

# **Charité Centrum für Chirurgische Medizin**

**Klinik für Urologie, Charité Campus Mitte**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. S.A. Loening

**Habilitationsschrift**

## **BEHANDLUNG DES KONSERVIERUNGS-REPERFUSIONSSCHADENS NACH NIERENTRANSPLANTATION: UNTERSUCHUNGEN AM TIERMODELL**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Experimentelle Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Tom Florian Fuller

geboren am 21.10.1972 in Kronstadt

Eingereicht im November 2006

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Heynemann

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Haffner

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Vorbemerkungen.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Konservierungs-Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation.....</b>	<b>6</b>
2.1 Definition.....	6
2.2 Pathophysiologie .....	6
2.3 Konservierungs-Reperfusionsschaden nach Lebendnierentransplantation..	8
<b>3. Reduktion des Konservierungs-Reperfusionsschadens.....</b>	<b>9</b>
3.1 Antiinflammatorische Behandlung.....	9
3.2 Antioxidative Behandlung.....	10
3.3 Induktion von Hitzeschockprotein in der Spenderniere.....	11
3.4 Ischämische Präkonditionierung der Spenderniere.....	12
<b>4. Einfluss antiproliferativer Immunsuppressiva auf den Konservierungs- Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation.....</b>	<b>14</b>
4.1 Der mTOR-Inhibitor Sirolimus.....	14
4.2 Mycophenolat Mofetil (MMF).....	16
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>24</b>
<b>8. Danksagung und eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>27</b>
<b>Anlage: 7 Artikel als Erstautor.....</b>	<b>28</b>

## VORBEMERKUNGEN

Die Ergebnisse dieser kumulativen Habilitationsschrift basieren auf Untersuchungen, die ich größtenteils während meines 20-monatigen Forschungsaufenthaltes an der „University of California San Francisco“ (UCSF), *Department of Surgery, Division of Transplantation, San Francisco, USA* sowie im Transplantations-Forschungslabor (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte) gemeinsam mit Doktoranden sowie wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern der jeweiligen Einrichtungen durchgeführt habe. Hervorgehoben seien an dieser Stelle folgende Personen, welche meine Forschungstätigkeit in besonderer Weise unterstützt und gefördert haben:

Prof. Dr. Stefan A. Loening	Direktor der Klinik für Urologie, Charité Berlin Campus Mitte
Prof. Dr. Bernd Schönberger <sup>†</sup>	ehem. Oberarzt der Klinik für Urologie, Charité Campus Mitte
Prof. Dr. Duska Dragun	Oberärztin der Klinik für Nephrologie, Charité C. Virchow
John P. Roberts, M.D.	<i>Chief, UCSF, Dept. of Surgery, Div. of Transplantation</i>
Chris E. Freise, M.D.	<i>Associate Professor, UCSF, Div. of Transplantation</i>
Sandy Feng, M.D., Ph.D.	<i>Associate Professor, UCSF, Div. of Transplantation</i>
Claus U. Niemann, M.D.	<i>Associate Professor, UCSF, Div. of Transplantation</i>

Gegenstand meiner Forschungstätigkeit ist die Verbesserung der frühen Funktion von Transplantatnieren durch Reduktion des Konservierungs-Reperfusionsschadens. Die Ergebnisse von klinischen und experimentellen Untersuchungen auf diesem Gebiet sind in 7 Artikeln (siehe Anlage), welche ich in „peer reviewed“ Zeitschriften als Erstautor publiziert habe, zusammengefasst. Sie bilden den Mittelpunkt dieser Habilitationsschrift. Sämtliche Arbeiten wurden auf nationalen und internationalen Kongressen vorgetragen.

In den einzelnen Kapiteln der vorliegenden Habilitationsschrift werden die wesentlichen Ergebnisse der in der Anlage aufgeführten Publikationen kurz dargestellt und anschliessend übergreifend diskutiert. Aus der abschliessenden Zusammenfassung soll das therapeutische Gesamtkonzept der hier präsentierten Arbeiten hervorgehen. Die in der Habilitationsschrift verwendeten Abkürzungen sind jeweils bei erstmaliger Verwendung im Text erläutert.

## 1. EINLEITUNG

Die Nierentransplantation ist heutzutage die beste Therapie bei terminaler Niereninsuffizienz. Mortalität und Morbidität sind bei Langzeit-Dialysepatienten deutlich höher als bei einer vergleichbaren Population von Nierentransplantierten. Darüberhinaus ist die Nierentransplantation langfristig wesentlich kosteneffektiver als eine chronische Dialysebehandlung.

Die kurz - und mittelfristigen Risiken einer Nierentransplantation sind die Operation selbst, die Organabstoßung und die damit verbundene Immunisierung des Empfängers, was das Abstoßungsrisiko bei jeder neuen Transplantation erhöht. Langfristig steigt, gegenüber einer vergleichbaren Population von Nierengesunden, das Risiko durch dauerhafte Einnahme von Immunsuppressiva an Malignomen zu erkranken. Während die Inzidenz von perioperativen Komplikationen sowie diejenige von schweren Abstoßungen mit Transplantatverlust stetig fällt, bleibt als **Hauptproblem die Knappheit an Spenderorganen** bestehen.

Die Diskrepanz zwischen der stetig wachsenden Zahl von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und dem zahlenmässig stagnierenden Organangebot führt dazu, dass immer mehr Dialysepatienten auf der Warteliste versterben. Diesem Trend konnte weder durch Gesetzreformen noch durch verbesserte Aufklärung der Allgemeinbevölkerung Einhalt geboten werden. Zur Zeit bietet lediglich die stetige Erweiterung des Spenderpools eine Möglichkeit der Organknappheit entgegenzuwirken. Zu den wichtigsten Massnahmen gehört die Bemühung die Zahl der Lebendnierentransplantationen zu erhöhen. Ebenfalls steigerbar ist die Nutzung von sogenannten „**marginalen Nieren**“. Hierbei handelt es sich um Nieren, deren Qualität und Funktionstüchtigkeit durch Begleiterkrankungen des verstorbenen Spenders, hohem Spenderalter oder langer hypothermer Organkonservierung eingeschränkt ist. Diese Organe haben eine deutlich erhöhte Inzidenz von **verzögerter Transplantatfunktion** (engl. „*delayed graft function*“) <sup>1</sup>. Das Auftreten von verzögerter Transplantatfunktion, definiert als Notwendigkeit einer Dialysebehandlung während der ersten Woche nach Nierentransplantation, kann das Langzeitüberleben von Transplantatnieren deutlich verkürzen <sup>2</sup>.

Das gemeinsame Ziel der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten, ist die Verbesserung der Qualität und Funktionstüchtigkeit marginaler Transplantatnieren um sie

für die stetig wachsende Zahl von terminal niereninsuffizienten Patienten nutzbar zu machen. Darüberhinaus sollen Therapien zur Reduktion der Inzidenz von verzögerter Transplantatfunktion das Langzeitüberleben dieser Organe verbessern.

Um der o.g. Zielsetzung auf experimenteller Ebene nachzugehen, wählten wir das Modell der Rattennierentransplantation. Die Technik der mikrochirurgischen Nierentransplantation an der Ratte erlernte ich im Jahre 1996 an der Universität Göttingen in Vorbereitung auf meine Promotionsarbeit (Betreuung durch Oberarzt Dr. Thomas Lorf und Prof. Burckhardt Ringe, ehemals Leiter der Klinik für Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Göttingen). In den experimentellen Arbeiten, die ich als Erst- oder Zweitautor verfasst und hier zitiert habe, wurden sämtliche Rattennierentransplantationen von mir durchgeführt. Für alle Transplantationen wurde eine standardisierte und reproduzierbare End-zu-Seit (Gefässe) und End-zu-End (Ureter) Anastomosentechnik verwendet. Die Anastomosenzeiten betragen zwischen 20 und 17 Minuten. Die Tiere wurden von mir, nach geltenden Gesetzen und Richtlinien zum Umgang mit Labortieren, betreut und nach Beendigung der postoperativen Beobachtungszeit euthanasiert.

