

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

DISSERTATION

Einfluss einer einmaligen Spendervorbehandlung mit Cobalt-III-  
Protoporphyrin IX auf die Immunogenität des Transplantats im  
Rahmen der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation im  
Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Henriette Keßler

aus Bad Saarow Pieskow

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Pratschke

2. Prof. Dr. med. H.-D. Volk

3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Obermaier

Datum der Promotion: 18.09.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>6</b>
<b>1.1. Historische Entwicklung der Nierentransplantation</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Abstoßungsreaktionen</b>	<b>8</b>
1.2.1. Hyperakute Abstoßung	8
1.2.2. Akzelerierte Abstoßung	9
1.2.3. Akute Abstoßung	9
1.2.4. Chronische Abstoßung	9
<b>1.3. Banff Schema zur Einteilung der akuten Abstoßung</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Molekulare Auswirkung der akuten Abstoßung auf das Nephron</b>	<b>10</b>
<b>1.5. Einfluss akuter Abstoßungsreaktionen auf das         Langzeitüberleben des Transplantates</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Antigenpräsentation</b>	<b>12</b>
<b>1.7. Postoperative Immunsuppression</b>	<b>13</b>
<b>2. <u>Stand der Forschung und Hypothese</u></b>	<b>15</b>
<b>2.1. Spendervorbehandlung</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Ischämie/Reperfusionsschaden</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Hämoxygenasesystem</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Hypothese und Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3. <u>Material und Methoden</u></b>	<b>19</b>
<b>3.1. Versuchsaufbau</b>	<b>19</b>
3.1.1. Versuch	19
3.1.2. Kontrollgruppen	19
3.1.3. Versuchsgruppe	19
<b>3.2. Rattenmodell der akuten Abstoßung</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Herkunft der Versuchstiere</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Tierkennzeichnung</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Tierhaltung</b>	<b>21</b>

<b>3.6. Testsubstanzen</b>	<b>21</b>
3.6.1. Cobalt-III-Protoporphyrin IX	21
3.6.2. Zink-II-Protoporphyrin	21
<b>3.7. Operationsmethode</b>	<b>22</b>
3.7.1. Operationsvorbereitung und Anästhesie	22
3.7.2. Orthotope Nierentransplantation in der Ratte	22
3.7.2.1. Spendernephrektomie	22
3.7.2.2. Nephrektomie des Empfängertieres	23
3.7.2.3. End zu End Anastomisierung der Nierenarterie	24
3.7.2.4. End zu End Anastomisierung der Nierenvene	25
3.7.2.5. End zu End Anastomose des Ureters	26
<b>3.8. Instrumente und Materialien</b>	<b>27</b>
3.8.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
3.8.2. Chirurgisches Instrumentarium	27
3.8.3. Mikrochirurgisches Instrumentarium	27
3.8.4. Nahtmaterial	27
3.8.5. Konservierungslösung	28
3.8.6. Medikamente	28
<b>3.9. Datenerhebung</b>	<b>28</b>
3.9.1. Beobachtungszeitraum	28
3.9.2. Beobachtungsende	28
<b>3.10. Immunhistochemische Untersuchung</b>	<b>29</b>
3.10.1. Durchführung	29
3.10.2. Antikörperauswahl	29
3.10.3. Quantifizierung der immunhistochemischen Präparate	29
<b>3.11. Flowzytometrische Auswertung (FACS)</b>	<b>30</b>
3.11.1. Methode	30
3.11.2. Durchführung	30
3.11.3 Antikörperauswahl	31
<b>3.12. Enzym-linked-Immunospot (Elispot)</b>	<b>31</b>
3.12.1. Methode	31
3.12.2. Durchführung	32
<b>3.13. Statistische Auswertung</b>	<b>32</b>

<b>4. <u>Ergebnisse</u></b>	<b>33</b>
<b>4.1. Immunhistologische Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Durchflusszytometrische Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.2.1. DA-spenderspezifische OX62+ Dendritische Zellen	39
4.2.2. OX62+ Dendritische Zellen des Empfängers (Lewis)	41
4.2.3. CD4+TCR+ (T-Zell-Rezeptor) Lymphozyten in der FACS-Analyse für Niere, Blut, Lymphknoten und Milz	45
<b>4.3. Ergebnisse des Enzym-linked Immunospot (Eli-Spot)</b>	<b>47</b>
<b>5. <u>Diskussion</u></b>	<b>49</b>
<b>6. <u>Zusammenfassung</u></b>	<b>61</b>
<b>7. <u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>63</b>
<b>8. <u>Glossar</u></b>	<b>72</b>
<b>9. <u>Danksagung</u></b>	<b>73</b>
<b>10. <u>Curriculum vitae</u></b>	<b>74</b>
<b>11. <u>Eidesstattliche Erklärung</u></b>	<b>77</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Historische Entwicklung der Nierentransplantation**

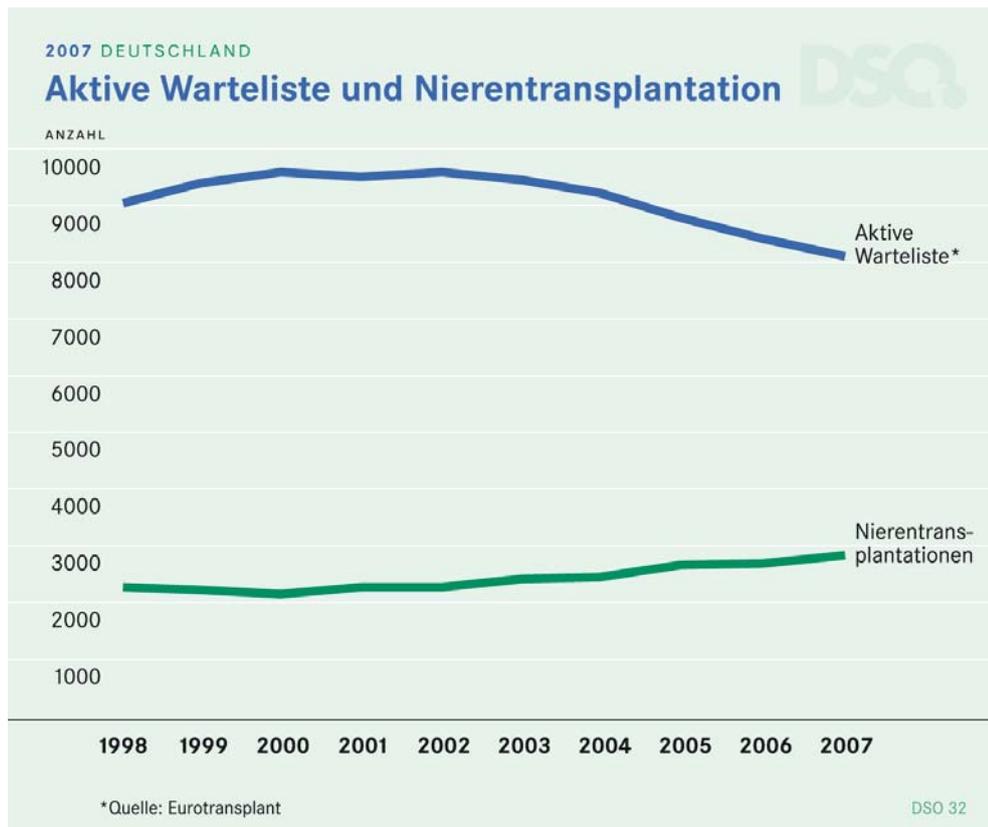
Die Nierentransplantation, die auf eine über 50-jährige Geschichte zurückblicken kann, stellt heute ein sicheres und standardisiertes Verfahren der Behandlung terminal niereninsuffizienter Patienten dar. Obwohl bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts sporadisch Transplantationen der Niere durchgeführt wurden, kann von geplanten Transplantationsprogrammen erst ab dem Ende der 40-iger Jahre des letzten Jahrhunderts die Rede sein (1).

In diesen Jahren begannen intensivere Studien verschiedener terminaler Nierenerkrankungen (z.B. Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Zystennieren), welche zum Einsatz der ersten „artificialen Niere“ führten, die ab 1949 bei akutem und chronischem Nierenversagen eingesetzt werden konnte.

Schon zuvor erkannte man im Rahmen von Hauttransplantationen, eine bessere Heilungstendenz bei Verpflanzungen der Haut homozygoter Zwillinge. Gleichzeitig entwickelten sich chirurgische Fähig- und Möglichkeiten weiter, so dass sich die erfolgreiche Organtransplantation der Niere auf die Zusammenführung dieser drei separaten Pfade zurückführen lässt: der intensiven Erforschung renaler Erkrankungen, der Hautverpflanzung innerhalb von Zwillingen und der wachsenden chirurgischen Möglichkeiten. Dies alles führte zu der ersten erfolgreichen Lebendspendentransplantation bei eineiigen Zwillingen, welche von Dr. Joseph Murray 1954 in Boston durchgeführt wurde (2). Durch weiterführende intensive klinische Forschungen und Grundlagenuntersuchungen konnten, nachdem 1959 von Schwarz und Dameshek erstmals über die immunsuppressive Wirkung von 6-Mercaptopurine berichtet worden war (3), im Jahr 1961 die ersten Organe nicht verwandter Leichenspender transplantiert werden. Trotzdem die ersten Transplantationen aufgrund der toxischen Nebenwirkungen des Immunsuppressivums Azathioprin letal verliefen, stieg bis 1965 die 1-Jahres-Überlebensrate verwandter Spender auf ca. 80% und die nichtverwandter Kadaverspender auf ca. 65% an. Mit der Einführung von Cyclosporinen konnten in den folgenden Jahren diese Resultate weiter verbessert werden. Durch die Einführung zahlreicher neuer immunsuppressiver Medikamente, vor allem in den 90-iger Jahren, wie z.B. Tacrolimus, IL-2-Rezeptorantagonisten oder Sirolimus sowie durch die verbesserte ambulante Versorgung transplantierte Patienten verlängerte sich die Transplantationsüberlebenszeit zunehmend (4).

Ein wesentliches Problem der Transplantationsmedizin ist aber nach wie vor das ungleiche Verhältnis zwischen der hohen Anzahl der wartenden potentiellen Empfänger und der wenigen zur Verfügung stehenden Organspender. Die Zahl der Nierentransplantationen in Deutschland liegt bei ca. 2300 Nierentransplantationen/Jahr (2007), die Zahl der Patienten auf der Warteliste beträgt ca. 8100 im Jahr 2007.

Abbildung 1



**Abbildung 1:** Warteliste und Nierentransplantationen 1998-2007. Die Zahl der Patienten/innen in Deutschland, die auf eine neue Niere warten, übersteigt die Zahl der jährlich durchgeführten Transplantationen deutlich. (Quelle: [www.dso.de](http://www.dso.de))

Es wird auf unterschiedlichen Wegen versucht, diesem Missverhältnis zu begegnen. Zum einem strebt man eine Erhöhung der postmortalen Organspende durch Verwendung der Organe „marginaler Spender“ an (5), zum anderem soll auch die Zahl der Lebendspenden durch Erweiterung der Spenderkriterien (Alter, Vorerkrankung) angehoben werden. Auch die so genannte „Cross-Over“-Transplantation, wie sie in einigen Ländern praktiziert wird (z.B. Niederlande), in Deutschland aufgrund des Transplantationsgesetzes jedoch nicht zulässig ist, wird zunehmend diskutiert (6).

Ein weiterer Schritt zur Kompensation der steigenden Patientenzahl auf der Warteliste ist eine Verbesserung des Transplantatüberlebens. Von allen der beispielsweise in der Bundesrepublik im Jahr 2001 in die chronische Nierenersatztherapie aufgenommenen Patienten hatten 5,5 % ein vorausgegangenes Transplantatversagen (7).

Obwohl die 1-Jahresüberlebensraten wesentlich angestiegen sind, sind die Langzeitergebnisse weiterhin unbefriedigend (8).

Wichtige Ursachen dafür sind chronische Abstoßung durch chronische Transplantatnephropathie und Tod des Empfängers bei funktionierendem Organ.

Bei der Analyse des USRDS (United States Renal Data System)-Reports von 2002 ergaben sich folgende Faktoren, die das Risiko des Transplantatsversagen bzw. des Todes bestimmen (9):

- Art des Spenderorgans (Lebend- vs. Leichenspende)
- das Alter und Geschlecht von Empfänger und Spender
- Dauer der zuvor durchgeführten Dialyse
- das HLA- Mismatch
- die Ischämiezeit bzw. der Ischämie/Reperfusionsschaden
- der Bildungsstatus und Arbeitsverhältnisse
- Begleiterkrankungen (Diabetes mellitus, Hypertonus)

Wichtige, in diesem Report nicht berücksichtigte Faktoren des Empfängertodes sind auch postoperative CMV-Infektionen und Ausbildung maligner Tumoren während der Immunsuppression.

Es handelt sich bei der chronischen Abstoßung demzufolge um ein nach Monaten bis Jahren auftretendes multifaktorielles destruierendes Geschehen, welches derzeit keiner etablierten Therapie zugänglich ist.

## **1.2. Abstoßungsreaktionen**

Neben der chronischen Abstoßung können noch drei weitere Entitäten der Abstoßungsreaktion beschrieben werden:

### 1.2.1. Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb weniger Minuten oder Stunden auf. Sie beruht auf präformierten Antikörpern, die durch eine vorangegangene Sensibilisierung (Schwangerschaft, Transfusion) induziert werden können. Hierbei handelt es sich vor allem um Antikörper gegen HLA-Merkmale und Isoagglutinine bei inkompatiblen Hauptblutgruppen. Meist binden diese an das Endothel, so dass über eine Komplementaktivierung zytotoxische Reaktionen mit Zellnekrosen induziert werden. Durch Aktivierung des Gerinnungssystems werden gleichzeitig Mikrothromben gebildet, welche die Kapillaren verschließen und so eine ischämische Nekrose nach sich ziehen. Die zuverige Kreuzung der zirkulierenden Antikörper des Empfängers mit Donorlymphozyten schließt in der Regel jedoch eine hyperakute Reaktion aus.

### 1.2.2. Akzelerierte Abstoßung

In diesem Fall handelt es sich um eine Reaktion, welche vor allem nach Retransplantation bzw. zuveriger Präsensibilisierung vorkommt. Sie beruht ebenfalls auf präformierten Antikörpern bzw. präsensibilisierten zytotoxischen T-Lymphozyten. Meist tritt sie innerhalb einiger Tage auf.

### 1.2.3. Akute Abstoßung

Sie tritt gewöhnlich ca. eine Woche nach der Transplantation auf und umfasst humorale und zelluläre Mechanismen. Die zelluläre Abstoßung wird in der Regel durch CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T- Zellen vermittelt, was die Entstehung eines lymphoplasmazellulären und mononukleären Infiltrats sowie eines Ödems nach sich zieht. Die humorale antikörperabhängige Reaktion erfolgt in Form einer Vaskulitis nach Ablagerung von Antikörpern in der Gefäßwand und führt zu einer Aktivierung des Komplement- sowie des Gerinnungssystems. In verschiedenen Veröffentlichungen wird die Inzidenz dieser Reaktion auf 0-9% bis zu 30-35% aller akuten Abstoßungsereignisse geschätzt (10). Als Risikofaktoren gelten neben vorangegangener Transplantation auch weibliches Geschlecht, Schwangerschaft, ein positives cross-match in der Krankheitsgeschichte und hohe Panel-reaktive Antikörpertiter.

#### 1.2.4. Chronische Abstoßung

Die chronische Transplantatnephropathie entwickelt sich langsam progredient und geht sowohl mit morphologischen Veränderungen wie auch mit funktioneller Organverschlechterung einher. Durch chronische Entzündung kommt es zu einer Stimulation von Gefäßendothelien und der glatten Muskelzellen der Gefäßwand, wodurch sich Intimafibrose und -hyalinose (107), die typischen morphologischen Veränderungen, entwickeln. Dieser Umbau führt nachfolgend zu einer Stenosierung des Gefäßlumens. Es kommt zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate sowie des renalen Plasmaflusses mit einem Anstieg der Nierenretentionswerte sowie zunehmender Proteinurie (106). Diese Veränderungen führen zu einer Atrophie und einem Funktionsverlust des Organs.

### 1.3. Banff-Schema zur Einteilung der akuten Abstoßung

Mit Hilfe des Banff-Schemas ist es möglich, histopathologisch reproduzierbare Ergebnisse bei Nadelbiopsien der Niere zu gewinnen, zwischen zell- bzw. antikörperabhängiger (humoraler) Abstoßung zu unterscheiden, und eine Therapie einzuleiten. Die Einteilung der zellulären akuten Abstoßung erfolgt hierbei in drei Kategorien bzw. Schweregrade der lymphozytären Inflammation. Typ I - eine tubulointerstitielle Abstoßung ohne Arteritis, Typ II - eine vaskuläre Abstoßung mit Beteiligung der Intima und Typ III – eine schwere Abstoßung mit transmuraler Beteiligung der Gefäße. Wichtig ist das Erkennen ungewöhnlich infiltrierender Zellen (z.B. Eosinophile, Plasmazellen), da diese auf eine mögliche Therapierefraktion hinweisend sein könnten.

Für die humorale akute Abstoßungsreaktion wurden ebenfalls drei Gruppen definiert: 1. die frühe tubuläre Abstoßung, sowie 2. Kapillaritis/Glomerulitis und 3. Arteritis. Zur genauen Bestimmung dieser Reaktion zählt desweiteren die immunhistologische Anfärbung und der positive Nachweis des Komplementfaktors C4d und/oder Immunglobulin (11).

### 1.4. Molekulare Auswirkung der akuten Abstoßung auf das Nephron

Die Auswirkung der akuten Abstoßung der Niere auf dem morphologisch/histologischen Level wurde mehrfach beschrieben und ist in der Banff Klassifikation zusammengefasst. Die spezifischen Veränderungen auf dem tubulären bzw. zellulären Level sind jedoch noch relativ unbekannt und erst seit neuerer Zeit Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Es ist bekannt, dass nierentransplantierte Patienten oft einen unbalanzierten Elektrolyt- und

Wasserhaushalt entwickeln, welcher mit endokrinen Veränderungen einhergeht (12). Beispielsweise kommt es zur Aktivierung der Glukose- und Natrium-Reabsorption sowie zur Zunahme der Kalium-Sekretion (47).

So konnte nach einseitiger Nierentransplantation und der folgenden Entwicklung einer akuten Abstoßung eine Reduktion der Expression und Funktion des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -3-Transporters (NHE-3) und eine vermehrte Ausbildung des  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  Cotransporters (NBC-1) des proximalen Tubulus nachgewiesen werden. Andere Transporter,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -1-Transporter,  $\text{Na}^+$ - Glukose-2-Transporter,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Hormonrezeptoren (Angiotensin II Rezeptor, Natriuretisches Peptid-Rezeptor) blieben unbeeinflusst (48). Eine Veränderung im RAS-System (Renin-Angiotensin-System) trat nicht auf, und divergiert daher mit Ergebnissen, welche in Ischämie/Reperfusionen-Modellen gewonnen werden konnten (49). Der Unterschied zwischen diesen beiden Modellen lässt darauf schließen, dass es sich im Rahmen der akuten Abstoßung um spezifische Veränderungen der Transporter zum Schutz des Nephrons handelt, welche nicht durch eine generelle Gewebszerstörung entstanden sind.

Innerhalb des gleichen Transplantationsmodells wurde ebenfalls gezeigt, dass es im Rahmen dieser Abstoßungsreaktion zu einer Senkung der Expression und Funktion des epithelialen Natriumkanals des Sammelrohrs kommt. Auch eine Reduktion des vasopressinabhängigen Wasserkanals (AQP2) ließ sich nachweisen. All diese Veränderungen traten nicht auf, wenn Cyclosporin zur Immunsuppression eingesetzt wurde. Unbeeinflusst blieben die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowie die sekretorischen Kaliumkanäle des distalen Tubulus. Die Autoren vermuten auch in diesem Fall, dass es zu diesen Veränderungen kommt, um den Energieverbrauch des distalen Nephrons zu senken und so die Niere nach der Transplantation zu schützen. Die Tatsache, dass die Expression und Funktion eines weiteren energieverbrauchenden Kanals, dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Transporter des aufsteigenden Teils der Henlenschen Schleife, unbeeinflusst bleibt, verhindert eine weitere Senkung der Konzentrationsfähigkeit der Niere (13). Um diese Mechanismen allerdings komplett zu verstehen, sind weitere Untersuchungen nötig.

### **1.5. Einfluss akuter Abstoßungsreaktionen auf das Langzeitüberleben des Transplantates**

In dem USRDS – Report von 2002 ist ein wesentlicher Faktor zum Transplantatüberleben nicht erwähnt worden. Seit einiger Zeit ist der Einfluss der akuten Abstoßung als Hauptrisikofaktor der Entstehung chronischer Abstoßungsreaktionen bekannt und wurde in mehreren klinischen Studien beschrieben. In verschiedenen Studien konnten Ausprägung,

Anzahl, Art und Zeitpunkt der akuten Abstoßung als beteiligte Faktoren evaluiert werden. So konnte in einer klinischen Studie bei Kindertransplantationen der Niere gezeigt werden, dass Kinder ohne akutes Abstoßungsereignis nach 5 Jahren keine Anzeichen einer chronischen Abstoßung aufwiesen und 100% der transplantierten Organe überlebten, wohingegen Kinder mit einem bzw. mehreren akuten Abstoßungsereignissen signifikant schlechtere Ergebnisse aufwiesen und die Rate des Transplantatüberlebens nach 5 Jahren auf 90% abfiel (14).

