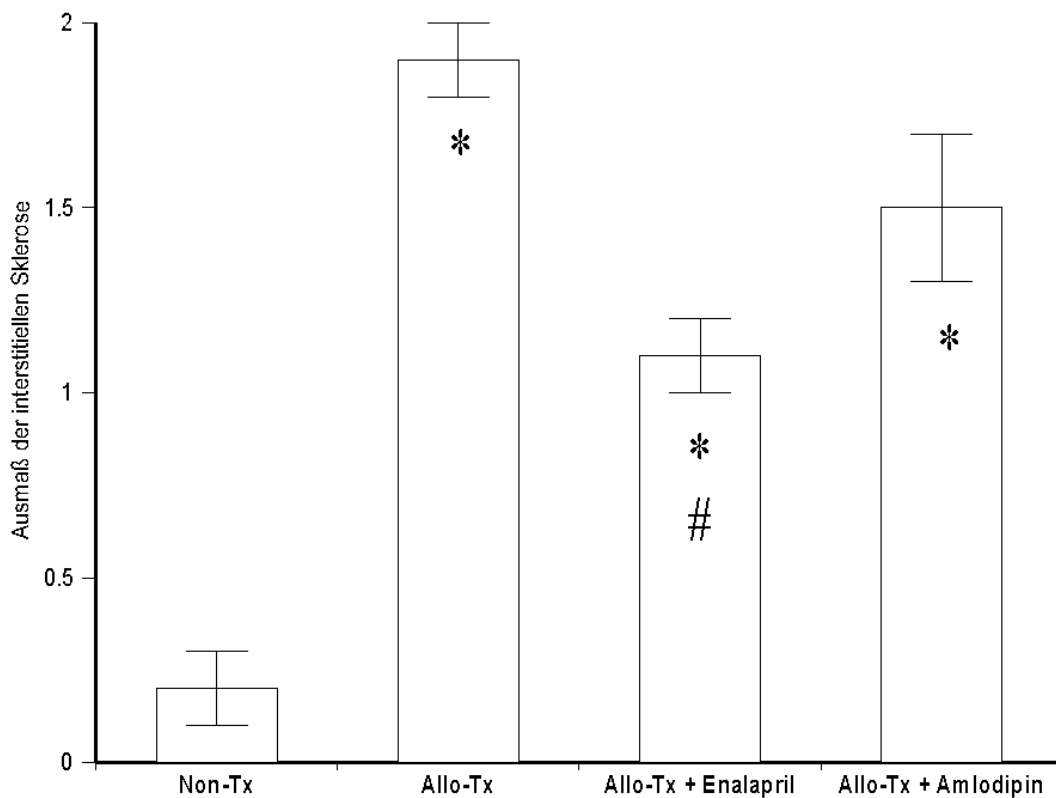


Abbildung 18: Interstitielle Sklerose in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A). Amlodipin n = 3; Enalapril n = 6; Allo-Tx n = 4; Non-Tx n = 3. * = p < 0,05 vs. Non-Tx; # = p < 0,05 vs. Allo-Tx

Tabelle 8: Interstitieller Sklerosesscore in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Allo-Tx | Allo-Tx + Enalapril | Allo-Tx + Amlodipin | Non-Tx |
|----------------|-------------|---------------------|---------------------|-----------|
| Sklerosesscore | 1,9 ± 0,1 * | 1,1 ± 0,1 *# | 1,5 ± 0,2 * | 0,2 ± 0,1 |

* = p < 0,05 vs. Non-T; # = p < 0,05 vs. Allo-Tx

3.8. PCNA-positive Zellen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach drei Monaten (Gruppe B)

Drei Monate nach Transplantation konnte eine signifikant höhere PCNA-Expression bei den hypertensiven allotransplantierten Tieren sowohl im Vergleich zu den allotransplantierten normotensiven sowie zu den isotransplantierten Tieren mit und ohne Hypertonus festgestellt werden ($p < 0,05$; siehe auch Tabelle 9 in Kapitel 3.9.).

Die Gruppe der hypertensiven Allotransplantate wies die höchste Anzahl nachweisbarer PCNA-positiver Zellen auf. Die meisten PCNA-exprimierenden Zellen fanden sich tubulär (s. Abbildungen 5 - 7), aber auch mesangial ließen sich PCNA-exprimierende Zellen nachweisen. Das Ausmaß der PCNA-positiven Zellen bei den isotransplantierten Tieren mit Hypertonus und bei den allotransplantierten Tieren ohne Hypertonus ist nahezu identisch (s. Tabelle 9).

Der Vergleich der Isotransplantate zeigt eine niedrigere PCNA-Expression für die hypertone Gruppe; bei dem Vergleich der Allotransplantate stellt man einen signifikanten Unterschied zwischen normo- und hypertensiven Tieren fest.

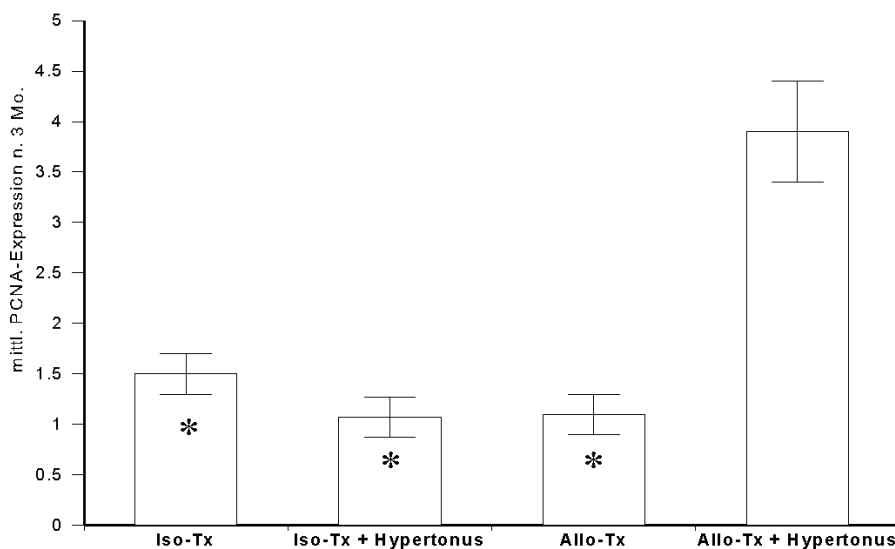


Abbildung 19: PCNA-positive Zellen nach drei Monaten (Gruppe B).

Iso-Tx n = 4; Iso-Tx + Hypertonus n = 3; Allo-Tx n = 4; Allo-Tx + Hypertonus n = 4.

* = $p < 0,05$ vs. Allo + Hypertonus

3.9. PCNA-positive Zellen der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach sechs Monaten (Gruppe B)

Sechs Monate post transplantationem war kein signifikanter Unterschied der PCNA-Expression zwischen den einzelnen Gruppen mehr feststellbar.

Die PCNA-Expression der hypertensiven Allo- und Isotransplantate war nahezu identisch und höher als die der normotensiven Tieren ohne das Signifikanzniveau $p < 0,05$ zu erreichen. Es fällt auf, dass bei bestehendem Hypertonus die PCNA-Expression, ungeachtet ob es sich um syngene oder allogene Transplantate handelt, gesteigert ist.

So zeigen die normotensiven Iso- wie auch die Allotransplantate einen deutlich geringeren Nachweis von PCNA-positiven Zellen im Vergleich zu den jeweiligen hypertensiven Tieren.

Die PCNA-Expression der normotensiven Allo- und Isotransplantate hatte ebenfalls ein ähnliches Ausmaß (s. Tabelle 9). Der PCNA-Nachweis nach sechs Monaten fällt deutlich geringer aus als drei Monate nach Transplantation (s. Tabelle 9).

