

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

DISSERTATION

Der Einfluss von TNF- α -Inhibitoren auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden und assoziierte
Inflammationsreaktionen in der Dünndarmtransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Georgi Atanasov
aus Varna

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Pascher
2. Prof. Dr. med. S. Jonas
3. Prof. Dr. med. J. Pratschke

Datum der Promotion: 22. März 2013

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1. Das chronische Darmversagen und Indikationen zur Dünndarmtransplantation | 7 |
| 1.2. Kurze Geschichte der Dünndarmtransplantation | 10 |
| 1.3. Operationstechnik | 10 |
| 1.4. Aktueller Stand und Ergebnisse der Dünndarmtransplantation | 12 |
| 1.5. Therapeutischer Ansatz für die Verwendung von TNF- α -Inhibitoren in der experimentellen und klinischen Transplantation vaskularisierter Organe | 14 |
| 2. Stand der Forschung | 15 |
| 2.1. Der Ischämie-/Reperfusionsschaden | 15 |
| 2.2. Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschadens nach Dünndarmtransplantationen | 16 |
| 2.2.1. Veränderungen der resorptiven Funktion des Dünndarms | 16 |
| 2.2.2. Bakterielle Translokation | 17 |
| 2.2.3. Schädigung extraintestinaler Organe | 17 |
| 2.3. TNF- α beim Ischämie-/Reperfusionsschaden | 17 |
| 2.4. Immuntherapie mit TNF- α -Inhibitoren | 19 |
| 3. Fragestellung | 21 |
| 4. Material und Methoden | 22 |
| 4.1. Versuchsaufbau | 22 |
| 4.2. Versuchsgruppen | 22 |
| 4.3. Versuchstiere | 23 |
| 4.3.1. Isogenes Modell der orthotopen Dünndarmtransplantation | 23 |
| 4.3.2. Tierausswahl, Haltung und Kennzeichnung | 24 |
| 4.3.3. Tierschutzrechtliche Genehmigung | 24 |
| 4.4. Operation, Tierbehandlung und Probenentnahme | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.4.1. | Narkose und perioperative Versorgung | 24 |
| 4.4.2. | Entnahme und Lagerung des Transplantats | 25 |
| 4.4.3. | Orthotope Implantation des Spenderorgans | 25 |
| 4.4.4. | Euthanasie des Empfängertiers | 29 |
| 4.5. | Auswertungsverfahren | 29 |
| 4.5.1. | Histomorphologie | 29 |
| 4.5.2. | Immunhistochemie | 30 |
| 4.5.3. | Apoptose-Färbung | 30 |
| 4.5.4. | Myeloperoxidase-Färbung | 31 |
| 4.5.5. | Leukozytenisolation und Proteinaufreinigung aus den Dünndarmtransplantaten | 32 |
| 4.5.6. | Zytokin- und Chemokinbestimmung | 32 |
| 4.5.6.1. | Messprinzip | 32 |
| 4.5.6.2. | Durchführungsprotokoll | 33 |
| 4.6. | Statistische Verfahren | 33 |
| 4.7. | Material | 34 |
| 5. | Ergebnisse | 40 |
| 5.1. | Ein-/Ausschlusskriterien | 40 |
| 5.2. | Überleben | 40 |
| 5.3. | Histomorphologie | 41 |
| 5.4. | Immunhistochemie | 45 |
| 5.5. | Detektion apoptotischer Zellen | 54 |
| 5.6. | Infiltration der Empfängerlunge mit neutrophilen Granulozyten | 54 |
| 5.7. | Zytokinkonzentrationen in den Dünndarmtransplantaten und den Empfängerlymphknoten | 57 |
| 6. | Diskussion | 58 |
| 7. | Zusammenfassung | 72 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 74 |
| 9. | Glossar | 85 |

| | | |
|------------|----------------------------------|-----------|
| 10. | Publikationsverzeichnis | 87 |
| 11. | Danksagung | 88 |
| 12. | Lebenslauf | 89 |
| 13. | Eidesstattliche Erklärung | 90 |

1. Einleitung

1.1. Das chronische Darmversagen und Indikationen zur Dünndarmtransplantation

Der Begriff des chronischen Darmversagens wurde vor ca. 30 Jahren eingeführt und stellt heutzutage ein selbstständiges Krankheitsbild mit klar definierten Therapiestrategien dar. 1981 definierten Fleming und Remington das Darmversagen als die Reduktion des funktionstüchtigen Darmes unter die für die normale Digestion und Absorption von aufgenommener Nahrung notwendige Masse (1). Das chronische Darmversagen kann als ein Zustand definiert werden, bei dem die suffiziente orale Nahrungsaufnahme sowie die Absorptionskapazität des Darmes nicht aufrechterhalten werden können, was zu einem unkontrollierten Verlust an Nahrungsenergeträgern für den Organismus führt. Die betroffenen Patienten werden häufig von einer totalen parenteralen Ernährung (TPN) abhängig. Die Ursachen der Entstehung des chronischen Darmversagens können wiederholte chirurgische Darmresektionen als Folge von Trauma, Volvulus, mesenterialer Ischämie und Infarzierung sein. Des Weiteren kann trotz suffizienter Dünndarmlänge ein funktionelles Versagen als Komplikation im Rahmen eines Acquired Immune Deficiency Syndrom (AIDS), durch Diarrhöe unklarer Ätiologie oder nach Resektion spezialisierter Dünndarmabschnitte entstehen (2). Insgesamt wird die kritische Restlänge des Dünndarms, unterhalb welcher ein permanentes Kurzdarmsyndrom mit großer Wahrscheinlichkeit entsteht, auf 80-100 cm geschätzt. Bei Kindern liegt diese Länge bei ca. 40 cm. Die normale Länge des Dünndarms beträgt 350-400 cm. Meist variiert diese Zahl jedoch im einzelnen Individuum stark. Die Nahrungsbestandteile, die den Dünndarm erreichen, werden hauptsächlich im Jejunum aufgenommen. Dort sind die meisten zellulären Verdauungsenzyme lokalisiert. Kohlenhydrate, Stickstoff und Fette werden präferenziell in den ersten 100 bis 150 cm des Jejunums resorbiert. Im Gastrointestinaltrakt werden täglich 8-9 L Flüssigkeit transportiert. Bis zu 80% davon werden unter normalen Umständen im Ileum reabsorbiert. Die Aufnahme von Vitamin B12 und Gallensäuren via enterohepatischem Kreislauf findet im distalen Ileum statt. Der Verlust des enterohepatischen Kreislaufs führt zum Gallensäurenverlustsyndrom und zur Malabsorption von Fetten. Die Folgen eines Darmversagens sind erhöhte Sekretion, reduzierte Absorption von Nahrungsträgern und Flüssigkeiten sowie der Verlust an hormonellen Rückkopplungsmechanismen. All diese Faktoren begünstigen die Entstehung einer hochosmolaren Diarrhöe. Des Weiteren wird die bakterielle Überwucherung im Darmlumen durch die Anhäufung von nicht verdauten Kohlenhydratbestandteilen entscheidend gefördert, was wiederum die Entstehung von osmotischer Diarrhöe zur Folge hat. Ein Verlust der Ileozökalklappe führt durch Dilatation und herabgesetzte Motilität ebenfalls zur Überwucherung mit Dünndarmbakterien. Dieser Zustand

hat negative Konsequenzen wie Konkurrenz um Nahrungsbestandteile, Entzündungen, gastrointestinale Blutungen, bakterielle Translokationen, Endotoxinämie sowie Leberschädigung und Laktatazidose.

Die klassische Manifestationsform des chronischen Darmversagens ist die Malabsorption von Nahrungsbestandteilen. In anderen Fällen stehen eine gestörte Flüssigkeitshomöostase und die Unmöglichkeit, ausgeglichene Serumelektrolytspiegel aufrechtzuerhalten, welche sich hauptsächlich als Frühkomplikationen zeigen, im Vordergrund. Zu den Spätkomplikationen werden die bakterielle Überwucherung, Mangel an Nahrungsenergeträgern, metabolische Veränderungen sowie die Komplikationen, die auf dem Boden der TPN entstehen, gezählt. Im Rahmen der TPN wird der First-Pass-Effekt der Leber umgangen, was im Langzeitverlauf die Entwicklung von schwerwiegenden Komplikationen wie Steatose, Cholestase und Zirrhose nach sich zieht. Des Weiteren tragen rezidivierende Katheter-assoziierte Sepsisepisoden, Überwucherung mit Darmbakterien und biliäre Sepsis entscheidend zur Entstehung von Leberschädigungen bei 15% der Patienten, die länger als 12 Monate TPN erhalten, bei. Diese entwickeln im weiteren Verlauf eine fortgeschrittene Leberzirrhose, was die 2-Jahres-Mortalitätsrate dieser Patienten auf fast 100% anhebt (3). Innerhalb von 5 Jahren entwickeln mindestens 50% der Patienten unter TPN eine signifikante Leberschädigung, die zu gravierenden Komplikationen führt. Interessant ist die Tatsache, dass bei Patienten mit Darmversagen signifikant häufiger eine komplikationsreiche Lebererkrankung unter TPN entsteht als bei Patienten, die TPN aus anderen Gründen bekommen. Diese Tatsache wird meist mit den rezidivierenden Sepsisepisoden in Verbindung gebracht.

Das Therapieziel bei Patienten mit chronischem Darmversagen ist das Erreichen eines normalen Lebensstandards. Chirurgische Therapieoptionen, die von einer Transplantation absehen, wie z. B. Verfahren zur Verlangsamung der intestinalen Passage, Wiederherstellung der Darmkontinuität oder Vergrößerung der aktiven intestinalen Resorptionsfläche, erbrachten bei kleinen Patientengruppen positive Ergebnisse, die jedoch in größeren klinischen Studien nicht reproduziert werden konnten.

In den letzten Jahrzehnten stellte die parenterale Ernährung die Therapie der Wahl für Patienten mit Kurzdarmsyndrom dar. Trotz Fortschritten auf diesem Gebiet ist diese Therapie häufig mit gravierenden Komplikationen wie Katheter-assoziiierter Sepsis, Hepatotoxizität (Steatohepatitis, Fibrose, Zirrhose) und erniedrigter Lebensqualität verbunden. All diese Faktoren zusammengenommen führen zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 60% für alle Patienten mit totaler parenteraler Ernährung (2).

Basierend auf Daten des internationalen Dünndarmtransplantationsregisters besteht eine Vielfalt

an Indikationen für Dünndarmtransplantation (DTx) (4) (Tabelle 1). Während Gastroschisis (21%), Volvulus (18%), nekrotisierende Enterokolitis (12%), Pseudoobstruktion (9%), intestinale Atresie (7%) und Aganglionose bzw. M. Hirschprung (7%) die Ursache für fast zwei Drittel aller DTx bei Kindern darstellen, dominieren bei Erwachsenen vaskuläre Komplikationen wie ischämische oder hämorrhagische mesenteriale Infarzierung (22%), gefolgt von M. Crohn (13%) und Trauma (12%). Tumore stellen eher eine Ausnahme für die Indikationsstellung zur DTx dar. Ein Beispiel dafür sind low-grade maligne Tumore wie Desmoidtumore, häufig assoziiert mit familiärer adenomatöser Poliposis (Gardner Syndrom).

| | | |
|------------|--|----|
| Kinder | Gastroschisis | 21 |
| | Volvulus | 18 |
| | Nekrotisierende Enterokolitis | 12 |
| | Pseudoobstruktion | 9 |
| | Intestinale Atresie | 7 |
| | Re -Transplantation | 7 |
| | Aganglionosis / Hirschsprung's disease | 7 |
| | Microvillus inclusion | 6 |
| | Malabsorption / Andere | 4 |
| | Tumor | 1 |
| | Andere | 8 |
| Erwachsene | Ischämie | 22 |
| | M. Crohn | 13 |
| | Trauma | 12 |
| | Desmoid | 1 |
| | Motilität | 9 |
| | Volvulus | 7 |
| | Kurzdarm / Andere | 7 |
| | Tumor / Andere | 7 |
| | Re -Transplantation | 5 |
| | M. Gardner / FAP | 3 |
| | Andere | 5 |

Tabelle 1.

Indikationen für DTx bei Erwachsenen und Kleinkindern; aus dem internationalen Dünndarmtransplantationsregister; Häufigkeit in %.

1.2. Kurze Geschichte der Dünndarmtransplantation

Als in den späten 1980er Jahren die Dünndarmtransplantation als erste und bis heute einzige kausale Therapie zur Behandlung des Kurzdarmsyndroms und des chronischen Darmversagens mit lebenslanger Abhängigkeit von totaler parenteraler Ernährung durchgeführt wurde, bedeutete dies einen immensen Fortschritt bei der Behandlung der betroffenen Patienten. Jedoch konnten bislang verschiedene schwerwiegende Komplikationen nicht vermieden werden, was die Entwicklung der DTx im Vergleich zur Transplantation von anderen vaskularisierten Organen deutlich langsamer voranschreiten ließ. Hohe Abstoßungsraten als Folge der hohen Immunogenität des Dünndarms, die Gefahr der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD), beobachtet in ca. 15 % der Fälle in den ersten Jahren der Anwendung der DTx (1991-1995), und die bakterielle Translokation mit daraus resultierenden Infektionen nach einer DTx stellten ein gravierendes Risiko dar (4).

Im Jahr 1987 konnte die weltweit erste erfolgreiche Dünndarmtransplantation in Pittsburg, USA, bei einem Kind im Rahmen einer Multiviszeraltransplantation mit nachfolgender Cyclosporin-A-basierter Immunsuppression durchgeführt werden (5). 6 Monate nach der Transplantation verstarb das Kind an einem B- Zell- Lymphom. Die erste Lebendspende-DTx fand 1988 an der Universität Kiel statt (6). Als Ergebnis dieser Operation kam es zu einem 56-monatigen Patientenüberleben mit einem über einen langen Zeitraum zufriedenstellend funktionierenden Transplantat. Weltweit wurden in der Folgezeit mehrere Dünndarmtransplantationen erfolgreich durchgeführt (Grant et al. in London, Ontario, Kanada, Margreiter et al. in Innsbruck, Österreich und Geulet et al. in Paris, Frankreich) (7-9).

Mit der Einführung von Tacrolimus als Immunsuppressivum stiegen die Anzahl der Dünndarmtransplantationen und das Langzeitüberleben bis zum Ende der 1990er Jahre stetig an. Nach der Kostenübernahme für DTx vom Krankenversicherungssystem in den Vereinigten Staaten im Jahr 2000 erhöhte sich die weltweite Anzahl der DTx signifikant auf ca. 150 Transplantationen pro Jahr.

1.3. Operationstechnik

Für die Abtrennung der Mesenterialgefäße werden bei der Transplantatentnahme im Rahmen der Spenderoperation A. und V. mesenterica superior im Bereich der Mesenterialwurzel selektiv durchtrennt. Die Notwendigkeit eines Aorteninterponats mittels Spender-A. iliaca ergibt sich aus dem Vorhandensein variabler Mesenterialarterien. Es kann hierfür auch notwendig werden, mehrere Mesenterialarterien zu rekonstruieren (10, 11). Durch eine end-zu-seit-Anastomose wird die V. mesenterica inferior des Spenders direkt mit der V. mesenterica inferior oder der

Konfluenz bzw. der V. mesenterica superior des Empfängers verbunden. Letztere erfordern ein Veneninterponat. Alternativ können bei anatomisch schwierigen Verhältnissen auch die V. cava oder V. renalis zur Anastomosierung verwendet werden (12, 13).

Die Transplantation sollte innerhalb von 6 Stunden nach der Organentnahme erfolgen. Voroperationen des Empfängers machen hierbei häufig Modifikationen des operativen Vorgehens notwendig. Das proximale Ende des Spenderdarms wird end-zu-end mit dem des Empfängers anastomosiert. Distal erfolgt eine Ausleitung des Transplantats mittels Ileostoma durch die Bauchwand. Die intestinale Kontinuität zum Kolon wird end-zu-seit direkt hergestellt. Hierdurch wird die in der Regel 6 Monate nach der Transplantation durchzuführende Rückverlagerung des Ileostomas erleichtert. Auf die Transplantation des Kolons zur Vermeidung von Diarrhöen verzichtet man heute, da hierdurch das Risiko des Auftretens letaler septischer Komplikationen signifikant ansteigt (14). Im Gegensatz dazu jedoch hat sich der Einschluss der Ileozökalregion bei fehlendem Kolon als erfolgreich erwiesen.