Wenn man bei der Auswertung, der 1- bzw. 2-Jahres Transplantatüberlebenszeit die histopathologischen Kriterien des Banff-Schemas berücksichtigt, so kommt man zu dem Ergebnis, dass die 1- bzw. 2-Jahres Transplantatüberlebenszeit bei 50% bzw. 23% bei Patienten mit schwerer vaskulärer Infiltration (Banff III) und bei 87% bzw. 80% bei Patienten mit nur leichter tubulointerstitieller Infiltration liegt (15, 16). Die Ergebnisse der Kontrollgruppen, welche keine Form der akuten Abstoßung zeigten, sind denen der Patienten mit Reaktion nach Banff I sehr ähnlich. Nach van Saase et al. liegt das Risiko der Entwicklung einer chronischen Abstoßung nach vaskulärer akuter Abstoßung bei 8,8%, nach interstitieller Infiltration jedoch bei nur 2% (16). Diese Ergebnisse implizieren, dass interstitielle Typ I Reaktionen keinen Einfluss auf die klinischen Endpunkte haben. Zu erwähnen ist, dass in den meisten Studien Nierenbiopsien erst durchgeführt wurden, nachdem ein Anstieg des Serumkreatinins zu verzeichnen war. In Untersuchungen von Rush et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass in Routinebiopsien bei Patienten mit stabilem Serumkreatinin, 30% eine „subklinische“ Reaktion nach Banff I aufwiesen (17). Eine Kortikosteroidbehandlung dieser subklinischen Reaktion resultierte u.a. in einer verbesserten Transplantatfunktion nach 2 Jahren und einem verbesserten 4-Jahres Transplantatüberleben, so dass zu vermuten ist, dass selbst leichteste Formen der akuten Abstoßung zu einer chronischen Abstoßungsreaktion führen können (17).

Der Einfluss der Frequenz akuter Abstoßungsperioden auf das chronische Abstossungsgeschehen wurde retrospektiv schon in den 80-iger Jahren beschrieben und konnte anhand eines Rattenmodells prospektiv nachgewiesen werden (18, 19). In diesen Versuchen konnte drei Monate posttransplantativ eine starke Korrelation zwischen der Frequenz der akuten Abstoßung und dem Auftreten chronischer Abstoßung, welche sich durch ein erhöhtes Level des Serumkreatinins und der Verschlechterung der histologischen Hauptkriterien (Intimaverdickung, Zunahme der glomerulären mesangialen Matrix) auszeichnete, gezeigt werden.

Auf der anderen Seite konnte durch die eigene Arbeitsgruppe experimentell gezeigt werden, dass eine syngene Rücktransplantation zu kompletter Reversibilität der akuten Abstoßungsperiode führt und somit die chronische Transplantatfunktion uneingeschränkt bleibt (20).

Trotz bisher ungeklärter Mechanismen, scheint der zeitliche Zusammenhang des Auftretens der ersten akuten Abstoßungsperiode und dem Auftreten der chronischen Abstoßungssituation für gesichert. So konnte in mehreren retrospektiven klinischen Studien gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Bildung einer chronischen Abstoßung geringer ist, sollte die erste akute Abstoßungsperiode frühzeitig, d.h. innerhalb der ersten 60 Tage nach Transplantation, auftreten. Eine späte akute Abstoßung (nach 60 Tagen) ist mit einem schlechteren Transplantatüberleben assoziiert (21). Es ist zu vermuten, dass die pathophysiologischen Mechanismen der späten akuten Abstoßung sich von denen der frühen unterscheiden und einflussreicher bei der Bildung der chronischen Abstoßung sind. Weiterhin kann auch angenommen werden, dass die späte akute Abstoßung ein Marker für eine nicht erkannte Non-Compliance der Patienten bezüglich der Einnahme immunsuppressiver Medikamente ist.

## **1.6. Antigenpräsentation**

Eine weitere Erklärung des unterschiedlichen Einflusses der frühen bzw. späteren akuten Abstoßungsreaktion und daher der vulnerablen Phase bietet sich bei der Betrachtung der Antigenpräsentation der dendritischen Zellen (DZ). Dendritische Zellen sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen, welche die T-Zell-Antwort innerhalb der akuten Abstoßungsreaktion initiieren. Sie stimulieren effizient CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf verschiedenen Wegen. Nach vorangegangener Transplantation migrieren DZs des Spenders in die sekundären Lymphorgane des Empfängers, präsentieren dort allogene MHC-Moleküle an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des Empfängers und führen zur Lyse des Gewebes. Dieser Mechanismus wird als direkte Alloerkennung bezeichnet und wird durch die große Anzahl der T-Zellen, welche allogene MHC-Moleküle erkennen (1 von 200), ermöglicht (22). Die hohe Frequenz der alloreaktiven T-Zellen spiegelt die Rolle des T-Zell-Rezeptors wieder, MHC-Moleküle unabhängig von ihrer Herkunft zu erkennen. Alternativ zu diesem Weg, wandern dendritische Zellen des Empfängers in transplantiertes Gewebe ein und prozessieren polymorphe Fragmente der Spender MHC innerhalb der eigenen MHC-Moleküle. Unter den vom Spender abstammenden prozessierten Peptiden befinden sich unter anderem Peptide des fremden

MHC-Komplexes aber auch solche von minor histokompatiblen Antigenen. Diese Präsentation führt zur Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und wird als indirekter Weg der Alloerkennung bezeichnet.

Die Anzahl der T-Zellen, welche Allopeptide über den indirekten Weg erkennen ist, verglichen mit denen, welche über den direkten Weg aktiviert werden, sehr gering (<1 von 100.000). Obwohl beide Wege an der frühen Phase der akuten Abstoßung beteiligt sein können, ist der direkte Weg der Alloerkennung der initiale und nimmt im Laufe der Zeit nach der Transplantation ab, wohingegen die Alloerkennung via indirektem Weg sich auf einem konstanten Level befindet und auch an der chronischen Abstoßungsreaktion partizipiert (23, 24). Jedoch scheinen T-Zellen innerhalb der frühen akuten Abstoßung durch andere prozessierte Fremdmoleküle der Spender-MHC aktiviert zu werden als bei der späteren akuten Abstoßungsreaktion (25). Dieses Phänomen, der zeitlichen Entwicklung des indirekten Weges der Alloerkennung könnte eine Erklärung für den zeitlichen Zusammenhang des Auftretens der ersten akuten Abstoßungsperiode und dem Auftreten der chronischen Abstoßungssituation sein.

### **1.7. Postoperative Immunsuppression**

Um die akute Abstoßungsreaktion zu verhindern und somit auch die Langzeitfunktion des Transplantates zu verbessern, ist ein gutes immunsuppressives Therapieregime notwendig.

Zur immunsuppressiven Therapie steht heute eine Vielzahl von Medikamenten zur Verfügung, die sich in ihren Wirkprofilen unterscheiden. Die Protokolle der klinischen Therapie sind komplex und unterliegen einem ständigen Wandel. Zusätzlich zu den seit den 90-iger Jahren gängigen Medikamenten wie Cyclosporin A, Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Sirolimus, Azathioprin und Kortison, werden immer weitere Medikamente entwickelt und in der klinischen Therapie eingesetzt. Dazu zählen z.B. monoklonale Antikörper, welche gegen unterschiedlichste Oberflächenproteine der T-Zellen gerichtet sind. Beispiele dafür sind unter anderem OKT3, ein Anti-CD3-Antikörper und Daklizumab, gerichtet gegen Interleukin-2-Rezeptoren. Ein weiteres Medikament, welches aktuellen klinischen Studien unterliegt ist FTY 720. Dabei handelt es sich, um einen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Agonisten, welcher die Migration der Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen verhindert, da die Sensibilität gegenüber Homing-Chemokinen erhöht ist. Durch diesen neuartigen Wirkmechanismus bleibt in Tierexperimenten die Immunität gegenüber systemischen viralen Infekten unbeeinträchtigt (59).

## **2. Stand der Forschung und Hypothese**

### **2.1. Spendervorbehandlung**

Neben der posttransplantativen Immunsuppression ist die Spendervorbehandlung, welche bisher nur vereinzelt durchgeführt wird, eine weitere Therapieoption. Schon Mitte der 70-iger Jahre wurden zytotoxische Medikamente zur Spendervorbehandlung im Rahmen einer Nierentransplantation am Menschen erfolgreich angewandt. Es wurde postuliert, dass hauptsächlich die Elimination der Spenderleukozyten nach Spendervorbehandlung zu einem verlängerten Transplantatüberleben führt (26). Diese Hypothese wurde vielfach bestätigt. So konnten Soos et al. 1978 ein verlängertes Überleben nach Herztransplantation in Ratten beobachten, nachdem die Spender mit verschiedenen Medikamenten (z.B. Cyclophosphamid, Busulfan, Methotrexat) vorbehandelt worden waren (27).

Auch die Vorbehandlung von Spenderratten vor Nierentransplantation mit Prednisolon oder FK506 führte zu einer verbesserten Transplantatfunktion nach 6 Monaten. Dies ging mit einer reduzierten Anzahl infiltrierender Zellen (ED1+, CD4+) einher (5).

In verschiedenen retrospektiven Studien konnte belegt werden, dass akute Abstoßungsepisoden reduziert waren, wenn der Spender Katecholamine zur Aufrechterhaltung des Kreislaufes erhalten hatte. Unter den verabreichten Katecholaminen konnte nur Dopamin die Inzidenz akuter Abstoßung vermindern, was sich auch in später durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen bestätigte (28). Als eine mögliche Erklärung für das verbesserte Langzeitüberleben, wurde die antioxidative Wirkung von Katecholaminen beschrieben (29).

Desweiteren ist bekannt, dass Dopamin zu einer erhöhten Expression des protektiven Enzyms Hämoxigenase-1 führt (30). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Spendervorbehandlung mit Cobaltprotoporphyrin zu einer Induktion der HO-1 und in der Folge zu einem verlängerten Transplantatüberleben und zu einer verbesserten Funktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen führt (31).

### **2.2. Ischämie/Reperfusionsschaden**

Im Rahmen der Transplantation kommt es zu einem Ischämie/Reperfusionsschaden.

Dieser entsteht im Verlauf des ischämischen Zustandes des Gewebes und der vermehrten Anhäufung von Laktat durch anaerobe Glykolyse sowie der gesteigerten Freisetzung reaktiver

Sauerstoffradikale während der ischämischen Phase und der Reperfusion des Gewebes. Die antioxidativen Mechanismen werden überfordert und führen zum apoptotischen Zelltod. Desweiteren kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine mit nachfolgender Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten (32, 33).

Durch eine Spendervorbehandlung ist es möglich diesen Schaden zu verringern und die Funktion sowie das Überleben des Transplantates zu verbessern.

### **2.3. Hämoxigenasesystem**

In verschiedenen Experimenten konnten wir und andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Induktion der Hämoxigenase eine Verbesserung der Transplantatfunktion zur Folge hat. Physiologisch katalysiert das Hämoxigenasesystem den oxidativen Abbau des Hämmoleküls in seine biologisch aktiven Metabolite- Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO) und schützt so die Zelle vor den schädlichen Effekten des Hämmoleküls, wie z.B. die Lipidperoxidation und die Formation freier Sauerstoffradikale. Das Hämoxigenaseenzymssystem umfasst drei Isoenzyme. Die stressinduzierbare HO-1 (HSP32), die kontinuierlich gebildete HO-2, sowie die bisher in Ihrer Funktion wenig bekannte HO-3. Die spezifische Aktivität der HO unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Organe des Körpers. Die größte Aktivität konnte in Milz, Hoden und Gehirn nachgewiesen werden. Die Milz, ist das einzige Organ, in dem unter normalen physiologischen Bedingungen die HO-1 das dominante Isoenzym ist. In allen anderen Organen konnte die HO-2 als dominierendes Isoenzym evaluiert werden (34, 35).

Die HO-1 ist durch eine Vielzahl von Stimuli (Ischämie, Hypoxie, Strahlung usw.) induzierbar, dies liegt an der großen Zahl der bindenden Elemente des Genpromotors und an der Möglichkeit der vielfältigen Interaktion mit Komponenten verschiedener Zell-Signal-Kaskaden.

Es ist bekannt, dass die HO-1 sowie die Endprodukte des Hämabbaus antiinflammatorische, antiapoptische und antioxidative Funktionen ausüben und auch eine Rolle bei Signal gebenden Mechanismen der Zelle sowie bei der Gefäßhomeostase spielen.

Die Funktionen der biologisch aktiven Endprodukte sind ebenfalls vielfach beschrieben worden. Das prooxidative Eisen, ein bekannter Genregulator, ist beispielsweise an der Regulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) beteiligt und inhibiert diese. Die iNOS generiert Stickstoffmonoxid (NO), ein freies Radikal, welches zur

Gewebszerstörung führt. Es konnte gezeigt werden, dass die iNOS im Rahmen einer akuten Abstoßungsreaktion überexprimiert wird, die Rolle des NO-Systems in der Pathophysiologie der Transplantation bleibt aber kontrovers und ist noch nicht genau geklärt (46).

Auch auf die Modulation der Ferritinsynthese hat freies Eisen einen Einfluss und ist daher in seiner oxidativ-schädigenden Wirkung selbstlimitierend (34, 35).

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist, ähnlich wie NO, ein Signalmolekül für die Generation von cGMP (cyklisches 3':5'-Guanosine Monophosphat). Dieser Mechanismus der Aktivierung der cGMP Kaskade spielt vor allem im kardiovaskulären System eine wichtige Rolle. Hier kommt es zu einer vasodilatativen Wirkung und zur Verhinderung der Plättchenaggregation mit möglicher Entstehung von Mikrothromben (36, 37). CO ist aber auch an der Modulation des Zellzyklus beteiligt und übt über den p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase- Weg einen antiapoptotischen Effekt auf Endothelzellen aus (38).

Bilirubin, welches bei der Reduktion von Biliverdin entsteht, ist eine stark wirkendes Antioxidanz. Biliverdin selbst ist ebenfalls biologisch aktiv und unterbindet z.B. die virale Replikation von Herpes- bzw. HI-Viren in vitro.

Diese Funktionen müssen jedoch in ihrem jeweiligen Kontext interpretiert werden. Eine Hyperbilirubinämie kann z.B. durch Reduktion der natürlichen Killerzellen und der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität zu einer Zunahme der Mortalität infolge einer Sepsis führen (39). Des Weiteren ist eine Erhöhung der Apoptose in neuronalen Zellen beschrieben worden, welche mit einer Erhöhung des Bilirubins assoziiert war (40). Auf der anderen Seite ist die antiapoptotische Wirkung der HO-1 seit längerer Zeit bekannt.

Die Rolle des HO-Systems ist daher von dem jeweilig herrschenden zellulären Milieu abhängig.

Das Hämmolekül, das Substrat der HO, entspricht chemisch dem Aufbau eines Metallo-Protoporphyrins, Eisen-Protoporphyrin IX. Verschiedene andere Metalle, z.B. Zink und Cobalt sind ebenfalls in der Lage eine Bindung mit einem Porphyrinring einzugehen (41). Somit konkurrieren diese Metalloporphyrine mit Häm und sind in der Lage die HO-1 zu inhibieren, da sie nicht, wie Häm, in die einzelnen Endprodukte abgebaut werden können. Auf der anderen Seite können Häm und andere Metalloporphyrine eine HO-1-Expression induzieren (42, 43).

Cobalt(III)-Protoporphyrin IX wird oft, wie auch in unseren Versuchen, als Aktivator der HO-1-Synthese verwendet, da die induzierenden Effekte den inhibitorischen Effekten überlegen sind. Im Gegensatz dazu, ist Zink(II)-Protoporphyrin, welches in unseren Versuchen

eingesetzt wurde, nur ein schwacher Aktivator der HO-1. Hier überwiegen die hemmenden Effekte, weshalb es auch zur HO-1 Inhibition eingesetzt wird (44).

Viele Untersuchungen ließen bisher vermuten, dass die antiapoptotischen Wirkungen der HO-1 unter anderem über einen Caspase-3 bzw. -8 Zellsignalweg übermittelt wird (45). Andererseits zeigen neuere Ergebnisse, dass die Metalloporphyrine ebenfalls diesen Weg der Signalvermittlung nutzen und eventuell zeitabhängig direkt die Caspase -3/-8, unabhängig von der HO-1-Aktivität, blockieren (44). Ob die indirekte Wirkung über die HO-1 oder aber die direkte Wirkung der Metalloporphyrine überwiegt wird in weiteren Untersuchungen genauer zu klären sein.

## **2.4. Hypothese und Fragestellung**

Basierend auf dem Wissen über die Hämoxigenase-1, den antiapoptotischen, antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekten, konnten wir in früheren Versuchen eine Verbesserung der Langzeitfunktion und des Transplantatüberlebens der Niere im Rahmen einer chronischen Abstoßung im Rattenmodell nach einmaliger CoPP-Spendervorbehandlung nachweisen.

In diesen Versuchen war es unser Ziel, die genaueren Mechanismen der Hämoxigenase-1 in der akuten Abstoßungsreaktion nach Induktion durch CoPP durch einmalige Spendervorbehandlung nachzuvollziehen. Als Hypothese für diese Experimente nahmen wir an, dass die Überexpression der HO-1 mit einer verminderten Transplantatimmunogenität assoziiert ist.

Augenmerk sollte daher auf folgende Fragestellungen gelegt werden:

1. Hat die Spendervorbehandlung zur Induktion der HO-1 einen Einfluss auf die Reifung und Migration der dendritischen Zellen des Spenders?
2. Führt eine Vorbehandlung mit ZnPP zur Inhibition der HO-1 zu einer erhöhten Transplantatimmunogenität?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Versuchsaufbau**

##### 3.1.1. Versuch

Die Nierentransplantationen wurden in einem Rattentransplantationsmodell durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden nach standardisierter mikrochirurgischer Technik operiert. Die Tiere wurden zufällig den Gruppen der einzelnen Versuche zugeordnet.

##### 3.1.2. Kontrollgruppen

In der Kontrollgruppe A blieben die Spendertiere vor der orthotopen linksseitigen Nierentransplantation unbehandelt. Nach Explantation der Spenderniere wurde diese für sechs Stunden einer kalten Ischämie bei +4°C ausgesetzt. Es wurden zwei Untersuchungszeitpunkte, erster bzw. dritter Tag nach Nierentransplantation, festgelegt. Am Tag 1 bzw. 3 wurde das Transplantat, sowie Blut, Milz und Lymphknoten entnommen und im Anschluss immunhistologische, durchflusszytometrische sowie ELISPOT Untersuchungen durchgeführt. Die Gruppen bestanden jeweils aus fünf Tieren.

In einer Negativkontrollgruppe B (n = 5) wurde der Einfluss einer ZnPP (Zink II - Protoporphyrin) – Vorbehandlung der Spendertiere auf die akute Abstoßung untersucht. Die Spendertiere erhielten eine einmalige ZnPP, einem HO-1 Inhibitor, (20mg/kg)-Therapie durch intraabdominelle/ intraperitoneale Injektion (in Kurznarkose) 24 Stunden vor Organentnahme. Der weitere Versuchsablauf entspricht der der Kontrollgruppe A.

##### 3.1.3. Versuchsgruppe

In der Versuchsgruppe wurden die Spendertiere 24 Stunden vor orthotoper Nierentransplantation mit Cobalt-III-Protoporphyrin IX (CoPP) (5mg/kg), durch intraabdominelle Injektion vorbehandelt (in Kurznarkose).

Die Versuchsgruppe bestand aus jeweils fünf Versuchstieren. Das Transplantat wurde nach Explantation einer kalten Ischämie von 6 Stunden bei +4°C ausgesetzt. Der Beobachtungszeitraum betrug ein bzw. drei Tage. Das Prozedere am Ende der Beobachtungszeiträume entspricht dem der Kontrollgruppen.

Abbildung 2 zeigt auf einer Zeitachse aufgetragen das Prozedere und die Operationen dieser Gruppen.

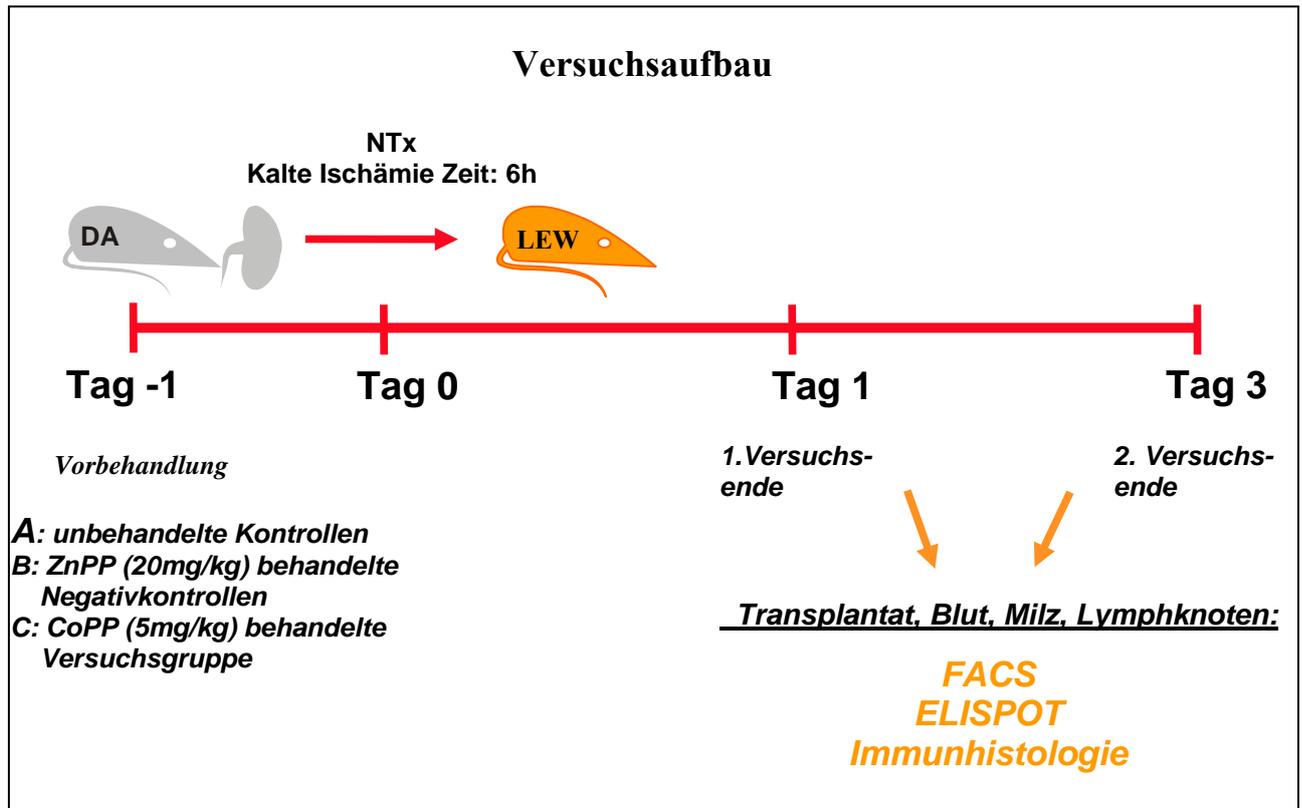


Abbildung 2: Dargestellt sind die Operationen und Prozedere in den Kontroll- und Versuchsgruppen. Nach entsprechender Gruppenzuordnung erfolgt am Tag -1 die jeweilige Spendervorbehandlung. Die Transplantate werden über 6 Stunden einer kalten Ischämie von +4 Grad Celsius ausgesetzt. Am Tag 0 wird die linksseitige orthotope Nierentransplantation durchgeführt. An den Versuchenden (1. bzw. 3. Tag) wird das Transplantat, sowie Blut, Milz und Lymphknoten entnommen und den jeweiligen Untersuchungen zugeführt. NTx = Nierentransplantation, ZnPP = Zinkprotoporphyrin, CoPP = Cobaltprotoporphyrin.