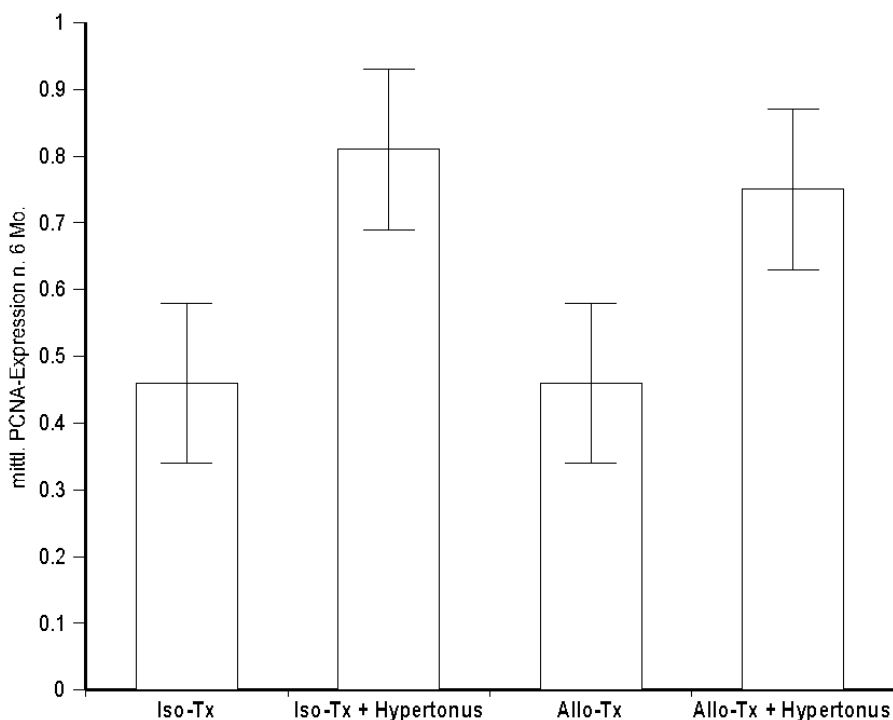


Abbildung 20: PCNA-Expression nach sechs Monaten post translationem (Gruppe B). Iso-Tx n = 4; Iso-Tx + Hypertonus n = 3; Allo-Tx n = 4; Allo-Tx + Hypertonus n = 4.

Tabelle 9: PCNA-positive Zellen/Gesichtsfeld nach drei und sechs Monaten in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Iso-Tx | Iso-Tx + Hypertonus | Allo-Tx | Allo-Tx + Hypertonus |
|------------------------------------|-------------|---------------------|-------------|----------------------|
| PCNA-Expression nach drei Monaten | 1,5 ± 0,2 * | 1,07 ± 0,2 * | 1,1 ± 0,2 * | 3,9 ± 0,5 |
| PCNA-Expression nach sechs Monaten | 0,46 ± 0,12 | 0,81 ± 0,12 | 0,46 ± 0,12 | 0,75 ± 0,12 |

* = $p < 0,05$ vs. Allo + Hypertonus

3.10. MHC-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach drei Monaten (Gruppe B)

Bei der computerunterstützten Auswertung der MHC-Expression nach drei Monaten war die MHC-II-Expression der hypertensiven allotransplantierten Tiere im Vergleich zu allen anderen Gruppen deutlich erhöht.

Ein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen den isotransplantierten Tieren mit und ohne DOCA/Kochsalz-Belastung im Vergleich zu den hypertensiven allotransplantierten Tieren feststellen (s. Tabelle 10 in Kapitel 3.11.).

Auch die normotensiven allotransplantierten Tiere zeigten ein größeres Ausmaß der MHC-Expression als beide Gruppen der isotransplantierten Tiere jedoch ohne das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zu erreichen. Die Allogenetät scheint - wie nicht anders zu erwarten - einen entscheidenden Einfluss auf die MHC-Expression zu haben und wird durch einen Hypertonus offenbar potenziert.

Die MHC-Expression war bei allen Gruppen nach drei Monaten höher als sechs Monate post transplantationem (s. Tabelle 10 in Kapitel 3.11.).

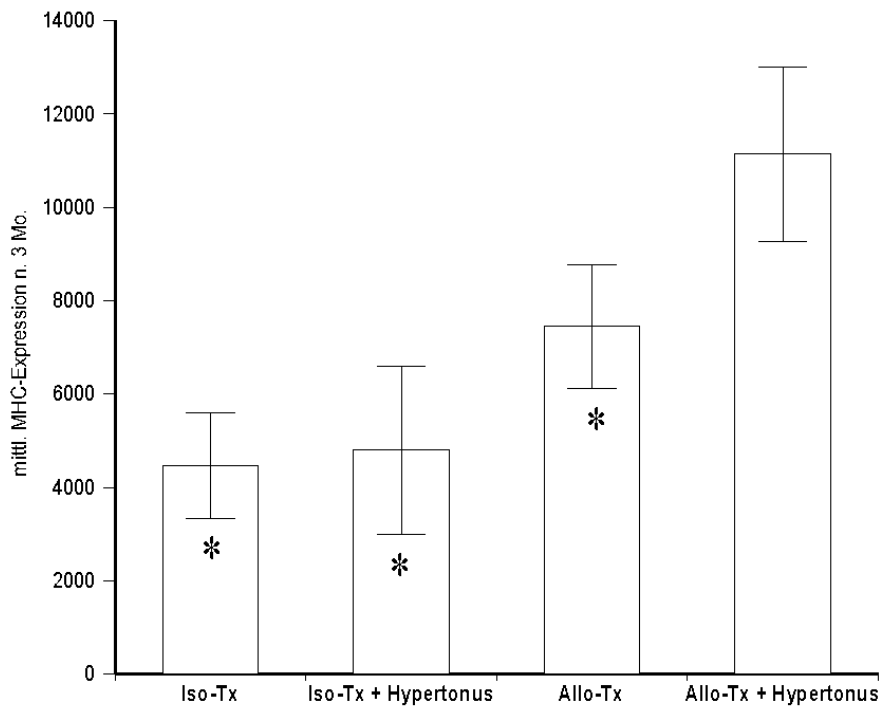


Abbildung 21: MHC-Expression nach drei Monaten (Gruppe B). Iso-Tx n = 4; Iso-Tx + Hypertonus n = 3; Allo-Tx n = 4; Allo-Tx + Hypertonus n = 4. * = p < 0,05 vs. Allo+ Hypertonus

3.11. MHC-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie nach sechs Monaten (Gruppe B)

Insgesamt fiel die MHC-Expression sechs Monate post transplantationem deutlich geringer aus als drei Monate post transplantationem.

Es konnte eine signifikant ($p < 0,05$) höhere MHC-Expression für die hypertensiv allotransplantierten Tiere im Vergleich zu allen Gruppen nachgewiesen werden.

Die MHC-Expression der hypertensiven Isotransplantate fiel sogar geringfügig höher aus als die der normotensiven Isotransplantate und der normotensiven Allotransplantate. Das deutlich geringste Maß der MHC-Expression wiesen die normotensiven Isotransplantate auf (s. Tabelle 10).