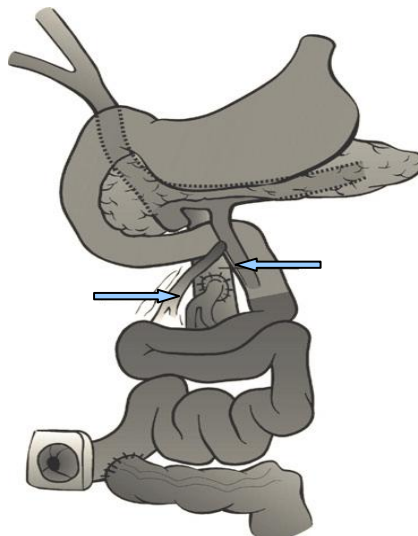


Abbildung 1.

Schematische Darstellung des Dünndarmtransplantates. End-zu-end-Jejunojejunostomie, end-zu-seit-Ileokolostomie und Ausleitung des terminalen Ileums als diagnostisches Ileostoma für 6 Monate. Interposition der A. iliaca des Spenders auf die infrarenale Aorta unter Rekonstruktion von 1-3 Mesenterialarterien. Direkte end-zu-seit-Anastomosierung der Spender-V. mesenterica superior auf die V. mesenterica inferior (Pfeil). Modifiziert nach: Muller AR, Pascher A, Platz K-P, et al. Zentralbl Chir 2003; 128:849-855.

1.4. Aktueller Stand und Ergebnisse der Dünndarmtransplantation

Während das 1- und 3-Jahres-Transplantatüberleben vor 1991, d. h. vor der klinischen Einführung von Tacrolimus, bei ca. 30% bzw. 20% lag, wurden zwischen 1995 und 1997 bereits Raten von ca. 60% bzw. 50% erreicht. Mittlerweile werden 1-Jahres-Patienten- und Transplantat-Überlebensraten von annähernd 80-90% erreicht (4, 9, 15). Selektierte Patientengruppen zeigen sogar bessere Ergebnisse (12).

Diese beeindruckenden Fortschritte sind sowohl von den Verbesserungen der chirurgischen Techniken und den Entwicklungen in der intensivmedizinischen Therapie als auch durch ein besseres Verständnis der intestinalen Immunologie bedingt. Noch entscheidender haben jedoch die Fortschritte in den Bereichen der immunsuppressiven Therapie, der Monitoringmethoden, und der Prävention und Therapie der Posttransplantations-Lymphoproliferativerkrankung (PTLD) zu dieser positiven Entwicklung beigetragen. Dennoch stellt die DTx immer noch eine der größten Herausforderungen bei der Transplantation vaskularisierter Organe dar und ist daher bislang eher eine relativ selten angewendete Prozedur. Weltweit sind bisher annähernd 2500 DTx durchgeführt worden; hiervon laut Internationalem Dünndarmtransplantationsregister die Mehrzahl (60%) bei Kindern (4, 9).

Im Gegensatz zu den exzellenten 1- und 3-Jahres-Überlebensraten sind die Langzeitdaten trotz erheblicher Fortschritte auf dem Gebiet der Dünndarmtransplantation in den letzten Jahren enttäuschend (Abb. 2). Das Langzeitüberleben hat sich im Vergleich zu den Frühzeiten der Dünndarmtransplantation nur wenig gebessert. Heute liegt die 5-Jahres-Patienten- und Transplantat-Überlebensrate bei ca. 53% bzw. 37%. Vergleicht man diese Daten mit den aktuellen 5-Jahres-Transplantat-Überlebensraten von ca. 70% nach Lebertransplantationen, so wird ein großer Forschungs- und Entwicklungsbedarf im Bereich der DTx deutlich (16).

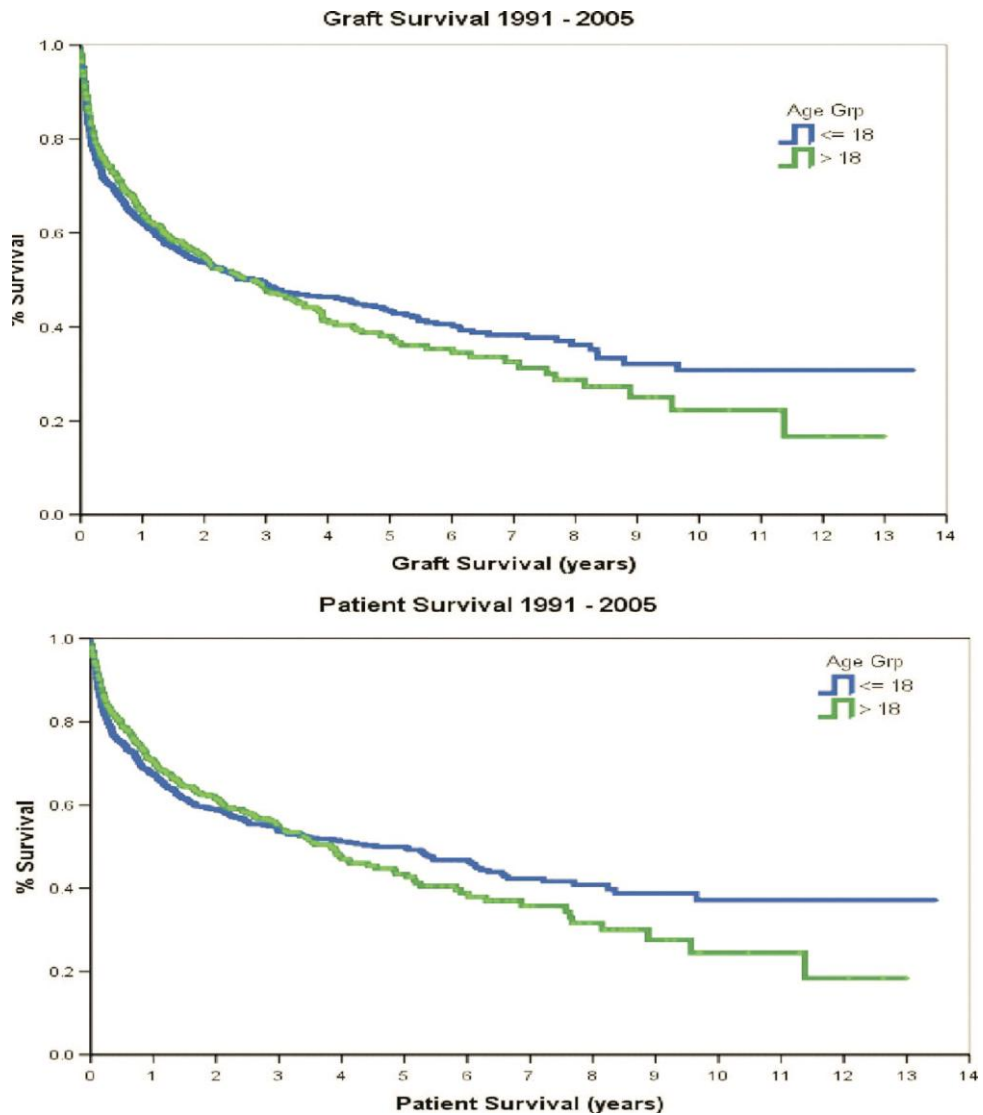


Abbildung 2.

Weltweite Patienten- und Transplantat-Überlebensraten nach DTx basierend auf Daten des Internationalen Dünndarmtransplantationsregisters. Modifiziert nach Ruiz P. Transplantation 2007; 83: 1-6.

Es ist die Verbesserung des Langzeitergebnisses nach Dünndarmtransplantationen, die heutzutage eine der größten Herausforderungen auf dem Gebiet der DTx darstellt. Daher gewinnen früher weniger erforschte Aspekte, deren Relevanz z. B. auf dem Gebiet der Nierentransplantation längst erkannt und in die Forschung einbezogen wurde, zunehmend an Bedeutung. So ist in den letzten Jahren die Minimierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) und damit die Modulation der frühen Transplantatschädigung deutlich in den Fokus der DTx-Forschung gerückt.

1.5. Therapeutischer Ansatz für die Verwendung von TNF- α -Inhibitoren in der experimentellen und klinischen Transplantation vaskularisierter Organe

Der therapeutische Effekt von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)-Inhibitoren konnte bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und ankylosierender Spondylitis nachgewiesen werden. Mehrere TNF- α -Inhibitoren sind für die Therapie der mit M. Crohn und rheumatoider Arthritis assoziierten entzündlichen Manifestationen bereits zugelassen. Diese Medikamente werden zunehmend ebenfalls bei der Therapie der kortikosteroid-resistenten Graft-versus-Host-Erkrankung nach Knochenmarkstransplantation angewendet. In Fallberichten wurde ihre Wirksamkeit auch bei der Behandlung von kortikosteroid- und muromonab-resistenten Abstoßungen nach Dünndarmtransplantation beschrieben (17).

Experimentelle Ergebnisse weisen auf die Schlüsselrolle von TNF- α bei der Vermittlung des I/R-Schadens nach Leber-, Nieren-, Herz-, Pankreas- und Dünndarmtransplantation hin (18). Des Weiteren wurde TNF- α als Markerzytokin während Transplantatabstoßungen identifiziert. Das Molekül ist ein zentraler Mediator im Rahmen des Entzündungsprozesses und der Aktivierung des Immunsystems und hat ein breites Wirkungsspektrum: Zytotoxizität, Induktion von Apoptose und Nekrose, Aktivierung des Nuclear Factor kappa B (NF κ B), Hochregulation von Zelloberflächenmolekülen wie MHC-Klasse I und II, der NO-Synthetase sowie diversen entzündlichen Interleukinen (u. a. IL-1 und IL-6) und TNF- α selbst. Daher gewinnt die Erforschung der potentiellen Rolle der TNF- α -Inhibitoren in der Transplantation vaskularisierter Organe zunehmend an Bedeutung.

Es sind heute mehrere Inhibitoren der TNF- α -Aktivität beschrieben, u. a. Steroide (19), Pentoxiphyllin (20), IL-4 (21) und der chimäre monoklonale Antikörper (mAK) Infliximab (22). Neuere Substanzen, die eine TNF- α -Blockade bewirken, sind das humanisierte lösliche TNF- α -Rezeptor-Konstrukt Etanercept (23), das pegylierte anti-TNF- α -Antikörperfragment CDP-870 (18) und das rekombinante humane TNF- α -bindende Protein Onercept (24).

2. Stand der Forschung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Modulation des Ischämie-/Reperfusionsschadens und der assoziierten inflammatorischen Reaktion durch die Blockade der TNF- α -Aktivität im Rahmen der isogenen Dünndarmtransplantation in der Ratte. Zur Neutralisierung von TNF- α wurden drei unterschiedliche Inhibitoren angewandt: der chimäre monoklonale Antikörper Infliximab, das Fusionsprotein Etanercept und der nicht-selektive Inhibitor der zyklischen 3',5'-Phosphodiesterase (PDE) Pentoxiphyllin. Die Darstellung des Forschungsstandes beschränkt sich auf die hierfür unmittelbar relevanten Aspekte der Transplantationsimmunologie.

2.1. Der Ischämie-/Reperfusionsschaden

Der Prozess des Ischämie-/Reperfusionsschadens ist ein hochkomplexes pathophysiologisches Phänomen bei der Transplantation von Organen wie Hirn, Herz, Leber, Niere und Darm. Der Energiegewinn der Zellen dieser Organe wird hauptsächlich über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien gewährleistet. Die anaerobe Glykolyse allein ist für eine adäquate Sauerstoffversorgung dieser Organe nicht ausreichend. Pathophysiologisch werden zwei Elemente unterschieden: die entnahmebedingte Transplantatischämie und der nachfolgende Reperfusionsschaden im Empfänger.

Beim Ischämieschaden kommt es zum Abfall der mitochondrialen ATP-Produktion und konsekutiv zur kompromittierten Energieproduktion der Zelle. Der somit provozierte Energiemangel hat zur Folge, dass direkt und indirekt intrazelluläre Veränderungen wie Anhäufung von Hydrolasen, Beeinträchtigung der Ionen-Homöostase und Instabilität der zellulären Membranen entstehen. Der erhöhte Natriumgehalt führt zur osmotisch bedingten Anschwellung der Zelle, was die Funktion der zellulären Membran zusätzlich stark beeinträchtigt. Die erhöhte Kalziumionenkonzentration bewirkt eine Aktivierung von Phospholipasen und Proteasen, wodurch sich die entstehende Zellschädigung potenziert (25). Aufgrund von ATP-Degradation und Wasserstoffionenanhäufung durch geschädigte Lysosomen sowie gesteigerte anaerobe Glykolyse sinkt der zelluläre pH-Wert. Des Weiteren kumulieren freie Sauerstoffradikale, die eine oxidative zelluläre Schädigung unmittelbar zur Folge haben. Andererseits führt dieser Vorgang zur verstärkten Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Dieses löst über mehrere Zwischenschritte eine oxidative Schädigung intrazellulärer Proteine aus (26). Die NO-Produktion wird durch eine Steigerung der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase zusätzlich erhöht, was den zellulären Schaden aggraviert (27). Das Ergebnis der Summe dieser schädigenden Vorgänge hat den Tod der Zelle zur Folge.

Nach der Reperfusion wird eine zusätzliche Inflammationsreaktion initiiert, wobei

Makrophagen, Endothelzellen, Neutrophile, Lymphozyten, Thrombozyten, Parenchymzellen sowie nichtzelluläre Elemente wie das Komplementsystem, die Gerinnungskaskade, reaktive Sauerstoffradikale, NO, und pro- und antiinflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle spielen. Die im Rahmen der Reperfusion auftretende zelluläre Schädigung ist häufig eine direkte Folge der bei der Ischämie entstandenen intrazellulären Veränderungen. Die Inflammationsreaktion wird sowohl durch Bestandteile der geschädigten Zellen (Zelldetritus) als auch durch die Komponenten der geschädigten Gewebematrix verstärkt. Aktivierte Endothelzellen, Makrophagen, Thrombozyten und Neutrophile, jedoch auch vorgeschädigte und abgestorbene Zellen, sind entscheidend an der Generierung und Freigabe von freien Sauerstoffradikalen beteiligt. Diese Zellspezies nehmen auch maßgeblich an der Produktion und Abgabe von entzündlichen Metaboliten teil, was über positive Feedback-Mechanismen zur einer verstärkten Aktivierung dieser Zellen führt.

Ein pathophysiologisch wichtiger Aspekt, der nach einer kalten Ischämie beobachtet wird, ist die nachfolgende Apoptose der geschädigten Zellen (28). Hier sind kausal Eisenionen beteiligt, die im Rahmen der kalten Organpräservierung akkumulieren. Nach Wiederherstellung der Organperfusion können diese Eisenionen entscheidend bei der Induktion der Apoptose der affizierten Zelle sowie der Produktion von freien Sauerstoffradikalen mitwirken. Die inflammatorische Komponente der Reperfusion ist auch durch die verstärkte Migration von empfängereigenen Neutrophilen in postischämische Transplantatgebiete gekennzeichnet, die durch die gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen den vorbestehenden Schaden verstärken (29). Diese Migration wird durch im Rahmen der Ischämiephase akkumulierte proinflammatorische Zyto- und Chemokine stimuliert. Bei der Ischämie hochregulierte und verstärkt exprimierte Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 auf spendereigenen Transplantatzellen stimulieren zusätzlich die Migration von Entzündungszellen, was einen hämodynamisch wirksamen Einfluss auf die kapilläre Mikroperfusion ausüben kann (30). Die mikrovaskuläre Perfusion wird zusätzlich durch die Anhäufung von diversen schädigenden Stimuli (NO, Endothelin-1, gesteigerte Blutkoagulation) entscheidend beeinträchtigt. Als Folge der mikrovaskulären Dysregulation kann dies in der Reperusionsphase einen hypoxischen Gewebeschaden auslösen.