### 3.2. Rattenmodell der akuten Abstoßung

Das Dark Agouti (DA RT<sub>1</sub><sup>av1</sup>) → Lewis (Lew RT<sub>1</sub><sup>1</sup>) Modell ist ein etabliertes Modell starker Histoinkompatibilität für experimentelle Untersuchungen der akuten Abstoßungsreaktion. In der Kombination DA als Spender und Lewis als Empfänger lassen sich im Nierenmodell reproduzierbare histomorphologische Veränderungen zeigen, die denen der akuten Abstoßungsreaktion in menschlichen Transplantatnieren gleichen.

### 3.3. Herkunft der Versuchstiere

Bei den in diesem Modell verwendeten Tieren handelte es sich bei Spender- und Empfängertieren um männliche Ratten definierter Inzuchtstämme. Die Versuchstiere wurden über die Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland, bezogen. Zum Versuchsbeginn

waren die Tiere mindestens 12 Wochen alt und wogen 200-250 Gramm. Als Spendertiere dienten Ratten des Inzuchtstammes DA ( $RT_1^{av1}$ ), als Empfänger Tiere, diese des Stammes Lewis ( $RT_1^1$ ).

### **3.4. Tierkennzeichnung**

Es wurden 5 Tiere pro Standardkäfig gehalten. Die Tiere wurden mit entsprechenden Ohrmarkierungen versehen, die Käfige wurden zur Identifikation beschriftet.

### **3.5. Tierhaltung**

Die Ratten erhielten eine Spezialdiät in pelletierter Form (Sniff, Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum. Die Unterbringung erfolgte in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Charité, Campus Virchow Klinikum unter Standardbedingungen, natürlichem Tag/Nachtrhythmus und einer Raumtemperatur von  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6. Testsubstanzen**

#### **3.6.1. Cobalt-III-Protoporphyrin IX**

CoPP (Co(III)protoporphyrin IX chloride), wurde über die Firma SIGMA-ALDRICH, Deutschland bezogen und sowohl als Trockensubstanz wie auch als Lösung bei  $4-8^{\circ}\text{C}$  gelagert. CoPP-Lösung wurde wöchentlich in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Endkonzentration von 5mg/kg Körpergewicht hergestellt und den Ratten einmalig, 24 Stunden vor Organentnahme, intraperitoneal appliziert.

#### **3.6.2. Zink-Protoporphyrin**

Zink-II-Protoporphyrin (ZnPP), bezogen über die Firma SIGMA-ALDRICH, Deutschland, wurde sowohl als Trockensubstanz wie auch als Lösung bei  $4-8^{\circ}\text{C}$  gelagert. ZnPP-Lösung wurde wöchentlich in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Endkonzentration von 20 mg/kg Körpergewicht hergestellt und den Ratten einmalig intraperitoneal, 24 Stunden vor Organentnahme, appliziert.

### 3.7. Operationsmethode

#### 3.7.1. Operationsvorbereitung und Anästhesie

Für die perioperative Narkose der Versuchstiere wurde den Ratten das Inhalationsnarkotikum Isofluran, ein Gasgemisch aus 20% Sauerstoff und 80% Lachgas, kontinuierlich über eine kombinierte Mund/Nasenmaske zugeführt. Die Kontamination der Umgebungsluft mit Isofluran wurde durch eine Unterdruck-Absaugvorrichtung verhindert.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem luftdicht verschlossenen Glaszylinder mit Isofluranzuleitung und Abzug. In diesem verblieben die Tiere ca. 1-2 Minuten, so dass eine ausreichende Narkosetiefe zur weiteren OP-Vorbereitung garantiert werden konnte. Auf die Narkoseeinleitung folgten die Rasur des gesamten Abdomens und die Fixation der Ratte sowie das Anbringen der Nasen/Mundmaske. Die Fixation erfolgte in Rückenlage auf einem Korkbrett, welches zuvor mit einem Antiseptikum abgesprüht wurde.

Die Konzentration des Isofluran wurde zu Beginn des Eingriffs am Verdampfer auf 2 Vol. % eingestellt, bei der Implantationsoperation jedoch nach der Initialphase auf 1,5 Vol. % reduziert, um bei der Dauer des Eingriffs von ca. 1 Stunde eine Atemdepression infolge Überdosierung zu vermeiden.

Die Versuchstiere wurden auf diese Weise über den gesamten OP-Zeitraum in gleichmäßiger Narkose gehalten und erwachten nach Ende des Eingriffs und Entfernung der Narkosemaske zügig.

#### 3.7.2. Orthotope Nierentransplantation in der Ratte

Die Nierentransplantation in Ratten ist ein wichtiger Bestandteil der Transplantationsforschung und wurde erstmals von Fisher und Lee beschrieben (50). Verschiedene Operations- und Anästhesiemethoden scheinen keinen Einfluss auf das Outcome, die Transplantatfunktion bzw.- abstoßung auszuüben. Entscheidend sind, wie Schumacher et al. zusammenfassen, Gewicht (200-400g) der Ratten und die Zeit der warmen Ischämie ( $\leq 30$ min.) (51).

In unserem Modell etablierten wir sowohl die End zu End Anastomosen der Gefäße wie auch des Ureters.

### 3.7.2.1. Spendernephrektomie

Das Abdomen wurde in Narkose mit einer Schere durch eine mediane Längslaparatomie von der Blase bis zum Proc. Xiphoideus eröffnet. Das Darmpaket wurde nach links mobilisiert und mit einer feuchten Kompresse bedeckt. Nun wurde das Operationsgebiet, das Retroperitoneum durch das Anbringen von vier Wundhacken optimal dargestellt. Der linke Nierenhilus wurde anfangs stumpf freipräpariert, im Anschluss wurden Vena und Arteria renalis vorsichtig, unter Vermeidung zu starken Kontaktes (Venenperforation, Arterienkonstriktion) mit Mikropinzetten spitz separiert und von Adventitia und Fettgewebe befreit. Eventuell vorhandene Gefäßabgänge der A./V. Suprarenalis wurden mit 6/0 Seide unterbunden und durchtrennt. Die Niere wurde darauf atraumatisch mit der Mikroschere aus ihrem perirenalem Fettgewebe befreit. Der Ureter wurde stumpf mit Wattestäbchen im Fettgewebe aufgesucht, und inklusive der ihn begleitenden Gefäße weit distal abgesetzt.

Im nächsten Schritt wurde zur Perfusion der Niere, die Aorta abdominalis knapp proximal des Nierenarterienabgangs zum Anlegen eines Gefäßclips präpariert. Auch eine Ligatur proximal der Nierenvene wurde locker vorgelegt. Eine 10 ml Spritze mit kalten 0,9% NaCl sowie eine weitere 10 ml Spritze mit kalter UW-Lösung (University of Wisconsin) lagen bereit.

Um die warme Ischämiezeit kurz zu halten und eine zu große Irritation des Transplantates zu vermeiden, mussten die Schritte der Perfusion und Entnahme möglichst schnell aber vorsichtig geschehen.

Es wurde die distale Aorta abdominalis mit einer 0,9 x 25 mm Venenverweilkanüle punktiert, der Gefäßclip oberhalb des Nierenarterienabgangs angebracht und die vorgelegte Venenligatur zugezogen. Um einen Abfluss zu schaffen, wurde die Vena renalis ligaturnah mit der Mikroschere durchtrennt. Die Niere wurde dann über die Venenverweilkanüle mit 10 ml 0,9% NaCl und im Anschluss mit 10 ml UW-Lösung perfundiert. Sofort entfärbte sich das Transplantat. Die Nierenarterie wurde mit einem Scherenschlag durchtrennt und aus dem Situs entfernt. Vorsichtig wurde die Niere vollkommen bedeckt in UW-Lösung für 6 Stunden (kalte Ischämie) bei +4°C gelagert.

Das Spendertier wurde in Narkose durch Einschneiden des Diaphragmas getötet.

### 3.7.2.2. Nephrektomie des Empfängertieres

Das Präparieren der linken Niere und des Nierenhilus entsprach weitestgehend der Spendernephrektomie. Die Nierengefäße wurden in ihrem Verlauf freipräpariert. Proximal wurde jeweils ein Gefäßclip angebracht und die Gefäße mit einem Scherenschlag durchtrennt. Die Gefäßstümpfe wurden mit einer Mikropinzette vorsichtig aufgedehnt und sorgfältig mit

NaCl 0,9% gespült. Der Ureter wurde nach stumpfer Präparation nierennah durchtrennt, die Niere von perirenalem Fettgewebe befreit und aus dem Situs entfernt.

### 3.7.2.3. End zu End Anastomisierung der Nierenarterie

#### Abbildung 3

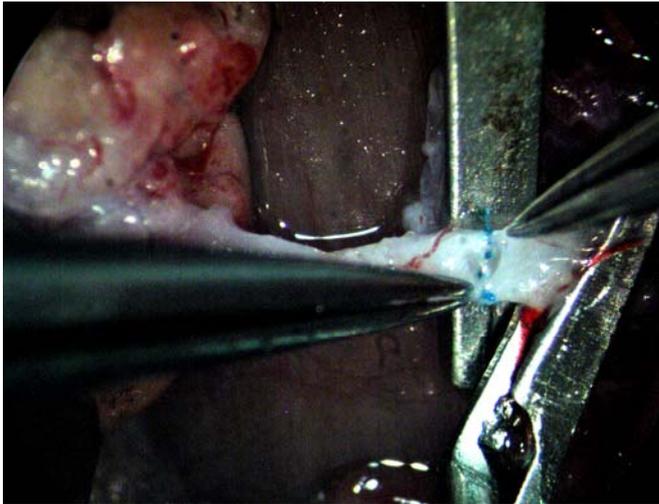


Abb. 3: Dargestellt ist die Anastomisierung der A. renalis. In der abgebildeten Phase sind die beiden Eckhaltefäden gut zu erkennen. Die Arterienvorderwand wurde mit Einzelknopfnähten bereits geknüpft. Im Vordergrund sieht man die im Anschluss zu knüpfende Arterienhinterwand. (Bild: Brandenburg/Kramer)

Die Spenderniere wurde vorsichtig in das linke Nierenlager positioniert, so dass die Gefäßstümpfe nah aneinander lagen und wenig Zugspannung auf das Gewebe bei der Anastomisierung ausgeübt wurde.

Für die Gefäß- und Ureternähte wurden 10/0 Prolenefäden der Firma Ethicon, verwendet.

Die Arterie wurde mit 8-10 Einzelknopfnähten anastomisiert.

Im ersten Schritt wurden zwei Haltefäden an den gegenüberliegenden Eckseiten angebracht. Die Enden wurden vorerst lang gelassen, um mit ihnen die Arterie besser positionieren zu können. Im zweiten Schritt wurden an Vorder- und Hinterwand jeweils drei bis vier Einzelknopfnähte gelegt. Um die Arterienhinterwand darzustellen, wurde die Arterie an den beiden Haltefäden um 180° gedreht. Es war dabei darauf zu achten, die Nähte in möglichst gleichen Abständen zu platzieren, um spätere Blutungen zu vermeiden. Nachdem die Arterie wieder in ihre Ausgangslage gedreht worden ist, konnten nun die Haltefäden gekürzt werden.

### 3.7.2.4. End zu End Anastomisierung der Nierenvene

Abbildung 4

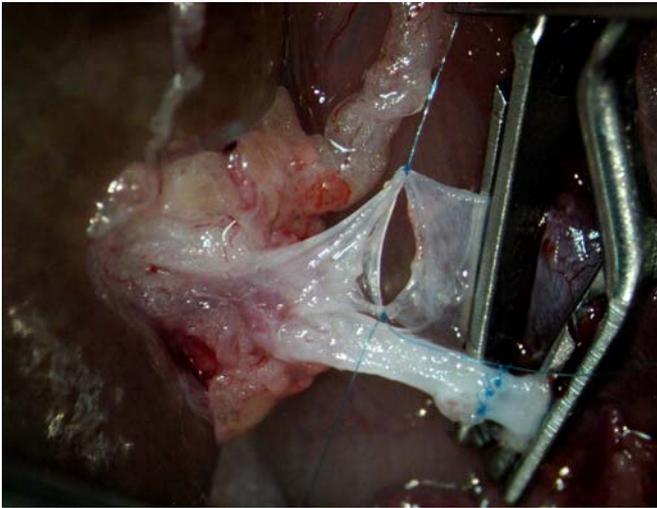


Abb. 4: Dargestellt ist die Nierenvenenanastomose. Die zwei Haltefäden wurden bereits gesetzt und die Vorder- und Hinterwand gut separiert sind zu erkennen. Mit dem im Bild oberen Faden wird nun im nächsten Schritt die Gefäßhinterwand fortlaufend genäht, im Anschluss daran wird die Vorderwand fortlaufend verschlossen. Im Bildvordergrund ist die bereits anastomosierte Nierenarterie gut zu erkennen. (Bild: Brandenburg/Kramer)

Im ersten Schritt wurden zwei Haltefäden in die gegenüberliegenden Eckpunkte gelegt, so dass Vorder- und Hinterwand sich gut darstellten. Das Gefäß wurde mit 0,9% NaCl angefeuchtet. Nun wurde die Venenhinterwand transluminal fortlaufend anastomosiert, dazu wurde der ungekürzte obere Haltefaden verwendet. Es wurde am kaudalen Ende ein lockerer Knoten gesetzt und die Venenvorderwand von kaudal nach kranial auf die gleiche Weise verschlossen. Bevor der Endknoten gesetzt wurde, wurde das Lumen mit einer Mikropinzette nochmals gedehnt, um einer späteren Stenose vorzubeugen.

Zur Überprüfung der Anastomosen wurde zuerst der venöse und im Anschluss der arterielle Gefäßclip kurz entfernt. Im Falle einer Leckage konnte eine weitere Einzelknopfnah angebracht werden. Um die Durchblutung wieder herzustellen, wurden darauf beide Gefäßclips in oben genannter Reihenfolge entfernt. Kleinere Blutungen konnten durch leichte Kompression mit einem Wattetupfer oder durch Einlegen kleiner Tabotampfstreifen gestillt werden.

### 3.7.2.5. End zu End Anastomose des Ureters

Abbildung 5

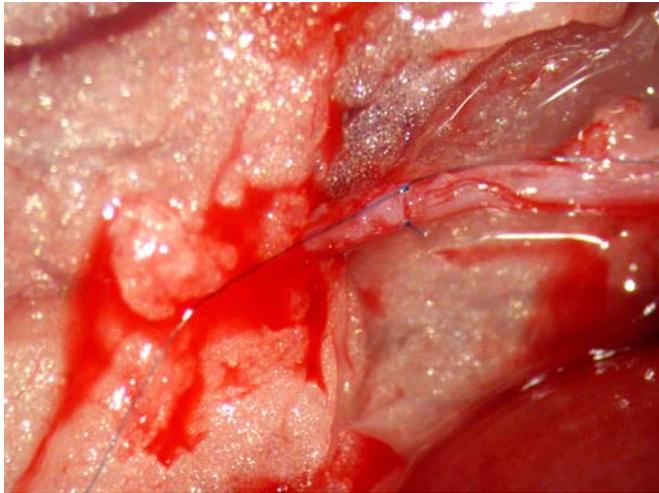


Abb. 5 zeigt die Anastomose des Ureters. Die zwei Haltefäden sind in den sich gegenüberliegenden Eckpunkten bereits gesetzt. In den nächsten Schritten werden vorsichtig Vorder- und Hinterwand mit Einzelknopfnähten verschlossen. (Bild: Brandenburg)

Die beiden sich gegenüberliegenden Ureterstümpfe wurden mit 0,9% NaCl angefeuchtet. Es wurden zwei Eckhaltefäden gelegt und an Vorder- und Hinterwand jeweils eine weitere mittige Einzelknopfnäht geknüpft. Um den Ureter nicht zu verletzen, wurde dieser nur am periureteralem Fettgewebe vorsichtig mit der Mikropinzette gegriffen.

Während der gesamten Operationszeit wurde darauf geachtet, dass sowohl das Darnpaket als auch die Niere ständig befeuchtet (0,9% NaCl) waren.

Die mediane Bauchlaparatomie wurde zweischichtig (Muskulatur, Haut) jeweils fortlaufend mit Vicryl 4/0 Faden verschlossen.

Zum Aufwachen wurden die Tiere unter einer Rotlichtlampe 30 Minuten gewärmt und in den Käfig zurückgelegt.

### **3.8. Instrumente und Materialien**

Für die Nierentransplantation wurden folgende Instrumente und Materialien benutzt:

#### 3.8.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Operationsmikroskop M690 (Fa. Leica)

Korkplatte 35cm X 35cm

sterile OP-Abdecktücher

Multikompressen 10cm X 10cm

Wattetupfer

Kanülen (verschiedene Größen)

Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)

Venenverweilkanüle 0,9 x 25mm (Fa. Venflon)

Urinbecher 50ml

sterile NaCl 0,9% Lösung (Fa. Braun)

Tabotamp 5 x 7.5cm (Fa.Ethicon)

#### 3.8.2. Chirurgisches Instrumentarium

Präparierschere BC 263 (Fa. Aesculap)

Splitterpinzette BD 520 (Fa. Aesculap)

Nadelhalter 8709N (Fa. Codman)

Bauchhaken (Eigenbau)

#### 3.8.3. Mikrochirurgisches Instrumentarium

Pinzetten 30-6715 (Fa.Codman)

Gebogene Federschere 2401/894 Q (Fa. Weck)

Gefäßklemmen 20-1251 (Fa.Codman)

Nadelhalter 80-2003 (Fa.Codman)

#### 3.8.4. Nahtmaterial

Vicryl 4/0 (Fa. Ethicon)

Prolene 10/0, BV-4, EH 7596 (Fa.Ethicon)

6/0 Seide "E" geflochten (Fa.Resoba)

### 3.8.5. Konservierungslösung

ViaSpan Belzer UW- (University of Wisconsin) Lösung a 1000ml, Du Pont Pharma

### 3.8.6. Medikamente

Isofluran 250ml (Fa. Curamed)

Cobalt-III-Protoporphyrin IX (Fa. Sigma Aldrich)

Zink-II-Protoporphyrin (Fa. Sigma Aldrich)

## **3.9. Datenerhebung**

### 3.9.1. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum betrug ein bzw. drei Tage. Bei in diesem Zeitraum verstorbenen Tieren wurde eine Autopsie durchgeführt, um etwaige andere Todesursachen (Infektionen, Blutungen) auszuschließen. In diesen Fällen wurden die Tiere in die Versuchsauswertung nicht mit einbezogen.

### 3.9.2. Beobachtungsende

Am regulären Ende des Beobachtungszeitraumes wurde das Tier in Narkose analog zur Nierentransplantation vorbereitet. Das Abdomen wurde durch eine Längslaparotomie eröffnet und das Operationsfeld (Retroperitoneum) optimal freigelegt. Die Aorta wurde mit einer Venenverweilkanüle (0,9 x 25 mm) punktiert und ca. 5 ml Blut wurden entnommen. Im Anschluss erfolgte über diesen Zugang eine gründliche Spülung des Transplantates mit 20 ml kalter 0,9% NaCl-Lösung. Dazu wurde zuvor proximal des Nierenarterienabgangs ein Gefäßclip gesetzt und die Nierenvene durchtrennt, um einen Abfluss für die Perfusionsflüssigkeit zu schaffen. Die Niere entfärbte sich sofort gelb-weißlich und wurde aus dem Situs entfernt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die Niere mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Zwei Drittel der Niere wurden in PBS-Lösung gelegt, das restliche Drittel wurde zu einem Teil für immunhistochemische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und zum anderen Teil in 4%iger Formaldehydlösung konserviert. Die Tötung des Tieres erfolgte durch Einschneiden des Diaphragmas. Nach der Tötung wurden zügig Milz sowie die mesenterialen Lymphknoten entnommen und das Versuchstier vorschriftsmäßig entsorgt. Auch Milz und Lymphknoten wurden analog der Niere zum Teil in PBS-Lösung aufbewahrt bzw. schockgefroren oder in Formalin konserviert.

### 3.10. Immunhistochemische Untersuchung

#### 3.10.1. Durchführung

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mittels APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode (Fa. DAKO Diagnostika, Hamburg), einer seit den 80-iger Jahren bekannte und gut etablierte Methode durchgeführt (52).

Für diese Untersuchung wurden die schockgefrorenen Transplantate mit Hilfe eines Kryotoms (Microm HM 500 OM) in 4µm dicke Gefrierschnitte geschnitten und nach 10 minütiger Acetonfixierung luftgetrocknet. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren erfolgte die Inkubation mit Normal-Kaninchenserum (Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg). Danach folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit Tris-gepufferter NaCl-Lösung (TBS) bei pH 7,4. Dieser Vorgang wiederholte sich nach jeder darauf folgender Inkubation. Bei Raumtemperatur erfolgte die 30 minütige Inkubation mit den spezifischen monoklonalen Primäantikörpern (Maus Anti-Ratte Sekundäantikörper).

Danach wurde der APAAP-Komplex aufgetragen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Substrat/Chromogen-System; als Substrat für die alkalische Phosphatase diente Naphtol AS-BI Phosphat, als Farbstoff Neu-Fuchsin (Naphtol AS-BI Phosphat). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt, welches in einem weiteren Schritt aufgetragen wurde.