Um eine Schädigung und Einschränkung der Funktionsfähigkeit der Transplantatnieren i.S. von marginalen Organen herbeizuführen, wurden alle Spendernieren vor Transplantation einer mindestens 24-stündigen Konservierung bei 4°C unterzogen. Als Konservierungslösung wurde fast ausschliesslich, die in der humanen Nierentransplantation verwendete University of Wisconsin (UW)-Lösung, eingesetzt. Andere Parameter, die den Schädigungsgrad der Spendernieren hätten beeinflussen können, z.B. hohes Spenderalter oder Länge der warmen Ischämiezeit, wurden konstant gehalten.

Auf die jeweiligen Fragestellungen und die wesentlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeiten werde ich in den folgenden Kapiteln eingehen.

## 2. KONSERVIERUNGS-REPERFUSIONSSCHADEN NACH NIERENTRANSPLANTATION

### 2.1 Definition

Die Grundlage für das klinische Bild der **verzögerten Transplantatfunktion** stellt der sogenannte Konservierungs-Reperfusionsschaden (K-R Schaden) dar. Der K-R Schaden spielt bei der postmortalen Nierenspende eine entscheidende Rolle und setzt sich aus der Organschädigung während der hypothermen Konservierung (kalte Ischämie) und dem schädlichen Einfluss der mit Freigabe des Blutstromes einsetzenden Reperfusion zusammen. Der Schweregrad des K-R Schadens hängt im Wesentlichen ab; einerseits von der Dauer der hypothermen Konservierung und andererseits von der Dauer der warmen Ischämiezeit (engl. *warm ischemia time*), d.h. der Zeit die der Operateur für die Gefässanastomosen benötigt. Das histopathologische Korrelat des K-R Schadens ist die akute Tubulusnekrose (ATN). Die ATN ist eine im Rahmen von Nierentransplantatbiopsien häufig gestellte Diagnose, welche eine unspezifische reversible Schädigung der Nierentubuli darstellt und eindeutig von einer akuten Abstoßung abzugrenzen ist.

### 2.2 Pathophysiologie

In der Literatur ist der Begriff des **Ischämie-Reperfusionsschadens** (I-R Schaden; engl. *ischemia-reperfusion injury*) weitaus häufiger anzutreffen als der des K-R Schadens. Dies liegt darin begründet, dass zur Erforschung des renalen I-R Schadens in der Mehrzahl der Fälle Tiermodelle verwendet werden, bei denen der ischämische Schaden durch temporäres Abklemmen der Nierengefäße herbeigeführt wird. Somit handelt es sich lediglich um eine Kombination aus warmer Ischämie mit anschliessender Reperfusion, was den Verhältnissen bei der Organtransplantation nur bedingt gerecht wird.

Da die Pathophysiologie des renalen I-R Schadens hochkomplex und noch nicht vollständig erforscht ist, werde ich im Folgenden nur auf zentrale Merkmale des I-R Schadens eingehen. Eine unter Berücksichtigung neuester Forschungsergebnisse anschauliche Übersicht zu diesem Thema bietet der Artikel von Perico et al. <sup>1</sup>.

Um dem Umstand gerecht zu werden, dass in sämtlichen von mir verfassten und hier zitierten Arbeiten ein Nierentransplantationsmodell mit hypothermer Konservierung verwendet wurde, werde ich in den folgenden Kapiteln versuchen, den Begriff „Ischämie-Reperfusionsschaden“ durch den treffenderen Begriff des „Konservierungs-Reperfusionsschadens“ (K-R Schaden) zu ersetzen auch wenn sich in den Überschriften der meisten hier zitierten Arbeiten die Bezeichnung „*ischemia/reperfusion injury*“ wiederfinden wird.

Unter **Ischämie** kommt es zu einem rapiden Abfall von Sauerstoff und Nährstoffen bei gleichzeitiger intrazellulärer Akkumulation toxischer Stoffwechselabbauprodukte. Im Zentrum steht der ATP Verlust mit Umstellung von aeroben auf anaeroben Metabolismus. Die daraus entstehende Laktazidose führt zu einer Aktivierung lytischer Enzyme. Am Ende dieser Kaskade steht die Bildung freier Sauerstoffradikale ( $O_2^-$  und  $H_2O_2$ ) bei gleichzeitigem Erliegen der zelleigenen antioxidativen Kapazität. Toxische Sauerstoffradikale können die zelluläre Integrität und Funktion über eine Lipid- und Eiweissperoxidation stören. Nach Freigabe des Blutstromes (**Reperfusion**) kommt es zur adhäsionsmolekül-vermittelten Einwanderung von mononukleären Zellen in das Transplantat, was die lokale Entzündungsreaktion zusätzlich verstärkt. Ein weiteres wichtiges Merkmal des renalen Reperfusionsschadens ist eine Mikrozirkulationsstörung. Abhängig vom Schweregrad des I-R Schadens und der daraus resultierenden Entzündungsreaktion kommt es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten morphologischen Veränderungen (Tubuluszellnekrose und Apoptose) im Transplantat. Diese haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Organfunktion in den ersten Tagen nach der Transplantation.

## **2.3 Konservierungs-Reperfusionsschaden nach Lebendnierentransplantation**

### **Artikel Nr. E1 (S. 28)**

Im Vergleich zur postmortalen Nierenspende spielt der K-R Schaden nach Lebendnierenspende eine eher untergeordnete Rolle. Hauptgrund hierfür ist die wesentlich kürzere kalte Ischämiezeit. Entsprechend niedriger ist die Inzidenz von verzögerter Transplantatfunktion. Bei 428 Lebendnierentransplantatempfängern, davon 308 Verwandte- und 120 Nicht-verwandte Empfänger, betrug die Inzidenz einer verzögerten Transplantatfunktion lediglich 2,8%. Die verzögerte Transplantatfunktion konnte jedoch eindeutig als Risikofaktor für eine akute Abstoßung identifiziert werden. Weitere Risikofaktoren waren: mehr als 1 HLA-mismatch, ein Spenderalter > 55 Jahre und ein Empfänger body-mass-index > 30. Die 1-Jahres Abstoßungsrate lag bei 21%. Bei Empfängern einer Verwandten-Nierenspende führte eine akute Abstoßung innerhalb des 1. Jahres zu einem signifikant verkürzten Transplantatüberleben (siehe Abb. 2B in Artikel E1). Die mediane Nachbeobachtungszeit lag in dieser retrospektiven Studie bei 26 Monaten.

Fazit unserer Studie ist, dass die verzögerte Organfunktion nach Lebendnierentransplantation die Inzidenz einer akuten Abstoßung erhöht und damit das Transplantatüberleben verkürzen kann.