2.2. Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschadens nach Dünndarmtransplantationen

2.2.1. Veränderungen der resorptiven Funktion des Dünndarms

Nach einem I/R-Schaden des Dünndarms konnten in mehreren Arbeiten Veränderungen der resorptiven Darmfunktion gezeigt werden (31, 32). Dies könnte zu ungenügender Absorption

von Nahrungsbestandteilen führen und bei ausgeprägter Schädigung kann, z. B. bei Infarzierung des Darms, ein Kurzdarmsyndrom entstehen (33). Sileri et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass ein I/R-Schaden des Dünndarms akute und chronische Veränderungen in seiner absorptiven Funktion verursacht, die mit erhöhter Mortalität einhergehen (34).

2.2.2. Bakterielle Translokation

Bakterielle Translokation ist die Passage von vitalen Bakterien vom Gastrointestinaltrakt durch die epitheliale Mukosa zu extraintestinalen Orten wie mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz (35). In Folge breiten sich die Bakterien im gesamten Organismus aus und begünstigen damit die Entstehung von Sepsis, Schock und Multiorganversagen (MOF). Im Rahmen einer Dünndarmtransplantation tritt bakterielle Translokation bei ca. 44% der pädiatrischen Patienten auf (36). Die Erhöhung der intestinalen Hyperpermeabilität, die bakterielle Überwucherung und Varianzen im Immunsystem des Wirts sind Hauptfaktoren, die eine bakterielle Translokation begünstigen (37, 38).

2.2.3. Schädigung extraintestinaler Organe

Der I/R-Schaden des Dünndarms resultiert in der Produktion von Molekülen wie Peroxiden, Superoxiden und inflammatorischen Zytokinen, die eine zusätzliche Schädigung der extraintestinalen Organe des Empfängers zur Folge hat. Dies wiederum führt zur Entwicklung eines systemic inflammatory response syndroms (SIRS), welches zum MOF eskalieren kann (39). Desweiteren verursacht intestinaler I/R-Schaden eine Infiltration der Empfängerlunge mit neutrophilen Granulozyten, was die Entwicklung eines akuten Lungenversagens (ARDS) begünstigt (40). Aus diesem Grund wird der Darm auch als 'Motor des MOF' bezeichnet (41).

2.3. TNF- α beim Ischämie-/Reperfusionsschaden

TNF- α wurde ursprünglich als eine Substanz identifiziert, welche im Serum von mit Endotoxin (LPS) injizierten Mäusen nachgewiesen wurde und eine hämorrhagische Nekrose von Tumoren induzieren konnte (42). In Kenntnis dieser Wirkung wurde TNF- α früh für die bei terminalen Krebspatienten beobachtete Kachexie verantwortlich gemacht (43). Heute ist bekannt, dass TNF- α über ein breites Spektrum biologischer Funktionen verfügt, die in ihrer Gesamtheit für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von entzündlichen Reaktionen von größter Bedeutung sind. TNF- α gehört zur großen TNF-Superfamilie und ist in seiner biologischen Form ein nicht-glykosyliertes Molekül (17,3 kD), das als Homotrimer entweder in membrangebundener oder infolge proteolytischer Spaltung durch die Matrix-Metalloprotease TACE (TNF- α -converting

enzyme) in löslicher Form (51 kD) vorliegt (44).

TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. Jedoch zählen zu den Hauptproduzenten auch Endothelzellen und eine Reihe von Immunzellen wie aktivierte Lymphozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Kupffer-Zellen und Mastzellen. Der I/R-Schaden stellt einen klassischen Mechanismus für die Aktivierung der TNF- α -Synthese dar. Auf der anderen Seite wird die Produktion des entzündlichen Metaboliten z. B. durch Kortikosteroide, IL-4, TGF und IL-6 gehemmt.

Die Wirkung von TNF- α wird durch zwei unterschiedlichen Rezeptoren vermittelt: TNFR1 und TNFR2. Die Bindung zu TNFR1 führt einerseits zur Aktivierung von Kaspasen, was klassischerweise die Apoptose der Zelle zur Folge hat. Andererseits werden über die Bindung von TNF- α an TNFR1 und TNFR2 die biochemischen Transduktionswege induziert, die zur Aktivierung des NF κ B führen. NF κ B seinerseits induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, P-Selectin, E-Selectin), TNF- α , Interleukinen, Chemokinen und Enzymen (iNOS, COX-2) (45, 46). Diese Änderungen vermitteln gemeinsam den proinflammatorischen Effekt von TNF- α .

TNF- α wird als Folge des I/R-Schadens produziert und spielt andererseits in der Pathogenese des I/R-Schadens nach Nieren-, Herz-, Leber- und Pankreastransplantation eine entscheidende Rolle (47-52). Periphere Monozyten, die das transplantierte Organ infiltrieren, werden häufig als der Hauptproduzent von TNF- α angesehen; jedoch zeigten neue Studien, dass auch glomeruläre Mesangiumzellen eine wichtige TNF- α -Quelle darstellen (53). Im Herz trägt von lokalen Kardiomyozyten hergestelltes TNF- α zur Entstehung eines I/R-Schadens nach einer Herztransplantation bei (48-51). In der Leber produzieren Kupffer-Zellen TNF- α als Antwort auf TNF- α und IL-1 im Rahmen eines I/R-Schadens (54, 55). Es wurde gezeigt, dass auch Enterozyten erhöhte Mengen an entzündlichen Zytokinen während Sepsis, hämorrhagischem Schock und Trauma produzieren (56).

Die TNF- α -Effekte beim I/R-Schaden von Leber, Niere und Herz sind relativ gut bekannt. Jedoch ist die Rolle von TNF- α beim I/R-Schaden von anderen vaskularisierten Organen wie dem Dünndarm weniger erforscht. Die detaillierten Aspekte der Signalkaskade, welche die Produktion von TNF- α im Rahmen des I/R-Schadens induziert, wurden hauptsächlich durch experimentelle Modelle des I/R-Schadens von Herz und Niere bekannt. Diese Kaskade wurde am Beispiel der Makrophagen am besten definiert. Das bakterielle LPS ist der potenteste Stimulator der Produktion von TNF- α in diesen Zellen (57, 58). LPS bindet an den CD14-Rezeptor, was die Phosphorylierung von mehreren Proteinkinasen provoziert (59, 60), welche wiederum die Aktivierung von RAS (rat sarcoma), einem Proto-Onkogen, anregen. Nachfolgend

aktiviert RAS die MAP-Kinasen (61, 62). Die p38 MAP-Kinase (MAPK14) bewirkt die Aktivierung von NF κ B und die nachfolgende Produktion von TNF- α (63, 64) Die Bindung von TNF- α an TNFRI und TNFRII induziert seine weitere Produktion im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Auf der anderen Seite aktivieren im Rahmen der Reperfusion freigesetzte freie Radikale die p38 MAP-Kinase und nachfolgend NF κ B sowie die Synthese von TNF- α (65).

2.4. Immuntherapie mit TNF- α -Inhibitoren

TNF- α spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Entzündungsprozesses. TNF- α -Inhibitoren kommen derzeit in der Therapie von pathophysiologischen Zuständen, in die TNF- α kausal involviert ist, vielfältig zur Anwendung. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche TNF- α -Inhibitoren zur Modulation des I/R-Schadens und der nachfolgenden Entzündungsreaktion nach DTx eingesetzt: Infliximab, Etanercept und Pentoxiphyllin.

Infliximab ist ein monoklonaler, chimärer Maus-anti-Mensch IgG1 anti-TNF- α -Antikörper, der sowohl gegen den löslichen als auch den membrangebundenen Anteil des TNF- α -Moleküls gerichtet ist (Abb. 3). Es besitzt die konstante Region des menschlichen IgG1 (75%) und die antigenbindende variable Region (25%) der Maus (Abb. 3) (66). Infliximab wurde als therapeutische Option in GvHD nach Knochenmarkstransplantationen eingesetzt (67). Seine erfolgreiche Anwendung in der Therapie der kortikosteroid- und OKT3-resistenten Abstoßung nach klinischer DTx wurde dokumentiert (68). Klinische Studien haben seine Wirksamkeit für die Induktion und Erhaltung von Ansprechen und Remission bei Patienten mit aktivem inflammatorischen und fistulierenden M. Crohn nachgewiesen (69, 70). Die Gabe von Infliximab führt zur selektiven Lyse der TNF- α -exprimierenden Zellen (66).

Etanercept, ein Fusionsprotein, bestehend aus dem TNF- α -Rezeptor II (TNFRII) (p75) und der Fc-Region eines humanen IgG1 Antikörpers, bindet spezifisch die trimere Form des löslichen TNF- α -Moleküls (71) (Abb. 3). Die Fc-Region von Etanercept beinhaltet die CH2- und die CH3-Domänen und die Gelenkregion des IgG1, jedoch nicht die CH1-Domäne. Die Inaktivierung von TNF- α durch Etanercept ist 1000 Mal stärker als die Inaktivierung mit dem monomären TNFR (66). In vitro-Versuche haben gezeigt, dass die Neutralisierung von TNF- α mit Etanercept nicht zur Lyse der auf ihrer Oberfläche TNF- α exprimierenden Zelle führt (66). Etanercept assoziiert und dissoziiert schnell mit dem TNF- α -Trimer. Die Bioaktivität des Trimers bleibt hierbei erhalten (72). Die Effizienz von Etanercept, den I/R-Schaden einer transplantierten Niere zu minimieren, indem es die Schädigung der Nierentubuli und die Apoptoserate vermindert, wurde demonstriert (73). Bei M. Crohn zeigte Etanercept im Vergleich zu Infliximab allerdings eine geringere Wirksamkeit (74).

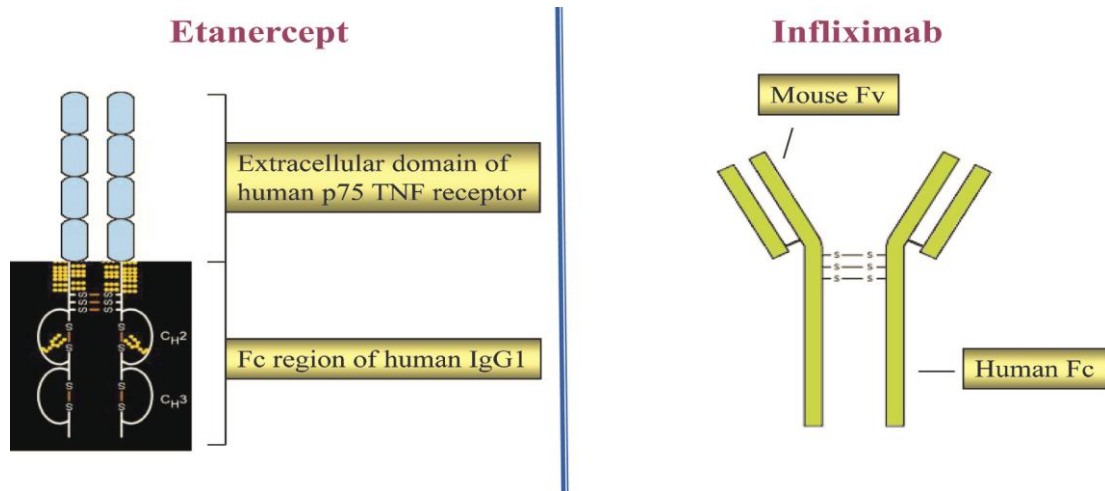


Abbildung 3.

Struktur von Etanercept und Infliximab. Erläuterung siehe Text. Modifiziert nach: Esposito E, Cuzzocrea S. *Curr Med Chem* 2009;16(24):3152-67.

Pentoxiphyllin, ein nicht-selektiver Inhibitor von zyklischer 3',5'-Phosphodiesterase (PDE), ist ebenfalls ein aktiver Inhibitor von TNF- α (75, 76). Pentoxiphyllin ist auch als ein rheologisches Medikament bekannt. Als aktiver TNF- α -Inhibitor besitzt dieses Mittel ein breites Wirkungsspektrum gegen Inflammation und Zellproliferation. Pentoxiphyllin zeigte Wirksamkeit in der Prävention der Hochregulation von TNF- α im I/R-Schaden nach experimenteller Lebertransplantation, was einen signifikanten Abfall der Serumkonzentration von ASAT und der Apoptoserate sowie ein verlängertes Transplantat-Überleben zur Folge hatte (77). Die Eigenschaft von Pentoxiphyllin, die Produktion von TNF- α zu inhibieren und somit die Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten zu verhindern, wurde auch auf dem Gebiet der Lungentransplantation demonstriert. Seine Gabe in der Flush-Lösung reduzierte die Myeloperoxidaseaktivität und die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten (78).

3. Fragestellung

Die Frage, inwiefern ein Ischämie-/Reperfusionsschaden und damit assoziierte Immunreaktionen durch die perioperative Gabe der TNF- α -Inhibitoren Infliximab, Etanercept und Pentoxiphyllin in der Dünndarmtransplantation beeinflusst werden, ist bisher nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit kam ein etabliertes, isogenes Dünndarmtransplantationsmodell für Ratten zur Anwendung. Es wurden drei mit den TNF- α -Inhibitoren behandelte Gruppen sowie eine Kontrollgruppe gebildet. Gewebeproben der Empfänger wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten nach der Transplantation gewonnen. Der isogene Versuchsaufbau stellte sicher, dass das Auftreten einer Abstoßungsreaktion nach der Transplantation vermieden wurde. Das Zustandekommen des I/R-Schadens blieb jedoch durch dieses Modell erhalten. Inwieweit die Applikation von TNF- α -Inhibitoren den Prozess des I/R-Schadens und die damit verbundene Entzündung in den Empfängertieren minimiert, wurde histologisch und immunhistochemisch untersucht. Hierzu wurden in den Gewebeproben der Grad des I/R-Schadens und die Frequenz von CD4+, CD8+ und CD25+ T-Zellen, ED1+ Makrophagen, OX62+ dendritischen Zellen, MHC-Klasse II und die HSP70-Expression bestimmt. Ergänzend wurden die Expressionsniveaus charakteristischer proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-4, IL-6) in den Dünndarmtransplantaten und den mesenterialen Lymphknoten sowie die Apoptoserate in den Transplantaten ermittelt. Ferner wurde nach TNF- α -Blockade der Ausprägungsgrad der Neutrophileninfiltration in die Empfängerlunge als Folge der systemischen Entzündungsreaktion nach DTx untersucht.

Beantwortet werden sollten die folgenden Fragen:

Welchen Einfluss hat die perioperative TNF- α -Blockade beim Empfänger auf:

1. das Empfängerüberleben, den I/R-Schaden und die histomorphologischen Organveränderungen?
2. die Expression einer Reihe immunologischer Markermoleküle und proinflammatorischer Zytokine, die Apoptoserate und die Protektion der Empfängerlunge?

4. Material und Methoden

4.1. Versuchsaufbau

In einem etablierten isogenen Dünndarmtransplantationsmodell in der Ratte (Lewis/Lewis) wurden Untersuchungen zur Charakterisierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens und der inflammatorischen Reaktionen, die durch den Prozess der Schädigung ausgelöst und vermittelt werden, unter Einsatz von TNF- α -Inhibitoren durchgeführt. In den Versuchen wurden Lewis-Ratten sowohl als Spender- als auch als Empfängertiere verwendet. Da in diesem Transplantationsmodell keine Abstoßungsreaktion stattfinden kann, konzentrieren sich die Untersuchungen ausschließlich auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden und die nachfolgende Entzündungsreaktion.

Davon ausgehend, dass TNF- α eine zentrale Rolle bei der Initiierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens und der assoziierten Entzündungsreaktionen spielt, wurden zur Neutralisierung von TNF- α die Substanzen Infliximab, Etanercept und Pentoxiphyllin in den drei behandelten Gruppen eingesetzt. In der Kontrollgruppe wurde ebenfalls eine isogene Dünndarmtransplantation durchgeführt, jedoch erfolgte keine Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren. Um normale Vergleichswerte für die untersuchten Variablen zu bekommen, diente eine weitere Tiergruppe als native Kontrollgruppe. In dieser Gruppe fand weder eine Transplantation noch eine Tierbehandlung mit TNF- α -Inhibitoren statt.