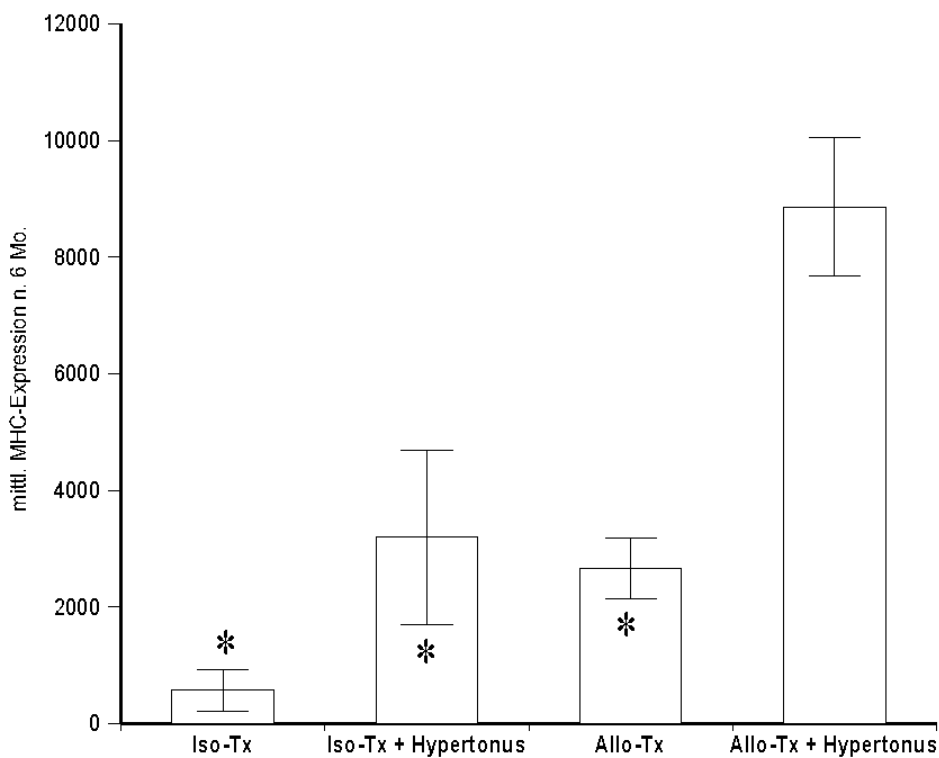


Abbildung 22: MHC-Expression nach sechs Monaten (Gruppe B). Iso-Tx n = 4; Iso-Tx + Hypertonus n = 3; Allo-Tx n = 4; Allo-Tx + Hypertonus n = 4. * = $p < 0,05$ vs. Allo+ Hypertonus

Tabelle 10: MHC-Expression nach drei und sechs Monaten in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B); Angabe von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

| | Iso-Tx | Iso-Tx + Hypertonus | Allo-Tx | Allo-Tx + Hypertonus |
|--------------------------------------|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| MHC (arbitrary units) nach 3 Monaten | 4460 ± 1132 * | 4796 ± 1799 * | 7443 ± 1332 * | 11136 ± 1861 |
| MHC (arbitrary units) nach 6 Monaten | 572 ± 354 * | 3200 ± 1496 * | 2668 ± 520 * | 8863 ± 1192 |

* = $p < 0,05$ vs. Allo+ Hypertonus

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den Einfluss des Hypertonus auf die CTD zu untersuchen.

Als Einflussgrößen wurden die Transplantationsform (iso oder allo), das Vorhandensein eines Hypertonus und in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (Gruppe A) zusätzlich der Einfluss einer antihypertensiven Therapie mittels Ca-Antagonisten (Amlodipin) respektive eines ACE-Hemmers (Enalapril) berücksichtigt.

Wie in verschiedenen Studien bereits beschrieben wurde, scheinen das Auftreten einer CTD und das Auftreten eines Hypertonus in einem Zusammenhang zu stehen (Kusaka et al. 1999; Mannon et al. 1999; Opelz et al. 1998; Paul 1995; Szabo et al. 1998).

Der intraglomeruläre Hypertonus und die Hyperfiltration werden als die wichtigsten hämodynamischen Faktoren für das Fortschreiten der glomerulären Schädigungen angesehen (Olsen et al. 1982). So konnte in einer Studie von Mange et al. (2000) festgestellt werden, dass das Risiko für das Transplantatversagen um den Faktor 1,15 anwächst, wenn der systolische Blutdruck um 10 mmHg steigt. Das Risiko des Transplantatversagens ist sogar um den Faktor 1,27 erhöht, wenn der diastolische Blutdruck um denselben Wert steigt (Mange et al. 2000).

Cosio et al. (1999) zeigten einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Blutdruck und Transplantatüberleben über sechs Jahre post transplantationem bei über 550 Patienten, die eine akute Abstoßung durchlaufen haben. Bei Patienten ohne akute Abstoßung hatte der Blutdruck keinen Einfluss auf das Transplantatversagen. Akute Abstoßung und Blutdruck scheinen sich negativ zu ergänzen (Cosio et al. 2001).

Opelz et al. (1998) belegten anhand einer Studie, die 29.000 Nierentransplantationspatienten umfaßte, dass der systolische und diastolische Blutdruck ein Jahr nach der Transplantation den Transplantatverlust in den nächsten Jahren vorhersagt. So zeigte die Gruppe mit systolischen Werten zwischen 140 bis 160 mmHg 16 % mehr Transplantatverluste im Vergleich zu der Gruppe mit systolischen Werten < 140 mmHg. Bei Werten über 180 mmHg betrug diese Differenz sogar 106 % (Opelz et al. 1998).

Frei et al. (1995) zeigten, dass ein Hypertonus vor der Transplantation mit schlechteren Langzeitergebnissen einhergeht. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte der Einfluß des Hypertonus auf inflammatorische Reaktionen anhand der Expression von Zytokinen festgestellt werden (Frei et al. 1995).

Der Hypertonus führt zu einem erhöhten kapillären Druck innerhalb der Glomeruli und somit auch zu einer erhöhten Wandspannung derselben und zu einer Zunahme der auf sie einwirkenden Scherkräfte. Diese stellen einen entscheidenden Faktor, der zur Aktivierung von Endothelzellen führt, dar (Langeville und O'Donell 1986; Mai et al. 1993; Pohl et al. 1986).

Es wird vermutet, dass die Aktivierung der Endothelzellen eine Interaktion von Empfänger-Leukozyten und Spender-Antigenen ermöglicht und somit eine entscheidende Rolle für die Abstoßungsreaktion spielen könnte (Heemann et al. 1994).

Die Belastung der Glomeruluskapillaren durch den konstant erhöhten systemischen Blutdruck wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Nierenerkrankung zugeschrieben. Ein vermehrter Durchfluß von Makromolekülen durch das Mesangium und die mesangiale Erweiterung durch die Druck- und Flußbelastung gipfeln schließlich in einer Glomerulosklerose (Szabo et al. 1998).

Neben der Interaktion von Empfänger-Leukozyten und Spender-Antigenen durch die Endothelaktivierung werden vermehrt vasokonstringierende Substanzen wie Angiotensin-II, Endothelin-I und Thromboxane-A₂ und Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF-AA und b-FGF ausgeschüttet. Hierdurch kommt es zu einer Migration von glatten Muskelzellen in die Intima der Gefäße, die hier proliferieren und zu einer weiteren Verengung der Strombahn führen und in einem *circulus vitiosus* münden und somit die Zerstörung des Transplantates vorantreiben (Szabo et al. 1998).

Ziai et al. (2000) konnten durch eine Senkung des kapillären Drucks in den Glomeruli hypertensiver Ratten mittels Losartan, einem AT-II-Rezeptorantagonisten, einen renoprotektiven Effekt erzielen. Dies gelang durch eine herabgesetzte Expression von Zytokinen, die der Rekrutierung von Makrophagen dienen sowie durch eine verminderte Expression Makrophagen assoziierter Chemokine. Sie schlußfolgerten, dass Mechanismen, die eine CTD begünstigen, Angiotensin-II-abhängig sind und durch die Verabreichung eines AT-II-Rezeptorblockers positiv beeinflusst werden können. Weitere Studien zur Untersuchung des geeigneten Antihypertensivums sind erforderlich, um die bestmögliche Therapie des Hypertonus nach Nierentransplantation zu finden.

Grone et al. (1999) konnten die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in Nierentransplantaten durch die Applikation von met-RANTES, einem Chemokin-Rezeptorantagonisten, erfolgreich unterdrücken und somit einer Abstoßungsreaktion entgegenwirken.