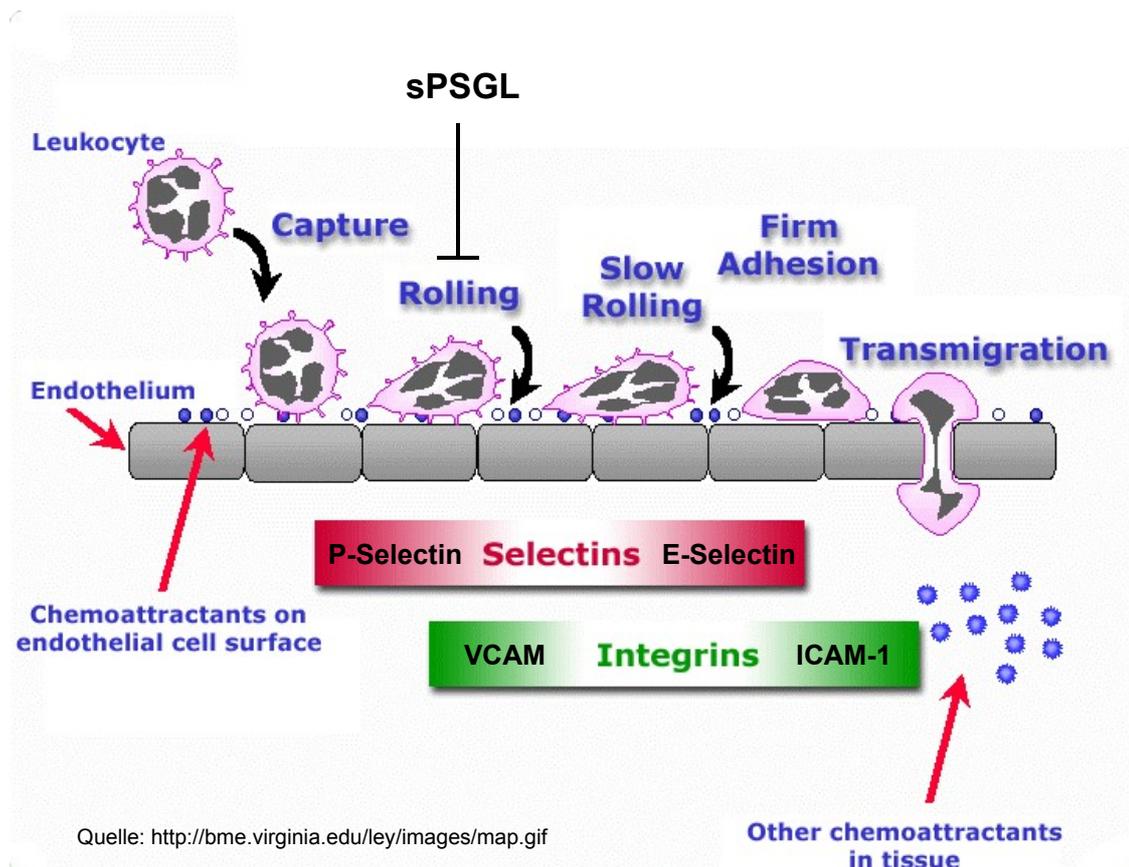
### 3. REDUKTION DES KONSERVIERUNGS-REPERFUSIONSSCHADENS

#### 3.1 Antiinflammatorische Behandlung

##### Artikel Nr. E2

Kurze Zeit nach Freigabe des Blutstromes kommt es zu einer adhäsionsmolekül-vermittelten Einwanderung von Entzündungszellen in das Transplantat (Abb. 1). Diese lokale postischämische Entzündungsreaktion stellt ein wichtiges Merkmal des K-R Schadens dar. Ziel unserer antiinflammatorischen Behandlung war es die Adhäsionskaskade - und damit die Interaktion zwischen Empfängerleukozyten und Spenderendothel - zu unterbinden.

Vor wenigen Jahren wurde ein rekombinanter, löslicher P-Selektin Glykoprotein Ligand (*engl.* sPSGL) entwickelt, der das endotheliale Adhäsionsmolekül P-Selektin blockiert und somit ein Rollen des Leukozyten entlang der Endothelwand verhindert (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Frühe Unterbrechung der Adhäsionskaskade durch den löslichen P-Selektin Glykoprotein-Liganden (sPSGL)

Am syngenem Rattennierentransplantationsmodell sollte gezeigt werden, dass die Empfängerbehandlung mit sPSGL den K-R Schaden nach 24-stündiger kalter Ischämie in HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat; Custodiol®) reduziert. Die Anzahl intrarenaler Leukozyteninfiltrate sowie die frühe postoperative Nierenfunktion wurde durch sPSGL nicht beeinflusst. Ein überraschendes und wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war die Tatsache, dass die mit sPSGL behandelte Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich verbesserte medulläre Mikrozirkulation aufwies. Nierenregionen mit geringfügiger Mikrozirkulationsstörung wiesen gleichzeitig eine nahezu intakte tubuläre Struktur auf.

Das Fazit unserer o.g. Arbeit ist, dass die frühe Unterbrechung der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch den löslichen P-Selektin Glykoprotein Liganden sPSGL wichtige Merkmale des renalen K-R Schadens z.B. Mikrozirkulationsstörung und Tubuluszellnekrose abmildert.

### **3.2 Antioxidative Behandlung**

#### **Artikel Nr. E3**

die Substanz N-Acetylcystein (NAC) oder Acetylcystein (ACC) ist in der Klinik weit verbreitet und wird u.a. als Mukolytikum eingesetzt. Die zusätzliche antioxidative Eigenschaft von NAC beruht wahrscheinlich auf der Induktion der zelleigenen Glutathionsynthese<sup>3</sup>. Glutathion wirkt zytoprotektiv durch Elimination freier Sauerstoffradikale, welche während der Ischämie entstehen und zu einer Lipid - und Eiweissperoxidation führen können. In einer früheren Arbeit konnte an der ischämisch geschädigten Rattenniere gezeigt werden, dass eine NAC-Behandlung - 1 Stunde vor und 1 Stunde nach 50-minütiger warmer Ischämie - den Tubulusschaden abmildert und gleichzeitig die Nierenfunktion nachhaltig verbessert<sup>4</sup>. Hierbei kam es selbst bei übertherapeutischer Dosierung von NAC (> 1 g/kg/KG) zu keinerlei systemischen Nebenwirkungen.

In unserer Arbeit sollte die antioxidative Wirkung von NAC in einem syngenem Nierentransplantationsmodell mit 24-stündiger kalter Ischämie in UW-Lösung (University of Wisconsin) getestet werden. Wir konnten zeigen, dass eine Spendervorbehandlung mit NAC

(1 g/kg/KG) die Konzentration der ischämiespezifischen Metabolite TMAO und Allantoin 24 Stunden nach Reperfusion sowohl im Nierengewebe als auch im Blut signifikant senkt. Die Metabolite TMAO und Allantoin wurden mit Hilfe der Magnetresonanz-Spektroskopie (<sup>1</sup>H-MRS) gemessen (siehe auch Serkova et al. <sup>5</sup>). NAC hatte 24 Stunden nach Reperfusion jedoch keinen messbaren Einfluss auf den Serumkreatininwert und den relativ gering ausgeprägten Tubulusschaden. Der vergleichsweise milde Tubulusschaden könnte Ausdruck der exzellenten Organkonservierung durch die UW-Lösung sein. In unserer vorangehenden Arbeit zur Untersuchung der Wirkung von sPSGL, führte eine 24-stündige Organkonservierung in HTK-Lösung zu einem deutlich ausgeprägteren Tubulusschaden (siehe Artikel Nr. E2). Für den Nachweis einer protektiven Wirkung von NAC anhand klinischer Parameter (Serum-Kreatinin und histologischer Tubulusschaden) wäre ein Transplantationsmodell mit schwererem Ischämieschaden wahrscheinlich geeigneter gewesen. Das Fazit unserer Arbeit ist, dass der postischämische Metabolismus in der Transplantatniere nach Spendervorbehandlung mit NAC weitgehend intakt bleibt und dass NAC somit eine renoprotektive Wirkung zugeschrieben werden kann. Mit Hilfe von hochsensitiven Methoden, wie der Magnetresonanz-Spektroskopie, kann eine ischämische Transplantatschädigung möglicherweise viel früher diagnostiziert werden als mit herkömmlichen klinischen Parametern.