4.2. Versuchsgruppen

Die Empfängertiere wurden randomisiert auf vier Gruppen verteilt. Jede Gruppe bestand aus 18 Tieren. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe (TxK). In dieser Gruppe fand keine Behandlung statt. Den Empfängertieren der weiteren drei Gruppen wurden die TNF- α -Inhibitoren Etanercept (E), Pentoxiphyllin (P) und Infliximab (I) gemäß den Behandlungsprotokollen appliziert. Zusätzlich wurde jede dieser Empfängergruppen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen (12 Stunden, 7 Tage, 6 Monate) in drei Subgruppen mit je 6 Tieren unterteilt. In den Subgruppen, die eine Beobachtungszeit von 12 Stunden durchliefen, wurde intraoperativ 20 Minuten nach der Reperfusion zusätzlich eine Segmentresektion vom proximalen bzw. distalen Dünndarmtransplantat durchgeführt. In einer fünften nativen Kontrollgruppe (K), welche aus 6 Tieren bestand, fand weder eine Transplantation noch eine Therapie mit TNF- α -Inhibitoren statt (Tabelle 2).

| Gruppe | DTx | Behandlung | Beobachtungszeitraum | | |
|-----------------------------|-----|---|----------------------|-----------|-----------|
| | | | 20 min/ 12 h | 7 d | 6 m |
| native Kontrolle (K) | - | - | n 1 - 6 | | |
| DTx-Kontrolle (TxK) | + | - | n 7 - 12 | n 13 - 18 | n 19 - 24 |
| Infliximab (I) | + | 8 mg/kg KG i.v. unmittelbar nach Reperfusion | n 25 - 30 | n 31 - 36 | n 37 - 42 |
| Etanercept (E) | + | 1 mg/kg KG s.c. 30 min vor Reperfusion und am POD 1, 3, 5 und 7 | n 43 - 48 | n 49 - 54 | n 55 - 60 |
| Pentoxiphyllin (P) | + | 50 mg/kg KG i.p. 30 min vor Reperfusion | n 61 - 66 | n 67 - 72 | n 73 - 78 |
| | | 25 mg/kg KG i.p. am POD 1-5 | | | |

Tabelle 2.

Behandlungsprotokoll mit TNF- α -Inhibitoren in den unterschiedlichen Tiergruppen.

4.3. Versuchstiere

4.3.1. Isogenes Modell der orthotopen Dünndarmtransplantation

Als Modell wurde ein etabliertes, isogenes Transplantationsmodell eingesetzt. Der Begriff isogene (auch syngene oder isologe) Transplantation bedeutet Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen zwischen genetisch identischen Individuen. Dazu zählen eineiige Zwillinge oder Tiere desselben Inzuchtstammes. Daher kann bei dieser Transplantationsart keine Abstoßungsreaktion stattfinden. Jedoch bleiben der Prozess des Ischämie-/Reperfusionsschadens und die nachfolgende Entzündungsreaktion unbeeinflusst.

4.3.2. Tierausswahl, Haltung und Kennzeichnung

Es wurden ausschließlich männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (RT1¹) verwendet (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Bei Versuchsbeginn waren die Tiere ca. 12 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 230-260 g.

Je 2 bis 5 Ratten wurden in einem Standardkäfig (BHT 40x20x60 cm; Techniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Sie hatten während der gesamten Zeit unbegrenzten Zugang zu Wasser und artgerechter Spezialnahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Unterbringung und Betreuung der Tiere erfolgten in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum (Leitung: PD Dr. med. vet. Christian Große-Siestrup) gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).

Zur Identifikation wurden den Tieren in Narkose Lochmarkierungen im Ohr angebracht.

4.3.3. Tierschutzrechtliche Genehmigung

Alle Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Tierversuchsvorhaben G 0196/ 06).

4.4. Operation, Tierbehandlung und Probenentnahme

4.4.1. Narkose und perioperative Versorgung

Aufgrund besserer Steuerbarkeit und größerer therapeutischer Breite wurde ein Inhalationsverfahren verwendet (79). Die Tiere wurden mit 2%-Vol. Isofluran im Gemisch mit 80% Sauerstoff und 20% Lachgas anästhesiert. Die Einleitung erfolgte in einem Kunststoffzylinder bei kurzzeitig erhöhter Konzentration von 4%-Vol. Isofluran und einer Applikationsdauer von 2-3 Minuten.

Die Abdomen der Tiere wurden vor den Eingriffen rasiert und die Tiere in Rückenlage unter dem Operationsmikroskop fixiert. Die kontinuierliche Narkoseapplikation und die Absaugung der Expirationsluft erfolgten über eine Gesichtsmaske. Bei Organimplantation wurde 15 Minuten nach OP-Beginn die Konzentration auf 1,5%-Vol. Isofluran gesenkt. So wurden für die durchschnittliche Dauer der Operation von 100 Minuten eine ausreichend tiefe Narkose und rasches postoperatives Erwachen sichergestellt. Nach Abschluss der Eingriffe wurden die Empfänger zum Ausgleich des Wärmeverlustes für 15-20 Minuten unter eine Wärmelampe verbracht.

Die postoperative analgetische Versorgung erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) mit Pentazocin s.c.

4.4.2. Entnahme und Lagerung des Transplantats

Präoperativ wurden dem Spender 0,05 ml Heparin in 0,15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung in die V. dorsalis profunda penis injiziert. Der Wert einer solchen Koagulationsprophylaxe wird allgemein betont (80). Durch das Prüfen des Zwischenzehenreflexes wurde sichergestellt, dass das Anästhesiestadium III2 (Stadium der chirurgischen Toleranz) erreicht war, bevor die Laparotomie erfolgte. Das Abdomen des Spenders wurde dann medial laparotomiert und mit der Präparierschere auf mittlerer Höhe über die volle Breite quer inzidiert. Jejunum und Ileum wurden mit der entsprechenden Gefäßversorgung mittels eines feuchten Wattetupfers vorsichtig auf die rechte Tierseite gelagert. Das Treitz'sche Band wurde mit einer Mikro-Federschere durchtrennt. Das gesamte Colon mit distalem Ileum wurde freipräpariert, ligiert und aus der Bauchhöhle entfernt. Das Dünndarmkonvolut wurde in mit warmer NaCl-Lösung befeuchtete Gaze gehüllt und auf die rechte Seite des Tieres ausgelagert. Dann wurde die Pfortader vorsichtig von Pankreas, Binde- und Fettgewebe sowie von zuführenden Gefäßen (V. pylorica, V. splenica) befreit. Die abdominale Aorta wurde im Umfeld der abgehenden A. mesenterica superior stumpf mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und freipräpariert und die A. mesenterica superior wurde von umgebendem Bindegewebe befreit. Die distale Aorta wurde mit Wattetupfern vom Peritoneum und von umgebendem Bindegewebe befreit, mit einer Mosquitoklemme proximal zur Aortenbifurkation geklemmt und dabei leicht angehoben. Kranial des Abganges der A. mesenterica superior wurde die Aorta mit einer zweiten Mosquitoklemme verschlossen. Anschließend wurde das Transplantat mittels einer Kanüle über die infrarenale Aorta mit 1 ml kalter University of Wisconsin- (UW) Lösung perfundiert. Nachdem die Pfortader lebernah durchtrennt wurde, wurde die A. mesenterica superior mit einem verbleibenden Aortenpatch von der Aorta getrennt. Das intestinale Lumen wurde sodann vorsichtig mit 5 ml UW-Lösung irrigiert. Das entnommene Organ wurde für 6 Stunden bis zur Transplantation bei 4°C in UW-Lösung gelagert.

4.4.3. Orthotope Implantation des Spenderorgans

1971 beschrieben Monchik und Russel die heterotope Dünndarmtransplantation in der Ratte (81). In diesem Modell wird der transplantierte Dünndarm mittels proximalen und distalen Stomata über die Bauchdecke ausgeleitet. Des Weiteren wird der Empfängerdünnarm in situ belassen. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte orthotope Dünndarmtransplantation, entwickelt von Kort et al. (82), stellt das bevorzugte Transplantationsmodell für physiologische Untersuchungen bei Dünndarmtransplantation dar, da die Mucosa des Dünndarms ständigen Kontakt mit der aufgenommenen Nahrung benötigt, um eine normale Funktion zu gewährleisten (83).

Die Empfängertiere wurden auf die gleiche Weise wie die Spendertiere narkotisiert, rasiert und auf der Arbeitsfläche fixiert. Längslaparotomie und Exposition des Situs wurden ebenfalls wie für die Spendertiere beschrieben, durchgeführt. Nach dem Darstellen und Durchtrennen des Treitz'schen Bandes wurde der Dünndarm des Empfängers außerhalb der Bauchhöhle auf der rechten Seite des Tieres in feuchtwarme Gaze gehüllt gelagert. Nachdem die infrarenale Aorta und die V. cava inferior vorsichtig mobilisiert und vom umgebenden Bindegewebe befreit wurden, wurde ein kurzer Verlauf beider Gefäße gemeinsam mit Mikro-Gefäßklemmen proximal sowie distal verschlossen. (Abb. 4).



Abbildung 4.

Infrarenale Aorta (im Bild rechts) und V. cava (im Bild links) des Empfängers vor Anlegen der arteriellen und venösen Anastomose. Im kranialen Anteil der Aorta ist der Abgang der linken Nierenarterie erkennbar.

Innerhalb dieses isolierten Gefäßverlaufes wurde die Aorta mit einer feinen, spitzen Pinzette etwas angehoben und anschließend eine elliptische Aortotomie ausgeführt. Etwas kranial der Aortotomie wurde eine längs verlaufende Venotomie durchgeführt. Beide Gefäßlumina wurden mit heparinierter NaCl-Lösung gespült. An beide Enden der venösen Öffnung wurde jeweils ein 8-0 Nylon-Eckfaden vorgelegt. Das in Gaze feucht gehaltene Transplantat wurde dann im Empfängertier so positioniert, dass die beiden Gefäßenden nahe bei den Gefäßöffnungen des Empfängertieres lagen. Nachdem sichergestellt wurde, dass die Spendervene nicht verdreht war,

wurde diese end-zu-seit mit der V. cava des Empfängers anastomosiert, wobei die beiden vorgelegten 8-0 Nylon-Eckfäden benutzt wurden. Hierbei kam eine fortlaufende Nahttechnik zum Einsatz, wobei zuerst die Rückwand von der Gefäßinnenseite aus genäht wurde, sodass dafür das Transplantat nicht aufs Neue positioniert werden musste. Für die arterielle Anastomose wurden erneut zwei 8-0 Nylon-Eckfäden vorgelegt und sodann die Vorderwand mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (Abb. 5). Danach wurde das Transplantat vorsichtig auf die linke Seite der Bauchhöhle gelegt, sodass die hintere Seite der arteriellen Anastomose mit fortlaufenden Stichen geschlossen werden konnte.

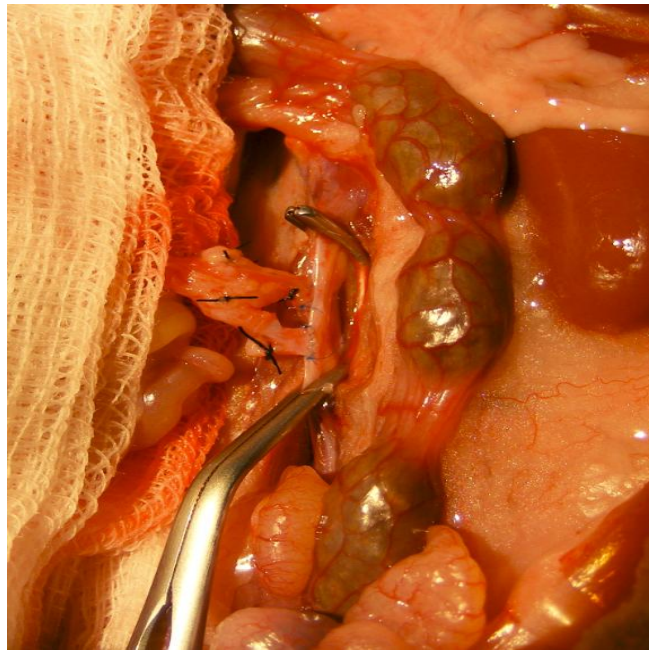


Abbildung 5.

Arterielle Anastomose im mit einer modifizierten Gefäßklemme ausgeschalteten Abschnitt der Empfängeraorta. Links erkennbar: Ligaturen von abgesetzten arteriellen Gefäßen im Bereich des Versorgungsgebietes der A. mesenterica superior des Spenders. Am rechten Bildrand ist die linke Niere des Empfängers zu erkennen.

Nach Abschluss der Gefäßanastomosierung wurde zuerst die distale und anschließend die proximale Mikrogefäßklemme gelöst. Das Transplantat änderte nun bei einwandfreier Anastomosenfunktion augenblicklich seine Farbe von weiß nach rosa. Blutungen an den Anastomosen wurden mit Wattetupfern und feinen Streifen Gelita-Tamponade zum Stillstand gebracht. Das Transplantat wurde dann links in der Bauchhöhle positioniert. Anschließend wurde der auf der rechten Tierseite liegende Empfängerdünndarm freigelegt. Für den dem Transplantat

entsprechenden Darmabschnitt wurden die Gefäße ligiert und durchtrennt. Nachdem das Darmlumen distal wie proximal an den dafür vorgesehenen Stellen durchtrennt worden war, wurde der Empfänger Darm entfernt. Das Transplantat wurde so positioniert, dass die offenen Stomata von Spender- und Empfänger Darm so beieinander lagen, dass nach Ausführung der Darmanastomosen die Kontinuität des Darmverlaufes wieder gewährleistet werden konnte. 20 Minuten nach Reperfusion wurden vom proximalen und distalen Transplantat je ca. 20 cm lange Segmente reseziert und anschließend asserviert. Dazu erfolgte zuerst die Ligatur der entsprechenden Mesenterialgefäße und dann die Durchtrennung des Darmes mit der Mikroschere. Nach Abschluß der Segmentresektion wurden beide end-zu-end-Darmanastomosen mit 7-0 Nylon-Nahtmaterial in einer fortlaufenden eingestülpten Einschichtnahttechnik ausgeführt (Abb. 6).

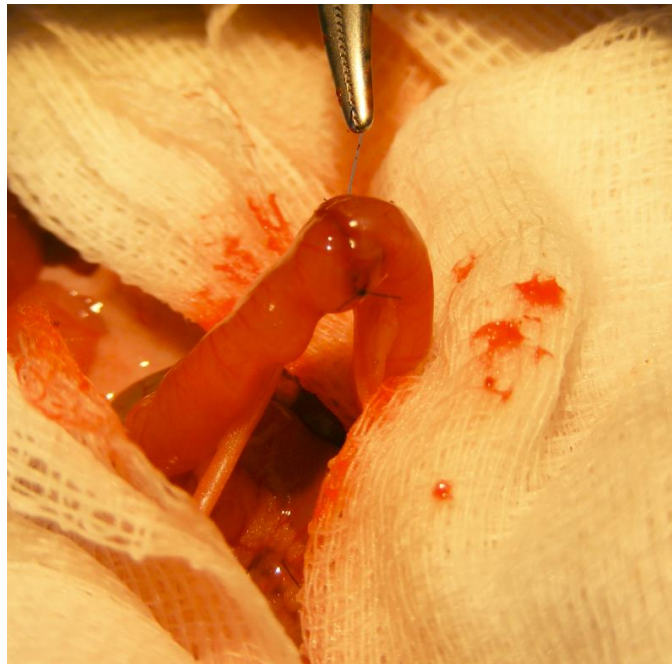


Abbildung 6.

Anlegen der intestinalen Anastomose mittels 7-0-Naht. Die Darmlumina werden in fortlaufender Nahttechnik anastomosiert.

Nach Fertigstellung aller Anastomosen wurden der Situs gespült und eventuelle Koagel entfernt. Abschließend wurden der M. rectus abdominis entlang der Linea alba und sodann die durch Laparotomie inzidierte Haut jeweils durch eine fortlaufende Naht mit 7-0 Prolene verschlossen. Während der Aufwachphase wurden die Tiere in einem isolierten Käfig unter einer Wärmelampe gelagert.

4.4.4. Euthanasie des Empfängertiers

Den Tieren wurden am Ende der Beobachtungszeiträume Transplantat, mesenteriale Lymphknoten und ein Lungenflügel entnommen.