El Fettouh et al. (2000) wiesen eine strenge Assoziation zwischen positivem Flow-Cytometry-Crossmatch (FCXM) und der Entwicklung einer chronischen Abstoßung nach. Folglich könnte eine aggressivere Therapie der Patienten mit positiver FCXM in einer niedrigeren CTD-Rate münden und somit die Transplantatüberlebensquote deutlich verbessern.

Der Hypertonus scheint auf die Langzeitprognose von Nierentransplantierten einen entscheidenden Einfluss zu haben. Um eine gezielte und genaue Einstellung eines Hypertonus vornehmen zu können, ist eine exakte Erfassung desselbigen unentbehrlich. Hierzu empfiehlt sich ein 24-Stunden Monitoring, insbesondere um nächtliche Blutdruckspitzen zu erfassen. Sporadische Messungen sind nicht ausreichend.

Nakano et al. (1999) stellten fest, dass das Risiko terminal niereninsuffizient zu werden, bei fehlender nächtlicher Blutdruckabsenkung um den Faktor 8 erhöht ist. Curtis et al. (1988) konnten belegen, dass eine Kochsalz-Restriktion zu einem signifikanten Blutdruckabfall bei Nierentransplantierten führt.

Eine NaCl-Restriktion ist empfehlenswert, da eine Hypervolämie der medikamentösen Therapie entgegenwirkt. Die Prävalenz einer Nierenarterienerkrankung der hypertensiven Population liegt bei etwa 10 %; meist handelt es sich um eine Stenose der A. renalis aufgrund arteriosklerotischer Umbauvorgänge. Ein circulus vitiosus entsteht, da eine unilaterale Stenose zu einer vermehrten Ausschüttung von Renin führt mit der sich daraus ergebenden peripheren Vasokonstriktion und Drucknatriurese der kontralateralen Niere. Bei einer bilateralen arteriellen Stenose der A. renalis spielt das RAAS eine untergeordnete Rolle; der Anstieg des Blutdrucks wird vielmehr durch eine Natriumretention und der damit verbundenen Volumenexpansion erklärt. Bei bilateraler Nierenarterienstenose kann ein ACE-Hemmer die Nierenverschlechterung beschleunigen, wohingegen er bei unilateraler Nierenarterienstenose die Funktion der gesunden Niere schützt und die Atrophie der stenotischen Seite fördert. Die Anwendung eines ACE-Hemmers zur antihypertensiven Therapie bedarf folglich einer intensiven Überwachung der Nierenfunktion; besonders bei bilateraler Stenose (Tullis et al. 1999). Das Zusammenspiel von alloantigen-abhängigen und -unabhängigen Faktoren lässt sich anhand der durch die Gewebeschädigung für das Immunsystem des Empfängers erkennbar gewordenen Antigene gut verdeutlichen (Paul 1999a). Der immunologische Abstoßungsprozess wird also durch nicht-immunologische Veränderungen gefördert, alloantigen-abhängige sowie alloantigen-unabhängige Einflussfaktoren scheinen einen

ergänzenden Einfluss auf die Entwicklung des chronischen Transplantatversagens zu haben.

Sie scheinen dieselben zellulären und molekularen Mediatoren der Gewebeverletzung, Umbildung und Reparatur zu aktivieren (Varghese 1999). Der Mechanismus mit dem der Hypertonus die Expression von Wachstumsfaktoren akzeleriert, ist nicht gänzlich geklärt.

Da diese aktivierten Mediatoren einen entscheidenden Beitrag zur Zellinfiltration bei der Transplantatabstoßung leisten, ist deren Antagonisierung ein hoffnungsvoller Schritt zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion. Denkbare Therapieansätze wären die Blockade des Signalflusses von Wachstumsfaktoren sowie die Unterdrückung ihrer Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (Häyry 1999).

4.1. PCNA-Expression

PCNA ist ein etablierter Marker für die proliferative Potenz eines Gewebes. So eignet er sich, um Vergleiche zwischen proliferationshemmenden oder -fördernden Einflüssen verschiedener Zustände oder Noxen zu beurteilen.

4.1.1. PCNA-Expression unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A)

Die größte PCNA-Expression konnte in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe (A) für die hypertensiven Allo-Tx, die keinerlei Antihypertensiva erhielten, nachgewiesen werden.

Für die mit Amlodipin therapierten Tiere ließ sich zwar die niedrigste Anzahl von PCNA-positiven Zellen unter den transplantierten Tieren feststellen, der Unterschied zu den mit Enalapril therapierten Tieren war jedoch nicht signifikant.

Die eindeutig geringste PCNA-Expression zeigten die normotensiven nicht transplantierten Tiere.

Deutlich wird hier, dass sowohl Alloantigenität (Transplantation) als auch alloantigenunabhängige Faktoren (Hypertonus) Einfluss auf die PCNA-Expression nehmen. Der Hypertonus hat einen progressiven Einfluss auf Zellumbauvorgänge, die in

einer Sklerose münden können. Diese sklerotischen Umbauvorgänge wiederum machen Alloantigene detektierbar und begünstigen somit eine Immunreaktion.

Bei den transplantierten Tieren unter Enalapriltherapie ließ sich eine signifikant höhere PCNA-Expression dokumentieren als bei den Tieren der Non-Tx Gruppe.

Für die transplantierten Tiere unter Amlodipintherapie war die PCNA-Ausschüttung im Vergleich zu den Non-Tx Tieren nicht signifikant gesteigert. Unter der Therapie mit einem Ca-Antagonisten scheinen die Proliferationsvorgänge also suffizienter gedrosselt zu werden als unter der Therapie mit einem ACE-Hemmer. Inwiefern ein Ca-Antagonist Gewebeumbauprozesse über die Senkung des Blutdrucks hinaus positiv zu beeinflussen vermag, bleibt zu klären.

Ungeachtet der Therapieform bleibt festzuhalten, dass auch in dieser Versuchsreihe ein Hypertonus stets zu einer erhöhten Expression von PCNA führt.

So wies die untherapierte transplantierte Gruppe das deutlich größte Ausmaß an PCNA-positiven Zellen auf (s. Abbildung 5).

Die Therapie des Hypertonus vermag das Ausmaß zwar günstig zu beeinflussen, ist jedoch nicht in der Lage, den Zustand ohne jeglichen Einfluss alloantigen-abhängiger oder -unabhängiger Faktoren herzustellen.

Die nicht transplantierten Tiere zeigten stets die geringste PCNA-Expression. Auch in diesem Fall wird das Zusammenspiel des Hypertonus und Allogenität offensichtlich.

4.1.2. PCNA-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B)

In unserem Versuchsaufbau der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie ließ sich für die drei Monatstiere der signifikant größte Nachweis von PCNA-positiven Zellen für die hypertensiven Allotransplantate aufzeigen.

Hypertensive isotransplantierte Tiere wiesen eine nahezu identische Fülle an PCNA-positiven Zellen wie die normotensiven Allotransplantate auf. Diese beiden Feststellungen legen die Schlußfolgerung nahe, dass die Existenz eines Hypertonus über den Einfluss alloantigen-abhängiger Faktoren hinaus proliferative Prozesse begünstigt. Die positive Beeinflussung von alloantigen-abhängigen Faktoren durch die Existenz eines Hypertonus wird durch unsere Feststellung, dass die PCNA-Expression bei den hypertensiven Iso-Tx niedriger ausfällt als bei den normotensiven Iso-Tx während für die Allo-

Tx ein signifikanter Unterschied zwischen normo- und hypertensiven Tieren festgehalten werden kann, unterstrichen.

Sechs Monate post transplantationem ließ sich für die hypertensiven Iso-Tx und Allo-Tx eine deutlich höhere PCNA-Expression nachweisen als für die normotensiven Tiere.