### **3.3 Induktion von Hitzeschockprotein in der Spenderniere**

#### **Artikel Nr. E4**

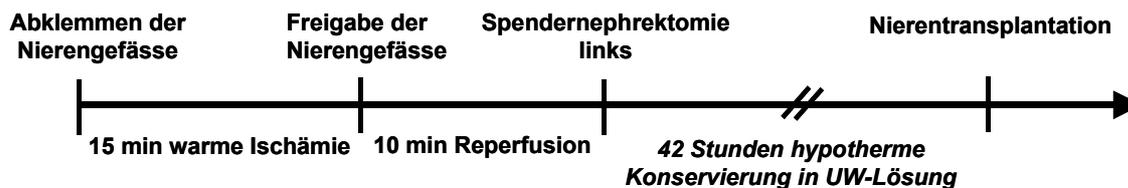
Hitzeschockproteine (HSP) spielen im zellulären Regenerationsprozess nach ischämischer oder toxischer Schädigung eine entscheidende Rolle. HSP unterstützen auf molekularer Ebene die Remodellierung denaturierter Proteine und beeinflusst u.a. die zelluläre Apoptose <sup>6</sup>. Für Glutamin, eine nicht-essentielle Aminosäure, konnte sowohl beim Tier als auch beim Menschen eine HSP-induzierende- und damit zytoprotektive Wirkung nachgewiesen werden <sup>7-9</sup>. Glutamin (GLN) kann parenteral verabreicht werden und entfaltet selbst bei hoher Dosierung keine unerwünschten Nebenwirkungen.

In unserer Studie sollte geprüft werden, ob eine Spendervorbehandlung mit GLN zu einer signifikanten Erhöhung der renalen HSP Expression führt und damit die Transplantatnieren vor den Folgen des schweren K-R Schadens schützen kann. Als Messparameter diente u.a. das Ausmass der Tubulusnekrose und Apoptose, die Nierenfunktion 24 Stunden nach Transplantation sowie die Anzahl von Entzündungszellinfiltraten im Transplantat. Wir konnten zeigen, dass eine Spendervorbehandlung mit GLN zu einer nachhaltigen Induktion von HSP im Transplantat führt. In der GLN-behandelten Gruppe zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion apoptotischer Tubuluszellen in allen drei Nierenregionen (Cortex, Medulla und Papille). GLN führte darüberhinaus zu einer signifikanten Reduktion nekrotischer Zellen in der Papille. Die Transplantatfunktion und die Infiltration von Entzündungszellen blieb durch die GLN-Behandlung unbeeinflusst.

### 3.4 Ischämische Präkonditionierung der Spenderniere

#### Artikel Nr. E5

Unter ischämischer Präkonditionierung (IPK) versteht man, die kurzzeitige Unterbrechung und Freigabe der Blutzufuhr eines Organs, vor Beginn der eigentlichen ischämischen Schädigung. Es wird diskutiert, dass die IPK u.a. zu einer Erhöhung der renalen Stickstoffoxidkonzentration (NO) führt und über deren vasodilatatorische Wirkung zur Verbesserung der postischämischen Mikrozirkulation im Transplantat beiträgt <sup>10</sup>. In einer früheren Pilotstudie konnten wir zeigen, dass eine 42-stündige hypotherme Konservierung eine Transplantat- und damit Empfängerüberlebensrate von weniger als 50% erzeugt (siehe Artikel Nr. E6).



**Abbildung 2:** Schema der ischämischen Präkonditionierung vor Organentnahme

Ziel unserer Arbeit war es am Rattenmodell zu prüfen, ob das o.g. IPK-Protokoll - d.h. 15-minütige Ischämie mit 10-minütiger Reperfusion - die Nierentransplantatfunktion nach 42-

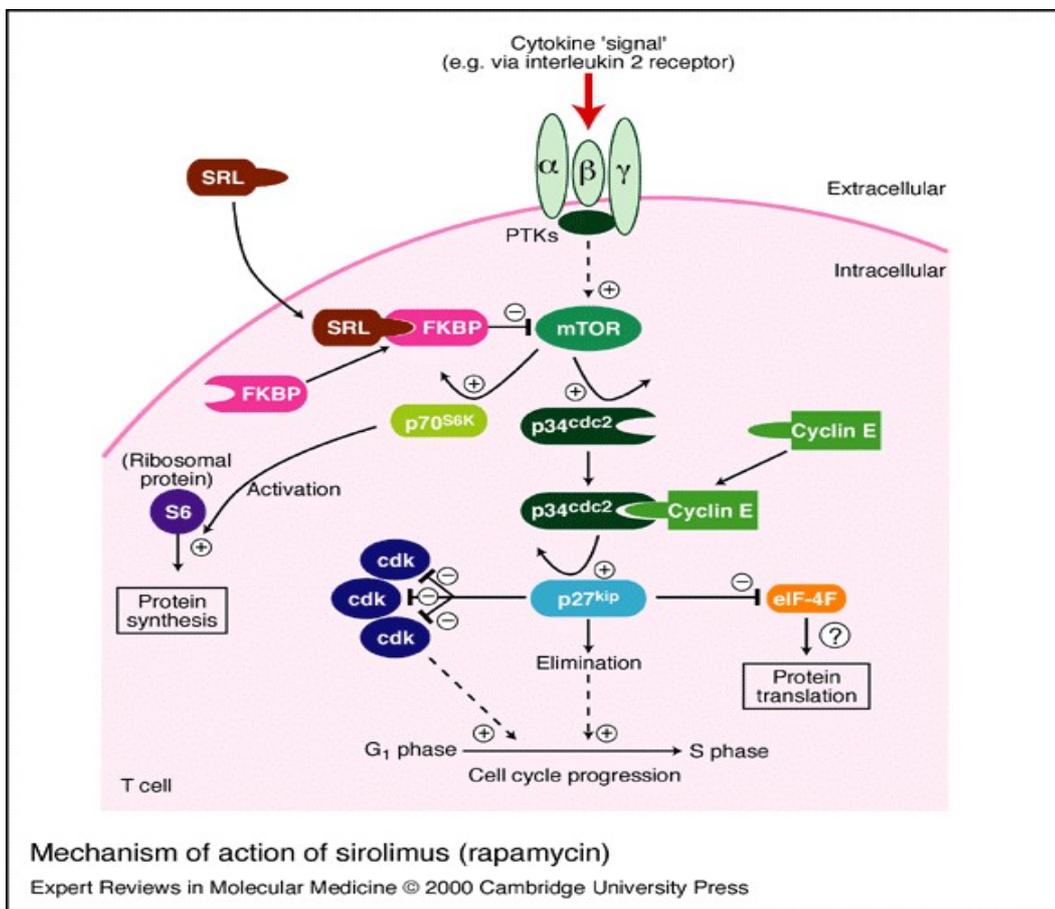
stündiger hypothermer Konservierung in UW-Lösung verbessert. In der hier vorgestellten Arbeit konnten wir unter Anwendung des o.g. IPK-Protokolls die Transplantatüberlebensrate nach 42-stündiger Konservierung von 40% (unbehandelte Spendernieren) auf 70% (behandelte Spendernieren) erhöhen. Trotz des positiven Trends zugunsten der IPK war der Überlebensvorteil statistisch nicht signifikant. Auffallend war jedoch, dass die mit IPK vorbehandelten Spendernieren einen signifikant schnelleren Kreatininabfall während der ersten 6 Tage nach Transplantation zeigten.