#### 3.10.2. Antikörperauswahl

Folgenden Antikörper der Fa. Serotec, Wiesbaden, Deutschland wurden verwendet:

Maus Anti-Ratte ED1 (Monozyten/Makrophagen), Klon ED1, Isotyp Maus IgG1,

Maus Anti-Ratte CD4 (CD4+ T-Helfer Zellen), Klon W3/25, Isotyp Maus IgG1

Maus Anti-Ratte CD8 (zytotoxische T-Zellen), Klon MRC OX8, Isotyp Maus IgG

Maus Anti-Ratte CD86 (antigen-präsentierende Zellen), Klon BU 63, Isotyp Maus IgG1

Maus Anti-Ratte I-A (MHC-Klasse II, Ia-Antigene), Klon OX3, Isotyp Maus IgG1

Maus Anti-Ratte DC (dendritische Zellen), Klon MRC OX62, Isotyp Maus IgG1

Folgender Antikörper der Firma Stressgen Bioreagents wurde verwendet:

Maus Anti-Ratte HO-1 (Hämoxigenase-1, HSP 32), Klon HO-1,2, IgG2

#### 3.10.3. Quantifizierung der immunhistochemischen Präparate

Es wurden jeweils mindestens 20 Gesichtsfelder pro Schnittpräparat bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet. Gezählt wurden die angefärbten transplantatinfiltrierenden Zellen

pro Gesichtsfeld. Aus diesen wurde gruppenabhängig ein arithmetischer Mittelwert  $\pm$  mittlerer Standardfehler ermittelt.

### **3.11. Durchflusszytometrische Untersuchung (FACS)**

#### 3.11.1. Methode

Die Durchflusszytometrie (fluorescenceactivated cell sorter) ist ein Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Das von van Villa entwickelte Prinzip der „hydrodynamischen Fokussierung“ in Verbindung mit der heutigen Laser- und Computertechnik führte zu der heute angewendeten Durchflusszytometrie. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung-, streuung-, oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur Analyse herangezogen werden. Durch Anfärbung definierter Strukturen mit speziellen Farbstoffen bzw. farbstoffmarkierten monoklonalen Antikörpern ist eine weitere Differenzierung möglich. Eine quantitative Aussage ist durch Erstellen definierter Eichkurven möglich (53).

Die FACS-Untersuchung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erlaubt eine genaue und reproduzierbare Bestimmung von Zellpopulationen und Subpopulationen auch bei geringen Konzentrationen (54).

Im Vergleich mit anderen etablierten Methoden der Zellquantifizierung (Licht-, Elektronenmikroskopie) ist die FACS-Methode der derzeitige „Goldstandard“ bezüglich der Genauigkeit sowie Reproduzierbarkeit (55).

#### 3.11.2. Durchführung

Da wir in unserem Versuch die Migration der spenderstämmigen dendritischen Zellen und deren Einfluss auf die akute Abstoßung untersuchten, ist dieses Verfahren besonders geeignet, da von sehr kleinen nachweisbaren Mengen auszugehen war.

Die Leukozytenpopulationen der zu untersuchenden Organe (Niere, Milz, Blut, Lymphknoten) wurde durch Dichte-zentrifugation (Pancoll<sup>TM</sup> Dichtegradient, Dichte 1.091 g/ml; Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) isoliert. Anschließend wurden die getrennten Leukozyten in RPMI-Medium resuspendiert (RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Es erfolgte nun die Färbung der Zellen mittels verschiedener Waschvorgänge bis zur Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper. Zur

Quantifizierung spenderstämmiger dendritischer Zellen verwendeten wir zur Doppelfluoreszenz RT1A<sup>ab</sup>-FITC (Fa. BD), dessen Emissionsmaximum bei grüner Anregung bei 525nm liegt und OX62-PE (Fa. BD), dessen Emissionsmaximum bei 575nm bei oranger Anregung liegt. Eventuell auftretende spektrale Überlappung konnten elektronisch kompensiert werden. Die Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen CD4 (anti-CD4-APC) (Fa. BD) und den T-Zellrezeptor (TCR-PerCP) (Fa. BD).

Die gefärbten und fixierten Zellen (1% Paraformaldehyd in PBS) wurden mittels eines FACS-Calibur-Gerätes (Fa. Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) gemessen und in einem Dot-Plot-Diagramm graphisch dargestellt. Durch diese Darstellung war eine statistische Auswertung der doppelgefärbten Populationen möglich. Die weitere Auswertung erfolgte mittels des Programms „Cell Quest“ Analyse-Software (Fa. Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA).

### 3.11.3 Antikörperauswahl

Folgende Antikörper der Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland wurden verwendet:

Maus Anti-Ratte CD4 (CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen), Klon OX 35, PE konjugiert, Isotyp IgG2

Maus Anti-Ratte- $\alpha$ ,  $\beta$ -TCR (T-Zell-Rezeptor), Klon R73, PerCP konjugiert, Isotyp IgG1

Maus Anti-Ratte DC (dendritische Zellen), Klon OX62, PE konjugiert, Isotyp IgG1

Maus Anti Ratte RT1A<sup>ab</sup> (MHC-Klasse I von DA-Ratten), Klon C3, FITC konjugiert, Isotyp IgG1

## 3.12. Enzym-linked-Immunospot (Elispot)

### 3.12.1. Methode

Die Elispotmethode ist entwickelt worden, um die genaue Menge zytokinproduzierender Zellen, (IFN- $\gamma$ ) in einer Zellsuspension zu bestimmen (56). In diesem in-vivo Verfahren wurden die zytokinproduzierenden Zellen mittels eines spenderspezifischen Stimulus über 24 Stunden angeregt. Obwohl auch unstimulierte T-Zellen der Milz kleine Mengen Zytokin produzieren, wird zur Produktion signifikanter Mengen ein Stimulus benötigt (57).

### 3.12.2. Durchführung

In unserem Experiment wurde die Frequenz alloreaktiver T-Zellen mittels eines Anti-Ratte-IFN- $\gamma$  Elispot Assays (Diacclone, Besancon Cedex, Frankreich) bestimmt. Dazu wurden PVDF-beschichtete 96-well Microtiter Platten (Diacclone, Besancon Cedex, Frankreich) zunächst mit 70%-igem Alkohol inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Ratte IFN- $\gamma$ - Bindungsantikörper für 12 Stunden. Nach Blockierung der unspezifischen Bindung mit 2%-iger entrahmter Trockenmilch in PBS wurden entweder RPMI-Medium (Negativkontrolle), in RPMI-Medium gelöstes PMA (2ng/ml)/ Ionomycin (2 $\mu$ g/ml) (Positivkontrolle) oder  $5 \times 10^5$  Stimulatorzellen (Milzlymphozyten der Spender-DA-Ratten) in den Mikrotiterplatten verteilt. Es wurden  $5 \times 10^5$  Responderzellen (Lewis-Milzzellen) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden im Folgenden über 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Waschen der Platten mit 0.1% Tween 20 enthaltendem PBS (Tween 20 pure, Serva Biochemica, Heidelberg, Deutschland) wurde der biotinylierte Anti-Ratte IFN- $\gamma$  Detektionsantikörper hinzugefügt und über 3 Stunden belassen. Es folgten eine 45-minütige Inkubation mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat und die Färbung mit Färbepuffer (BCTP/NTB). Die trockenen Elispot-Platten wurden mit dem BIOREADER® 3000 C/ BIOCOUNTER System (BIOREADER 3000 C, BIO-SYS GmbH, Karben, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

Anhand der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Anzahl der Gesamt- T-Zell-Population und unter Berücksichtigung der im Elispot tatsächlich eingesetzten Zellzahl konnte nun der Anteil alloreaktiver IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen berechnet werden.

### 3.13. Statistische Auswertung

Aus den gewonnenen Daten wurden Mittelwerte und Streuungsmaße errechnet.

Die Prüfung der Signifikanz der Daten für Immunhistochemie, FACS und Elispot erfolgte mit dem Students T-Test bzw. dem Mann- Whitney Test für nicht parametrische Werte und wurden mit dem Programm SPSS 14.0 ermittelt. Als statistisch signifikant gilt ein p-Wert <0,05. Die Daten werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Das Projekt wurde im Rahmen eines DFG geförderten Projektes durchgeführt.

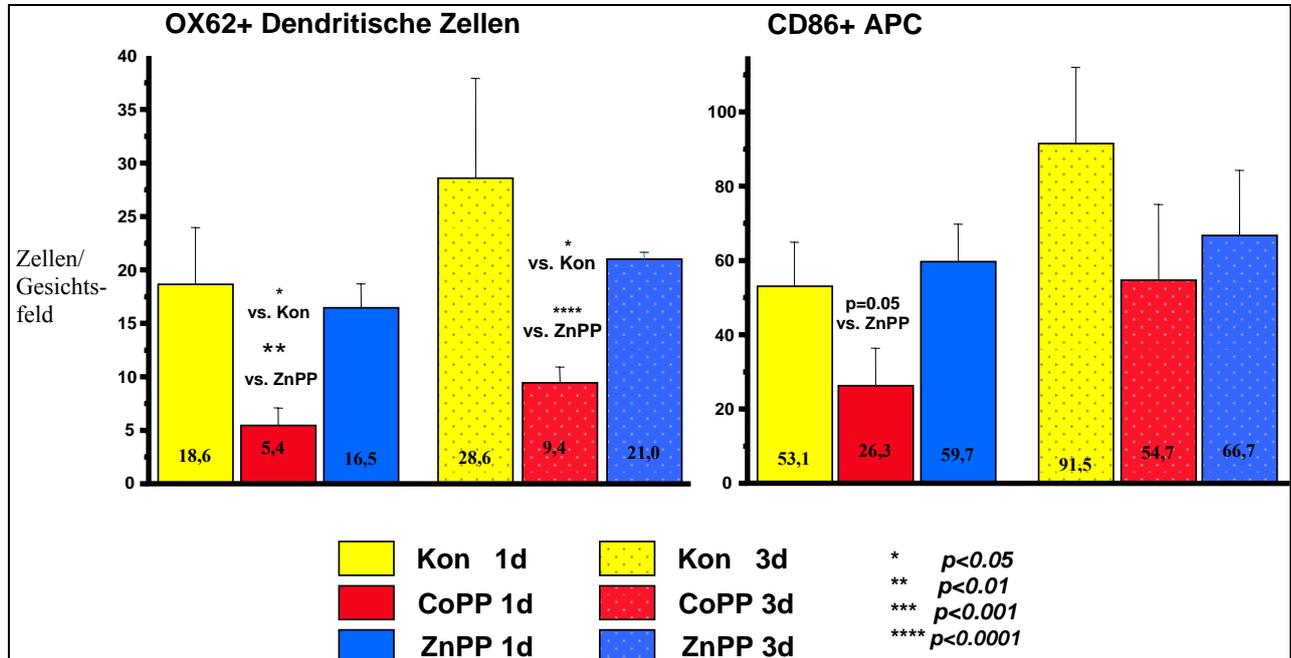
## 4. Ergebnisse

Die Versuchstiere wurden nach der Nierentransplantation für ein bzw. drei Tage beobachtet. In diesem Zeitraum verstorbene Tiere wurden zur Feststellung der Todesursache autopsiert. Aufgrund von Komplikationen (operativ-technische Fehler, Infektionen) verstorbene Ratten wurden nicht den anschließenden Untersuchungen zugeführt und aus dem Versuch ausgeschlossen.

### 4.1. Immunhistologische Ergebnisse

Unter einem Olympus BX41 Mikroskop wurden pro Organschnitt des Nierentransplantates mindestens 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Als Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert des jeweiligen Organs berechnet. Für die statistische Auswertung wurde ein Mittelwert  $\pm$  SD aus den Tieren einer Versuchs- bzw. Kontrollgruppe ermittelt. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung dargestellt.

Abbildung 6



**Abbildung 6:** Dargestellt sind die Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchung für OX62+Dendritische Zellen und CD86+APC zu zwei verschiedenen Beobachtungszeiträumen. Die Signifikanz sind mit „\*“, „\*\*“, „\*\*\*“ gekennzeichnet. Kon = Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP= Cobaltprotoporphyrin, ZnPP= Zinkprotoporphyrin, d=Tag (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

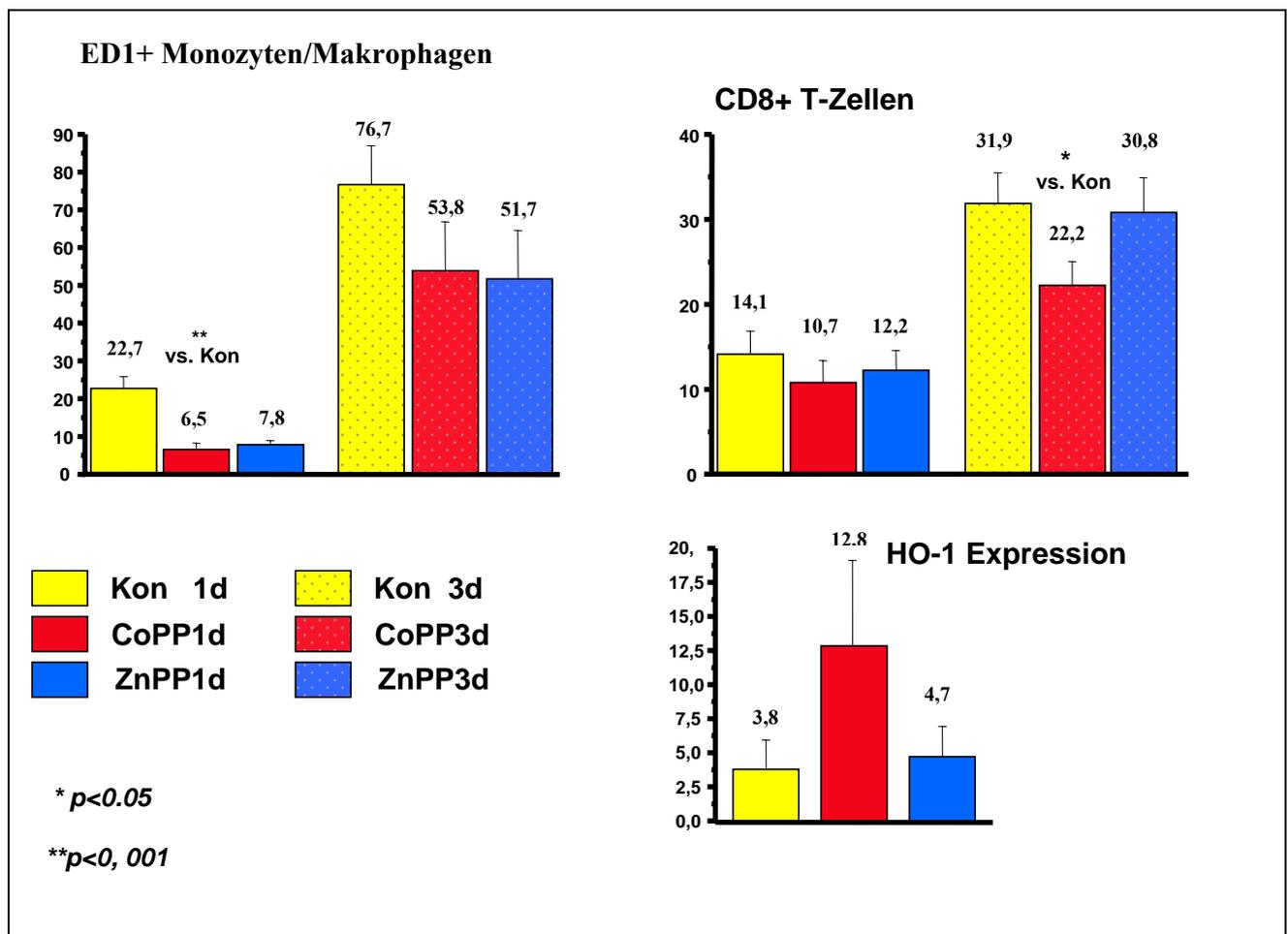
Tabelle 1

Statistische Auswertung für OX62+ CD86+ APC		
	OX62+	CD86+
Kontrolle1d vs CoPP 1d	p=0,015	p=0,115
CoPP1d vs ZnPP1d	p=0,0015	p=0,059
Kontrolle3d vs CoPP3d	p=0,029	n.s.
CoPP3d vs ZnPP3d	p<0,0001	n.s.

**Tabelle** Dargestellt sind die statistischen Signifikanzen der immunhistologischen Ergebnisse für OX62+ und CD86+ Zellen.

Es zeigt sich in diesem Versuch eine signifikante Reduktion OX62+ dendritischer Zellen im Vergleich zur Kontroll- und ZnPP- Gruppe nach einmaliger CoPP- Spendervorbehandlung. Dieser Effekt lässt sich sowohl nach einem wie auch nach 3 Tagen nachweisen. Diese Untersuchung lässt keine Aussage über die Herkunft (Empfänger/Spender) dieser Zellen zu. (Kon vs. CoPP 1d:  $18,63 \pm 5,3$  vs.  $5,4 \pm 1,65$  Z/GF,  $p < 0,015$  CoPP vs. ZnPP 1d:  $5,4 \pm 1,65$  vs.  $16,45 \pm 2,25$  Z/GF,  $p < 0,0015$  Kon vs. CoPP 3d:  $28,56 \pm 9,4$  vs.  $9,43 \pm 1,48$  Z/GF,  $p < 0,029$  CoPP vs. ZnPP 3d:  $9,43 \pm 1,48$  vs.  $21 \pm 0,65$  Z/GF,  $p < 0,0001$ ) Ähnlich verhält es sich bei der Anzahl CD86+ antigenpräsentierender Zellen. Hier wird die Infiltration nach CoPP-Vorbehandlung am ersten Tag im Vergleich zur ZnPP-Gruppe signifikant gesenkt. Auch nach drei Tagen ist ein Trend erkennbar. Dieser ist aufgrund der hohen Standardabweichung aber nicht signifikant (Kon vs. CoPP 1d:  $53,1 \pm 11,8$  vs.  $26,27 \pm 10,08$  Z/GF,  $p = n.s.$  CoPP vs. ZnPP 1d:  $26,27 \pm 10,08$  vs.  $59,69 \pm 10,06$  Z/GF,  $p = 0,05$ ; Kon vs. CoPP 3d:  $91,5 \pm 20,5$  vs.  $54,69 \pm 20,4$  Z/GF,  $p = n.s.$  CoPP vs. ZnPP 3d:  $54,69 \pm 20,4$  vs.  $66,7 \pm 17,56$  Z/GF,  $p = n.s.$ ).

Abbildung 7



**Abbildung 7** In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der Immunhistologie für ED1+Monozyten/Makrophagen und CD8 zu zwei Beobachtungszeitpunkten (24h, 3d), sowie für die HO-1 Expression nach Tag 1 dargestellt. Die Signifikanzen sind mit „\*, \*“, gekennzeichnet. Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP= Cobaltprotoporphyrin, ZnPP= Zinkprotoporphyrin, Kon= Kontrolle, d=Tag. (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

In obiger Abbildung ist die Infiltration von ED1+ Monozyten/Makrophagen, CD8+ T-Zellen sowie die HO-1 Expression im Transplantat dargestellt. ED1+ Zellen sind 24 Stunden postoperativ in der CoPP- behandelten Gruppe reduziert (Kon vs. CoPP 1d:  $22,73 \pm 3,09$  vs.  $6,57 \pm 1,64$  Z/GF,  $p < 0,001$ ).

Ein weiterer signifikanter Infiltrationsrückgang wird auch bei CD8+ T-Zellen nach drei Tagen beobachtet (Kon vs. CoPP 3d:  $31,87 \pm 3,6$  vs.  $22,2 \pm 2,82$  Z/GF,  $p = 0,0034$  CoPP vs. ZnPP 3d:  $22,2 \pm 2,82$  vs.  $30,8 \pm 4,1$  Z/GF,  $p = 0,061$ ). Die Infiltration ED1+ Makrophagen/Monozyten nach 3 Tagen sowie die Zahl der transplantatinfiltrierenden CD8+ T-Zellen 24 Stunden postoperativ wird in den CoPP-behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen nicht signifikant verringert.

Die Expression der HO-1 am ersten postoperativen Tag ist in der spendenvorbehandelten CoPP-Gruppe deutlich höher. Die Unterschiede zur Kontroll- bzw. ZnPP-Gruppe erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

Die immunhistochemische Auswertung CD4+ T-Zellen ergibt keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Untersuchungsgruppen.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, kommt es allenfalls zu einer leichten Zunahme der Infiltration in der ZnPP-behandelten Gruppe am Tag 1. An Tag drei kommt es innerhalb der CoPP-Gruppe zu einem unerwarteten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg CD4+-T-Zellen. Auch für die Expression von MHC Klasse II+ Zellen lässt sich bei fehlenden signifikanten Veränderungen keine weitere Schlussfolgerung bezüglich Transplantatschädigung treffen. Ein leichter Abwärtstrend ist in der CoPP-Gruppe am Tag 1 postoperativ festzustellen.

Tabelle 2

<b>Auswertung für CD4 und MHCII</b>		
	<b>CD4</b>	<b>MHCII</b>
<b>Kontrolle1d</b>	28,1±3,5	10,1±3,1
<b>CoPP1d</b>	28,2±1,9	5,44±1,31
<b>ZnPP1d</b>	40,9±6,96	9,2±2,5
<b>Kontrolle3d</b>	60±11,9	40,2±3,4
<b>CoPP3d</b>	72,4±16,7	44,9±7,0
<b>ZnPP3d</b>	82,9±9,9	62,8±6,4

Dargestellt sind die Ergebnisse (Zellen/Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung) der immunhistochemisch angefärbten Zellen als arithmetischer Mittelwert ± SD der verschiedenen Versuchsgruppen

In den folgenden Abbildungen werden exemplarisch Ausschnitte aus immunhistochemisch gefärbten Präparaten gezeigt. Alle Präparate wurden mit der APAAP-Methode gefärbt. Die jeweiligen Oberflächenantigen-positiven Zellen sind rot angefärbt.