Auch diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass alloantigen-abhängige Faktoren synergistisch mit alloantigen-abhängigen (Hypertonus) Faktoren auf proliferative Vorgänge einwirken.

4.2. MHC-Expression

MHC wird zum einen in seiner löslichen Form als Folge von Gewebeschäden nach Transplantation exprimiert, zum anderen aktiv von den transplantierten Organen produziert. Als membrangebundenes Antigen existiert es auf der Oberfläche intakter Spenderzellen (Kobayashi et al. 1999).

In einem Versuchsaufbau immunisierten Womer et al. (2001) Lewis-Ratten mit Wistar-Furth Klasse II-MHC-Antigenen (entweder HLA-DR-ähnlich oder HLA-DQ-ähnlich) oder Klasse I-MHC-Antigenen (HLA-A-ähnlich) 7 Tage vor Transplantation.

Die Kontrollgruppe erhielt nicht gematchte Kadavertransplantate.

Drei Monate später konnte bei der Gruppe HLA-A immunisierter Tiere eine deutlich höhere Vaskulopathierate festgestellt werden als in den MHC-II immunisierten Tieren sowie in den Kontrollgruppen.

Sechs Monate später war die Vaskulopathie bei den HLA-A und HLA-DR immunisierten Tieren deutlich stärker fortgeschritten als in den Kontrollgruppen und den HLA-DQ immunisierten Tieren. Es kommt im Verlauf folglich zu einer Verlagerung der Antigenität der MHC-Peptide.

Es konnte demonstriert werden, dass durch Prägung der Empfänger-T-Zellen durch spezifische MHC-I und MHC-II Allopeptide des Spenders die Entwicklung und das Fortschreiten einer Vaskulopathie begünstigt wird.

Ein indirektes Wiedererkennen von Spender MHC-Klasse I und II Antigenen fördert demzufolge die Entwicklung einer Vaskulopathie des Transplantates (Womer et al. 2001).

4.2.1. MHC-Expression unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A)

Bei der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den wahlweise mit Amlodipin oder Enalapril therapierten Tieren und den nicht therapierten hypertensiven Allotransplantaten festgestellt werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Amlodipin und den mit Enalapril behandelten Tieren hinsichtlich Reduktion der MHC-Expression besteht nicht.

Sowohl Amlodipin als auch Enalapril vermochten die MHC-Expression im Vergleich zu der Gruppe der nicht antihypertensiv behandelten Tiere signifikant zu senken. Diese Tatsache unterstreicht die Möglichkeit eines kausalen Zusammenhangs zwischen Hypertonus und MHC-Expression und verdeutlicht die Wichtigkeit des frühzeitigen Erkennens und Therapieren des Hypertonus.

Der Hypertonus scheint in diesem Versuchsaufbau einen entscheidenden Faktor für die MHC-Expression zu spielen.

Ebenso wie in der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie ist auch in der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe ein Einfluss alloantigen-abhängiger Faktoren zu verzeichnen, der durch den signifikanten Unterschied aller untersuchten Gruppen zu der Gruppe der nicht transplantierten Tiere zum Ausdruck kommt.

4.2.2. MCH-Expression der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B)

In unserem Versuchsaufbau der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie ließ sich eine signifikant vermehrte Expression des MHC II-Antigens bei den allotransplantierten hypertensiven Tieren nach drei Monaten im Vergleich zu den isotransplantierten Tieren mit und ohne Hypertonus nachweisen.

Der Unterschied zu den normotensiven Allotransplantaten war nicht signifikant.

Der Vergleich der normotensiven Allotransplantate mit den beiden Gruppen der Isotransplantate erbrachte eine gesteigerte MHC-Expression für die allotransplantierten Tiere ohne das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zu erreichen.

Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl alloantigen-abhängige wie auch -unabhängige Faktoren einen Einfluss auf die MHC-Expression haben.

Hypertonus und Allogenität scheinen synergistisch, die Existenz eines Hypertonus potenziert die Immunantwort.

Sechs Monate nach Transplantation war neben dem signifikanten Unterschied der hypertensiven Allotransplantate zu den Isotransplantaten auch ein signifikanter Unterschied zu den normotensiven Allotransplantaten nachweisbar, was die Beteiligung des Hypertonus an inflammatorischen und immunogenen Mechanismen verdeutlicht.

Die dagegen leicht gesteigerte MHC-Expression der hypertensiven Isotransplantate im Vergleich zu den normotensiven Allotransplantaten lässt sogar einen Einfluss des Hypertonus auf die MHC-Expression unter syngenem Bedingungen vermuten.

Wenn nicht alleinig, so hat der Hypertonus wenigstens synergistische bzw. additive Effekte mit alloantigen-abhängigen Faktoren auf inflammatorische Reaktionen.

Die Betonung der MHC-Expression auf den perivaskulären Bereich legt die Vermutung nahe, dass der Hypertonus und die mit ihm verbundenen Scherkräfte einen entscheidenden Beitrag für das Ausmaß der MHC-Expression leisten.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer Untersuchung von Kusaka et al. (1999) überein, in der ebenfalls eine erhöhte MHC-Expression bei hypertensiven Ratten mit chronischer Transplantatdysfunktion festgestellt werden konnte.

Durch eine vermehrte MHC-Expression, wie sie der Hypertonus zu begünstigen scheint, wird eine Immunantwort des Empfängers begünstigt und somit die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung vergrößert.

4.3. Interstitielle und glomeruläre Sklerose unter Amlodipin- bzw. Enalapriltherapie (Gruppe A)

Inflammation und Sklerose werden normalerweise von gesundem Gewebe gut kontrolliert. Eine denkbare Hypothese ist, dass streßgeplagte transplantierte Parenchymzellen dieser Kontrollfunktion nicht in ausreichendem Maß nachkommen können (Paul 1999a).

Ein wichtiger Mediator der Sklerose ist das multifunktionelle Zytokin TGF- β , das während der chronischen Transplantatdysfunktion von Nierentransplantaten exprimiert wird. TGF- β wird für die Matrixvermehrung bei der chronischen Transplantatdysfunktion verantwortlich gemacht (Paul 1999a, Paul 1999b).

Bei der Sklerose handelt es sich um einen irreversiblen Prozess. Während z.B. Gefäße auch nach massiver Zerstörung wieder vollständig aufgebaut werden können, gelingt dies bei Tubuluszellen nicht. Sie benötigen eine intakte tubuläre Basalmembran, an die ihre Integrine gebunden werden können, um proliferieren zu können und um die sie auszeichnende Polarität aufbauen zu können. Die Zerstörung der extrazellulären Matrixstruktur führt also zu einer Unfähigkeit, die Transplantatarchitektur wieder herzustellen (Paul 1999b).

Das renale Interstitium erfüllt nicht nur die Rolle eines passiven Gewebes, in das die funktionell tätigen Glomeruli eingebettet sind, sondern ist vielmehr ein dynamisches Gewebe, in dem Fasern und Grundsubstanzen produziert und abgebaut, Substanz-austausch und lymphatische Drainage stattfinden und hormonelle Funktionen gesteuert werden (Lemley und Kriz 1991). Die Schädigung der interstitiellen Matrix, wie sie der Hypertonus zu bewirken vermag, hat folglich weitreichende Bedeutung.

Kusaka et al. (1999) konnten eine interstitielle Sklerose und Glomerulosklerose bei hypertensiven Rattennieren mit chronischer Transplantatdysfunktion in einem Ausmaß nachweisen, wie es bei normotensiven Abstoßungspräparaten zuvor niemals beobachtet werden konnte.

Eine Alteration des Nierengewebes, wie ihn unter anderem ein Hypertonus zu bewirken vermag, kann über die vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren zu sklerotischen Umbauvorgängen des Nierengewebes führen. Gewebeschäden vermögen Antigene freizulegen, die unter normalen Umständen für das Immunsystem nicht zugänglich sind bzw. nicht erkannt werden können (Paul 1999a).