Der Zugang zum Abdomen wurde auf die gleiche Weise geschaffen wie unter 4.4.2. beschrieben. In situ wurde das Transplantat anhand von Konsistenz und Farbe beurteilt und die Gefäßanastomosen auf hämodynamisch relevante Stenosen kontrolliert. Ebenso wurden die proximale und distale Darmanastomose auf Dichtigkeit und Stenosen beurteilt und der vor der Anastomose gelegene Darmabschnitt auf eine eventuelle Distension überprüft. Im freigegebenen Situs wurde das Darmpaket dann vorsichtig nach links luxiert und in eine mit NaCl getränkte Kompresse eingebettet.

In die Aortenbifurkation unterhalb der arteriellen Anstomose wurde ein Venenverweilkatheter gelegt, über den 3 ml Blut in eine Heparin-Monovette abgenommen wurde. Nun wurde die Aorta abdominalis unterhalb des Zwerchfells mit Hilfe einer OP-Zange abgeklemmt und direkt oberhalb davon inzidiert. Anschließend wurde sofort in situ mit 30 ml einer sterilen, 4°C kalten 0,9%igen NaCl-Lösung orthograd perfundiert. Dann wurde der transplantierte Dünndarm entnommen und in einer Petrischale positioniert. Das proximale Ende wurde mittels eines Fadens markiert. Das Lumen wurde vorsichtig vom Dünndarminhalt befreit. Mit der chirurgischen Schere wurden danach repräsentative Stücke (je ca. 2 cm) vom proximalen und distalen Dünndarmtransplantat für ELISA, Immunhistologie und TUNEL entnommen und in separaten Gefäßen schockgefroren. Jeweils ein Dünndarmsegment vom proximalen und distalen Transplantat wurde in 4%iger Formalinlösung für die nachfolgende histopathologische Untersuchung fixiert.

Anschließend wurden 5-6 mesenteriale Lymphknoten unter dem Operationsmikroskop aufgesucht und entnommen und bis zur Weiterverarbeitung, welche binnen einer Stunde erfolgte, in eiskaltem RPMI-Zellkulturmedium gelagert.

Abschließend wurde mit der chirurgischen Schere median sternotomiert und eine Pneumektomie durchgeführt. Von der Lunge wurden Gewebeproben für die MPO-Färbung schockgefroren. Für den Zeitpunkt 20 min nach Reperfusion wurden keine Lymphknoten bzw. Lunge entnommen.

4.5. Auswertungsverfahren

4.5.1. Histomorphologie

Die in 4-%igem gepufferten Formaldehyd, pH 7,4, fixierten Proben wurden in einem Hypercenter (Heraeus, Hanau, Deutschland) maschinell entwässert und in flüssigem Paraffin eingebettet. Nach dem Erkalten wurden aus den Paraffinblöcken mit einem Schlittenmikrotom

(HM 400, Leica, Wetzlar, Deutschland) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem handwarmen Wasserbad gestreckt, auf einen Objektträger aufgezo-gen und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden mit Hilfe von Paraclear entparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach 2 x 15 Minuten im Paraclearbad wurden die Schnitte mit einem xylohaltigen Einbettmedium (Entellan, Merck, Darmstadt, Deutschland) auf den Objektträgern abgedeckt.

4.5.2. Immunhistochemie

Aus den kryokonservierten proximalen und distalen Dünndarmanteilen wurden immunhistochemische Präparate nach der von Cordell beschriebenen APAAP-Methode angefertigt (84).

Mit einem Kryotom (HM 500 OM, Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland) wurden Gefrierschnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden ca. 24 Stunden luftgetrocknet, sodann 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Der Färbung ging eine 30-minütige Präinkubation mit Verdünnungslösung (Waschpuffer mit 1% BSA) zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung voraus. Anschließend wurde mit folgenden monoklonalen Primärantikörpern (Maus Anti-Ratte) (Serotec, Düsseldorf, Deutschland oder Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) für eine Stunde inkubiert: ED1 (Serotec MCA341R), CD4 (W3/25, Serotec MCA55G), CD8 (OX8, Serotec MCA48G), CD25 (OX-39, Serotec MRCOX39), dendritische Zellen (OX62, Serotec MCA1029G), MHC-Klasse II (OX3, Serotec MCA45G) und Hitzeschockprotein 70 (HSP-70, Sigma Aldrich BRM-22). Es folgte die Inkubation mit einem Brückenantikörper (Kaninchen Anti-Maus-IgG, Dako Deutschland) und die Aufbringung des APAAP-Komplexes (Dako Deutschland). Schließlich wurden die Schnitte mit Neu-Fuchsin-Substrat (Naphtol-AS Biphosphat als Substrat und Neu-Fuchsin als Bindungsagens) visualisiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Schnitt wurde abschließend auf dem Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckt.

4.5.3. Apoptose-Färbung

Zur Anwendung kam ein TUNEL (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) -Assay der Firma R&D, bei dem die durch DNS-Doppelstrangbrüche frei werdenden 3'-OH-Enden in apoptotischen Zellen mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert werden. So kann der Apoptosegrad im untersuchten Gewebe quantifiziert werden.

Die auf Objektträger aufgebraachten 5 µm dicken Kryoschnitte der proximalen und distalen

Dünndarmabschnitte wurden in Formaldehydlösung für 10 Minuten fixiert. Die endogene Peroxidase wurde dann mit Quenching-Lösung (H_2O_2 in Methanol, Verdünnung 1:10) für 5 Minuten geblockt und anschließend wurde für 1 Minute in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Markierung der freien 3'-OH-Enden durch Inkubation mit dem Labeling-Reaction-Mix bei $37^\circ C$ für 60 Minuten. Die mitgeführten negativen Kontrollen wurden nur mit PBS behandelt. Die Detektion und Färbung der apoptotischen Zellen wurden anschließend mit Streptavidin-HRP-Detektionslösung (10 Minuten) und DAB- Arbeitslösung (ca. 10 Sekunden unter mikroskopischer Beobachtung) durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte für 15 Sekunden mit Methylgrün gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend mit einem xylohaltigen Einbettmedium (Entellan, Merck, Darmstadt, Deutschland) auf den Objektträgern eingebettet. Alle Schritte wurden gemäß den Empfehlungen des TACS TdT DAB-Kits (R&D TA4625, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) ausgeführt.

4.5.4. Myeloperoxidase-Färbung

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein lysosomales Enzym, welches aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird und somit als spezifischer Parameter für die Aktivierung von Neutrophilen und deren Migration in Gewebe dient. Um nach der Reperfusion den Grad der Infiltration der Empfängerlunge mit neutrophilen Granulozyten zu charakterisieren, wurden vom schockgefrorenen Lungengewebe mittels eines Kryotoms (HM 500 OM, Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland) 10 μm -dicke Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit Fixierlösung (37% Formaldehyd, 100% Ethanol, Verdünnung 1:10) für 30 Sekunden fixiert, 2 Minuten unter fließendem, handwarmem Leitungswasser gewaschen und anschließend für 10 Minuten luftgetrocknet. Danach erfolgte bei $37^\circ C$ unter minimaler Lichtexposition für 30 Minuten die Färbung mit einem Leukocyte Peroxidase Reagent, welches zuvor aus folgenden Komponenten frisch hergestellt worden war: 50 ml eines auf $37^\circ C$ vorgewärmten TRIZMAL 6,3-Verdünnungspuffers, 1 Flasche Peroxidase-Indikatorreagenz und 200 μl einer 3%igen H_2O_2 -Lösung. Nach einem Waschschrift (30 Sekunden mit Leitungswasser) wurden die Schnitte luftgetrocknet, für 10 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt und abschließend erneut gewaschen (30 Sekunden unter fließendem deionisiertem Wasser). Alle Arbeitsschritte wurden mit dem Leukocyte Peroxidase Kit (Sigma Aldrich 390A-1KT, München, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers ausgeführt.

4.5.5. Leukozytenisolation und Proteinaufreinigung aus den Dünndarmtransplantaten

Unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) wurden die soliden Lymphknoten mechanisch in RPMI-Medium zerkleinert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch einen CellStrainer (Porenweite 70 µm) filtriert. Anschließend wurde zur Isolierung der Lymphozyten eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt (2.400 U/min, 4°C, 30 min). Die Lymphozytenfraktion wurde abpipettiert und nach einem Waschschrift in RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert. Zur Einstellung der gewünschten Zellzahl von 15×10^6 Zellen/ml wurden die Proben in Trypanblau-Lösung verdünnt (20 µl Zellsuspension in 980 µl Typanblau-Lösung), in einer Neubauerzählkammer ausgezählt und anhand der ermittelten Zellzahl mit RPMI/FCS-Medium auf die benötigte Endkonzentration eingestellt.

Jeweils 0,5 ml der Zellsuspensionen wurden sodann mit 10 µl LPS für 5 Stunden bei 4°C mitogen stimuliert. Weitere 0,5 ml wurden mit 2 µl PMA und 2 µl Ionomycin für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sowie die mitgeführten unstimulierten Kontrollen zentrifugiert und die Überstände für die spätere Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Proteinaufreinigung wurden die tiefgefrorenen Dünndarmtransplantate in eiskalte Pufferlösung (1 Tablette Complete mini - Protease Inhibitor Cocktail pro 10 ml RIPA-Puffer) überführt und sofort mit einem Ultraturax-Gerät homogenisiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben in Eppendorf-Gefäße pipettiert und zentrifugiert (14.000 U/min, 4°C, 60 min). Die Überstände wurden bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

4.5.6. Zytokin- und Chemokinbestimmung

4.5.6.1. Messprinzip

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient der Konzentrationsmessung von Proteinen in einer Lösung. Hierbei bindet das zu bestimmende Protein spezifisch an einen Antikörper (Capture-Antikörper), der an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Ein zweiter Enzym-gekoppelter Antikörper (Detection-Antikörper), welcher ebenfalls spezifisch für das gesuchte Protein ist, jedoch eine andere Bindungsstelle benutzt, stellt die Brücke zu dem in einem dritten Schritt hinzugefügten Substrat dar. Das Enzym katalysiert die Umsetzung des Substrats zu einem Farbkomplex, dessen Intensität als Absorption photometrisch bestimmt wird. Die Höhe der Absorption ist proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Proteins, welche mittels einer mitgeführten Eichkurve bekannter Konzentrationen ermittelt werden kann.

4.5.6.2. Durchführungsprotokoll

Für die Bestimmung der Konzentrationen von IL-4, IL-6 und TNF- α in den Zellkulturüberständen der Empfängerlymphknoten als auch von homogenisierten Dünndarmproben wurden ELISA-Kits entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt (Rat ELISA-Sets, IL-4: 555198, IL-6: 550319, TNF- α : 558535, BD Biosciences, NJ. USA).

Zunächst wurden die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C mit 100 μ l des verdünnten Capture-Antikörpers inkubiert. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer die Blockade freier Bindungsstellen durch 60-minütige Inkubation mit 200 μ l einer Ziegenproteinenlösung (Assay Diluent, im Kit enthalten). Die Platten wurden fünfmal gewaschen und dann zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) mit einer Standardverdünnungsreihe und den Proben inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Wells für eine Stunde bei RT mit 100 μ l des entsprechend verdünnten Detection-Antikörpers inkubiert und anschließend 7 Mal gewaschen. Anschließend wurde für 30 Minuten die verdünnte Enzymlösung zugesetzt, erneut 7 Mal gewaschen und sodann die Substratlösung aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde die Farbreaktion mittels einer 2 M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Die Extinktion wurde mittels eines Photometers (Fluostar Galaxy®, BMG, Offenburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Anhand der Standardreihe wurden Eichkurven erstellt, mit deren Hilfe aus den gemessenen Extinktionen die Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt wurden.

4.6. Statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden mit gängigen Verfahren der deskriptiven Statistik elektronisch ausgewertet und dargestellt. Alle Daten wurden als arithmetisches Mittel \pm des mittleren Standardfehlers ausgedrückt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen. In Abhängigkeit von der Datenskalierung kamen unterschiedliche analytische Tests zur Anwendung: kumulative Überlebensraten und die mittlere Überlebenszeit wurden nach Kaplan-Meier dargestellt und mit dem Log-Rank-Test auf Signifikanz überprüft (85, 86). Multiple Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungs- und Kontrollgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden mittels two way ANOVA (analysis of variance) (Statistiksoftware GraphPad Prism Version 4) durchgeführt. Der Bonferroni post-hoc Test wurde für individuelle Zeitpunkte und Unterschiedsanalysen innerhalb der Gruppen angewendet.

4.7. Material

Die folgende Aufstellung enthält die Markennamen der verwendeten Materialien. Die Bezeichnungen entsprechen den im Text verwendeten.

OP-Instrumente

| | |
|----------------------------|---|
| Operationsmikroskop M690 | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Präparierschere 14519-14 | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Mikropinzetten 11252-40 | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Mikroschere 15020-15 | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Mikrogefäßklemmen 18320-11 | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Mikronadelhalter 80-2003 | Codman, Norderstedt, Deutschland |
| Narkosezylinder / -maske | Eigenbau |

Nahtmaterial

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| Prolene® USP 8-0 | Ethicon, Norderstedt, Deutschland |
| Vicryl® USP 4-0 | Ethicon, Norderstedt, Deutschland |
| Ethilon Nylon 7-0, | Ethicon, Norderstedt, Deutschland |
| Ethilon Nylon 8-0 | Ethicon, Norderstedt, Deutschland |
| Seide „E“ 6/0 | Resorba, Nürnberg, Deutschland |

Laborgeräte

| | |
|--|---|
| Hypercenter | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Inkubator | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Mikrotom HM 400 | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Tischmikroskop EX41 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Cryotom HM 500 OM | Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland |
| Macintosh PC | Apple Corporation, Cupertino, CA, USA |
| Fluostar Galaxy® (Photometer) | BMG, Offenburg, Deutschland |
| Fluostar Galaxy® 4.21-0 (Photometersoftware) | BMG, Offenburg, Deutschland |
| pH-Meter CG840 | Schott, Mainz, Deutschland |
| pH-Sonde 52000102 | Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland |
| Feinwaage AC121A | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Varifuge 3.0R (Zentrifuge) | Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, New York, USA |

GraphPad Prism 4.0 (Statistiksoftware)
Pipetten 2,5 ml, 100ml, 1000ml, 5000ml,

Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Verbrauchsmaterial

Venenverweilkanüle (REF 393204)
Spritzen und Kanülen, verschiedene Größen
Lithium-Heparin-Monovette, 5,5 ml
Blutmonovetten
Kunststoffröhrchen, 14 ml (Falcon®-Tube)
Kunststoffröhrchen, 50 ml (Falcon®-Tube)
Cryogefäß, 1,8 ml (Nalgene® Cryogenic Vial)
Eppendorf-Gefäße, 2ml
Petrischale
Pipettenspitzen, diverse Größen
ELISA-Platten, Module je 96 Wells
(F16 Maxisorp Loose®; Nr. 469914)
Einbettkassetten
DAKO-Pen
Zellsieb, 70 µm (Falcon® Cell Strainer)
Kompressen 10x10 cm

BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Nalgene Nunc, Rochester, NY, USA
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Becton Dickinson Labware Europe
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nunc, Roskilde, Dänemark

Sanowa, Leimen, Deutschland
Dako, Glostrup, Dänemark
BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Lohmann Rauscher, Rengsdorf, Deutschland

Pharmaka

Infliximab (Remicade ®)
Etanercept (Enbrel ®)
Pentoxiphyllin (Pentoxiphylline ®)
Isofluran (Forene®)
0,9%ige NaCl-Lösung, steril
Pentazocin (Fortral®)
Heparin (Liquemin®)
UW-Lösung (ViaSpan®)

Centocor, Leiden, Niederlande
Wyeth Pharma, Münster, Deutschland
Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland
Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
DuPont, Bad Homburg, Deutschland

Allgemeine Reagenzien und Lösungen

| | |
|--|--|
| Ethanol, 100 Vol%, denaturiert | Herbeta, Berlin, Deutschland |
| Aceton, pro analysis | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Fomaldehyd-Lösung, 4%, gepuffert | Herbeta, Berlin, Deutschland |
| Paraclear | Quartett GmbH, Berlin, Deutschland |
| Entellan Einbettmedium | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Cryoschnitt-Medium | Killik, Mailand, Italien |
| Paraffin (Kendall Paraplast Plus®) | Tyco, Mansfield, MA, USA |
| Flüssiger Stickstoff (N ₂) | Linde, Wiesbaden, Deutschland |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |

Das RMPI-Medium enthielt:

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| RPMI-Lösung (RPMI 1640), 500 ml | PAA, Pasching, Deutschland |
| Natriumpyruvat (MEM 100MM), 5 ml | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Non essential amino acids, 5 ml | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| L-Glutamin, 5 ml | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Pen-Strep, 5 ml | Biochrom, Cambridge, Großbritannien |
| β-Mercaptoethanol (0,25m), 1 ml | Biosciences, La Jolla, CA, USA |

Die RPMI/FCS-Lösung enthielt:

| | |
|--|-------------------------------|
| RMPI-Medium wie oben beschrieben, 100 ml | |
| FCS, 10 ml (Nr. (10106-169) | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |

Die PBS-Lösung enthielt

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| Aqua dest., 1000 ml | Fresenius, Bad Homburg, Deutschland |
| D-PBS (10x), 10 ml (Nr. 14200-067) | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |

Reagenzien und Lösungen H&E Färbung und Immunhistologie

| | |
|---|---------------------------------------|
| Hämatoxylin-Lösung (Nr. HHS32-1L) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Eosin-Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Kaisers Glyceringelatine (Nr. 1.09242.0100) | Merck, Darmstadt, Deutschland |

Der Waschpuffer enthielt:

| | |
|---|---------------------------------------|
| Trizma® Base (Nr. T-1503), 0,9 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Trizma® Hydrochlorid (Nr. 3253), 6,85 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Natriumchlorid, 8,78 g | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Aqua dest., 1 l | Fresenius, Bad Homburg, Deutschland |

Die BSA-Verdünnungslösung enthielt:

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Waschpuffer (siehe oben), 10 ml | |
| Bovines Serumalbumin, 0,1 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

Das Neufuchsin-Substrat enthielt:

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Waschpuffer (siehe oben), 105 ml | |
| Propandiol-Lösung, 0,2 M, 37,5 ml | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Levamisol, 0,06 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Napthol-AS-Biphosphat, 0,075 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| N,N-Dimethylformamid, 900 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Natriumnitrit, 0,03 g | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Neufuchsin-Lösung, 300 µl | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

Antikörper und Farbreagenzien:

| | |
|--|---|
| ED1 Mouse Anti-Rat (MCA341R) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| CD4 Mouse Anti-Rat (MCA55G) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| CD8 Mouse Anti-Rat (MCA48G) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| OX3 Mouse Anti-Rat (MCA45G) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| CD25 Mouse Anti-Rat (OX-39; MRC OX-39) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| OX 62 Mouse Anti-Rat (MCA1029G) | Serotec, Düsseldorf, Deutschland |
| Heat Shock Protein 70 (Hsp70, BRM-22) | Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland |
| Rabbit Anti-Mouse Ig (Z-0259) | Dako Deutschland GmbH, Hamburg, |
| APAAP, Mouse, Monoclonal (D-0651) | Dako Deutschland GmbH, Hamburg |

Geräte, Reagenzien und Lösungen ELISA

Ultraturrex homogenizer T25

Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen,
Deutschland

Der RIPA-Puffer enthielt:

Igepal CA-630, 1ml

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Natriumdeoxycholat, 0,5g

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Natriumdodecylsulfat, 0,1g

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Phenylmethylsulfanylfluorid

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Isopropanol, 10mg/1ml

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Complete mini Tabletten

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

LPS

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

PMA

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Ionomycin

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Antikörper:

alle OptEIA™ Set, Pharmingen, San Diego, USA

IL-4 Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-26311E)

IL-4 Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-26312E)

IL-6 Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-2705E)

IL-6 Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-27052E)

TNF- α Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-26971E)

TNF- α Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-26972E)

Avidin-HRP Enzyme (Nr. 51-264375)

Reagenzien und Lösungen TUNEL

alle R&D Systems GmbH, Wiesbaden,
Deutschland

Proteinase K Solution, 1 μ l

Quenching Solution, 50 ml

10x TdT Labeling Buffer, 5 ml

10x TdT Stop Buffer, 5 ml

TdT dNTP Mix, 1 μ l

TdT Enzyme, 1 μ l

Streptavidin-HRP, 1 μ l

DAB Solution, 250 μ l

Methylgrün (1.0%)

50x Co, 1 µl

50x Mn, 1 µl

TACS-Nuclease, 1 µl

TACS-Nuclease Puffer, 50 µl

Reagenzien und Lösungen MPO-Färbung

alle Sigma Aldrich, München, Deutschland

Verdünnungspuffer enthält:

Trizmal und Aqua dest (1:10)

Fixiermittel enthält:

100 % Ethanol, 37 % Formaldehyd und 45 ml

Ethanol

Peroxidase-Indikatorreagenz

5. Ergebnisse

5.1. Ein-/Ausschlusskriterien

Die postoperative Beobachtungszeit betrug sowohl für die DTx-Kontrolltiere als auch die behandelten Gruppen 12 Stunden, 7 Tage und 6 Monate. Des Weiteren wurden intraoperativ 20 Minuten nach der Reperfusion bei den Tieren der 12 Stunden-Gruppe Segmente vom proximalen und distalen Transplantatabschnitt mittels Segmentresektion des Dünndarms entnommen.

Die Tiere wurden bis zum 7. postoperativen Tag (POD) täglich untersucht; das Gewicht wurde protokolliert und mit dem präoperativen Gewicht verglichen. Im weiteren Verlauf erfolgten die Untersuchungen alle 2 Wochen bis zum Ende der jeweiligen Beobachtungszeit. Bei Anzeichen von Krankheit oder Leiden wurden die Tiere schmerzfrei getötet. Sofern der Kadaverzustand es zuließ, wurden diese Tiere obduziert. Beim Vorliegen von Anzeichen für eine Transplantatdysfunktion oder andere Todesursachen wurden solche Tiere von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

5.2. Überleben

Die Überlebensrate der mit Infliximab behandelten Tiere betrug zu allen Beobachtungszeitpunkten 100%. Dies stellte eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur DTx-Kontrollgruppe dar (I [100%] vs. TxK [60%]: $p < 0,05$) (Abb. 7). Der Anteil der überlebenden Tiere an Tag 7 belief sich bei den Empfängern, die mit Etanercept und Pentoxiphyllin behandelt worden waren, auf 76% bzw. 74%. Der Unterschied zur DTx-Kontrollgruppe war hier in beiden Fällen nicht signifikant. Jenseits der ersten 7 Tage überlebten 100% der Tiere in allen Gruppen.

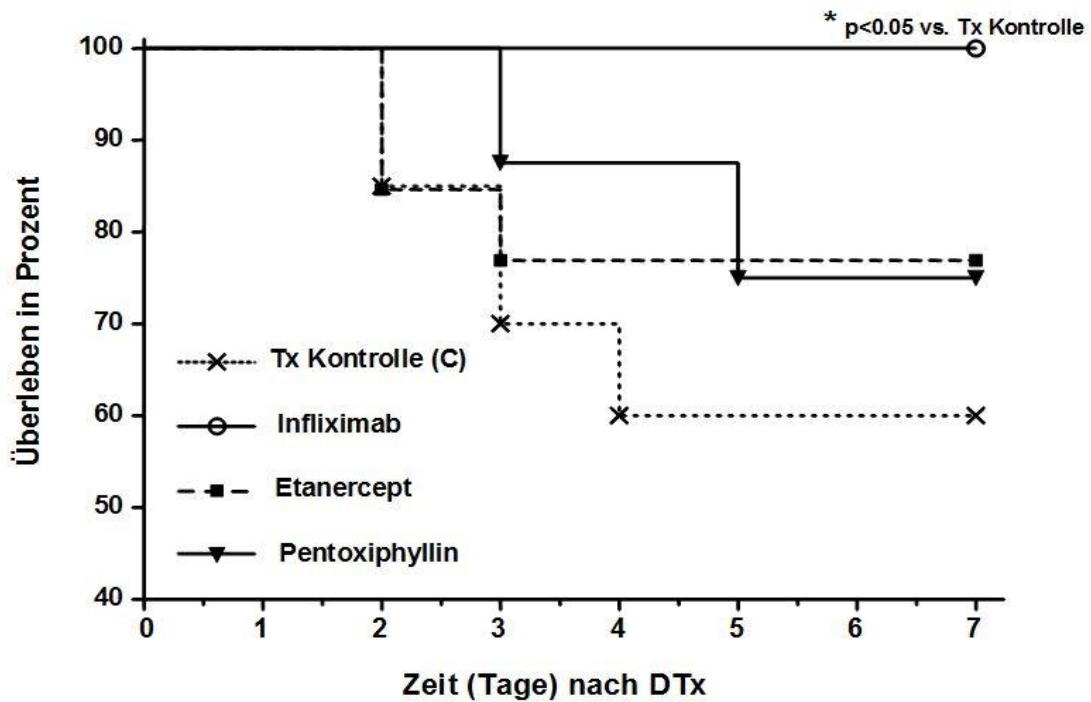


Abbildung 7.

Überlebenskurven der drei Behandlungsgruppen und der DTx-Kontrollgruppe.

5.3. Histomorphologie

Alle Auswertungen wurden als Blindtest durchgeführt, das heißt, der Auswertende hatte zum Zeitpunkt der Beurteilung keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Präparate.

Um den Schweregrad des I/R-Schadens bzw. der nachfolgenden Entzündungsreaktion nach isogener Dünndarmtransplantation und anti-TNF- α -Blockade charakterisieren zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Bewertungssystem entwickelt. Dieses System umfasst folgende drei Charakteristika: 1. die Entzündungsreaktion bzw. Infiltration des Transplantates mit inflammatorischen Zellen, 2. den Grad der epithelialen Apoptose und 3. die Schädigung im Bereich der Zotten und Krypten des transplantierten Dünndarms. Diese Schädigungen wurden in sechs Schweregrade eingeteilt (Tabelle 3).

| Schädigungs- grad | 0 kein | 1 leicht | 2 leicht bis mäßig | 3 mäßig | 4 mäßig bis stark | 5 stark |
|--|-------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|--|--|
| Infiltration/ Inflammation | 0 % | 0-15 % | 15-30 % | 30-50 % | 50-75 % | ≥ 75 % |
| Epitheliale Apoptose | 0 % | 0-15 % | 15-30 % | 30-50 % | 50-75 % | ≥ 75 % |
| Zotten- morphologie/ Kryp- schädigung | kein | Basale ¼ geschädigt | Basale ½ geschädigt | Basale ¾ geschädigt | nur Oberflächen- epithel intakt | Verlust der gesamten Kryp- ten- bzw. Epithelien- architektur |

Tabelle 3.

Bewertungssystem zur Einschätzung des Schweregrades der histologischen Transplantatschädigung nach isogener Dünndarmtransplantation.

Von jedem histomorphologischen Schnitt wurden 20 Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet. Innerhalb jeder Versuchsgruppe wurden die Mittelwerte für die drei histomorphologischen Kriterien berechnet. Diese wurden sodann für jede Tiergruppe gemittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Tendenz zu reduzierter histomorphologischer Schädigung des Transplantates nach TNF- α -Inhibition gezeigt werden. Die Dünndarmtransplantate der Tiere, die mit Etanercept und Pentoxiphyllin behandelt wurden, zeigten nach 20 Minuten Beobachtungszeit signifikant weniger histologische Schädigung im Vergleich zu den Tieren der DTx-Kontrollgruppe (E vs. TxK: $p < 0,01$; P vs. TxK: $p < 0,001$). In allen Behandlungsgruppen war nach 6 Monaten eine signifikant geminderte Transplantatschädigung verglichen mit den unbehandelten DTx-Kontrolltieren zu beobachten (I vs. TxK: $p < 0,001$; E vs. TxK: $p < 0,01$; P vs. TxK: $p < 0,01$) (Abb. 8).

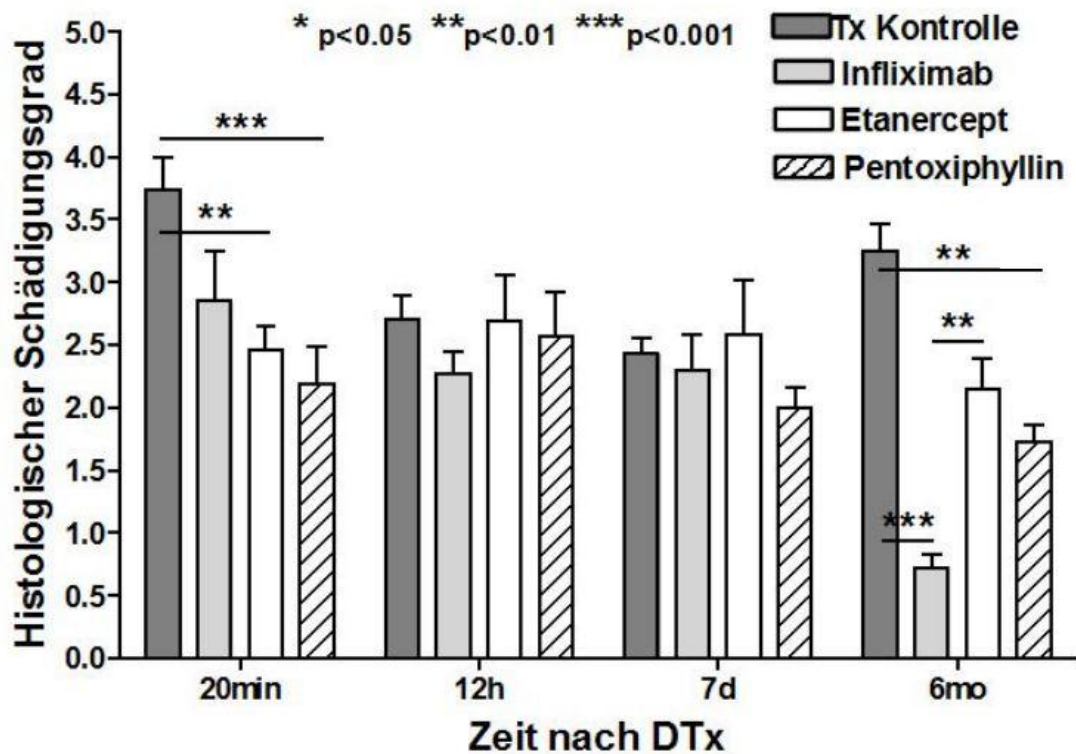


Abbildung 8.

Histologische Bewertung des transplantierten Dünndarms anhand des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Bewertungssystems zur Einschätzung des Grades der histologischen Schädigung (siehe auch Tabelle 2). Die histologische Auswertung der Transplantate erfolgte 20 Minuten, 12 Stunden, 7 Tage und 6 Monate nach Reperfusion.

Die Transplantate der unbehandelten Kontrolltiere zeigten besonders nach 6 Monaten starke Zeichen einer mesenterialen Fibrose. Des Weiteren waren beide Abschnitte des Transplantates massenhaft mit Entzündungszellen infiltriert. Die histologische Schädigung betraf häufig alle Schichten der intestinalen Wand. Interessanterweise zeigten sich nach Behandlung mit Infliximab im Unterschied zu den stark betroffenen Transplantaten der DTx-Kontrolltiere nach 6 Monaten keine Anzeichen einer mesenterialen Fibrose (Abb. 9).