Abbildung 8

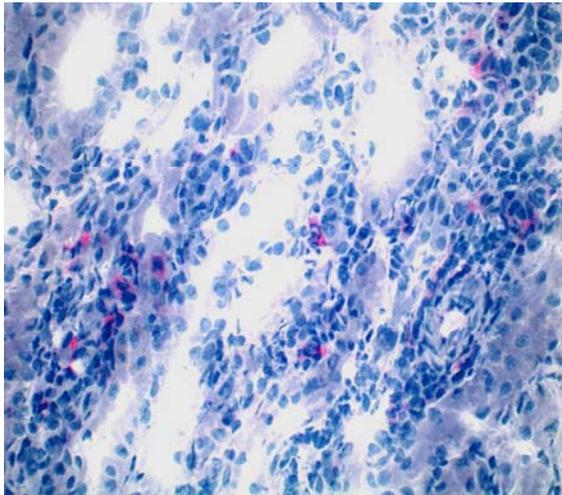


Abbildung 8: **OX62+ Zellen Kontrolle d3**  
Ein interstitielles Infiltrat ist bei 400-facher Vergrößerung gut zu erkennen.

Abbildung 9

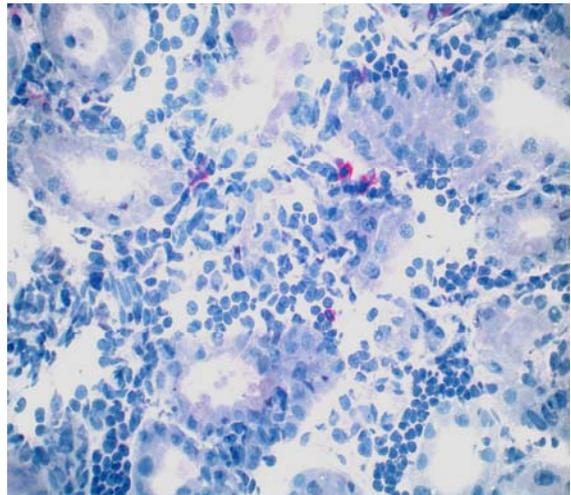


Abbildung 9: **OX62+ Zellen CoPP-Gruppe d3**  
In der 400-fachen Vergrößerung ist die interstitielle Infiltration im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Abbildung 10

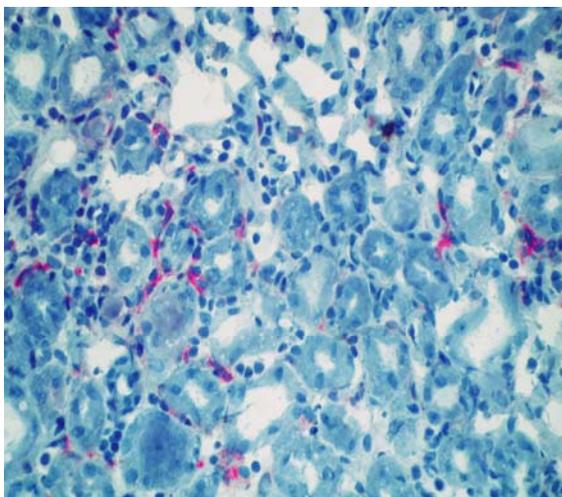


Abbildung 10: **CD86+ Zellen Kontrolle d1**  
Es ist ein deutliches interstitielles Infiltrat erkennbar. 400- fache Vergrößerung.

Abbildung 11

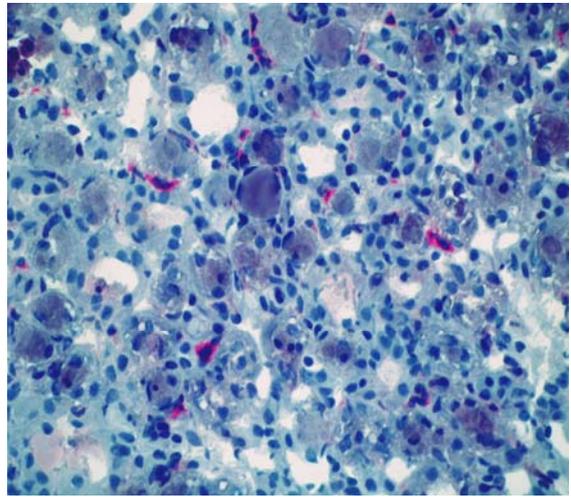


Abbildung 11: **CD86+ Zellen CoPP-Gruppe d1**  
Es ist nur ein geringes interstitielles Infiltrat bei 400- facher Vergrößerung sichtbar.

Abbildung 12

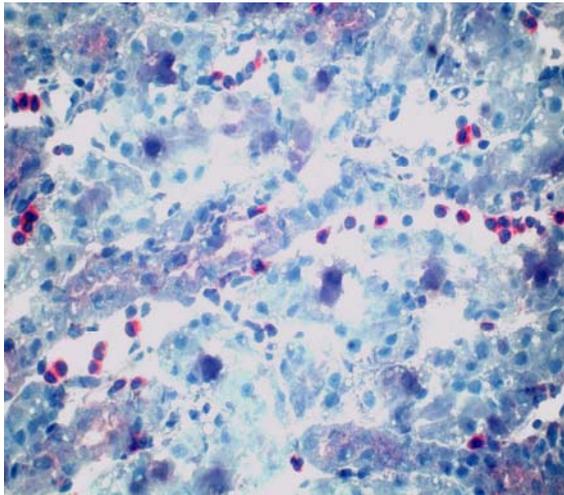


Abbildung 12: Dargestellt ist eine Färbung **ED1** positiver Zellen der **Kontrolle d1**. Ein interstitielles Infiltrat ist gut bei 400- facher Vergrößerung zu erkennen.

Abbildung 13

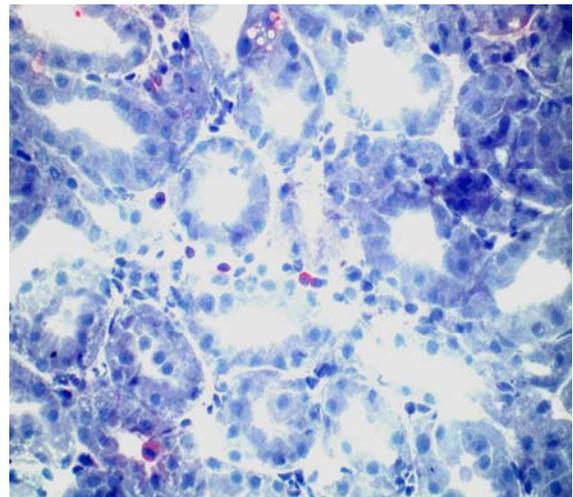


Abbildung 13: Dargestellt ist die Färbung **ED1** positiver Zellen der **CoPP-Gruppe d1**. Nur einzelne angefärbte Monozyten/ Makrophagen sind zu erkennen. 400- fache Vergrößerung.

Abbildung 14

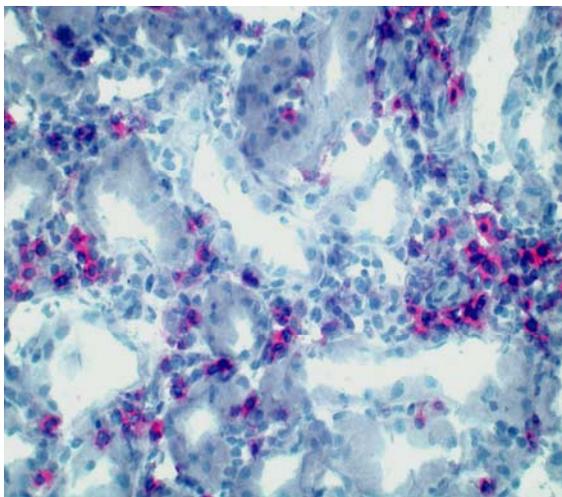


Abbildung 14: Dargestellt ist die APAAP Färbung für **CD8+ T-Zellen der Kontrollgr. nach 3 Tagen**. Ein ausgeprägtes Infiltrat ist bei 400- facher Vergrößerung gut zu erkennen.

Abbildung 15

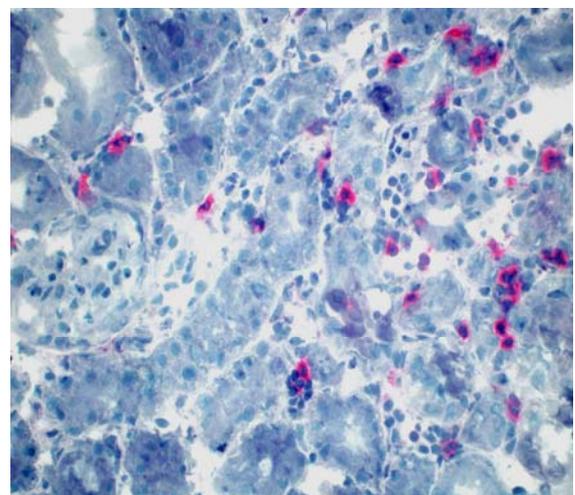


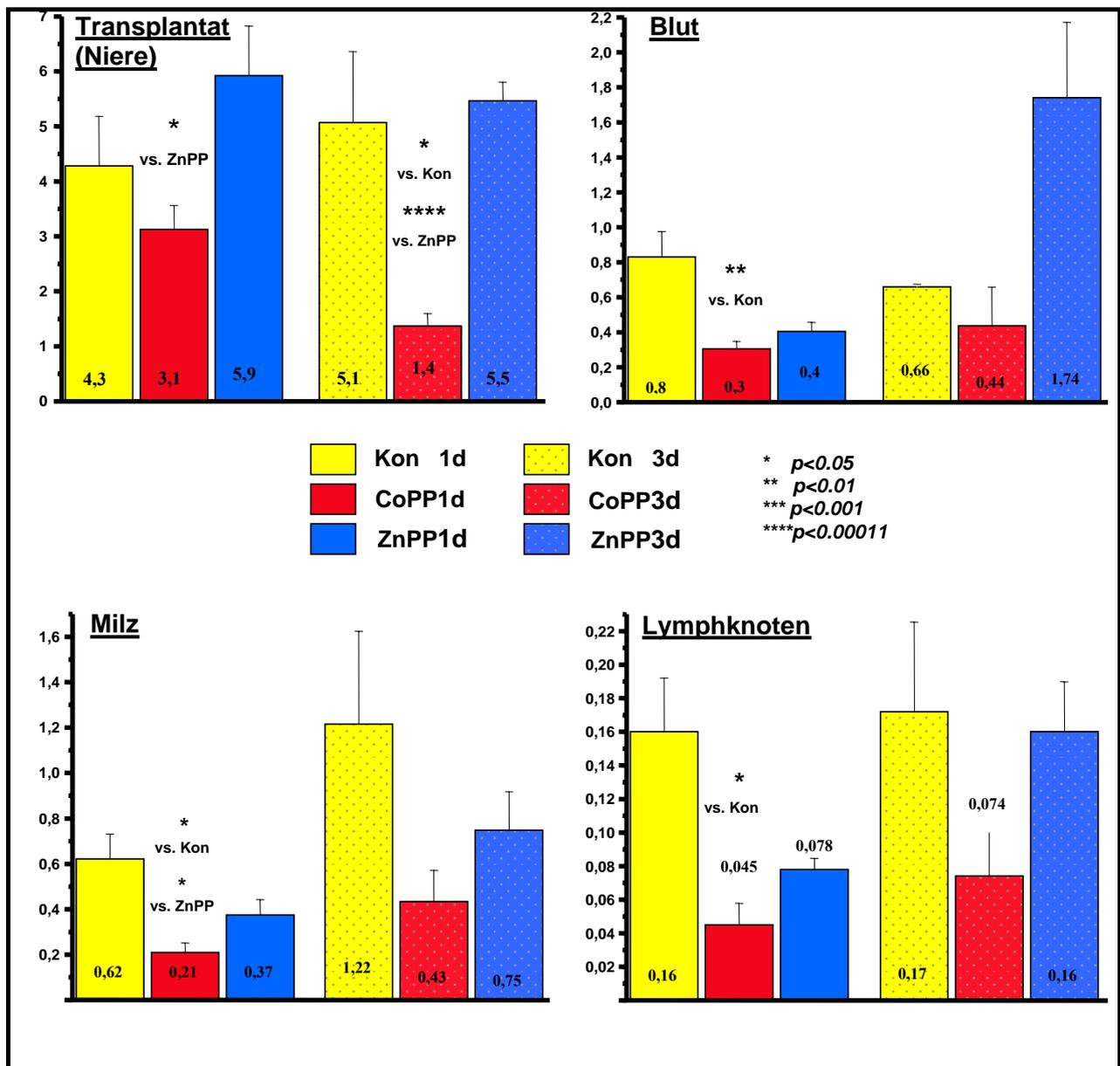
Abbildung 15: Angefärbt sind **CD8+ T-Zellen CoPP-Gruppe nach 3 Tagen**. Die interstitielle Infiltration ist bei 400- facher Vergrößerung signifikant reduziert.

## 4.2. Durchflusszytometrische Ergebnisse

In den einzelnen Organen (Niere, Blut, Milz, Lymphknoten) wurde die Anzahl T-Zell-Rezeptor- (TCR)+-Zellen, CD4+-T-Zellen sowie spenderspezifischer (RT1A<sup>ab+</sup>) dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt.

Abbildung 16

### 4.2.1. Spender (DA)-spezifische OX62+Dendritische Zellen (% RT1A<sup>ab+</sup> / OX62+ Zellen)



**Abbildung 16** Die Abbildung zeigt die Frequenz spenderspezifischer dendritischer Zellen (Doppelfärbung: RT1A<sup>ab+</sup> und OX62+) als prozentuale Angabe aller Leukozyten für Niere, Blut, Milz und Lymphknoten. Dargestellt sind jeweils beide Beobachtungszeitpunkte (ein bzw. drei Tage). Die Signifikanzen sind mit „\*“, „\*\*“, „\*\*\*“, „\*\*\*\*“ gekennzeichnet. Kon= Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP= Cobaltprotoporphyrin, ZnPP= Zinkprotoporphyrin, d=Tag. (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

Tabelle 3

DA+/DZ+	Niere		Blut		Lymphknoten		Milz	
	1Tag	3Tage	1 Tag	3Tage	1Tag	3Tage	1Tag	3Tage
Kontrolle	4,3±0,89	5,1±1,29	0,8±0,15	0,7±0,02	0,16±0,03	0,17±0,03	0,62±0,1	1,2±0,41
CoPP	3,1±0,44	1,4±0,23	0,3±0,04	0,4±0,22	0,05±0,01	0,07±0,03	0,21±0,04	0,4±0,14
ZnPP	5,9±0,9	5,5±0,34	0,4±0,05	1,7±0,43	0,08±0,006	0,16±0,03	0,37±0,07	0,7±0,17

**Tabelle 3:**

Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± Standardabweichung der Anzahl spenderstämmiger dendritischer Zellen der FACS-Analyse für Niere, Blut, Lymphknoten und Milz zu beiden Versuchszeitpunkten.

In Abbildung 16/Tabelle 3 ist die Frequenz der spenderstämmigen dendritischen Zellen in Niere, Blut, Milz und Lymphknoten nach einmaliger 24-stündiger präoperativer Spendervorbehandlung mit CoPP bzw. ZnPP im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu beiden Versuchszeitpunkten dargestellt.

Die einmalige CoPP-Spendervorbehandlung konnte die Anzahl dendritischer Zellen der Spendertiere in der transplantierten Niere nach einem Tag im Vergleich zur ZnPP Gruppe senken (CoPP vs. ZnPP 1d: 3,1±0,44 vs. 5,9±0,9 p=0,0118).

An Tag drei war die Frequenz dieser Zellen im Transplantat gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe sowie der ZnPP-behandelten Gruppe signifikant reduziert (Kon vs. CoPP 3d: 5,1±1,3 vs. 1,4±0,23 p=0,0223 CoPP vs. ZnPP 3d: 1,4±0,23 vs. 5,5±0,34 p<0,0001).

Nach einem Tag konnten in Blut (Kon vs. CoPP 1d: 0,83±0,15 vs. 0,3±0,04 p=0,016), Milz (Kon vs. CoPP 1d: 0,62±0,11 vs. 0,21±0,04 p=0,0124 CoPP vs. ZnPP 1d: 0,21±0,04 vs. 0,37±0,07 p=0,049) und Lymphknoten (Kon vs. CoPP 1d: 0,16±0,03 vs. 0,045±0,013 p=0,0032) ebenfalls signifikante Unterschiede in der spenderabhängigen DZ-Population gemessen werden.

In Abbildung 16 wird deutlich, dass die Anzahl dendritischer Zellen auch in der Peripherie (Blut, Milz, Lymphknoten) am dritten postoperativen Tag nach CoPP-Behandlung deutlich abnimmt, jedoch wird das Signifikanzniveau nicht erreicht (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Statistischer Vergleich der spenderabhängigen Dendritischen Zellen nach Nierentransplantation		
	1.Tag	3.Tag
<b>Niere</b>	CoPP vs	
Kontrolle	0,2485	<b>0,0223</b>
ZnPP	<b>0,0118</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Blut</b>		
Kontrolle	<b>0,0167</b>	d.n.s.
ZnPP	d.n.s.	0,0714
<b>Milz</b>		
Kontrolle	<b>0,0124</b>	0,086
ZnPP	<b>0,0485</b>	d.n.s.
<b>Lymphknoten</b>		
Kontrolle	<b>0,0032</b>	d.n.s.
ZnPP	0,0822	0,0608

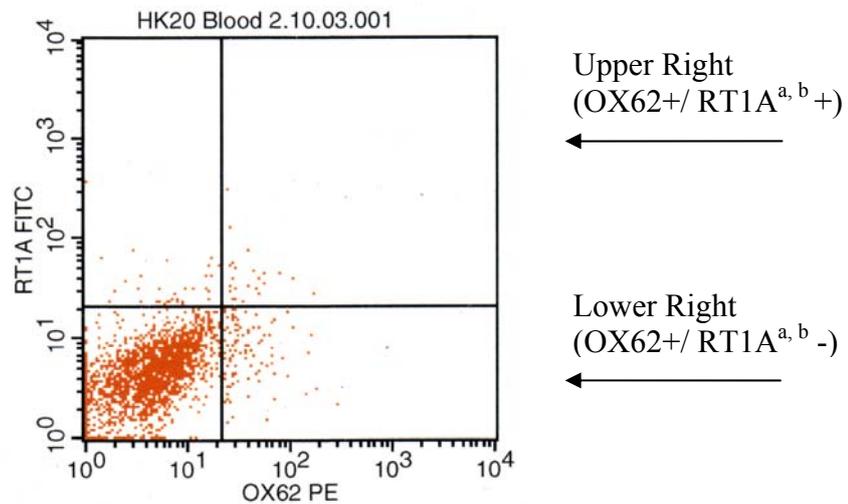
**Tabelle 4:** Dargestellt sind die statistischen Signifikanzen der spenderabhängigen DC-Population. Signifikante Werte wurden fett hervorgehoben. d.n.s. = deutlich nicht signifikant

#### 4.2.2. OX-62+ Dendritische Zellen des Empfängers (Lewis)

Im Dot-Plot-Diagramm der durchflusszytometrischen Auswertung ist es möglich verschiedene unterschiedlich angefärbte Populationen darzustellen.

In Abbildung 17 ist ein typisches Diagramm, von Zellen welche mit RT1A<sup>ab</sup>-FITC und OX62-PE doppelgefärbt wurden, dargestellt. Zellen, an denen beide monoklonale Antikörper gebunden haben, sind in der UR-(Upper Right)-Position zu finden und daher spenderspezifische dendritische Zellen. Demzufolge sind OX62 einfach angefärbte Zellen, die sich im „Gate“ LR-(Lower Right) befinden, dendritische Zellen der Empfänger-(Lewis) Tiere, welche RT1A<sup>ab</sup>- und OX62+ gefärbt sind.

Abbildung 17: Dot-Plot-Diagramm



Der Einfluss einer CoPP-Spendervorbehandlung, auf die Anzahl der dendritischen Zellen in verschiedenen Organen des Empfängertieres (Nierentransplantat, Blut, Milz, Lymphknoten) sind in Tabelle 5 zusammengefasst und in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

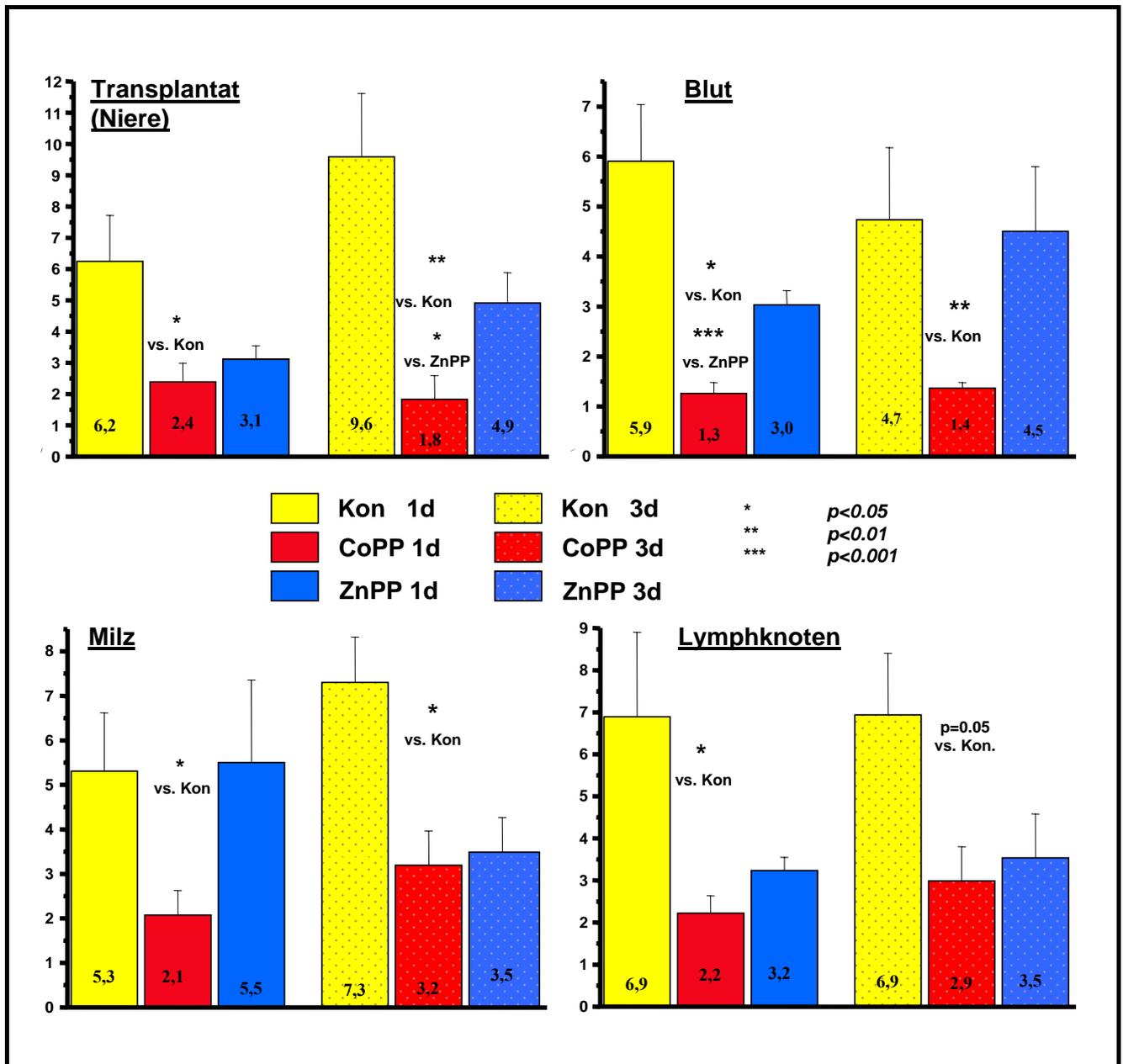
Tabelle 5

OX62+/DA-	Niere		Blut		Lymphknoten		Milz	
	1Tag	3Tage	1 Tag	3Tage	1Tag	3Tage	1Tag	3Tage
Kontrolle	6,2±1,47	9,6±2,03	5,9±1,14	4,7±1,44	6,9±2,01	6,94±1,47	5,3±1,3	7,3±1,02
CoPP	2,4±0,60	1,8±0,76	1,3±0,22	1,4±0,11	2,2±0,42	2,99±0,82	2,1±0,55	3,2±0,77
ZnPP	3,1±0,43	4,9±0,96	3,0±0,29	4,5±1,3	3,2±0,31	3,54±1,04	5,5±1,85	3,5±0,78

**Tabelle 5:** Dargestellt sind die prozentualen Werte ± Standardabweichung der Anzahl der OX62+/DA- vom Empfänger stammenden Zellen der FACS-Analyse für Niere, Blut, Lymphknoten und Milz zu jeweils beiden Versuchsenden.