Diese Untersuchungen werden durch unsere Ergebnisse bestätigt, die in beiden Auswertungen (interstitiell und glomerulär) eine signifikante Steigerung der Matrixvermehrung aller Gruppen gegenüber den nicht transplantierten Tieren aufwies.

Die mit Enalapril therapierten Tiere zeigten bei beiden Auswertungen (interstitiell und glomerulär) eine geringere Matrixvermehrung als die hypertensiven Allotransplantate.

Dennoch ließ sich für beide Medikamente ein signifikant höherer Sklerosescore als bei den nicht transplantierten Tieren nachweisen. Bezüglich der Sklerosevermehrung scheint der Hypertonus also einen synergistischen Effekt mit alloantigen-abhängigen Faktoren zu haben.

ACE ist ein membrangebundenes Enzym, das in den Wänden von Venen und Arterien vorkommt.

Powell et al. konnten zeigen, dass durch die kontinuierliche Gabe eines ACE-Hemmers die Hypertrophie von Muskelzellen in Arterien bei hypertensiven Ratten vermindert werden konnte. Des Weiteren konnten Powell et. Al.(1989) einen positiven Einfluss auf die Neointimaproliferation und deren Reduzierung bei hypertensiven Ratten für den ACE-Hemmer Captopril nachweisen; für den Ca-Antagonisten Verapamil konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden.

Für den Ca-Antagonisten Nitrendipin, welcher die präglomeruläre Restistance senkt, konnte nachgewiesen werden, dass er die Progression der Glomerulosklerose forciert (Wenzel et al. 1992).

Ein inhibitorischer Effekt auf hypertrophe Umbauvorgänge von renalen Gefäße von ACE-Hemmern konnte ebenso nachgewiesen werden (Naftilan et al. 1989, Amuchastegui et al. 1998). Unter Therapie mit dem AT-II-Rezeptorblocker Losartan gelang Ziai et al. (2000) der Nachweis eines reduzierten Ausmaßes der Glomerulosklerose.

ACE-Hemmer und AT II-Rezeptorblocker scheinen sowohl den Filtrationsdruck als auch das Risiko, eine Glomerulosklerose zu entwickeln, zu senken. Außerdem wird vermutet, dass sie die Proliferation von glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden senken (Naftilan et al. 1989).

Diese Beobachtung wird durch die Untersuchung der glomeruläre Umbauvorgänge in unserer antihypertensiv behandelten Versuchsreihe unterstrichen. So gelang uns der Nachweis einer signifikant niedrigeren glomerulären Matrixvermehrung für die mit Enalapril therapierten Tiere im Vergleich zu den mit Amlodipin behandelten Tieren.

Ebenso war die glomeruläre Sklerose bei den unter Enalapril stehenden Tieren signifikant niedriger als bei den unbehandelten Tieren.

Die Betrachtung der interstitiellen Sklerosevermehrung zeigte eine signifikant niedrigere Ausprägung der sklerotischen Umbauvorgänge für beide Medikamente im Vergleich zu den nicht transplantierten Tieren und keinen signifikanten Unterschiede im Vergleich beider Medikamente.

Es ist möglich, dass ein ACE-Hemmer über die Vermeidung der Umwandlung von Angiotensin-I in Angiotensin-II die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäße und die Matrixproteinsynthese positiv zu modulieren vermag (Powell et al. 1989).

Anderson et al. konnten über eine Kontrolle des systemischen und glomerulären Blutdrucks mittels Enalapril eine Abschwächung der Proteinurie und reduzierte glomeruläre Umbauvorgänge beobachten (Anderson et al. 1986)

Angiotensin scheint ein wichtiges Wachstum förderndes Agens der glatten Muskelzellen von Gefäßen zu sein.

Die Bearbeitung der Sklerose der nicht antihypertensiv behandelten Versuchsreihe erfolgt in der Dissertation von Dr. Y. Tanriver.

4.4. Proteinurie (Gruppe A)

Eine Assoziation zwischen Hypertonus und Nierenfunktionsverschlechterung - gemessen an der Ausprägung der Proteinurie - beweist keinen kausalen Zusammenhang; so ist es denkbar, dass der Hypertonus post transplantationem auch lediglich Folge der sich stetig verschlechternden Nierenfunktion ist und somit Auswirkung und nicht Ursache repräsentiert.

Szabo et al. (2000) und Ziai et al. (2000) konnten in Tierexperimenten nachweisen, dass Hemmer des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (sowohl ACE-Hemmer als auch AT-II-Rezeptorblocker) die chronische Abstoßung mildern und die Proteinurie senken konnten (Amuchastegui et al. 1998).

Anderson et al. (1986) gelang ebenfalls der Nachweis, dass bei mit Enalapril behandelten Ratten die Kontrolle des systemischen und glomerulären Drucks mit einer limitierten Progression der Proteinurie und bedeutend weniger strukturellen glomerulären Umbauvorgängen assoziiert war.

Unterstrichen werden diese Feststellungen durch unser Ergebnis, bei dem die geringste Proteinurie für die unter Enalapriltherapie stehenden Tiere der antihypertensiv behandelten Versuchsreihe meßbar ist. Der Unterschied zu den unter Amlodipintherapie stehenden Tieren war ebenso wie der zu den untherapierten Allotransplantaten signifikant.

Amlodipin hatte in unserem Versuchsaufbau keinen signifikant positiven Effekt auf die Reduktion der Proteinurie im Vergleich zu den nicht antihypertensiv behandelten Tieren. Für die nicht antihypertensiv behandelten Tiere konnte die größte Proteinurie nachgewiesen werden.

Roodnat et al. (2001) belegten in einer Versuchsreihe, dass das Ausmaß der Proteinurie post transplantationem sowohl das Risiko eines Transplantatverlustes erhöht als auch ein Risiko für das weitere Überleben darstellt.

4.5. Kritik

Ein direkter Effekt der DOCA- und Salzbelastung auf das Ausmaß der MHC- und PCNA-Expression sowie ein indirekter Effekt über Beeinflussung von Mediatoren kann nicht ausgeschlossen werden und somit deren potentielle Beeinflussung unserer Ergebnisse nicht negiert werden.

Bei dem von uns angewandten Versuchsaufbau erfolgte keine Kontrolle der tatsächlich aufgenommenen DOCA-Menge; ebenso wenig wurde die Aufnahme von Amlodipin und Enalapril auf eine Aufnahme in mg/kg Körpergewicht genormt. In welchem Ausmaß nun also das einzelne Tier tatsächlich mit DOCA belastet und mit Amlodipin bzw. Enalapril behandelt wurde, lässt sich nur abschätzen.

Es wurde berichtet, dass mit DOCA belastete Tiere nicht nur einen erhöhten Blutdruck, sondern auch eine erhöhte Rate von Sklerosen und TGF- β -Expression am Herzen aufweisen (Ammarguella et al. 2001, Ammarguella et al. 2002). Bei der Wertung der in unseren Versuchen erzielten Ergebnisse muß diese Tatsache Berücksichtigung finden.

Eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A wurde bei uns nur über 10 Tage durchgeführt und nicht, wie in der Transplantationsmedizin üblich, über die gesamte Dauer des Versuchs. Bei der Beurteilung der Sklerose ist zu berücksichtigen, dass Cyclosporin A die Entstehung sklerotischer Umbauvorgänge fördert.

Ein weiterer Kritikpunkt ist die Größe der von uns untersuchten Gruppen, die sich zum einen durch das vorzeitige Versterben der Tiere ergibt, zum anderen durch die Aufteilung in der nicht antihypertensiv behandelten Versuchsreihe der 3- und 6-Monatstiere. Eine Vergrößerung der Tiere pro Gruppe wäre nur unter großem Aufwand möglich.