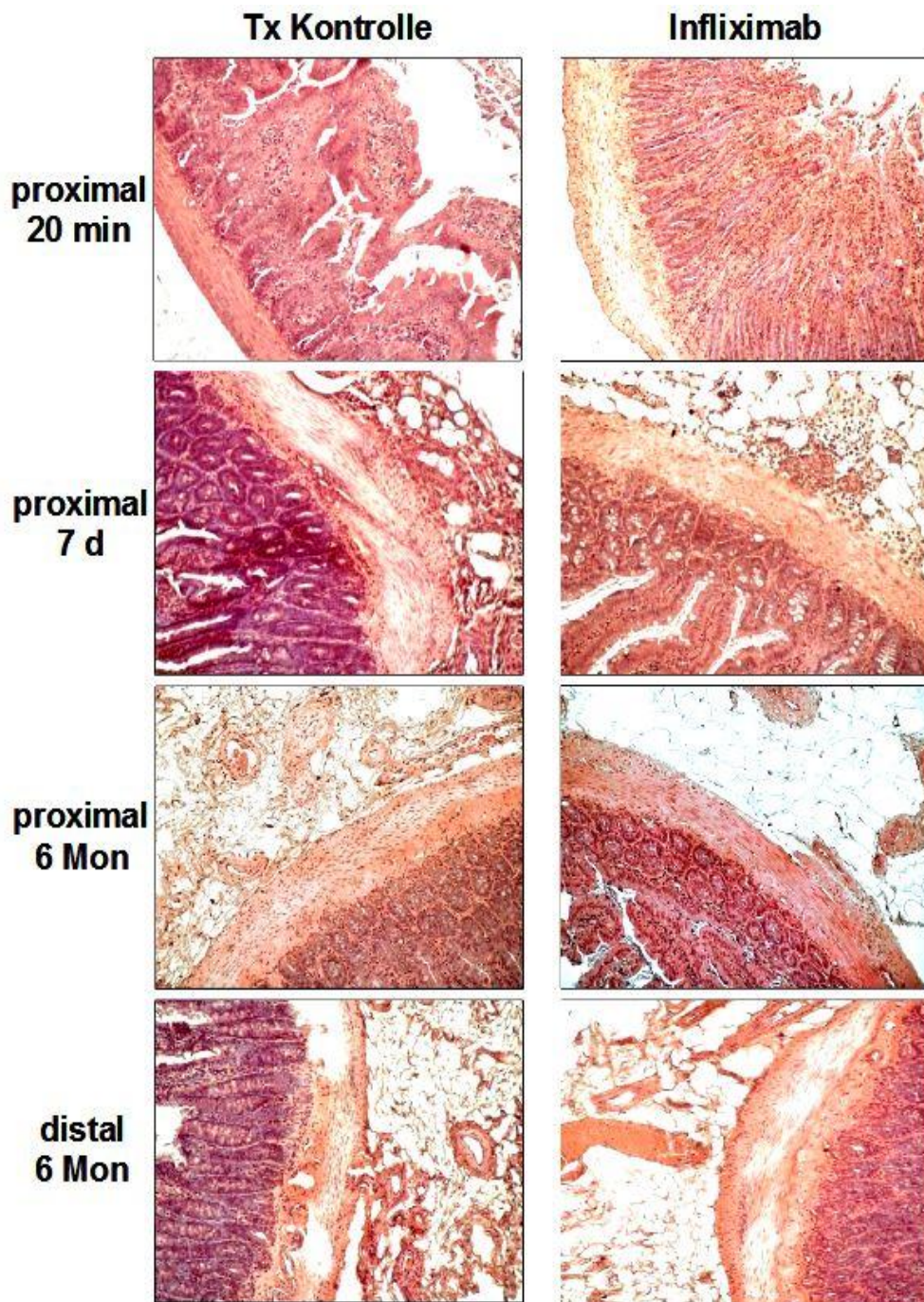


Abbildung 9.

H&E Färbung (Lichtmikroskopie, 200-fache Vergrößerung) vom proximalen (20 Minuten, 7 Tage und 6 Monate nach Reperfusion, Reihen 1-3) und distalen Transplantat (6 Monate, Reihe 4) am Beispiel der Behandlung mit Infliximab (rechte Kolonne) und der DTx-Kontrollgruppe (linke Kolonne). Erläuterungen siehe Text.

5.4. Immunhistochemie

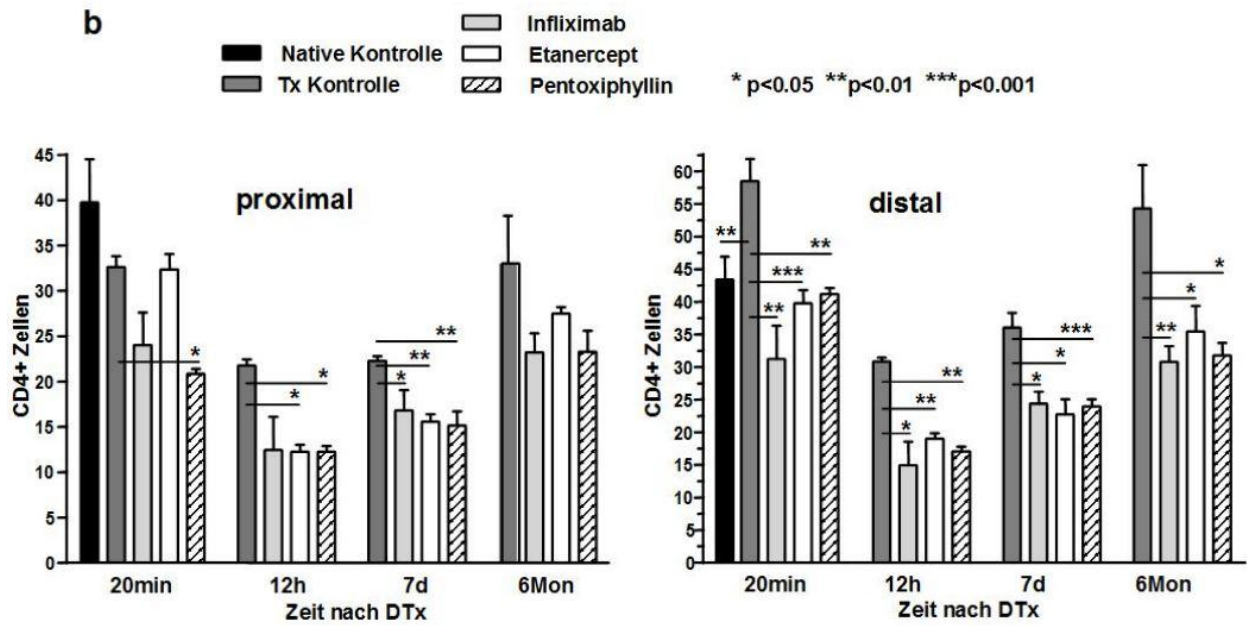
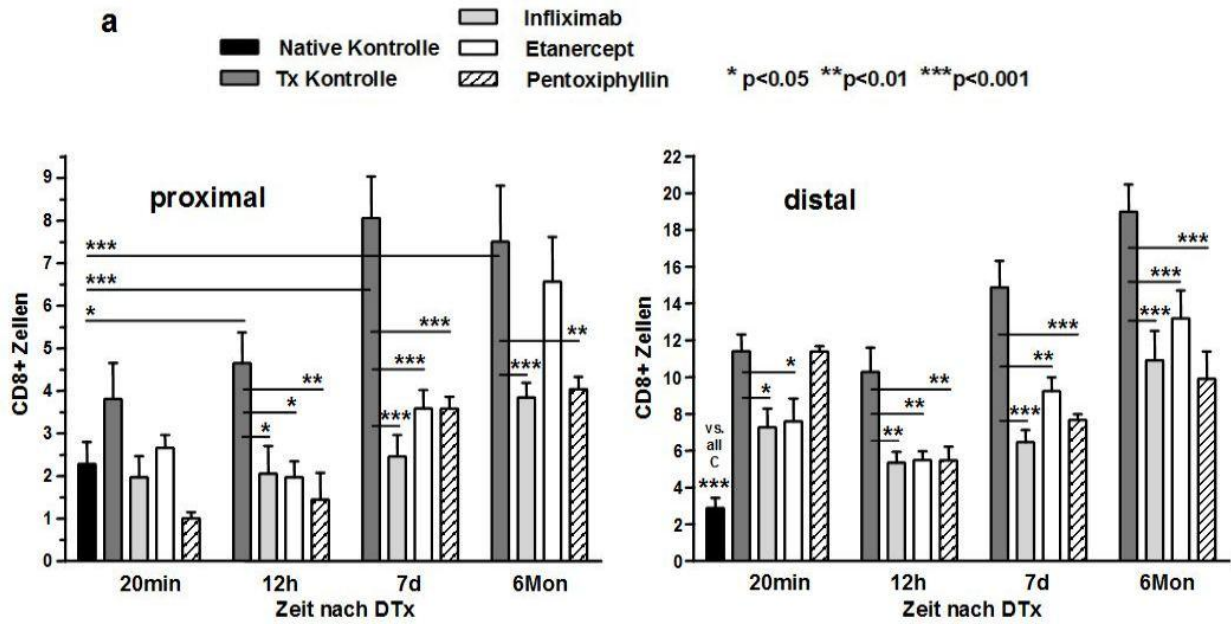
Zur Identifizierung transplantatinfiltrierender Leukozyten sowie der Expression immunologischer Markermoleküle und intrazellulärer Proteine wurden die proximalen und distalen Proben der Dünndarmtransplantate aller Gruppen und Untersuchungszeitpunkte mittels des APAAP-Verfahrens immunhistochemisch gegen folgende Antigene gefärbt:

| | |
|-------|--|
| CD4 | T-Helferzellen |
| CD8 | zytotoxische T-Zellen |
| CD25 | IL-2-Rezeptor aktivierte T-Zellen |
| ED1 | Monozyten / Makrophagen |
| OX62 | Dendritische Zellen |
| Hsp70 | Intrazelluläres Stressprotein |
| OX3 | Ia-Antigen (MHC-Klasse II) auf antigenpräsentierenden Zellen |

Pro Organschnitt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung erfolgte im Blindtest. Das Ergebnis wurde als Mittelwert der transplantatinfiltrierenden Zellen pro $\frac{1}{4}$ Blickfeld \pm Standardfehler dargestellt.

Wir nahmen an, dass der I/R-Schaden zu strukturellen und funktionellen Transplantatveränderungen führt, die seine Anfälligkeit für Immunantworten steigert und dass diese Ereignisse die Entstehung einer chronischen Transplantatdysfunktion begünstigen. Eine weitere These war, dass der Grad dieser initialen Transplantatschädigung durch die Inhibition des TNF- α -Moleküls minimiert werden kann. Folglich, um den Schweregrad der durch den I/R-Schaden induzierten inflammatorischen Reaktionen evaluieren zu können, wurde das Expressionsniveau sowohl von transplantatinfiltrierenden Entzündungszellen (CD8/CD4/CD25+ T-Zellen, Abb. 10 a-c, ED1+ Monozyten/Makrophagen, Abb. 10 d und OX62+ dendritische Zellen, Abb. 12) als auch von MHC-Klasse II (Abb. 13) und HSP-70 (Abb. 14) in den proximalen und distalen Dünndarmtransplantatabschnitten bestimmt.

Die immunhistologische Färbung für zytotoxische CD8+ T-Zellen, CD4+ T-Helferzellen, ED1+ Monozyten/Makrophagen und CD25, den IL2- Rezeptor, zeigte eine signifikante Reduktion in allen Behandlungsgruppen verglichen mit den unbehandelten DTx-Kontrolltieren. Diese Unterschiede in den proximalen und distalen Dünndarmsegmenten wurden für alle Untersuchungszeitpunkte beobachtet (Abb. 10 a-d).



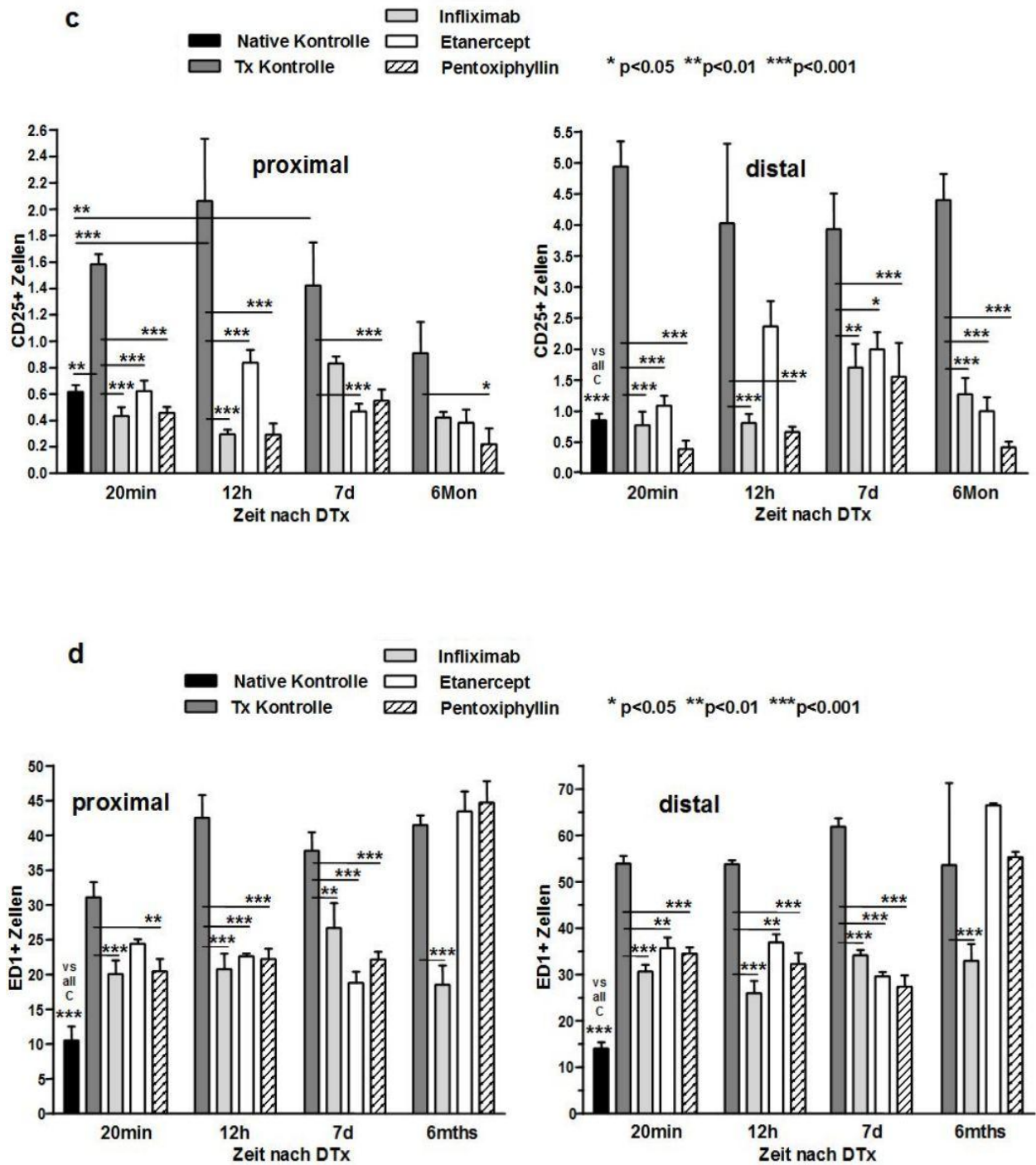
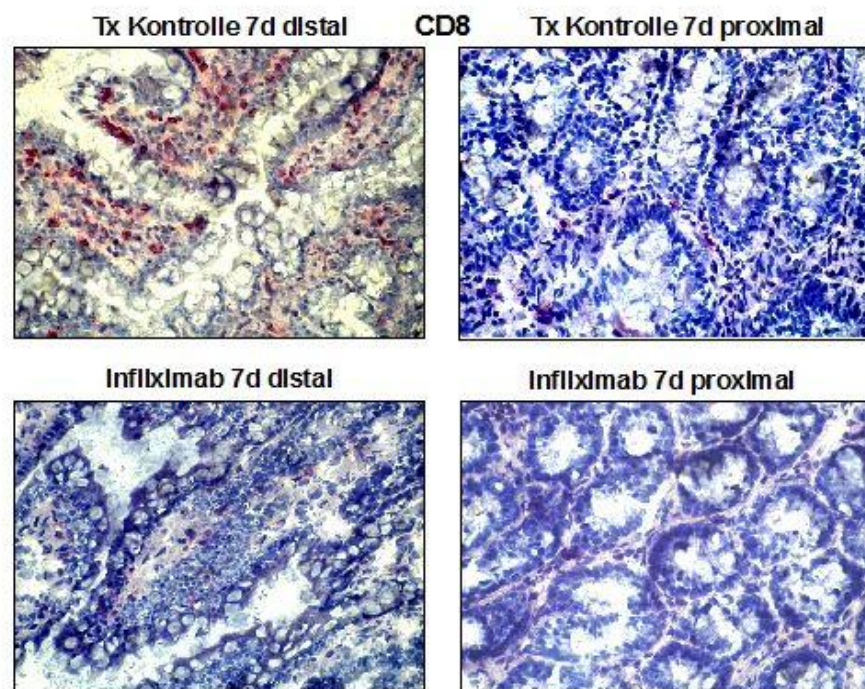


Abbildung 10 a-d.