Abbildung 18

OX62+Dendritische Zellen/Empfänger (% RT1A<sup>ab</sup> neg. / OX62+ Zellen)



**Abbildung 18:** Dargestellt ist die Anzahl dendritischer Zellen, der Empfänger-(Lewis)-Tiere in Abhängigkeit von der Spendervorbehandlung. Es sind jeweils die prozentualen Werte für den Anteil OX62+, aber RT1A<sup>ab</sup>-Zellen aller Leukozyten der Niere, Milz, Lymphknoten und des Blutes (an Tag 1 bzw. 3) angegeben. Die Signifikanzen sind mit „\*“, „\*\*“, „\*\*\*“ gekennzeichnet. Kon= Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP=Cobaltprotoporphyrin, ZnPP= Zinkprotoporphyrin, d=Tag. (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

In obiger Abbildung ist der Einfluss der Spendervorbehandlung auf die Anzahl dendritischer Zellen des Empfängertieres gut zu erkennen. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion dieser Zellen in allen vier untersuchten Organen zu jeweils beiden Beobachtungszeitpunkten.

Am stärksten ist dieser Effekt im Blut ausgeprägt (Kon vs. CoPP 1d:  $5,9 \pm 1,1$  vs.  $1,3 \pm 0,22$   $p=0,016$  CoPP vs. ZnPP 1d:  $1,3 \pm 0,22$  vs.  $3,0 \pm 0,3$   $p=0,0006$  Kon vs. CoPP 3d:  $4,7 \pm 1,4$  vs.  $1,4 \pm 0,1$   $p=0,01$ ). Die genaue statistische Auswertung der Signifikanzen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Betrachtet man vergleichend die Ergebnisse für Immunhistologie (Abbildung 6) und FACS-Analyse speziell für das Nierentransplantat (Abbildung 16, 18) korrelieren die Ergebnisse der OX62+ dendritischen Zellen, wobei in der Immunhistologie keine Aussage über die Herkunft dieser Zellen getroffen werden kann.

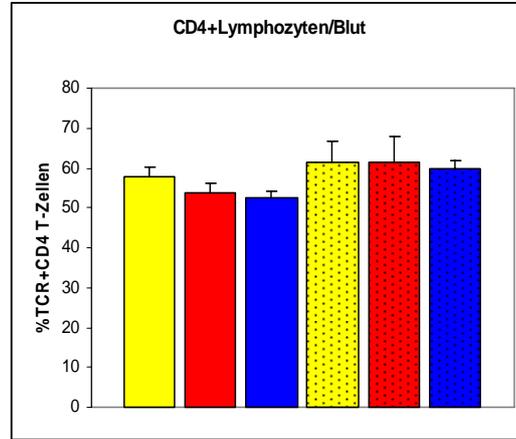
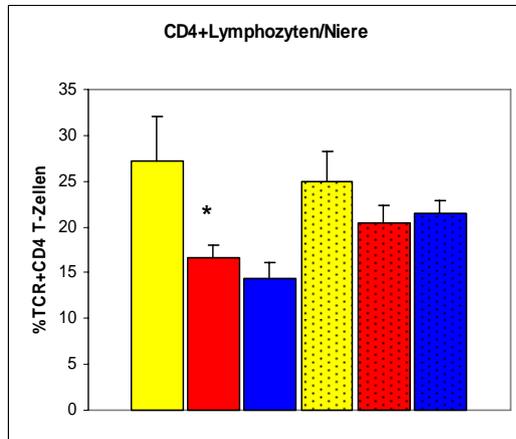
Tabelle 6

<b>Statistischer Vergleich/Signifikanzen (p-value) der Anzahl dendritischer Zellen des Empfängers</b>		
	1.Tag	3.Tag
<b>Niere</b>		
	CoPP vs.	
Kontrolle	<b>0,0213</b>	<b>0,016</b>
ZnPP	d.n.s.	<b>0,036</b>
<b>Blut</b>		
Kontrolle	<b>0,016</b>	<b>0,0079</b>
ZnPP	<b>0,0006</b>	0,074
<b>Milz</b>		
Kontrolle	<b>0,021</b>	<b>0,016</b>
ZnPP	d.n.s.	d.n.s.
<b>Lymphknoten</b>		
Kontrolle	<b>0,019</b>	<b>0,057</b>
Znpp	d.n.s.	d.n.s.

**Tabelle 6:** Dargestellt sind die statistischen Signifikanzen (p-value) der empfängerabhängigen DC-Population. Signifikante Werte wurden fett hervorgehoben.  
d.n.s.=deutlich nicht signifikant

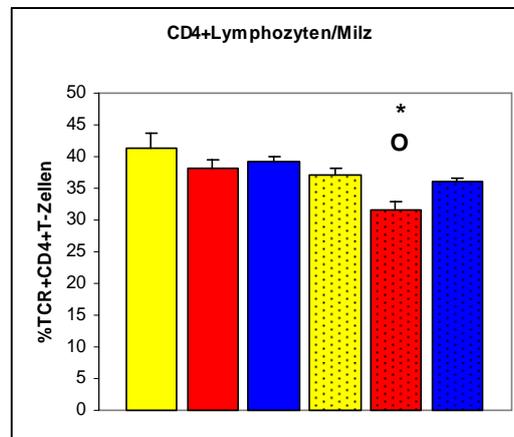
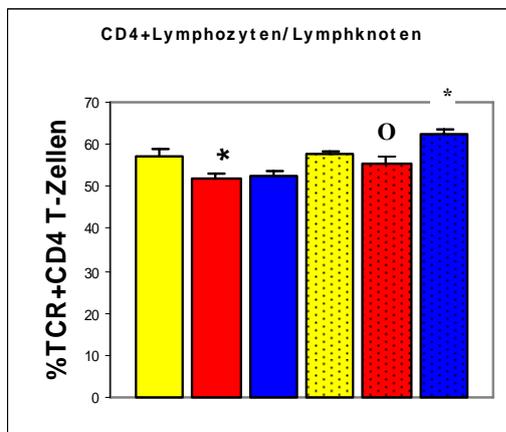
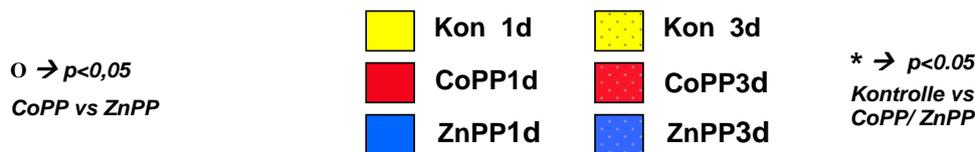
#### 4.2.3. CD4+/TCR- (T-Zell-Rezeptor)+ Lymphozyten in der FACS-Analyse für Niere, Blut, Lymphknoten und Milz

Abbildung 19



Ergebnisse der CD4+/TCR+T-Lymphozyten der FACS-Analyse der Niere. \*, \*\*, =signifikante Veränderung.

Ergebnisse der CD4+/TCR+T-Lymphozyten der FACS-Analyse im Blut.



Ergebnisse der CD4+/TCR+T-Lymphozyten der FACS-Analyse der Lymphknoten. \*, \*\*, =signifikante Veränderung.

Ergebnisse der CD4+/TCR+ T-Lymphozyten der FACS-Analyse in der Milz. \*, \*\*, = signifikante Veränderung.

Tabelle 7

CD4+TCR+	Niere		Blut		Lymphknoten		Milz	
	1Tag	3Tage	1 Tag	3Tage	1Tag	3Tage	1Tag	3Tage
Kontrolle	27,2±4,8	24,9±3,4	57,8±2,5	61,5±5,1	57,3±1,5	57,5±0,9	41,4±2,4	37,0±1,3
CoPP	16,7±1,3	20,5±1,8	53,9±2,3	61,5±6,5	52,2±1,1	55,5±1,5	38,2±1,2	31,7±1,1
ZnPP	14,3±1,9	21,4±1,4	52,5±1,7	59,6±2,1	52,6±1,1	62,7±0,6	39,1±1,0	36,1±0,5

**Tabelle 7:** Dargestellt sind die absoluten Werte ± Standardabweichung der Anzahl der CD4+/TCR+ T-Lymphozyten der FACS-Analyse für Niere, Blut, Lymphknoten und Milz zu jeweils beiden Untersuchungszeitpunkten. (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

Tabelle 8

<b>Signifikanzen (p-value) der Anzahl CD4+/TCR+T-Lymphozyten</b>		
	1.Tag	3.Tag
<b>Niere</b> CoPP vs.		
Kontrolle	<b>0,042</b>	d.n.s.
ZnPP	d.n.s.	d.n.s.
<b>Blut</b>		
Kontrolle	d.n.s.	d.n.s.
ZnPP	d.n.s.	d.n.s.
<b>Milz</b>		
Kontrolle	d.n.s.	<b>0,016</b>
ZnPP	d.n.s.	<b>0,029</b>
<b>Lymphknoten</b>		
Kontrolle	<b>0,019</b>	d.n.s.
Znpp	d.n.s.	<b>0,029</b>

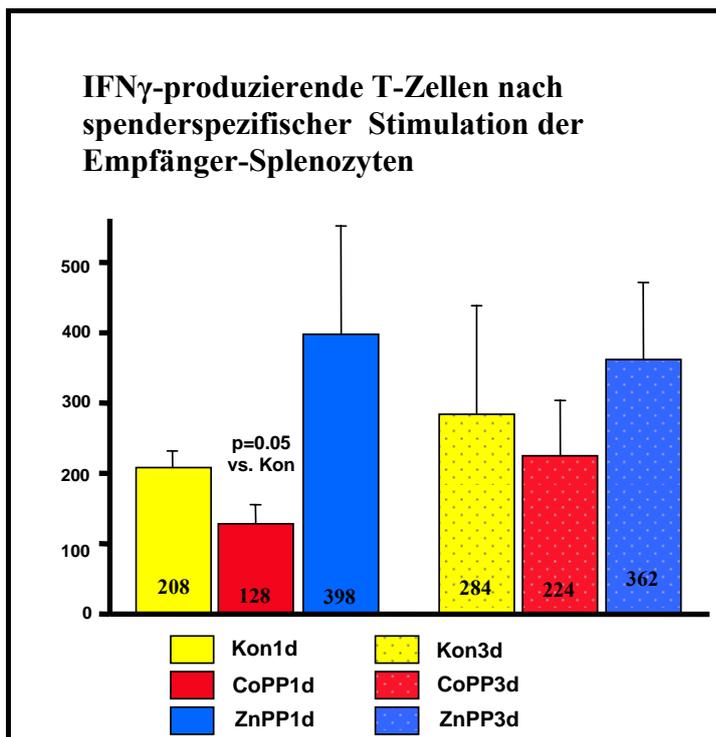
**Tabelle 8:** Dargestellt sind die statistischen Signifikanzen (p-value) der CD4+/TCR+ T-Lymphozyten. Signifikante Werte wurden fett hervorgehoben. d.n.s.=deutlich nicht signifikant

Anders als in der weniger sensitiven Immunhistologie, zeigt sich in der FACS-Analyse der CD4+-T-Zell-Rezeptor+ T-Lymphozyten eine Reduktion dieser Zellinfiltrate in allen Organen zu beiden Versuchenden. Signifikant ist diese Reduktion der CoPP-behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe jedoch nur im Transplantat (Tag 1), der Milz (Tag 3), sowie im Lymphknoten (erster postoperativer Tag). Eine signifikante Senkung im Vergleich zur ZnPP-behandelten Gruppe ist nur in der Milz (Tag3), sowie am dritten postoperativen Tag im Lymphknoten (Tabelle 8) erkennbar. Auch ist im Lymphknoten der einzige Anstieg der CD4+/TCR+ T-Lymphozyten in der ZnPP-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (nicht tabellarisch dargestellt) nachweisbar (Kon vs. ZnPP 3d:  $57,5 \pm 0,9$  vs.  $62,7 \pm 0,6$   $p=0,016$ ), in den anderen ausgewerteten Organen kommt es zu einer verminderten Anzahl der CD4+/TCR+ infiltrierenden Zellen im Vergleich von Kontroll- und ZnPP-Gruppe.

### 4.3. Ergebnisse des Enzym-linked Immunospot (Eli-Spot)

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Daten der Gesamt-T-Zell-Population und der Bestimmung von Interferon-(IFN) $\gamma$  im Eli-Spot konnte die IFN  $\gamma$  -produzierende alloreaktive T-Zell-Population der Milz errechnet werden.

Abbildung 20



**Abbildung 20:** Dargestellt sind die alloreaktiven IFN $\gamma$ -produzierenden T-Zellen der Empfängermilz als absolute Zellzahl /  $10^6$  T- Zellen an jeweils beiden Versuchenden (ein bzw. drei Tage) . Kon= Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP=Cobaltprotoporphyrin, ZnPP=Zinkprotoporphyrin, IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ . (n = 5 in jeweils allen Gruppen)

Tabelle 9

#### Statistischer Vergleich alloreaktiver IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen

	Kon	ZnPP
CoPP 1Tag	<b>p=0,05</b>	n.s.
CoPP 3Tage	n.s.	n.s.

**Tabelle 9:** Statistische Analyse nach dem Students-T-Test der IFN  $\gamma$  -produzierenden Milzlymphozyten, Kon= Kontrolle (unbehandelte Gruppe), CoPP=Cobaltprotoporphyrin, ZnPP=Zinkprotoporphyrin, IFN $\gamma$ =Interferon- $\gamma$ . Signifikante Werte sind fett hervorgehoben.

Tabelle 10

	1Tag	3Tage
Kontrolle	208,3 $\pm$ 23,6 / $10^6$	284,0 $\pm$ 154,7 / $10^6$
CoPP	128,3 $\pm$ 27,3 / $10^6$	224,8 $\pm$ 78,99 / $10^6$
ZnPP	398 $\pm$ 154,2 / $10^6$	362,0 $\pm$ 109,6 / $10^6$

Tabelle 10: Dargestellt sind die alloreaktiven IFN $\gamma$ -produzierenden T-Zellen der Empfängermilz/  $10^6$  T- Zellen  $\pm$  Standardabweichung zu jeweils beiden Versuchenden.

Aus Abbildung 20/Tabelle 10 ist ersichtlich, dass mit Hilfe der CoPP-Vorbehandlung die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden alloreaktiven T-Zellen reduziert werden kann. Am Tag 1 ergibt sich eine signifikante Verminderung dieser Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, ZnPP kehrt diesen Effekt um, allerdings wird aufgrund der hohen Standardabweichung das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Am dritten postoperativen Tag ist ein nicht signifikanter Trend erkennbar. Auch hier liegt keine Signifikanz vor (siehe Tabelle 9 ).

## **5. Diskussion**

Die akute Abstoßung wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und durch Moleküle wie z.B. Chemokine und Adhäsionsmoleküle getriggert.

Es ist bekannt, dass es bei der Durchführung der Transplantation zu einem Ischämie/Reperfusionsschaden kommt, welcher zu einer akuten Inflammation führt. Aufgrund dieser Inflammation kommt es zu einer Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinsekretion (IL-1, IL-6, IL-8) der Endothelzellen, welche zu einer Aktivierung und Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen führt (60).

Die wichtigsten Klassen der Adhäsionsmoleküle, welche in die Lymphozytenerkennung involviert sind, gehören der Familie der Immunglobuline an. Dazu zählen die Selektine - Oberflächenmoleküle, die an Oberflächen-Karbonhydrat binden und für das Leukozytenhoming in spezifisches peripheres Gewebe von Bedeutung sind. Sowohl auf Gefäßendothel (E-Selektine) als auch auf Leukozyten (L-Selektine) werden diese Adhäsionsmoleküle exprimiert.

Eine weitere Gruppe der Adhäsionsmoleküle sind die Integrine, die infolge von Entzündungsreaktionen die Immunantwort vermitteln können. Alle T-Zellen exprimieren LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1), von dem angenommen wird, dass es das wichtigste Adhäsionsmolekül im Rahmen der Lymphozytenaktivierung darstellt. Diese Annahme resultiert aus dem Nachweis der Aktivitätsinhibition von nativen und Effektor T-Zellen durch LFA-1- Antikörper. Auch auf Neutrophilen und Makrophagen wird LFA-1 exprimiert.

In einer späten Phase der T-Zell-Aktivierung wird eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, VLA (very late activation antigen), welche wichtig für die Rekrutierung von Effektor T-Zellen zu ihrem Zielgewebe sind, exprimiert. Drei sich sehr ähnelnde interzelluläre Adhäsionsmoleküle, ICAM-1, 2 und 3 können mit LFA-1 eine Bindung eingehen. Eine weitere Interaktion besteht zwischen VLA-4, exprimiert vor allem auf Effektor T-Zellen und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule). ICAM-1 und ICAM-2 werden auf Endothel aber auch auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Eine Bindung zwischen Endothelzellen und Lymphozyten erlaubt diesen die Blutgefäßwand zu durchdringen und in peripheres Gewebe einzuwandern (61).

Penefield et al. beschreiben, dass allein die Schädigung der Niere durch die Transplantation, unabhängig von Abstoßungsreaktionen, für die Einwanderung von Empfänger MHC-II-positiven Leukozyten in das Transplantat verantwortlich ist. Ein Teil dieser MHC-II-positiven Leukozyten konnten als dendritische Zellen identifiziert werden (62).

Ziel unseres Versuches war es, in einem Rattentransplantationsmodell den Einfluss des immunmodulatorischen Enzyms Hämoxigenase-1 auf die dendritischen Zellen bei verlängerter kalter Ischämie zu evaluieren und die akute Abstoßungsreaktion zu minimieren. Im Besonderen sollte der Einfluss einer CoPP-Spendervorbehandlung zur Induktion der HO-1 auf die Anzahl donor-assoziiertes dendritischer Zellen untersucht werden.

Wie Morelli et al. zusammenfassend beschreibt, existieren zwei Wege der Antigenpräsentation und -erkennung durch dendritische Zellen (63).

Zum einen erkennen Empfänger CD8+ (zytotoxische)-T-Zellen direkt fremde MHC-Moleküle und führen nach Aktivierung zur Lyse des fremden Gewebes. Dieser Mechanismus wird direkte Alloerkennung genannt. Bei der indirekten Form der Alloerkennung werden CD4+ T-Zellen des Empfängers durch prozessierte polymorphe Fragmente von Spender-MHC aktiviert. Diese Fragmente werden auf den eigenen MHC-Molekülen der Empfänger dendritischen Zellen präsentiert (64).

Obwohl beide Mechanismen eine Rolle in der akuten Abstoßungsreaktion spielen, konnte in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden, dass die T-Zell-Antwort durch direkte Stimulation im Laufe der Zeit nach der Transplantation sinkt und im Gegensatz dazu die indirekte Stimulation konstant bleibt bzw. zunimmt (23, 24,102).

Die Rolle, welche das Hämoxigenasesystem bei der Transplantation spielt ist vielschichtig (46).

1. Bei fast allen Transplantationen entsteht sowohl ein I/R-Schaden, welcher die Bildung von ROS (reactive oxygen species) zur Folge hat, sowie ein zytokinabhängiger inflammatorischer Schaden. Dieser verschlechtert nicht nur frühe postoperative Dysfunktionen, sondern führt auch zu einer gesteigerten chronischen Abstoßung (31). Schon vielfach beschrieben ist der antioxidative Effekt des HO-1- Systems, welcher vor allem durch das Abbauprodukt Biliverdin vermittelt wird (34).

Der positive Einfluss einer verstärkten HO-1-Expriemierung auf die Transplantatfunktion wurde nach Transplantation von verschiedenen Organen

nachgewiesen, u.a. nach Herz-, Leber-, Niere-, Dünndarm- und Inselzelltransplantation (65, 66, 67, 68, 69).