Bei der Auswertung ist ein subjektives Bewertungsverfahren gewählt worden. Die erzielten Ergebnisse sind daher nicht objektiv sondern unterliegen einer Beeinflussung durch den Untersucher.

5. Zusammenfassung

Hintergrund

Arterieller Hochdruck ist eng assoziiert mit chronischem Nierentransplantatversagen. Unklar ist jedoch ob Hochdruck Ursache oder Folge der Transplantatdysfunktion ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des arteriellen Hochdruckes auf die chronische Transplantatdysfunktion anhand eines standardisierten und gut reproduzierbaren Transplantations-Tiermodells Fisher → Lewis Ratte u.a. unter folgenden Fragestellungen untersucht: Akzeleriert der arterielle Hypertonus das Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion? Welche Pathomechanismen werden durch einen Hochdruck in der transplantierten Niere ausgelöst? Beeinflusst die Therapie des Hypertonus mit Antihypertensiva die Funktionsverschlechterung und das Transplantatüberleben sowie strukturelle Umbauvorgänge?

Methoden

Die Arbeiten wurden im Fisher → Lewis Transplantationsmodell durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden Allotransplantationen durchgeführt, ein Hochdruck durch Gabe von Desoxycorticosteronacetat (DOCA) und orale Salzbelastung induziert und anschließend entweder mit Enalapril oder mit Amlodipin behandelt (Gruppe A). Im zweiten Ansatz wurden Iso- und Allotransplantationen durchgeführt; bei jeweils der Hälfte der Tiere wurde ein Hochdruck mit DOCA/Salz erzeugt (Gruppe B). In beiden Versuchsaufbauten (Gruppe A und B) untersuchte ich die PCNA- und MHC-Expression im Nierengewebe mittels immunhistochemischer Verfahren. Die Proteinurie wurde mittels der Bradford Methode gemessen. Die Dokumentation und Diskussion der Proteinurie, des Überlebens sowie des Hypertonus der Versuchsreihe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) wurde von Dr. med. Tanriver, der an diesem Projekt mitwirkte, übernommen.

Ergebnisse

Für die Versuchsgruppe ohne antihypertensive Therapie (Gruppe B) konnte ich zeigen, dass die Induktion eines Hochdrucks die Expression von MHC deutlich zu steigern vermag, insbesondere in der Kombination Allo-Transplantat/Hochdruck. Ebenso kam es zur vermehrten Expression von PCNA. Ich konnte zeigen, dass unter Therapie mit Enalapril die Mortalität der Tiere in Gruppe A signifikant gesenkt werden kann,

dagegen konnte für die Tiere unter Amlodipintherapie keine signifikante Mortalitätssenkung nachgewiesen werden. Gleichzeitig gelang die Blutdrucksenkung mit Enalapril deutlich suffizienter als mit Amlodipin. Ebenso konnte unter Enalapriltherapie eine signifikant geringere Proteinurie erzielt werden als unter Amlodipintherapie. Unter Enalapril zeigten sich weniger strukturelle Umbauvorgänge im Sinne einer glomerulären und interstitiellen Sklerose als unter Amlodipintherapie. Für beide Medikamente konnte ein positiver Einfluss auf die MHC- und PCNA-Expression nachgewiesen werden, wobei Amlodipin eine suffizientere Unterdrückung der PCNA-Expression bewirkte als Enalapril.

Schlussfolgerung

Die erhobenen Daten unterstreichen das Zusammenspiel alloantigen-abhängiger und alloantigen-unabhängiger Faktoren, die auf die Langzeitprognose von Nierentransplantaten einen entscheidenden Einfluss ausüben. Der Hypertonus ist ein entscheidender alloantigen-unabhängiger Risikofaktor, der die Prognose für ein Nierentransplantat deutlich negativ beeinflusst. Für die Praxis ist neben einer suffizienten und intensiven immunsuppressiven Therapie folglich die konsequente Behandlung des arteriellen Hypertonus zwingend erforderlich um die Funktion der transplantierten Niere möglichst lange zu erhalten. Durch eine bessere Behandlung eines arteriellen Hypertonus scheint ein ACE-Hemmer die strukturellen Umbauvorgänge besser zu unterdrücken und somit die Überlebensrate des Transplantates zu erhöhen als ein Ca-Antagonist. Es ist zu schlussfolgern, dass ein ACE-Hemmer im Vergleich zu einem Ca-Antagonist deutliche Vorteile in der Prävention der chronischen Transplantatdysfunktion zu haben scheint.

6. Literaturverzeichnis

1. Agraz I., Guirado L. L., López-Navidad A., et al.: Renal transplantation and graft survival and its influencing factors. *Transplant Proc* 1999; 31: 2296-2300
2. Ambrosius H., Rudolph W.: *Grundriss der Immunbiologie*. Gustav Fischer, 2. Auflage, 1990
3. Ammarguella F. Z., Gannon P. O., Amiri F., et al.: Fibrosis, matrixmetallo-proteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET (A) receptors. *Hypertension* 2002; 39: 679-684
4. Ammarguella F. Z., Larouche I., Amiri F., et al.: Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of Endothelin ETA receptor Antagonist. *Circulation* 2001; 103: 319-324
5. Amuchastegui S. C., Azzollini N., Mister M., et al.: Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not by calcium channel antagonism. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1948-1955
6. Anderson S., Rennke H. G., Brenner B. M.: Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J. Clin Invest* 1986; 77: 1993-2000
7. Basadonna G. P., Matas A. J., Gillingham K. J. et al.: Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993; 55: 993-995
8. Bochicchio T., Ron O., Sandoval G., et al.: Hemodynamic alterations associate with progression of renal allograft injury. *Transplant Proc* 1992; 23: 1773-1774
9. Bitter-Suermann H.: Morphologic features of spleen allografts in rats. *Nature* 1975; 247: 465-466
10. Brazy P. C., Pirsch J., Berlzer F. O.: Factors affecting renal allograft in longterm recipients; *Am J Kidney Dis* 1992; 19: 558- 566
11. El Fettouh H. A., Cook D. J., Bishay E., et al.: Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56: 369-372
12. Classen M., Diehl V., Kochsiek K.: *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München, 4. Auflage; 1998
13. Cosio F. G., Pelletier R. P., Sedmak D. D., et al.: Renal allograft survival following acute rejection correlates with blood pressure levels and histopathology. *Kidney Int* 1999; 56: 1912-1919
14. Cosio F. G., Pelletier R. P., Pesavento T. E., et al.: Elevated blood pressure predicts the risk of acute rejection in renal allograft recipients. *Kidney Int* 2001; 59: 1158-1164

15. Curtis J. J., Luke R. G., Jones P., et al.: Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *Am J Med* 1988; 85: 134-138
16. El Fettouh H. A., Cook, D. J., Bishay, E., et al.: Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56: 369-372
17. Flechner S. M., Modlin C. M., Serrano D. P., et al.: Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 1996; 62: 1235-1241
18. Frei U., Schindler R., Wieters D., et al.: Pre-transplant hypertension: a major risk factor for chronic progressive renal allograft dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1206-1211
19. Gaweco A. S., Mitchell B. L., Lucas B. A., et al.: CD40 expression on graft infiltrates and parenchymal CD154 (CD40L) induction in human chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1999; 55: 1543-1552
20. Gemsa D., Kalden J. R., Resch K.: *Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis*, Thieme Verlag, 3. Auflage, 1991
21. Grone H. J., Weber C., Weber K. S., et al.: Metranes reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J* 1999; 13: 1371-1383
22. Habenicht A. J. R., Salbach P., Blattner C., et al.: Platelet-derived growth factor: formation and biological activities. *Growth factors, differentiation factors, and Cytokines*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 31-38, 1990
23. Häyry P.: Chronic rejection: new potential venues of therapy. *Transplant Proc* 1999; 31: 1799-1800
24. Hancock W. H., Whitley W. D., Tullius S. G., et al.: Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56: 643-650
25. Heaf J. G., Ladefoged J.: The effect of acute rejection on longterm renal graft survivals is mainly related to initial renal damage. *Transpl Int*. 1998; 11 (Suppl 1): 26-31
26. Heemann U. W., Tullius S. G., Azuma H., et al.: Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg* 1994; 219: 4-12
27. Humar A., Hassoun A., Kandaswamy R., et al.: Immunologic factors: the major risk for decreased longterm renal allograft survival. *Transplantation* 1999; 68: 1842-1846
28. Ishikawa N., Tanabe K., Tokumoto T., et al.: Risk factors affecting longterm results of renal retransplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 2858-2859