## 4. EINFLUSS ANTIPROLIFERATIVER IMMUNSUPPRESSIVA AUF DEN KONSERVIERUNGS-REPERFUSIONSSCHADEN NACH NIERENTRANSPANTATION

### 4.1 Der mTOR-Inhibitor Sirolimus

#### Artikel Nr. E6

Sirolimus oder Rapamycin ist ein makrozyklisches Laktone, das von der Pilzart *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird und aus einer Bodenprobe der Osterinseln isoliert wurde. Strukturell ist Sirolimus mit Tacrolimus verwandt, hat aber im Gegensatz zu jenem einen anderen Wirkungsmechanismus. Sirolimus bindet an das 12 kDa kleine, ubiquitäre Protein FKBP12 (FK506-binding-protein) und bildet mit diesem einen Komplex, der an die intrazelluläre Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) bindet und diese hemmt. Hierdurch wird die Signalübertragung zum Zellkern gestört und damit die zytokin-abhängige T-Zell-Proliferation unterdrückt, indem der Übergang der T-Zelle von der G1-Phase in die S-Phase verhindert wird (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Wirkmechanismus von Sirolimus (SRL)

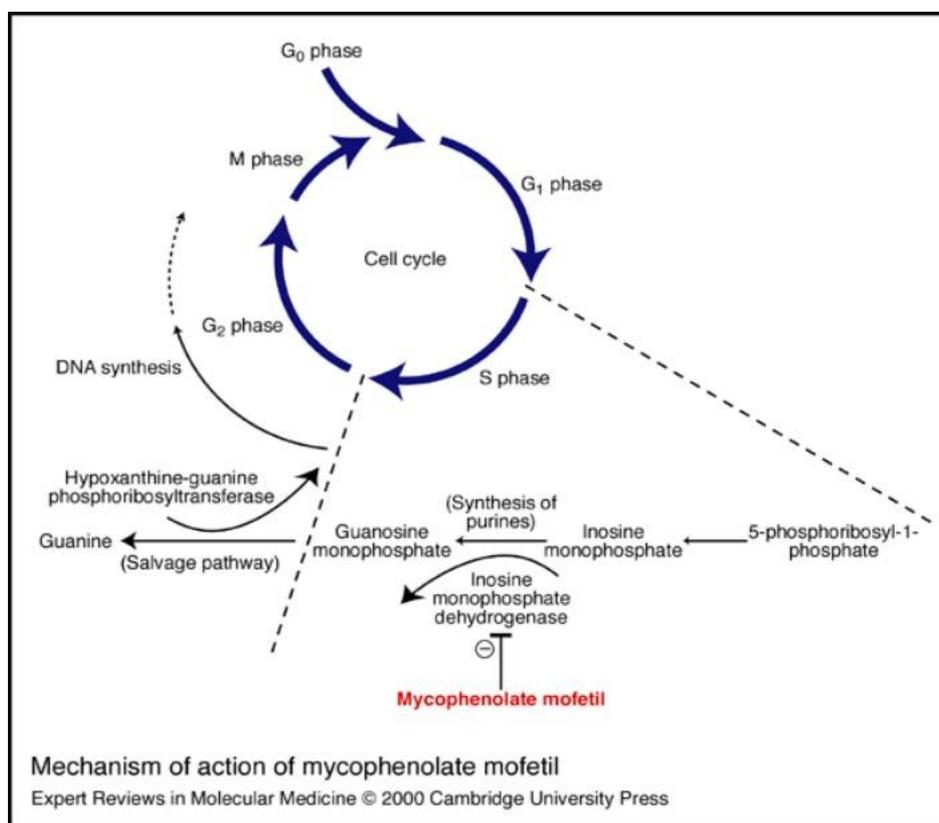
Wegen der vermeintlich fehlenden Nephrotoxizität ist anzunehmen, dass Sirolimus den schweren ischämischen Tubulusschaden nicht verstärkt. In klinischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Sirolimus zu einer Verlängerung der verzögerten Transplantatfunktion nach postmortaler Nierenspende führen kann <sup>11, 12</sup>. In der vorliegenden Studie sollte die Wirkung von Sirolimus auf die Transplantatfunktion und Morphologie in Abhängigkeit vom Schweregrad des K-R Schadens untersucht werden. Hierzu verwendeten wir ein syngenes Rattennierentransplantationsmodell mit 39-stündiger bzw. 24-stündiger kalter Ischämie und bilateraler Nephrektomie des Empfängers vor Transplantation. Die Dauer der kalten Ischämiezeiten wurden nach einer vorausgegangenen Pilotstudie so ausgewählt, dass das zu erwartende Empfängerüberleben in der Gruppe mit schwerem K-R Schaden (39 Stunden Ischämie) mindestens 80% und in der Gruppe mit mittelgradigem K-R Schaden (24 Stunden Ischämie) 100% betrug. Ein wichtiger Aspekt der Versuchsplanung war das frühe Erreichen immunsuppressiver Wirkspiegel im Empfängertier (Zielspiegel für Sirolimus: 10-20 ng/dl, siehe <sup>13</sup>). Bei Empfängern einer Niere mit 24-stündiger Ischämie war das Überleben in beiden Behandlungsgruppen annähernd 100%, während die Sirolimus-behandelte Gruppe einen signifikant verzögerten Kreatininabfall zeigte. In der Versuchsgruppe mit 39-stündiger kalter Ischämie betrug das Empfängerüberleben am Tag 7 ohne Behandlung 100% und mit Sirolimus-Behandlung 30% ( $P = 0,002$ ). Die schlechten funktionellen Ergebnisse nach Sirolimus-Behandlung gegenüber der unbehandelten Gruppe korrelierten mit einem deutlich ausgeprägteren histologischen Tubulusschaden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Sirolimus den vorbestehenden Tubulusschaden verstärkt und somit vom Schweregrad des K-R Schadens unabhängig die Normalisierung der postischämischen Transplantatfunktion verzögert.

Dass diese Ergebnisse von großem klinischem Interesse sind, wurde durch das Zitieren unserer Arbeit in einem 2004 erschienenen Übersichtsartikel zum Thema „*Delayed graft function in renal transplantation*“ dokumentiert <sup>14</sup>.

## 4.2 Mycophenolat Mofetil

### Artikel Nr. E7

Die immunsuppressive Wirkung von Mycophenolat Mofetil (MMF) beruht auf einer Proliferationshemmung von Lymphozyten. MMF ist eine Vorstufe der pharmakologisch wirksamen Mycophenolsäure (*engl.* MPA), welche die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) reversibel hemmt. Das Enzym IMPDH spielt bei der de-novo Purin-Synthese eine entscheidende Rolle. Da Lymphozyten bei der Zellteilung und DNA Regeneration deutlich stärker von der de-novo Purin-Synthese abhängen als andere Zellen, führt eine Hemmung der IMPDH vornehmlich zu einem Proliferationsstopp von Lymphozyten. Abbildung 4 zeigt den Wirkmechanismus von MMF.



**Abbildung 4:** Wirkmechanismus von MMF

In Rattenmodellen mit toxischer oder ischämischer Nierenschädigung konnte gezeigt werden, dass es unter Gabe von MMF zu einer Proliferationshemmung von Tubulusepithelzellen mit entsprechender Funktionsverschlechterung kommt<sup>15, 16</sup>. Die Untersuchung der Wirkung von MMF auf Transplantatnieren mit schwerem K-R Schaden ist insofern wichtig, als MMF bei verzögerter Transplantatfunktion zusammen mit Steroiden und Anti-Lymphozyten Antikörpern

als Mittel der Wahl gilt <sup>1</sup>. Ähnlich wie bei unserer vorangehenden Arbeit zu Sirolimus untersuchten wir hier die Wirkung von MMF auf die Transplantatfunktion und Morphologie in Abhängigkeit vom Schweregrad des K-R Schadens. Zusätzlich sollte die Wechselwirkung zwischen antiinflammatorischer und antiproliferativer Wirkung von MMF im Nierengewebe untersucht werden.