2. Auch die Verbesserung der Mikrozirkulation durch CO, einem weiteren Abbauprodukt des Häms kann zu einer verbesserten Organfunktion beitragen. In einem Maus-Ratte Xenotransplantationsmodell des Herzens wurde beschrieben, dass CO neben einem vasodilatativen Effekt auch die Plättchenaggregation vermindert (70).
3. In mehreren Veröffentlichungen wurde im Rahmen von chronischen Allotransplantat-Modellen gezeigt, dass eine HO-1 Überexpression zu einer verminderten Apoptose im Transplantat führt, welche einen Schlüsselmechanismus der Organverschlechterung nach Reperfusion darstellt (71).
4. Der Mechanismus, dem in unserem Experiment die größte Bedeutung zu kommt, ist die antiinflammatorische und immunmodulatorische Potenz der HO-1 nach Überexpression durch Gabe von Metalloporphyrinen oder immunmodulatorischen Peptiden (72). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass Metalloporphyrine bzw. immunmodulatorische Peptide aber auch die Aktivität der NOS (Stickstoffmonoxide-Synthetase) modulieren (73), die einer HO-1-Expression und deren Wirkungen entgegenwirken kann. Die Effekte der Metalloporphyrine können zudem HO-1 unabhängig vermittelt werden (74).

Es wurde bereits vor einiger Zeit gezeigt, dass die HO-1 immunmodulatorisch wirkt. In einem Rattenmodell der akuten Entzündung im Rahmen einer Typ III- (Arthus)-Reaktion bzw. Typ IV Hypersensitivitätsreaktion wurde von Willis et al. eine erhöhte Expression von HO-1 in polymorphnukleären Zellen (Granulozyten) bzw. mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) beschrieben (75). Es wurde nachgewiesen, dass die Aktivität und Expression der HO-1 am größten ist, wenn die Entzündungsreaktion rückläufig ist, somit wurde postuliert, dass dieser Expressionsanstieg einen endogenen antiinflammatorischen Mechanismus auslöst.

Eine modifizierte Zellimmunantwort durch den Einfluss einer HO-1 Überexpression auf die dendritischen Zellen wurde auch in einem Herztransplantationsmodell der Ratte beschrieben. In diesem Modell kam es zu einem verbesserten Langzeitüberleben nachdem die Ratten mit einem HO-1-codierenden Adenovirus beimpft worden waren (76). Die Autoren vermuteten hinter diesen Ergebnissen eine veränderte Transduktion der Spender und/oder Empfänger

antigenpräsentierenden Zellen nach HO-1-Induktion, welche von einer Migration dieser Zellen in die Milz und einer verminderten allogenen Immunantwort gefolgt wurde.

In unseren Experimenten ergab die durchflusszytometrische Analyse der transplantierten Niere einen signifikanten Unterschied der Anzahl spenderabhängiger dendritischer Zellen der CoPP-behandelten Gruppe gegenüber der ZnPP- Gruppe am ersten postoperativen Tag sowie gegenüber Kontrollgruppe und ZnPP-behandelter Gruppe am dritten Tag postoperativ.

Auch die Betrachtung der Peripherie (Blut, Lymphknoten und Milz) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen an Tag 1 post transplantationem im Vergleich zu unbehandelten Spenderkontrolltieren.

In den untersuchten Organen konnte jedoch keine signifikant erhöhte Frequenz spenderabhängiger dendritischer Zellen nach ZnPP-Vorbehandlung nachgewiesen werden; die Wirkung der HO-1 konnte in diesen Tieren nicht durch den HO-1 Inhibitor ZnPP vollständig aufgehoben werden. Am Tag 1 post OP waren hier die Unterschiede zwischen CoPP- und Kontrollgruppen ausgeprägter als zwischen CoPP- und ZnPP- behandelten Tieren.

Die immunhistologischen Untersuchungen spiegelten dieses Ergebnis wieder. Hier konnten wir nach HO-1-Induktion durch CoPP eine signifikante Infiltrationsreduktion von OX-62+ dendritischen Zellen an beiden Versuchenden, sowie von CD86+ antigenpräsentierenden Zellen am ersten postoperativen Tag zeigen.

Diese Ergebnisse korrelieren mit neu gewonnenen Ergebnissen von Chauveau et al. (77).

Dort wurden erstmals bestimmte Subpopulationen dendritischer Zellen (u.a. humane native DZs, isolierte DZs der Rattenmilz und dendritische Zellen des Knochenmarks der Ratte) in einem in vitro Experiment auf die Expression von HO-1 untersucht. Es zeigte sich, dass bestimmte Subpopulationen in einem unreifen Stadium HO-1 produzieren, reife DZs jedoch nicht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der HO-1 durch CoPP eine lipopolysaccharid-induzierte Reifung der DZs unterbindet und in der Folge die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-12p40, IL-6, TNF- $\alpha$ ) gesenkt, jedoch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 weiterhin sezerniert wird. IL-10 spielt unter anderem bei der Induktion einer T-Zell Toleranz eine bedeutende Rolle (78). Eine Studie von Lee et al. lässt vermuten, dass die antiinflammatorischen Funktionen von IL-10 über HO-1 vermittelt werden (79). Dies wird allerdings kontrovers diskutiert, da unterschiedliche Zellsignalwege bei den antiinflammatorischen Wirkungen von IL-10 bzw. HO-1 involviert sind (80).

In einer „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) wurde in der gleichen Versuchsreihe von Chauveau gezeigt, dass nach einer HO-1 Stimulation durch CoPP die IFN- $\gamma$  Produktion bzw. die alloreaktive T-Zell-Proliferation deutlich vermindert war.

Dieses Ergebnis korreliert mit den eigenen Ergebnissen der Elispot-Untersuchung zur Bestimmung der T-Zell-Alloreaktivität, durch die Bestimmung von intrazellulärem IFN $\gamma$  nach donor-spezifischer Stimulation von Empfängerlymphozyten. Hier fanden wir eine signifikant verminderte Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen am ersten Tag. Auch am dritten postoperativen Tag fand sich eine Reduktion dieser Zellen, allerdings ohne signifikanten Unterschied.

Als HO-1 Inhibitor wurde in den Versuchsreihen von Chauveau et al. Zinnprotoporphyrin-(SnPP) verwendet. Interessanterweise hat SnPP keinen Einfluss auf die untersuchten Größen, das heißt, dass eine HO-1 Blockade nicht die Reifung von dendritischen Zellen unterdrückt. Dieser Effekt bestätigte sich auch in unseren Untersuchungen bei Verwendung des HO-1 Inhibitors ZnPP (81).

Obwohl die Daten von Chauveau mit unseren gewonnenen Daten übereinstimmen (77), vermuten wir, dass nicht nur die Reifungshemmung der dendritischen Zellen die Immunogenität des Transplantates vermindert, sondern dass die Induktion der HO-1 einen antiproliferativen Effekt auf diese Zellen ausübt.

Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe Chauveau et al. haben wir in der FACS-Analyse ausschließlich OX62 als Marker für alle dendritischen Zellen unabhängig vom Reifungsgrad verwendet. In der oben erwähnten Studie wurden reife dendritische Zellen mit anti-MHC-II, anti-CD80 und anti-CD86 gefärbt und dargestellt.

Trotz der alleinigen Färbung mit OX 62 ließ sich eine Reduktion dieser Zellen nach CoPP-Behandlung nachweisen, was antiproliferativen Mechanismen zugrunde liegen könnte.

Dass eine HO-1-Induktion zu antiproliferativen Effekten führt wurde schon mehrfach an glatten Muskelzellen der Gefäße (VSMC) gezeigt. Choi et al. beschrieben z.B. 2004 diesen Effekt bei Ratten (82). Die Gabe von Paclitaxel, einem potenten HO-1-Induktor, resultierte in einer verminderten VSMC-Proliferation. Die Autoren vermuten, dass HO-1 bzw. die HO-1 katalysierte Freisetzung von CO eine PDGF-abhängige (platelet derived growth factor), d.h. eine wachstumsfaktorabhängige Zellproliferation unterdrückt. Es ist zu vermuten, dass ein ähnlicher Effekt bei der Proliferation dendritischer Zellen eine Rolle spielt, und auch hier die antiproliferative Wirkung über Wachstumsfaktoren, z.B. granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF) gesteuert wird.

In einem Versuch von Ducker et al. zeigte sich ebenfalls eine verminderte VSMC-Proliferation nach HO-1-Inhibition in vitro und in vivo (36), welche sich auf eine G1/S Arrestphase und eine vermehrte Aktivität des Zyklinkinase-Inhibitors p21<sup>cip1</sup> zurückführen ließ. Weiterhin wurde eine verminderte Aktivität von E2F-1 gemessen. Dieses Molekül ist für einen geregelten Zellzyklus essentiell indem es Zykline und die DNA-Polymerase reguliert (83).

Weiterhin ist beschrieben, dass das HO-1-System einen Effekt auf das Homing von Neutrophilen und Monozyten ausübt, welches durch verschiedene Adhäsionsmoleküle gesteuert wird. In einem endotoxischen Modell konnte nach vermehrter HO-1-Aktivität in Lunge, Niere und Leber eine veränderte Expression von P- und E-Selektin nachgewiesen werden, die in einer veränderten Leukozyteninfiltration resultierte (84).

Eine HO-1 vermittelte Zytoprotektion verminderte in Herz, Leber und Niere die Leukozyteninfiltration (70, 66, 31). Auch veränderte Leukotrinmuster vermindern die Leukozyteninfiltration. So wurde gezeigt, dass HO-1 bzw. das Endprodukt CO in der Lage ist u.a. IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 und macrophage inflammatory protein-2 in hypoxischen Lungen von HO-1 transgenen Mäusen zu senken (85).

Zusammenfassend lässt sich die Reduktion spenderstämmiger dendritischer Zellen und die damit verbundene Reduktion der direkten Alloerkennung nach Induktion der HO-1 durch CoPP, durch eine Reifungshemmung dieser Zellen, durch eine Proliferationshemmung und ein verändertes Adhäsionsmolekül- und Chemokinmuster, welches zu verminderter Infiltration führt, erklären. Wahrscheinlich hat die Inhibition der HO-1 durch ZnPP keinen entscheidenden Einfluss auf die Reifung oder Proliferation, dies spiegeln auch unsere gewonnenen Ergebnisse wieder. Vielmehr ist eine direkt zytotoxische Wirkung von Zinkprotoporphyrin IX beschrieben worden (86), so dass möglicherweise eine gesteigerte Proliferation durch HO-1-Inhibition und die zytotoxische ZnPP-Wirkung nahezu im Gleichgewicht stehen.

Neben der verminderten Zahl spenderabhängiger dendritischer Zellen konnten wir in unserem Versuch auch eine reduzierte Zahl von Makrophagen nachweisen. So waren die Anzahl ED1+ Makrophagen in der immunhistologischen Untersuchung am ersten postoperativen Tag signifikant gesenkt.

Auch diese Reduktion ist mit den oben erwähnten Mechanismen, wie Proliferationshemmung, verändertes Adhäsionsmolekül- und Chemokinmuster und dem damit verbundenen

veränderten Homing-Effekt zu erklären. Ebenso führt ein durch HO-1 Überexpression reduzierter I/R Schaden zu einer verringerten Makrophageninfiltration (62, 87).

Mit Kenntnis der immunmodulatorischen Wirkung der HO-1 auf dendritische Zellen ist das Verhalten dieser spenderspezifischen Zellen in unserem Experiment zu erklären. Jedoch scheint die Reduktion der Anzahl dendritischer Zellen des Empfängers nach Spender- CoPP-Gabe neben den beschriebenen Mechanismen (Reifungs- und Proliferationshemmung, Änderung des Adhäsionsmolekül- und Chemokinmusters) weiteren Mechanismen zu unterliegen.

In unserem Versuch wurden die empfängerabhängigen DZs nicht spezifisch angefärbt, sondern indirekt in der FACS-Analyse dargestellt (OX62+ RT1<sup>ab</sup>- ; Erklärung: siehe Seite 41).

Wir fanden in allen Organen zu beiden Beobachtungszeitpunkten eine signifikante Reduktion empfängerstämmiger dendritischer Zellen.

Es ist bekannt, dass es aufgrund des Ischämie/Reperfusionsschaden aber auch durch die intraoperative Schädigung bei der Transplantation zu einer stressbedingten Ausschüttung von ROS (reactive oxygen species) kommt (88, 89, 90,103). ROS aktivieren über mehrere Pfade verschiedene Gene, u.a. auch Onkogene, die als Effektoren im apoptotischen Zelltod eine Rolle spielen. Die p53-Kinase, welche durch freie Radikale aktiviert wird, aktiviert ihrerseits verschiedene Gene (z.B. Fas/Apo-1, DR-4/5), welche zur Apoptose führen können (91, 101).

1992 konnte durch Maines et al. das erste Mal gezeigt werden, dass HO-1 durch einen I/R Schaden induzierbar ist (88).

Als mögliche Aktivatoren dieses Enzyms wurden schon damals ROS angenommen. Dies konnte in verschiedenen späteren Versuchen bestätigt werden.

Durch die Überexpression der HO-1 kann diesem, durch ROS entstandenen Schaden via Biliverdin, einem stark antioxidativ wirkenden Endprodukt des Hämabbaus, entgegengewirkt werden. Durch die Reduktion der ROS kommt es zu einer verringerten Apoptoserate und somit zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration.

Ob diese antiapoptotischen Effekte jedoch tatsächlich HO-1- abhängig sind, bleibt in unserer Arbeit weiterhin ungeklärt.

In unseren Versuchen fanden wir in der FACS-Analyse der Niere am jeweils ersten und dritten postoperativen Tag im Vergleich der ZnPP-behandelten zur unbehandelten

Kontrollgruppe eine verminderte Infiltration dendritischer Zellen des Empfängers sowie eine Reduktion der infiltrierenden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Auch die immunhistologischen Untersuchungen für ED1<sup>+</sup>-Monozyten/Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten unterstützen die Ergebnisse einer verringerten Transplantatinfektion nach ZnPP-Vorbehandlung.

Diese Resultate geben möglicherweise ein Hinweis darauf, dass der antiapoptotische Effekt und die folgende Infiltration nicht ausschließlich über HO-1 gesteuert werden, sondern vielmehr über die Metalloporphyrine CoPP und ZnPP selbst.

Blumenthal et al. untersuchten den Caspase-3 und -8 abhängigen Zelltod und stellten fest, dass dieser unabhängig von HO-1 durch verschiedenen Metalloporphyrine u.a. CoPP und ZnPP inhibiert werden kann (44). Anhand dieser Resultate lässt sich erklären, weshalb in unseren Versuchen die Lymphozyteninfiltration der Niere nach HO-1-Inhibition durch ZnPP nicht ansteigt.

Zusammenfassend kann danach angenommen werden, dass die Reduktion empfängerspezifischer dendritischer Zellen nach CoPP-Behandlung von verschiedenen Mechanismen abhängig ist:

1. der Reifungshemmung der DZs
2. der Proliferationsminderung der DZs
3. der Migrationsmodulation der DZs nach Veränderung des Adhäsionsmolekül- und Chemokinmusters
4. der Verringerung der Infiltration durch einen gemilderten I/R-Schaden sowie eine Apoptosereduktion.

Desweiteren beobachteten wir Unterschiede in der Frequenz CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach CoPP-Vorbehandlung. So war in der Niere (1. Tag), der Milz (3. Tag) und der Lymphknoten (1. und 3. Tag) die Anzahl dieser Zellen nach CoPP-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutlich verringert. Es fand sich auch hier, mit Ausnahme der Lymphknoten am 3. postoperativen Tag, keine Umkehr des Ergebnisses nach ZnPP-Applikation.

Die hier beschriebenen Ergebnisse der FACS-Analyse stimmen leider nicht mit denen der immunhistologischen Untersuchungen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen überein. Immunhistochemisch konnte keine Reduktion dieser Zellen nach HO-1-Induktion gemessen werden. Eine deutliche Reduktion konnte hier allerdings für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden.

Eine Verminderung CD4<sup>+</sup>T-Zellen ist zum einen von der Frequenz dendritischer Zellen abhängig. Durch eine Reduktion von DZs, kommt es in den sekundären Lymphorganen zu einer reduzierten indirekten Antigenpräsentation und damit zu einer reduzierten CD4<sup>+</sup>T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Infiltration. Zum anderen hat die HO-1 aber auch eine direkte Wirkung auf diese Zellpopulation.

Dass die T-Zell-Proliferation nach Gabe des Hämabbauproduktes Kohlenstoffmonoxide (CO) gehemmt werden kann, wurde mehrfach beschrieben. Martins et al. beschrieben nach oraler Gabe von Methylenchlorid, welches in der Leber unter anderem zu CO metabolisiert wird, ebenfalls eine Reduktion der spenderstämmigen dendritischen Zellen sowie verminderter CD4<sup>+</sup>T-Zellen (105). Jedoch scheint diese Proliferationshemmung unterschiedlichen molekularen Mechanismen zu unterliegen.

CO ist in der Lage die Proliferation der T-Lymphozyten durch eine Zellzyklusblockade über den Guanylatzyklase/cGMP- Pathway zu hemmen, allerdings nur solange T-Lymphozyten noch nicht durch ein Antigen stimuliert wurden und der Zellzyklus schon in Gang gesetzt wurde (92). Hierzu beschrieben Hyun-Ock Pae et al. eine verminderte IL-2 Sekretion in isolierten anti-CD3-/anti CD28-Antikörper stimulierten humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach CO-Begasung. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten, welcher nach Stimulation sezerniert wird. Interessanter Weise scheint CO den bereits aktivierten Zellzyklus nicht blockieren zu können, so dass der antiproliferative Effekt von CO der verminderten IL-2-Sekretion zugeschrieben wird (92).

Die Autoren vermuten, dass diese IL-2-Reduktion durch verschieden so genannte Mitogen-Kinasen (mitogen-activated protein kinase- MAPK), welche durch Mitogene aktivierbar sind, vermittelt wird.

MAP-Kinasen werden in drei Subgruppen unterteilt: „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK), „Jun NH<sub>2</sub> –terminal kinase“ (JNK) und „p38-Kinase“ (93). Alle drei MAP-Kinasen sind durch HO-1/CO suppressierbar und an der Modulation unterschiedlichster biologischer Effekte beteiligt. ERK scheint die entscheidende MAP-Kinase in der Transkriptions- und Sekretionsregulation von IL-2 zu sein.

Die Arbeitsgruppe Song et al. macht andere Mechanismen für die Proliferationshemmung verantwortlich (94). In ihrem Modell wurden anti-CD3-Antikörper stimulierte T-Lymphozyten der Maus verwendet und mit CO begast. Eine verminderte Caspase-3/Caspase-8- Aktivität bei fehlender Zellproliferation war die Folge (94). Es ist vielfach beschrieben, dass Caspasen, die eine wichtige Rolle in der Regulation des apoptotischen Zelltodes spielen,

auch für die Kontrolle der Proliferation und des Zellzyklus von T-Lymphozyten von Bedeutung sind (95). Auch ihr Einfluss auf die IL-2-Sekretion wurde gezeigt (96).

Song et al. vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen, dass der MAP-Kinase-Weg bei der Proliferationshemmung keine Rolle spielt. Vielmehr wird angenommen, dass CO den Zellzyklus über den Zellzyklusinhibitor p21<sup>cip1</sup> hemmt, und dies mit einer Reduktion der Caspase-Aktivität assoziiert ist.

Insgesamt unterliegt die Proliferationshemmung der T-Lymphozyten vielen verschiedenen bisher noch nicht vollständig geklärten Mechanismen. Von großer Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der IL-2 Produktion sein.

Obwohl die eigenen Ergebnisse einer Reduktion von T-Lymphozyten nach HO-1 Induktion die einer Hemmung der T-Zell-Proliferation durch CO unterstützen, bleibt auch hier unklar, welchen Einfluss die Metalloporphyrine CoPP und ZnPP selbst ausüben, da die Tiere unserer Versuchsreihe nicht direkt CO ausgesetzt waren. Die Gabe von ZnPP konnte die Effekte nicht umkehren. Somit ist zu vermuten, dass die Proliferationshemmung durch Verminderung der Caspasen vermittelt wurde, da wie oben erwähnt, die Metalloporphyrine per se einen Einfluss auf diese ausüben (44).

Trotz der eigenen Ergebnisse und den Befunden anderer Arbeitsgruppen, welche vermuten lassen, dass eine exogene Hochregulation der HO-1 in Tiertransplantationsmodellen zytoprotektive Effekte ausübt, ist das Fenster, in dem eine HO-1- Überexpression protektiv wirkt, nicht definiert.

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass eine einmalige CoPP-Spendervorbehandlung 24 Stunden vor Transplantation das Überleben, sowie die Langzeitfunktion des Transplantates verbessert (31).

Auch wurde in jüngster Zeit gezeigt, dass eine Erhöhung der HO-1 durch einmalige Gabe von CoPP in hirntoten Ratten zu einer Verlängerung des 3 Monats Überlebens nach Nierentransplantation führte. Selbst gegenüber einer Lebensspende-Kontrollgruppe zeigte sich eine längere Überlebenszeit sowie eine verbesserte Nierenfunktion (104).

Es scheint jedoch möglich, dass eine exzessive Hochregulation der HO-1 zu einer verstärkten I/R-Schädigung führt.

In einer Lebertransplantationsstudie mit hirntoten Spendern führte eine anfänglich sehr hohe HO-1 Expression zu einer späteren schlechteren Leberfunktion (Transaminasen,

Gallensäureproduktion). Hingegen wurden in einer Gruppe mit geringer HO-1 Expression vor Transplantation postoperativ signifikant höhere HO-1-Level gemessen. Umgekehrt sanken die HO-1-Level in der Gruppe mit präoperativ hohen Spiegeln signifikant (97).

Auch in Fibroblastenkulturen konnte gezeigt werden, dass eine leichte HO-1-Induktion zytoprotektiv, eine exzessive Induktion hingegen destruktiv wirkt (98).

Die vermehrte Eisenfreisetzung nach HO-1-Überexpression scheint die Ursache für den erhöhten I/R-Schaden zu sein, da Eisen in der Lage ist, ROS zu generieren.

Ein weiterer Risikofaktor, einer zu starken HO-1-Induktion, ist eine übermäßige Freisetzung des Vasodilatators CO. In einem Modell des akuten Nierenversagens der Maus wurden die hämodynamischen Effekte den zellulär protektiven Effekten gegenübergestellt (99). In diesen Versuchen überwog die verbesserte Hämodynamik den zellulären Mechanismen nach HO-1 Inhibition durch ZnPP.