29. Isnoniemi H., Nurminen M., Tikkanen M. F., et al.: Risk factors predicting chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 1994; 57: 68-72
30. Kimikawa M., Tojimbara T., Nakajima I., et al.: Posttransplant antidonor antibodies and chronic rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 2872-2873
31. Kobayashi E., Lord R., Green M., et al.: Detection of membrane-bound and soluble-form MHC class I antigen from rat pancreas/spleen grafts during ongoing rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 3409-3413
32. Kusaka M., Ziai F., Hancock W. W., et al.: Systemic hypertension accelerates chronic rejection of renal allografts in the rat: *Transplant Proc* 1999; 31: 869
33. Langville B. L., O'Donnell F.: Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium dependent. *Science* 1986; 231: 405-407
34. Lemley K. V., Kriz W.: Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 1991; 39: 370-381
35. Mai M., Geiger H., Hilgers K. F., et al.: Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. *Hypertension* 1993; 22: 754-765
36. Mange K. C., Cizman B., Joffe M., et al.: Arterial hypertension and renal allograft survival. *J Am Med Assoc* 2000; 283:633-638
37. Mannon R. B., Kopp J. B., Ruiz P., et al.: Chronic rejection of mouse kidney allografts. *Kidney Int* 1999; 55: 1935-1944
38. Matas A.: Chronic rejection in renal transplant recipients- risk factors and correlates. *Clin Transplant* 1994; 8 (3Pt2): 332-335
39. Massy Z. A., Guijarro C., Ksiske B. L.: Clinical predictors of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 52 (Suppl): 85-88
40. Mihatsch M. J., Nicleleit V., Gudat F.: Morphologic criteria renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 1295-1297
41. Milford E. L.: Chronic renal allograft loss. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 475-479
42. Modlin C., Goldfarb D., Novick A. C.: Hyperfiltration nephropathy as a cause of late graft loss in renal transplantation. *World J Urol* 1996; 14:256-264
43. Naftilan A. J., Pratt R. E., Dzau V. J.: Induction of platelet-derived growth factor a-chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultures rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1419-1424
44. Nakano S., Ogihara M., Tamura C., et al.: Reversed circadian blood pressure rhythm independently predicts endstage renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1999; 13: 224-231

45. Olsen J. L., Hostetter T. H., Rennke H. G., et al.: Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int* 1982; 22:112-126
46. Opelz G., Wujciak T., Ritz E: Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int* 1998; 53: 218-222
47. Ostendorf T., Kunter U., Eitner F., et al.: VEGF165 mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 1999; 104: 913-923
48. Humar A., Leone J. P., Matas A. J.: *Frontiers in Bioscience. A brief review.* *Kidney Transplant* 1997; 2: e41-e47
49. Paul L. C.: Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1995; 47: 1491-1499
50. Paul L. C.: Current knowledge of the pathogenesis of chronic allograft dysfunction. *Transplant Proc* 1999; 31: 1793-1795
51. Paul L. C.: Pathophysiology of chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 2715-2716
52. Pilmore H. L., Eris J. M., Painter D. M., et al.: Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1999; 67: 929-933
53. Pirsch J. D., Ploeg R. J., Gange S., et al.: Determinants of graft survival after renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1581-1586
54. Pohl U., Holtz J., Busse R., et al.: Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37-47
55. Powell J. S., Clozel J.-P., Müller R. K. M., et al.: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989; 245: 186-188
56. Pratschke J., Wilhelm M. J., Kusaka M., et al.: Accelerated rejection of renal allograft from braindead donors. *Ann Surg* 2000; 232: 263-271
57. Promool S., Jhangri G. S., Cockfield S. M., et al.: Time dependency of factors affecting renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 565-573
58. Roodnat J. I., Mulder P. G., Rischen-Vos J., et al.: Proteinurie after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation* 2001; 72: 438-444
59. Saadeh E., Szatkowski M., Vary C. P., et al.: HLA-DMA allele polymorphism: no impact on kidney allograft outcome. *Hum Immunol* 2000; 61: 345-347

59. Silbernagel S., Lang F.: Taschenatlas der Pathophysiologie; Georg Thieme Verlag; 1998
60. Staines N., Brostoff J., James K.: Immunologisches Grundwissen; UTB Gustav Fischer, 1997
61. Starzl T. E., Demetris A. J., Murase N., et al.: Cell-Migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet* 1992; 339: 1579-1582
62. Sun J., McCaughan G., Gallagher N., et al.: Deletion of spontaneous acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 1995; 60: 233-236
63. Szabo A., Patschan O., Kuttler B., et al.: Hypertension accelerates the pace of chronic graft dysfunction in the rat. *Transplant Int* 1998; 11(Suppl. 1): S10-S14
64. Szabo A., Lutz J., Schleimer K., et al.: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int* 2000; 57: 982-991
65. Terasaki P. I., Koyama H., Checca M., et al.: The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 1450-1454
66. Tullius S. G., Nieminen M., Bechstein W. O., et al.: Contribution of early acute rejection episodes to chronic rejection in the rat kidney retransplantation model. *Kidney Int* 1998; 53: 465-472
67. Tullis M. J., Caps M. T., Zierle R. E., et al.: Blood pressure, antihypertensive medication, and atherosclerotic renal artery stenosis. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 675-681
68. Varghese Z.: Immunologic and nonimmunologic correlates of chronic renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 1999; 31: 3356-3358
69. Wenzel U. O., Troschau G., Schoeppe W., et al.: Adverse effect of calcium channel blocker itrendipine on nephrosclerosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 233-241
70. Womer K. L., Stone J. R., Murphy B., et al.: Indirect allorecognition of donor class I und II major histocompatibility complex peptides promotes the development of transplant vasculopathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2500-2506
71. Ziai F., Nagano H., Kusaka M., et al.: Renal allograft protection with Losartan in Fisher-Lewis rats: hemodynamics, macrophages and cytokines. *Kidney Int* 2000; 57: 2618-2625

Danksagung

Ich freue mich, mein Promotionsvorhaben mit dieser Arbeit beenden zu können. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen und Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. R. Schindler für die Bereitstellung des Themas und die stetige und aufmunternde Unterstützung sowie für die geduldige Korrektur meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. med. S. Bachmann möchte ich mich für die Nutzung der Geräte zur Auswertung der histologischen Präparate bedanken.

Bei Dr. med. S. Jürgensen möchte ich mich für die unabhängige Auswertung von den vorgelegten histologischen Schnitten bedanken.

Besonderer Dank gilt den technischen Assistentinnen für die kompetente Unterstützung und Hilfe bei meinen immunhistologischen Färbungen.

Für die Hilfe bei den Korrekturarbeiten und der optischen Aufarbeitung möchte ich mich insbesondere bei Dr. K. Schmengler bedanken.

Für die persönliche Unterstützung gilt meinen Eltern besonderer Dank.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Kerstin Noack, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Der Einfluss des arteriellen Hypertonus auf die chronische Nierentransplantatdysfunktion. Immunhistochemische Untersuchungen

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 und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben habe.

Datum, Ort

Unterschrift