Im Herztransplantationsmodell an der Ratte wurde nachgewiesen, dass MMF bei einer Dosierung von 20 mg/kg/KG seine volle immunsuppressive Wirkung entfaltet ohne toxisch zu wirken <sup>17</sup>. Durch Messung der Konzentration von Mycophenolsäure im Blut konnten wir nachweisen, dass MMF bei o.g. Dosierung den gewünschten pharmakologischen Wirkspiegel erreicht.

Wir konnten zeigen, dass bei Empfängern von mittelgradig geschädigten Transplantatnieren (24 Stunden kalte Ischämie) die antiinflammatorische Wirkung von MMF überwiegt. Gegenüber der unbehandelten Gruppe zeigten cortikale und medulläre Tubuluszellen nach MMF Behandlung eine starke Zunahme der Proliferationsaktivität bei gleichzeitiger Reduktion der renalen Makrophageninfiltration. In der MMF-Gruppe konnte keine Zunahme des histologischen Tubulusschadens bei gleichzeitigem Fehlen einer funktionellen Beeinträchtigung beobachtet werden. Die Feststellung, dass die Tubuluszellproliferation durch Gaben von MMF nicht gehemmt sondern im Gegenteil stimuliert wird, ist neu und könnte mit der starken antiinflammatorischen Wirkung von MMF zusammenhängen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Suppression der Makrophageninfiltration nach renaler Ischämie mit einer signifikanten Zunahme der Tubuluszellproliferation vergesellschaftet ist <sup>18, 19</sup>. In der Gruppe mit schwerem K-R Schaden (39 Stunden Ischämie) führte MMF, ähnlich wie Sirolimus, zu einer dramatischen Verschlechterung der Transplantatfunktion, welche am signifikant reduzierten Empfängerüberleben erkennbar war. Als morphologisches Korrelat für die schlechte Transplantatfunktion nach MMF Behandlung fand sich eine signifikante Zunahme der Papillennekrose gegenüber der unbehandelten Gruppe. Das Ausmaß an MMF-induzierter struktureller und funktioneller Transplantatschädigung korreliert offensichtlich mit dem Schweregrad des renalen K-R Schadens.

## 5. DISKUSSION

Gegenwärtig beträgt in den USA die 5-Jahres-Überlebensrate von Verstorbenen- und Lebendspendenieren im Durchschnitt 65% bzw. 80%. Diese Ergebnisse stammen aus dem 2004 veröffentlichten Transplantationsregister UNOS, in dem die Daten von 66.843 Nierentransplantatempfängern enthalten sind <sup>20</sup>. In einer kürzlich von uns veröffentlichten retrospektiven Studie an 512 Erwachsenen, die zwischen 1997 und 2003 an der University of California San Francisco eine Lebendnierentransplantation erhielten, betrug das 5-Jahres-Transplantatüberleben 94% bei einer durchschnittlichen 12-Monats-Abstoßungsrate von 20% <sup>21</sup>. Aus mehreren klinischen Studien ist bekannt, dass die durch K-R Schaden ausgelöste verzögerte Transplantatfunktion eindeutig mit einem verkürzten Transplantatüberleben korreliert <sup>22-25</sup>. Ein wesentlicher Grund für die deutlich niedrigere Inzidenz von verzögerter Transplantatfunktion nach Lebendnierenspende ist die kürzere Ischämiezeit im Vergleich zur postmortalen Nierenspende. Wir konnten zeigen, dass die verzögerte Transplantatfunktion nach Lebendnierenspende, trotz niedriger Inzidenz, das Risiko für eine akute Abstoßung erhöht <sup>26</sup>. Eine akute Abstoßung innerhalb des 1. Jahres nach Transplantation führte zu einer signifikanten Verkürzung des Transplantatüberlebens **[Artikel E1]**. Im Rahmen des K-R Schadens kann es zu einer verstärkten Expression von MHC Klasse I und II Molekülen in der Niere kommen, was die Immunogenität des ischämisch geschädigten Transplantates steigert <sup>27</sup>. Dies ist eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen verzögerter Transplantatfunktion und erhöhter Inzidenz von akuter Abstoßung.

### Reduktion des Konservierungs-Reperfusionsschadens

Die Erforschung der Pathophysiologie des K-R Schadens hat die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung des K-R Schadens und der daraus resultierenden verzögerten Transplantatfunktion vorangetrieben. In jüngerer Zeit sind neue Therapieansätze zur Behandlung des Organspenders und des Transplantatempfängers entwickelt worden. Hierzu zählt u.a. der Einsatz antiinflammatorischer und antioxidativer Pharmaka sowie der Einsatz von Vasodilatoren und Wachstumsfaktoren.

Die Unterbrechung der adhäsionsmolekülvermittelten Infiltration von Empfängerleukozyten in das ischämisch geschädigte Transplantat stellt eine hochspezifische antiinflammatorische Therapie dar. Mit Hilfe eines löslichen P-Selektin-Glykoprotein-Liganden (sPSGL), welcher das Rollen von Entzündungszellen entlang der aktivierten Endothelwand verhindert (siehe Abb. 1), konnte im Tiermodell eine signifikante Reduktion des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens erzielt werden <sup>28</sup>. Wir konnten zeigen, dass sPSGL die postischämische Mikrozirkulation nach Rattennierentransplantation signifikant verbessert und das Ausmaß der Tubuluszellnekrose verringert **[Artikel E2]**. In der Literatur gibt es bislang noch keine Angaben über den Einsatz von sPSGL in der humanen Nierentransplantation. Am Modell der allogenen Rattennierentransplantation konnte gezeigt werden, dass sPSGL die durch den Hirntod verursachte Entzündungsreaktion im Empfänger abmildert und das Transplantatüberleben verlängert <sup>29</sup>. Desweiteren führte sPSGL nach syngener Rattenlebertransplantation mit 24-stündiger kalter Ischämie zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens <sup>30</sup>. Die am Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse zur antiinflammatorischen Wirkung von sPSGL sind vielversprechend und würden den Einsatz dieser Substanz im Rahmen von klinischen Studien rechtfertigen.

Die Behandlung des Spenders vor Organentnahme gewinnt zunehmend an Bedeutung. Der Hauptvorteil einer Spendervorbehandlung ist die „Präkonditionierung“ d.h. die Induktion von Schutzmechanismen im Spenderorgan vor Beginn der ischämischen Schädigung. Der Einsatz von antioxidativen Substanzen eignet sich sowohl zur Behandlung des Spenders als auch des Empfängers. Wir konnten im Nierentransplantationsmodell zeigen, dass eine Spendervorbehandlung mit N-Acetylcystein (NAC oder ACC) renoprotektiv wirkt **[Artikel E3]**. NAC besitzt eine grosse therapeutische Breite und entfaltet seine antioxidative Wirkung sehr wahrscheinlich über eine Induktion der zelleigenen Glutathionsynthese <sup>3</sup>. NAC wird beim Patienten als Mukolytikum eingesetzt und in jüngerer Zeit auch als Antioxidans zum Schutz vor kontrastmittelinduzierter Nephrotoxizität <sup>31</sup>. Am Großtiermodell konnte nachgewiesen werden, dass eine Kombination aus NAC und einem weiteren Antioxidans die Nierentransplantatfunktion nach 48-stündiger kalter Ischämie in UW-Lösung nachhaltig verbessert <sup>32</sup>. Desweiteren konnte sowohl im Großtierversuch als auch klinisch gezeigt

werden, dass die Verwendung einer neu entwickelten Konservierungslösung, die u.a. NAC als Inhaltsstoff hat, zu einem deutlich verlängerten Überleben von Lungentransplantaten führt <sup>33</sup>. Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre NAC als wichtiges Additivum für zukünftige Organkonservierungslösungen zu sehen.