Ein erhöhter mittlerer arterieller Druck, sowie ein höherer renaler Blutfluss nach ZnPP-Applikation resultierten in einer verbesserten glomerulären Filtrationsrate und somit in einer verbesserten renalen Funktion.

Auch diese Reaktionen scheinen von dem Ausmaß der HO-1/CO Expression abhängig zu sein. CO führt per se zu einer Vasodilatation. In großen Mengen bindet CO an der Stickstoff-Synthase (NOS) und hemmt diese, was zu einer verminderten Produktion des freien Radikals NO führt (100). Niedrige CO-Konzentration führen hingegen zu einer intrazellulären Freisetzung von NO. Auch senkt CO die vaskuläre Reaktivität auf Vasokonstriktoren. Welche Effekte überwiegen, ist unklar, jedoch scheint eine ZnPP-Gabe in einem Tiermodell des akuten Nierenversagens die vasodilatative Wirkung von CO zu vermindern und die Nierenfunktion zu verbessern.

Es muss in weiteren Versuchen geklärt werden, welche HO-1 Effekte bei der Transplantation von Organen von zentraler Bedeutung sind. Besonders wichtig ist die Bestimmung des therapeutischen Fensters, in welchem die Hämoxigenase protektiv wirksam ist. Auch die molekularen Mechanismen der Wirkweise der HO-1, sowie ihrer Induktoren und Inhibitoren müssen geklärt werden bevor dieses Enzym einer klinischen Applikation zugänglich gemacht werden kann. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass die molekularen Mechanismen, welche im Rahmen der HO-1-Expression von Bedeutung sind, in den verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägt sein können. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine LPS-Stimulation in Makrophagen der Maus eine HO-1 Induktion bewirkt, der gleiche Stimulus aber auf humane myeloide Zellen keinen Einfluss hat (79,80).

Zusammenfassend konnte in unserem Versuch gezeigt werden, dass es nach Spendervorbehandlung mit Cobaltprotoporphyrin zu einer Induktion der HO-1 kommt, welche in einer verminderten Immunogenität des Organs resultiert. Die verminderte Immunogenität basiert auf einer Reduktion spenderspezifischer dendritischer Zellen aber auch einer Senkung der Anzahl dendritischer Zelle des Empfängers. Des Weiteren konnte eine verminderte Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten gemessen und somit eine verringerte T-Zell-Alloreaktivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine zum Teil signifikante Reduktion transplantatinfiltrierender CD4 $^{+}$ -Zellen, CD8 $^{+}$ -Zellen und ED1 $^{+}$ -Monozyten/Makrophagen beobachtet.

## **6. Zusammenfassung**

Die Transplantation stellt aktuell die Therapie der Wahl bei irreversiblen Organversagen dar. Nach wie vor ist hierbei das chronische Organversagen das Hauptproblem in der Transplantationsmedizin. Obwohl die Ein-Jahres Erfolgsraten deutlich gestiegen sind, weisen die Langzeitergebnisse weiterhin unbefriedigende Ergebnisse auf.

Die Ursachen des chronischen Transplantatverlustes und der Funktionseinschränkung sind multifaktoriell und schließen alloantigen-spezifische und alloantigen-unabhängige Faktoren ein. Bedeutende alloantigen-unabhängige Ursachen sind das Spenderalter, Vorerkrankung, Hirntod sowie Ischämie/Reperfusionsschaden. Es ist bekannt, dass alloantigen-spezifische Mechanismen durch alloantigen-unabhängige Faktoren akzeleriert werden können und so eine akute Abstoßung durch eine erhöhte Immunogenität des Organs fördern.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Induktion der Hämoxigenase-1 zytoprotektiv, d.h. antiinflammatorisch, antioxidativ, antiapoptotisch aber auch immunmodulatorisch wirkt, und zu verbesserten Herz, Leber und Dünndarm-Transplantatüberlebenszeiten führt.

Die Hämoxigenase existiert ubiquitär und katalysiert den oxidativen Hämabbau in Biliverdin, Eisen und CO. HO besteht aus mehreren Isoformen: die induzierbare HO-1, die HO-2 und die noch nicht genau definierte HO-3. Das Hitzeschockprotein HO-1 kann durch verschiedene Stimuli, u.a. Hypoxie, Hormone, Endotoxine, Schwermetalle, freie Radikale und Häm, aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass Protoporphyrine, im besonderen Cobaltprotoporphyrin (CoPP), zu einer lang anhaltenden Hochregulation der HO-1-Expression führen. Zinkprotoporphyrin hingegen wirkt als starker Inhibitor.

Ziel dieses Experimentes war es zu überprüfen, ob die protektiven Effekte der HO-1 auch mit einer verminderten Allotransplantat-Immunogenität in einem akuten Abstoßungsmodell der Ratte assoziiert sind.

Dazu wurden Nieren von DA-Ratten in unbehandelte Lew-Ratten transplantiert. 24 Stunden vor Organentnahme wurde den Spendern CoPP (5mg/kg KG) zur Induktion der HO-1 bzw. ZnPP IX (20mg/kg/KG) zur HO-1 Inhibition intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt.

Die zu analysierenden Proben des Transplantates, der mesenterialen Lymphknoten, der Milz und des Blutes wurden am ersten bzw. dritten postoperativen Tag entnommen. Spenderspezifische MHC-Klasse II+-dendritische Zellen (DZ) wurden mittels haplotyp-

spezifischen monoklonalen Antikörper durchflusszytometrisch (RT1<sup>ab</sup>, OX62+) bestimmt. Zusätzlich wurden relevante Oberflächenmarker (CD4/CD8+, ED1-Monozyten, MHC class II+, CD86+-DZ) immunhistochemisch quantifiziert. Die Anzahl alloreaktiver T-Zellen wurde im Elispot ermittelt.

In der FACS-Analyse zeigten unbehandelte Kontrollen im Transplantat eine große Anzahl spenderspezifischer DZs am Tag 1 und 3. Die HO-1-Induktion konnte die Anzahl spenderabhängiger dendritischer Zellen im Transplantat signifikant reduzieren, während eine Blockade der HO-1 durch ZnPP diese Effekte nicht vollständig umkehren konnte. Obwohl die relative Anzahl der spenderspezifischen DZs in der Peripherie (Milz, LK, Blut) geringer war als im Transplantat, war auch hier eine signifikante Reduktion nach HO-1 Induktion zu beobachten. Die verminderte Anzahl spenderspezifischer DZs war mit einer signifikant reduzierten Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender alloreaktiver T-Lymphozyten assoziiert. In der immunhistochemischen Untersuchung fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und CoPP-Gruppe in der Population der CD86+ (1.Tag) und der OX62+ Zellen (1. und 3.Tag) sowie der ED1+Monozyten/Makrophagen (1.Tag) im Transplantat.

In unserem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass eine einmalige Spenderbehandlung zur Induktion der HO-1 kurz vor der Organentnahme die Immunogenität des Transplantates reduziert. Dies wird durch eine verringerte Frequenz alloreaktiver T-Zellen in unseren Untersuchungen belegt. Eine reduzierte Anzahl spender-spezifischer dendritischer Zellen im Transplantat und in der Peripherie könnte eine verbesserte Transplantatfunktion nach HO-1 Induktion im Spender erklären.

## **7. Literaturverzeichnis**

- 1 Murray JE, Hills W. The successful organ transplants in man. *J Am Coll Surg* 2005; 200; 5-9
- 2 Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, et al. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 1956; 160; 277-82
- 3 Schwartz R, Eisner A, Dameshek W. The Effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *J Clin Invest* 1959; 38; 1394-140
- 4 Lutz J, Stangl M, Heeman U. Nierentransplantation in Deutschland-2002. *Zentralbl Chir* 2003; 128; 816-820
- 5 Reutzel-Selke A, Zschockel T, Denecke C, et al. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transplantation* 2003; 75; 1786-1792
- 6 Ross LF, Rubin DT, Siegler M, et al. Ethics of a paired-kidney-exchange program. *N Engl J Med* 1997; 336; 1752-1755
- 7 Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. *Quasi Niere* 2002; Berlin 22-25
- 8 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605
- 9 United States Renal Data System (USRDS). Annual report 2002, 135-150; <http://www.usrds.org>
- 10 Racusen LC. Antibody-mediated rejection in the kidney. *Transplantation Proceedings* 2004; 36; 768-769
- 11 Racusen LC. The Banff schema and differential diagnosis of allograft dysfunction. *Transplantation Proceedings* 2004; 36; 753-754
- 12 West TH, Turcotte JG, Vander A. Plasma renin activity, sodium balance and hypertension in a group of renal transplant recipients. *J Lab Clin Med* 1969; 73; 564-573
- 13 Velic A, Gabriels G, Hirsch JR, et al. Acute rejection after rat renal transplantation leads to downregulation of Na<sup>+</sup> and water channels in the collecting duct. *Am J Transpl* 2005; 5; 1276-1285
- 14 Birk PE, Matas AJ, Gillingham KJ, et al. Risk factors for chronic rejection in pediatric renal transplant recipients- a single-center experience. *Pediatr Nephrol* 1997; 11; 395-398

- 15 Matas AJ, Sibley R, Mauer M, et al. The value of needle renal allograft biopsy. A retrospective study of biopsies performed during putative rejection episodes. *Ann Surg* 1983; 197; 226
- 16 Van Saase JLCM, van der Woude FJ, Thorogood J, et al. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation* 1995; 59; 1280
- 17 Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9; 2129
- 18 Abele R, Novik AC, Braun WE, et al. Long- term results of renal transplantation in recipients with a functioning graft for 2 years. *Transplantation* 1982; 34; 264
- 19 Yilmaz S, Häyry P. The impact of acute episodes of rejection on the generation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56; 1153-1156
- 20 Tullius SG, Nieminen M, Bechstein WO, et al. Contribution of early rejection episodes to chronic rejection in a rat kidney retransplantation model. *Kidney International* 1998; 53; 465-472
- 21 de Mattos AM, Bennett WM, Barry JM, et al. HLA-identical sibling renal transplantation- a 21- yr single- center experience. *Clin Transplantation* 1999; 13; 158-167
- 22 Suciu-Foca N, Colovai AI, Ciubotariu R, et al. Mapping of HLA-DR determinants recognized via indirect pathway. *Graft* 1999; 2; 28-33
- 23 Mason PD, Robinson CM, Lechler RI. Detection of donor-specific hyporesponsiveness following late failure of human renal allografts. *Kidney Int* 1996; 50; 1019-1025
- 24 Hornick PI, et al. Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. *Circulation* 2000, 101, 2405-2410
- 25 Vella JP, Vos L, Carpenter CB, et al. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation* 1997; 64; 1823
- 26 Guttman RD, Beaudoin JG, Morehouse DD. *Transplantation Proc* 1973; 5; 663
- 27 Soots A, Häyry P. Prolongation of rat cardiac allograft survival by donor pre-treatment. *Transplantation* 1978; 25; 259-264
- 28 Gottmann U, Notheisen A, Brinkkoetter PT, et al. Influence of donor pre-treatment with dopamine on allogeneic kidney transplantation after prolonged cold storage in rats. *Transplantation* 2005; 79; 1344- 1350

- 29 Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol. *Biochem Pharmacol* 1998; 55 (12); 2001
- 30 Berger SP, Hunger M, Yard BA, et al. Dopamine induces the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro. *Kidney Int* 2000; 58 (6), 2314
- 31 Tullius SG, Nieminen-Kelhä M, Buelow R, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with Cobalt-Protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2002; 74; 591-598
- 32 Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364; 1814-1827
- 33 Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999; 17; 58-65
- 34 Maines MD. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37; 517-554
- 35 Maines MD. Mini Review. The heme oxygenase system: Update 2005. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 7; 1761-1766
- 36 Duckers H, Boehm M, True A, et al. Heme-oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 2001; 7 (6); 693
- 37 Buelow R, Tullius SG, Volk HD. Protection of grafts by hemeoxygenase-1 and its toxic product carbon monoxide. *Am J Transplant* 2001; 1; 313-315
- 38 Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon Monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192(7); 1015
- 39 Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1316; 29-34
- 40 Grojean S, Koziel V, Vert P, et al. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 2000; 166; 334-341
- 41 Smith KM, Falk JE. *Porphyryns and meteloporphyryns*, 2 nd Ed.
- 42 Maines MD. Zinc Protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. *Biochem Biophys. Acta* 1981; 673; 339-350
- 43 Shan Y, Pepe J, Lu TH, et al. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyryns. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 380; 219-227
- 44 Blumenthal SB, Kierner AK, Tiegs G, et al. Metalloporphyryns inactivate caspase-3 and -8. *FASEB J* 2005; 19; 1272-1279

- 45 Saas G, Soares MC, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; 38; 909-918
- 46 Katori M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74; 905-912
- 47 Ogden AD, Sitprija V, Holmes JH. Function of the renal homograft in man immediately after transplantation. *Am J Med* 1965; 38; 873-882
- 48 Velic A, Hirsch J, Bartel J, et al. Renal transplantation modulates expression and function of receptors and transporters of rat proximal tubulus. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15; 967-977
- 49 Kwon T-H, Frokiaer J, Han JS, et al. Decreased abundance of major Na<sup>+</sup> transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278; F925-F939
- 50 Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research, with special references to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58; 904-914
- 51 Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: An appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery* 2003; 23; 387-394
- 52 Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline Phosphatase (APAAP complexes). *Histochem Cytochem* 1984; 32(2); 219-29
- 53 Hexel K. Unterlagen FACScan-Kurs, DKFZ Tumorimmunologie
- 54 Ricci G, Presani G, Guaschino S, et al. Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Human Reproduction* 2000; 15; 1329-1337
- 55 Visser MJ, Van Lennep AC, Van Bockel JH, et al. Evaluation of various methods to quantify endothelial cells attached to vascular prostheses: comparison with a new "gold standard" FACS method. *J Surg Res* 1996; 61(1); 237-243
- 56 Amano M, Martin JC, McGhee JR, et al. Immunofluorescence-digital image processing system for the quantitation of secreted immunoglobulin by single cells. *J Immunol Methods* 1991; 144(1); 127-140
- 57 Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, et al. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzym-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* 1990; 128(1); 65-73

- 58 Wong CK, Lun SWM, Ko FWS, et al. Increased expression of plasma and cell surface costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD86 in adult patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2005; 141; 122-129
- 59 Pinschewer DD, Ochsenein AF, Odermatt B, et al. FTY720 immunosuppression impairs effector T-cell peripheral homing without affecting induction, expansion and memory. *J Immunol* 2000; 164; 5761
- 60 de Vries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Sem Immunol* 2003; 15; 33-48
- 61 Immunobiology, Fourth Edition, Ch. Janeway et al, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, page 266-269
- 62 Penfield JG, Wang Y, Li S, et al. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. *Kidney International* 1999; 56; 1759-1769
- 63 Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunological Reviews* 2003; 196; 125-146
- 64 Gallon L, Watschinger B, Murphy B, et al. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation* 1995; 59; 612
- 65 Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 2002; 73(2); 287
- 66 Kato H, Amersi F, Buelow R, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 2001; 1(1); 121
- 67 Blydt-Hansen T, Katori M, Lassman C, et al. Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidneys from ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2002
- 68 Squiers E, Bruch D, Buelow R, et al. Pretreatment of small bowel isograft donors with Cobalt-Protoporphyrin decreases preservation injury. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2); 585
- 69 Pileggi A, Molano R, Berney T, et al. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 2001; 50(9); 1983...

- 70 Sato K, Balla J, Otterbein L, et al Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001; 166(6); 4185...
- 71 Ke K, Buelow R, Shen X, et al. Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves allograft survival via carbon monoxide pathway. *Hum Gen Ther* 2002; 13; 1189...
- 72 Iyer S, et al. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84 binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 1998; 273; 2692-2697
- 73 Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 1999; 31; 459-475
- 74 Cuturi MC, et al. RDP1258, a new rationally designed immunosuppressive peptide, prolongs survival in rats: Analysis of its mechanism of action. *Mol Med* 1999; 5; 820-832
- 75 Willis D, Moore AR, Willoughby DA. Heme oxygenase isoforms expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 2000; 190; 627-634
- 76 Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, et al. Induction of long -term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Therapy* 2004; 11; 701-710
- 77 Chauveau C, Rémy S, Royer P, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2005; 106; 1694-1702
- 78 Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159; 4772-4780
- 79 Lee TS, Tsai HL, Chau LY, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-Deoxy-prostaglandin J<sub>2</sub>. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278; 19325-19330
- 80 Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. Heme oxygenase-1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 2004; 76; 719-726
- 81 Drummond GS, Kappas A. Sn-Protoporphyrin inhibition of fetal and neonatal brain heme oxygenase. *J Clin Invest* 1986; 77; 971-976

- 82 Choi BM, Kim YM, Jeong YR, et al. Induction of heme oxygenase-1 is involves in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 321; 132-137
- 83 Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell- derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995; 96(6); 2676
- 84 Vachharajani T, Work J, Issekutz A, et al. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(5); 1613
- 85 Minamino T, Christou H, Hsieh C, et al. Targeted expression of heme oxigenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(1); 8798
- 86 Lutton JD, Abraham NG, Drummond GS, et al. Zinc porphyrins: Potent inhibitors of hematopoieses in animal and human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94; 1432-1436
- 87 Jose MD, Ikezumi Y, Rooijen N, et al. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003; 76; 1015-1022
- 88 Maines MD, Mayer RD, Ewing EF, et al. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: Possible role of heme as both promoter of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 264; 457-462
- 89 WU CJ, Sheu JR, Chen HH, et al. Modulation of monocyte-derived dendritic cell differentiation is associated with ischemic acute renal failure. *J of Surg Res Res* 2005; XX;
- 90 de Vecchi E, Lubatti L, Beretta C, et al. Protection from renal ischemia-reperfusion injury by the 2-methylaminochroman U83836E. *Kidney Int* 1998; 54; 857
- 91 Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biol Med* 1999; 27; 936-944
- 92 Pae HO, Oh GS, Choi BM, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *The J Immunology* 2004; 172; 4744-4751
- 93 Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20; 55

- 94 Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *The J Immunology* 2004 ; 172 ; 1220-1226
- 95 Los M, Stroh C, Janicke RU, et al. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 2001; 22; 31
- 96 Alam A, Cohen LY, Aouad S, et al. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 1999; 190; 1879
- 97 Geuken E, Carlijn IB, Dorien S, et al. Expression of heme oxygenase- 1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation. *American J Transplantation* 2005; 5; 1875-1885
- 98 Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999; 13; 1800-1809
- 99 Poole B, Wang W, Chen YC, et al. Role of heme oxygenase-1 in endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289; 1382-1385
- 100 Thorup C, Jones CL, Gross SS, et al. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but supresses endothelial NOS. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 277; 882-889
- 101 Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, et al. p53-dependent and independent regulation of the death receptor Killer/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 1998; 58; 1593-1598
- 102 Hornick PI, Mason PD, Yacoup MH, et al. Assesment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejections in humans. *Circulation* 1998; 97; 1257-1263
- 103 Rutault K, Alderman C, Chain BM, et al. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 26; 232
- 104 Kotsch K, Francuski M, Pascher A, et al. Improved long term graft survival after HO-1 Induction in brain-dead donors. *American Journal of Transplantation* 2006; 6: 477:486
- 105 Martins PN, Reutzel-Selke A, Jurisch A, et al. Induction of Carbon Monoxide in donor animal prior to organ procurement reduces graft immunogenicity and inhibits chronic allograft dysfunction

- 106 Tilney NL, Whitley D, Diamond JR, et al. Chronic rejection-An undefined conundrum. *Transplantation* 1991; 52; 389-398
- 107 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55; 713-723

## **8. Glossar**

CD- Cluster of Differentiation	NHE- Natrium/Wasserstoff-Transporter
CMV-Cytomegalievirus	I/R- Ischämie-Reperfusion
NBC-Natrium/Bicarbonattransporter	
ED-1- Monozyten-/Makrophagenmarker	
OX3 - Marker MHC-II positive antigenpräsentierende Zellen	
OX62 - Marker für Dendritische Zellen	
OX8 - Marker für CD8+ zytotoxische T-Zellen	
CD86 - Marker für Antigen-präsentierende Zellen	
HO-1 - Hämoxygenase 1	
F-344- Fisher- 344 Ratteninzuchtstamm	
DA - Dark Agouti Ratteninzuchtstamm	
HLA- Human Leucocyte Antigen (=MHC)	
ICAM- Intercellular Adhesion Molecule	
VCAM- Vascular Cell Adhesion Molecule	
Il- Interleukin	
IFN- $\gamma$ Interferon Gamma	
OKT-3- Antikörper gegen CD-3- Komplex	
VLA-4- Very Late Antigen	
LFA- Lymphocyte function associated	
cGMP- cyklisches Guanosin-Monophosphat	
MAPK- mitogen activated protein kinase	
ERK- extracellular signal- regulated kinase	
JNK- Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase	
RAS- Renin-Angiotensin-System	
HSP32- Heat Shock Protein 32	
DZ- Dendritische Zellen	
iNOS- induzierbare Stickstoffmonoxide Synthase	
LPS- Lipopolysaccharide	
FACS- Flowzytometrie	
CO- Kohlenmonoxide	
CoPP- Cobaltprotoporphyrin	
ZnPP- Zinkprotoporphyrin	

## **9. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Stefan G. Tullius (Associate Professor of Surgery, Chief Division of Transplantation, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School) für die Überlassung des Themas, für die intensive Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. med. Johann Pratschke (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Standort Virchow-Klinikum) für die problemlose Übernahme der Betreuung nach dem Weggang von Professor Tullius bedanken.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich bei Frau Dr. Anja Reutzel-Selke für die Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate, der statistischen Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Anke Jurisch für die große Hilfe im Labor und die Hilfe bei der Färbung und Auswertung der immunhistologischen Präparate.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und Freunden.

## Curriculum vitae

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





## **11. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Henriette Keßler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss einer einmaligen Spendervorbehandlung mit Cobalt-III-Protoporphyrin IX auf die Immunogenität des Transplantats im Rahmen der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation im Rattenmodell“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 28. September 2008

Henriette Keßler