Hitzeschockproteine (HSP) unterstützen die zelluläre Regeneration nach toxischer oder ischämischer Gewebsschädigung. Am Rattennierentransplantationsmodell mit 40-stündiger kalter Ischämie konnte gezeigt werden, dass eine kurze Ganzkörperhyperthermie des Spenders zu einer signifikanten Erhöhung der HSP-Expression in der Transplantatniere führt. Rattennieren mit erhöhter HSP Expression zeigten einen deutlich schnelleren Kreatininabfall und eine verbesserte Überlebensrate in der 1. Woche nach Transplantation <sup>34</sup>. Da eine Ganzkörperhyperthermie des Spenders unter klinischen Bedingungen nur sehr schwer zu realisieren ist, suchten wir nach Möglichkeiten einer pharmakologischen HSP Induktion. Die nicht-essentielle Aminosäure Glutamin hat sich sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen als potenter Induktor von HSP etabliert <sup>7-9</sup>. In unserem Nierentransplantationsmodell mit schwerem K-R Schaden konnten wir nachweisen, dass eine Spendervorbehandlung mit Glutamin zu einer signifikanten und langdauernden Induktion von HSP im Transplantat führt. Mit Glutamin vorbehandelte Transplantatnieren waren vor der ischämiebedingten Tubuluszellapoptose- und Nekrose wesentlich besser geschützt als unbehandelte Nieren **[Artikel E4]**. Für einen möglichen Einsatz von Glutamin bei menschlichen Transplantatnieren spricht die fehlende Toxizität und die bereits vorhandene klinische Erfahrung im Umgang mit dieser Substanz <sup>9</sup>.

Unter ischämischer Präkonditionierung versteht man die kurzzeitige Unterbrechung der Blutzufuhr eines Organs vor Beginn der eigentlichen ischämischen Schädigung. Diese Therapieform ist klinisch praktikabel und kann das Spenderorgan vor den Folgen des K-R Schadens schützen. An der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine 15-minütige Ischämie der Spenderniere gefolgt von einer 10-minütigen Reperusionsphase die Transplantatfunktion nach 5-stündiger hypothermer Konservierung nachhaltig verbessert <sup>10</sup>. In unserem Rattennierentransplantationsmodell konnte mit dem gleichen Behandlungsschema ein im Vergleich zu nichtbehandelten Nieren signifikant schnellerer Kreatininabfall nach 42-stündiger

hypothermer Konservierung erzielt werden **[Artikel E5]**. Dies könnte für einen günstigen Effekt der ischämischer Präkonditionierung auf die Regeneration nach schwerem renalem K-R Schaden sprechen. Nach erfolgreicher klinischer Anwendung bei der Lebertransplantation<sup>35</sup> wäre ein baldiger Einsatz der ischämischen Präkonditionierung bei der postmortalen Nierenspende denkbar.

#### Antiproliferative Immunsuppressiva und Konservierungs-Reperfusionsschaden

Bei zu erwartender verzögerter Transplantatfunktion infolge des K-R Schadens wird im klinischen Alltag häufig eine Änderung des gängigen Immunsuppressionsschemas vorgenommen. Dies geschieht vor dem Hintergrund der bekannten Nephrotoxizität der beiden Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 (Tacrolimus), die nach wie vor das Rückgrat der modernen Immunsuppression bilden. In den letzten Jahren wurden im Rahmen von klinischen Studien neue Immunsuppressionsschemata getestet, die eine Reduktion der CNI-Dosis oder sogar einen Verzicht auf CNI vorsehen<sup>36, 37</sup>. Wichtiger Bestandteil dieser Protokolle sind neben den Lymphozyten-depletierenden-Antikörpern und den anti-IL2-Rezeptor-Antikörpern die antiproliferativen Immunsuppressiva. Zu dieser Gruppe zählt der mTOR-Inhibitor Sirolimus sowie Mycophenolat Mofetil, dessen Metabolit Mycophenolsäure die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase reversibel hemmt. Die immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen beruht auf einer effizienten Hemmung der T-Zell-Proliferation. Der Vorteil dieser Gruppe von Immunsuppressiva gegenüber den CNI ist die vermeintlich fehlende Nephrotoxizität. Aus diesem Grund werden Sirolimus und Mycophenolat Mofetil (MMF) bei Transplantatnieren mit schwerem K-R Schaden und verzögerter Funktionsaufnahme bevorzugt eingesetzt. Dass sich die antiproliferative Wirkung von Sirolimus nicht ausschliesslich auf T-Zellen beschränkt, konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden<sup>38</sup>. An einem Rattenmodell mit warmer Ischämie wurde nachgewiesen, dass Sirolimus die Proliferation von ischämisch geschädigten Tubuluszellen hemmt und das Wiedererlangen der Funktion nach akutem Nierenversagen signifikant verzögert<sup>39</sup>. Ziel unserer tierexperimentellen Untersuchungen war es den Einfluss von Sirolimus und MMF auf die Transplantatfunktion und die Tubulusregeneration nach mittelschwerem und schwerem K-R

Schaden zu überprüfen. Ein Ergebnis von hoher klinischer Relevanz war, dass Sirolimus den vorbestehenden Tubulusschaden verstärkt und die Normalisierung der postischämischen Transplantatfunktion *unabhängig* vom Schweregrad des K-R Schadens deutlich verzögert **[Artikel E6]**. Dies deckt sich mit der klinischen Beobachtung, dass Sirolimus zu einer Verlängerung der Phase der verzögerten Transplantatfunktion nach postmortaler Nierenspende führen kann<sup>11, 12</sup>. Hingegen konnten wir für MMF zeigen, dass ein antiproliferativer und damit tubulotoxischer Effekt lediglich bei schwerem K-R Schaden (39 Stunden kalte Ischämie) zum Tragen kommt **[Artikel E7]**. Für die klinische Anwendung könnte dies bedeuten, dass bei zu erwartender verzögerter Transplantatfunktion nach mittelschwerem K-R Schaden (24 Stunden kalte Ischämie) MMF bedenkenlos eingesetzt werden kann, wohingegen auf die Gabe von Sirolimus nach Möglichkeit verzichtet werden sollte.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Der akute Organmangel wird auch zukünftig das beherrschende Thema in der Transplantationsmedizin bleiben. Wegen der zunehmenden Verwendung marginaler Organe wird das Problem der verzögerten Transplantatfunktion an Bedeutung gewinnen. Die Wichtigkeit einer möglichst schnellen Funktionsaufnahme von Transplantatnieren für deren Langzeitüberleben ist hinreichend belegt. Wir konnten in unseren klinischen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen verzögerter Nierentransplantatfunktion, erhöhter Inzidenz von akuter Abstoßung und verkürztem Transplantatüberleben nachweisen.

Die hier dargestellten experimentellen Arbeiten beschäftigen sich mit dem Konservierungs-Reperfusionsschaden (K-R Schaden) nach Nierentransplantation und dem Ziel diesen zu minimieren. Der komplexen Pathophysiologie des renalen K-R Schadens Rechnung tragend, wählten wir verschiedene Therapieansätze (antiinflammatorisch, antioxidativ, zytoprotektiv) und konnten zeigen, dass jede dieser Therapien für sich einen Beitrag zur Reduktion des K-R Schadens nach Rattennierentransplantation leistet. Ein neuer und wichtiger Aspekt der hier vorgestellten Arbeiten ist die erfolgreiche Behandlung des Spenders vor Beginn der Organentnahme und hypothermen Konservierung.

Der Einfluss antiproliferativer Immunsuppressiva mit vermeintlich fehlender Nephrotoxizität auf die verzögerte Transplantatfunktion ist noch nicht hinreichend erforscht. Wir konnten im Tiermodell zeigen, dass Sirolimus im Gegensatz zu MMF den vorbestehenden K-R Schaden und die damit verbundene Funktionsstörung verstärkt und deshalb bei Nieren mit verzögerter Funktionsaufnahme nicht eingesetzt werden sollte. Die aus tierexperimentellen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse zur Pathophysiologie des renalen K-R Schadens und dessen Behandlung sind vielversprechend. Ein einzelnes im klinischen Alltag einsetzbares Therapeutikum steht bisher jedoch noch nicht zur Verfügung. Daher erscheint zum jetzigen Zeitpunkt in der Klinik ein multimodales Vorgehen sinnvoll, d.h. die Kombination verschiedener Substanzen mit antiinflammatorischer, antioxidativer oder vasodilatativer Wirkung deren therapeutische Breite groß genug sein sollte, um sowohl beim Spender als auch beim Empfänger eingesetzt werden zu können.

## 7. LITERATUR

1. Perico N, Cattaneo D, Sayegh M, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814-1827
2. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:968-974
3. De Vries N, De Flora S. N-acetyl-L-cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:270-277
4. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, Price P, Davis R, Safirstein R. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol* 1997;272:F292-298
5. Serkova N, **Fuller TF**, Klawitter J, Freise CE, Niemann CU. H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney Int* 2005; 67:1142-1151
6. Kelly KJ. Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury. *Contrib Nephrol* 2005;148:86-106
7. Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* 2001;90:2403-2410
8. Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 2002;18:225-228
9. Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD, Luo M, Fernandez-Estivariz C, Griffith DP, Galloway JR, Wischmeyer PE. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2005;31:1079-1086
10. Torras J, Herrero-Fresnada I, LLOberas N, Riera M, Cruzado JM, Grinyo JM. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int* 2002;61:2218-2227
11. McTaggart RA, Gottlieb D, Brooks J, Bacchetti P, Roberts JP, Tomlanovich S, Feng S. Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3:416-423
12. Smith KD, Wrenshall LE, Nicosia RF, Pichler R, Marsh CL, Alpers CE, Polissar N, Davis CL. Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1037-1045
13. DiJoseph JF, Fluhler E, Armstrong J, Sharr M, Sehgal SN. Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. *Transplantation* 1996;62:1109-1112
14. Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N. Delayed graft function in renal transplantation. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:489-498
15. Gonzalez N, Alvarez V, Pons H, Parra G, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil aggravates postischemic acute renal failure in rats. *Transplant Proc* 2002;34:43-44

16. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Goto T, Yonemura K, Hishida A. Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. *Am J Pathol* 2002;161:217-227
17. Barten MJ, van Gelder T, Gummert JF, Boeke K, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE. Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *Am J Transplant* 2002;2:719-732
18. Forbes JM, Leaker B, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL. Macrophage and myofibroblast involvement in ischemic acute renal failure is attenuated by endothelin receptor antagonists. *Kidney Int* 1999;55:198-208
19. Vercauteren SR, Ysebaert DK, Van Rompay AR, De Greef KE, De Broe ME. Acute ischemia/reperfusion injury after isogeneic kidney transplantation is mitigated in a rat model of chronic renal failure. *Am J Transplant* 2003;3:570-580
20. Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl* 2004;1-16
21. Brennan TV, **Fuller TF**, Vincenti F, Chan S, Chang CK, Bostrom A, Zlatunich JK, Tomlanovich SJ, Feng S. Living donor kidney transplant recipients and clinical trials: participation profiles and impact on post-transplant care. *Am J Transplant* 2006;6:2429-2435
22. Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, Dantal J, Blancho G, Daguin P, Ancelet D, Souillou JP. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 1998;54:972-978
23. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant* 2001;1:115-120
24. Whittaker JR, Veith FJ, Soberman R, Lalezari P, Tellis I, Freed SZ, Gliedman ML. The fate of the renal transplant with delayed function. *Surg Gynecol Obstet* 1973;136:919-922
25. Halloran PF, Aprile MA, Farewell V, Ludwin D, Smith EK, Tsai SY, Bear RA, Cole EH, Fenton SS, Cattran DC. Early function as the principal correlate of graft survival. A multivariate analysis of 200 cadaveric renal transplants treated with a protocol incorporating antilymphocyte globulin and cyclosporine. *Transplantation* 1988;46:223-228
26. Brennan TV, Freise CE, **Fuller TF**, Vincenti F, Chan S, Chang CK, Bostrom A, Zlatunich JK, Tomlanovich SJ, Feng S. Early graft function after living donor kidney transplantation predicts rejection but not outcomes. *Am J Transplant* 2004;4: 971-979
27. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996;155:1831-1840
28. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997;99:2682-2690

29. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001; 234:732- 740
30. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, Wang T, Zhao D, Busuttil AA, Kato H, Murray NG, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg* 1998; 227: 832-840
31. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000;343:180-184
32. Lin A, Sekhon C, Sekhon B, Smith A, Chavin K, Orak J, Singh I, Singh A. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 654-659
33. Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Med J* 2004; 45: 1107-1114
34. Redaelli CA, Tien YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, Schilling MK, Wagner AC. Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. *Nephron* 2002;90:486-497
35. Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND, Rela M. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation* 2006;81:169-174
36. Vincenti F, Ramos E, Brattstrom C, Cho S, Ekberg H, Grinyo J, Johnson R, Kuypers D, Stuart F, Khanna A, Navarro M, Nashan B. Multicenter trial exploring calcineurin inhibitors avoidance in renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:1282-1287
37. Larson TS, Dean PG, Stegall MD, Griffin MD, Textor SC, Schwab TR, Gloor JM, Cosio FG, Lund WJ, Kremers WK, Nyberg SL, Ishitani MB, Prieto M, Velosa JA. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant* 2006;6:514-522
38. Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995;17:660-665
39. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, Valeri R, Levine JS. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F693-706

## **8. DANKSAGUNG UND EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Herrn Prof. Dr. Stefan Loening und Herrn Prof. Dr. Dietmar Schnorr danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung. Meinem ehemaligen Mentor Herrn Prof. Dr. Bernd Schönberger, der leider viel zu früh verstorben ist, bin ich für die Motivation und Beratung bei der Durchführung meiner Forschungsarbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Frau Prof. Dr. Duska Dragun schulde ich für ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten großen Dank. Durch ihre hohe wissenschaftliche Qualifikation und Erfahrung war ihre Hilfe von unschätzbarem Wert.

Besonderer Dank gilt meinen amerikanischen Kollegen Dr. Chris Freise, Dr. Sandy Feng und Dr. Claus Niemann. Nur durch ihre Anleitung und tatkräftige Unterstützung konnte ein Großteil der Projekte verwirklicht werden.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Nephrologischen und Urologischen Forschungslabors und nicht zuletzt allen beteiligten Koautoren der publizierten Arbeiten danken.

### **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

(gemäß Habilitationsordnung der Charité, Universitätsmedizin Berlin)

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 1. November 2006

Dr. med. T. Florian Fuller

**ANLAGE****Artikel Nr. E1**

**Increased rejection in living unrelated versus living related kidney transplants does not affect short-term function and survival.**

**Transplantation 2004; 78:1030-1035**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E2**

**Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney  
grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand.**

**Transplantation 2001; 72:216-222**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E3**

**Influence of donor pretreatment with n-acetylcysteine on  
ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts.**

**J Urol 2004; 171:1296-1300**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E4**

**Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with  
severe preservation reperfusion injury.**

**J Surg Res 2007; 140:77-83**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E5**

**Ischemic preconditioning improves rat kidney graft function after  
severe ischemia/reperfusion injury.**

**Transplant Proc 2005; 37:377-378**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E6**

**Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury.**

**Transplantation 2003; 76:1594-1599**

**Fuller TF, et al.**

**Artikel Nr. E7**

**Effect of mycophenolate mofetil on rat kidney grafts with  
prolonged cold preservation.**

**Kidney Int 2006; 70:570-577**

**Fuller TF, et al.**