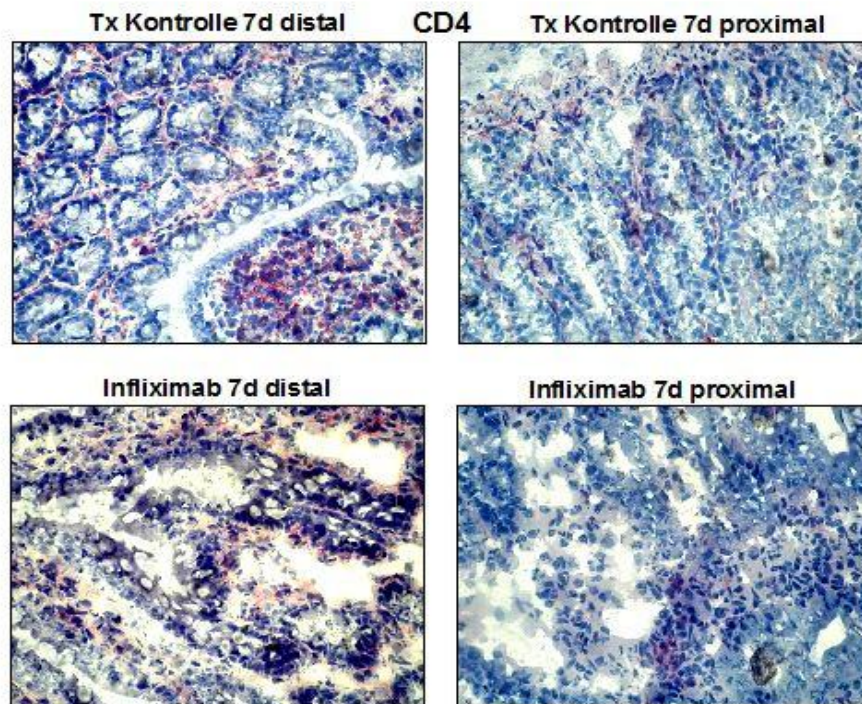
Immunhistologische Färbung für T-Zell-assoziierte Antigene (CD8+ T-Zellen (a), CD4+ T-Zellen (b) und CD25+ T-Zellen (c) und ED1+ Monozyten/Makrophagen (d) in proximalen und distalen Dünndarmtransplantatabschnitten nach Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren und in unbehandelten DTx-Kontrollen.

Im Unterschied zum spärlichen Verteilungsmuster in Mucosa und Submucosa der nativen Kontrollen zeigten die unbehandelten DTx-Kontrollen eine starke Infiltration mit Leukozyten. Diese inflammatorische Reaktion war besonders im Bereich der Zotten sehr stark ausgeprägt. In den Behandlungsgruppen hingegen war eine deutliche Reduktion gegenüber den DTx-Kontrollen in der Lamina propria festzustellen. Dort konnten nur spärliche Haufen von gefärbten Zellen beobachtet werden. Die Submukosa der behandelten Gruppen zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Entzündungszellen. Das Infiltrationsmuster war hier jedoch deutlich schwächer im Vergleich zu den unbehandelten DTx-Kontrollen (Abb. 11).

a



b



c

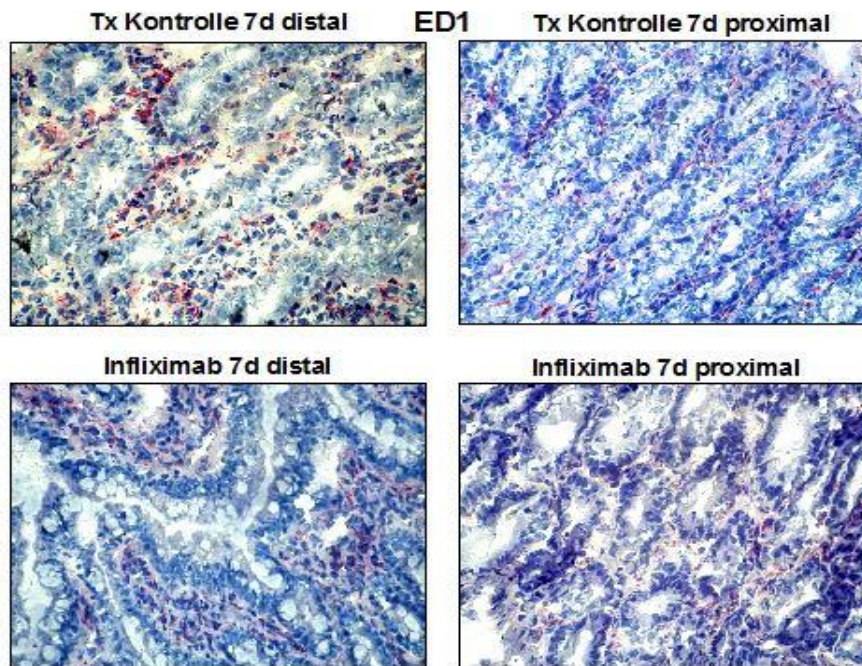


Abbildung 11.

Immunhistologische Färbungen von CD8 (a), CD4 (b) und ED1 (c) (Lichtmikroskopie, Vergrößerung 400-fach) im distalen (linke Kolonne) und proximalen (rechte Kolonne) Dünndarmtransplantatabschnitt in unbehandelten DTx-Kontrollen (obere Reihe) und nach TNF- α -Inhibition mit Infliximab (untere Reihe) 7 Tage nach DTx.

Unterschiede zwischen den unterschiedlichen TNF- α Inhibitionsformen wurden kaum beobachtet. Dennoch wurde nach 6 Monaten eine signifikante Reduktion von infiltrierenden ED1+ Monozyten/Makrophagen nur in den proximalen und distalen Dünndarmtransplantaten der mit Infliximab behandelten Tiere (Abb. 10 d) detektiert. Die Transplantatinfiltration mit ED1+ Monozyten/Makrophagen in den Etanercept- und Pentoxiphyllingruppen war nach 6 Monaten vergleichbar mit derjenigen der unbehandelten Kontrollen.

Die Färbung von OX62+ dendritischen Zellen zeigte eine Tendenz zur Reduktion der Expression in den Behandlungsgruppen. Die Ergebnisse waren jedoch von der Art der Inhibition abhängig. Nur eine TNF- α -Blockade mit Infliximab und Pentoxiphyllin erreichte eine signifikante Reduktion der infiltrierenden OX62+ Zellen in den proximalen Abschnitten des Transplantats nach 20 Minuten und 7 Tagen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (nach 20 Minuten: I vs. TxK $p < 0,05$; P vs. TxK $p < 0,01$; nach 7 Tagen: P vs. TxK $p < 0,05$; I vs. TxK $p < 0,05$; Abb. 12).

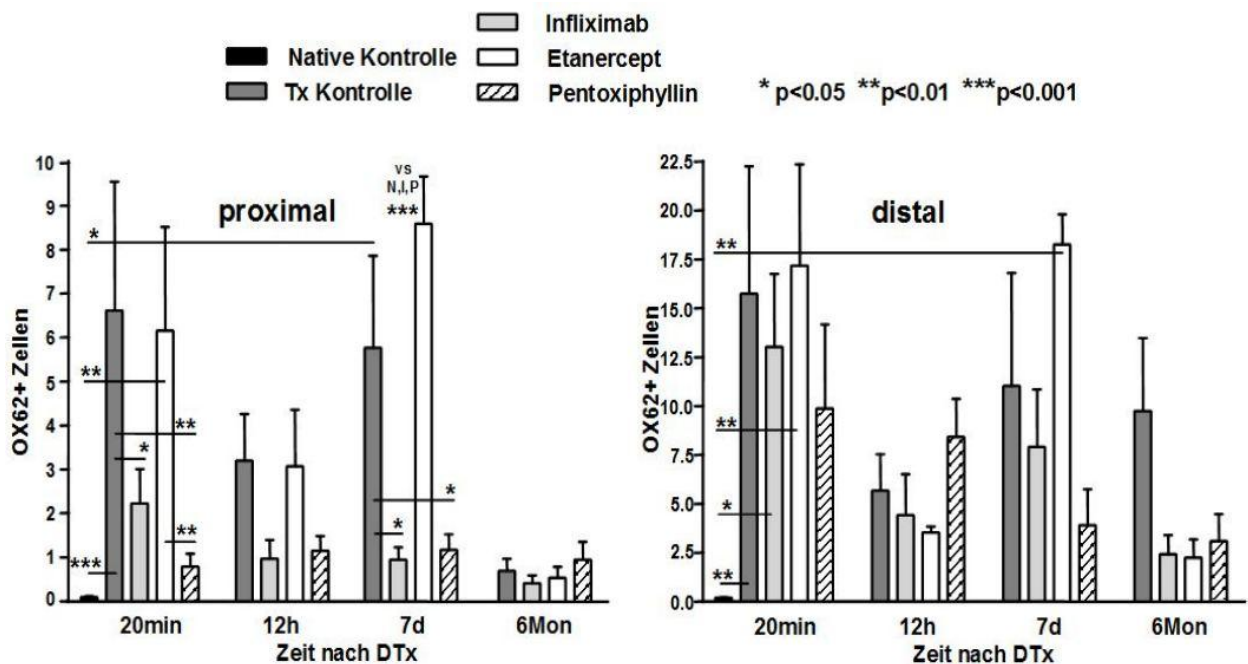


Abbildung 12.

Immunhistologische Färbung für OX62+ Zellen in proximalen und distalen Dünndarmtransplantatabschnitten mit und ohne Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren und in unbehandelten Kontrollen.

Die MHC-Klasse II- Expression wurde kaum durch die TNF- α -Inhibition oder die Transplantation beeinflusst (Abb. 13).

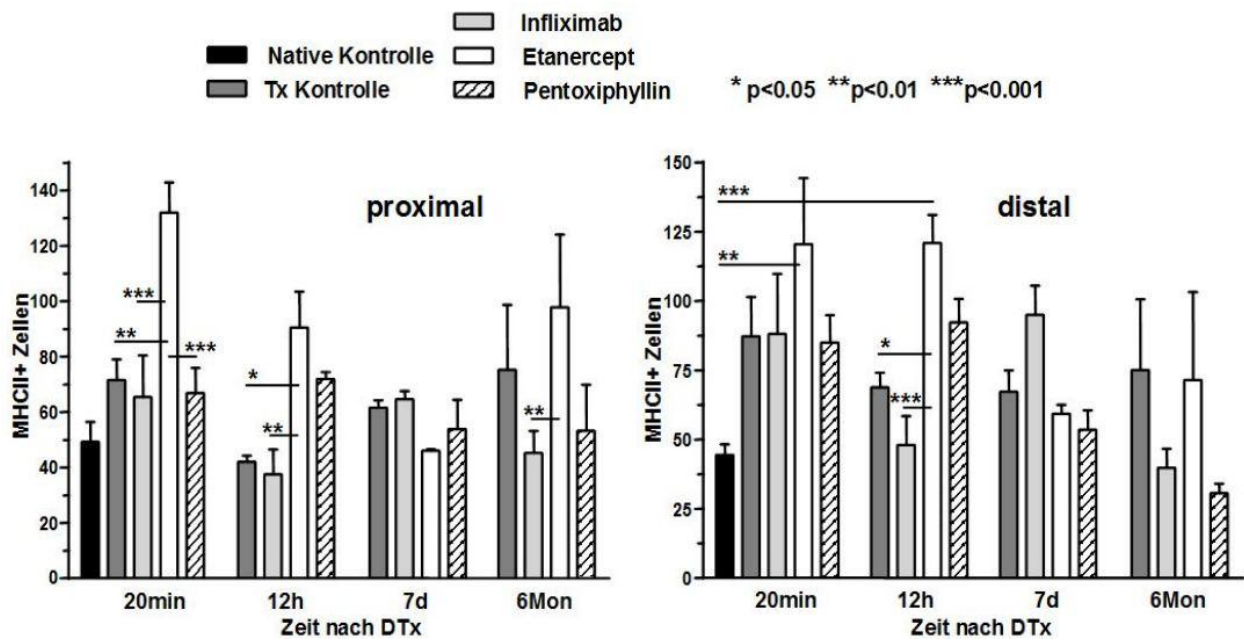


Abbildung 13.

Immunhistologische Färbung für MHC-Klasse II+ Zellen in proximalen und distalen Dünndarmtransplantatabschnitten mit und ohne Behandlung mit TNF- α Inhibitoren und in unbehandelten Kontrollen.

Die Expression von HSP-70 war sowohl 20 Minuten als auch 7 Tage nach Reperfusion im proximalen Abschnitt des Transplantats nach TNF- α -Blockade mit Infliximab (nach 20 Minuten: I vs. TxK $p < 0,001$; I vs. K $p < 0,001$; nach 7 Tagen: I vs. TxK $p < 0,05$; I vs. K $p < 0,01$) als auch 7 Tage nach Reperfusion im distalen Abschnitt (I vs. TxK $p < 0,01$; I vs. K $p < 0,001$) verglichen mit den nativen und unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 14).

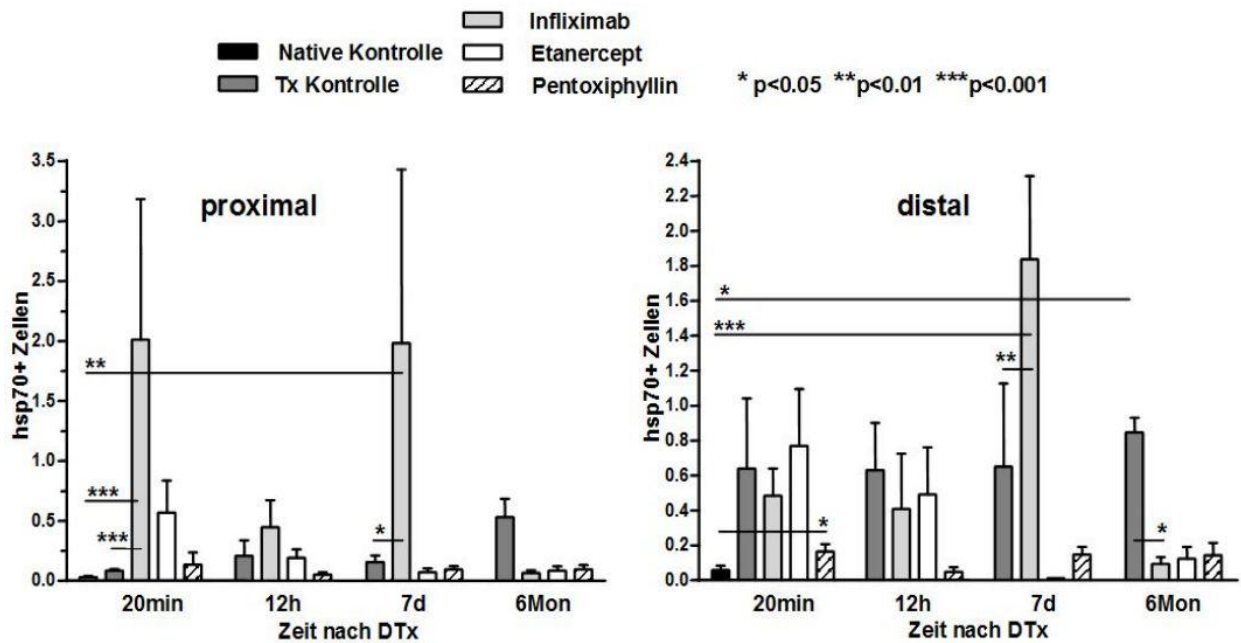


Abbildung 14.

HSP-70+ Zellen in proximalen und distalen Dünndarmtransplantatabschnitten mit und ohne Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren und in unbehandelten Kontrollen.

Interessanterweise zeigten die unbehandelten DTx-Kontrollen eine signifikant verstärkte Infiltration sowohl mit entzündlichen CD8+, CD4+ und CD25+ T Zellen als auch mit ED1+ Monozyten/Makrophagen im distalen Abschnitt des Transplantats gegenüber den proximalen Abschnitten zu allen Zeitpunkten nach Reperfusion, während solche Unterschiede in den nativen Kontrollen nicht zu beobachten waren (Abb. 15). Diese Unterschiede persistierten auch nach der TNF- α -Blockade.

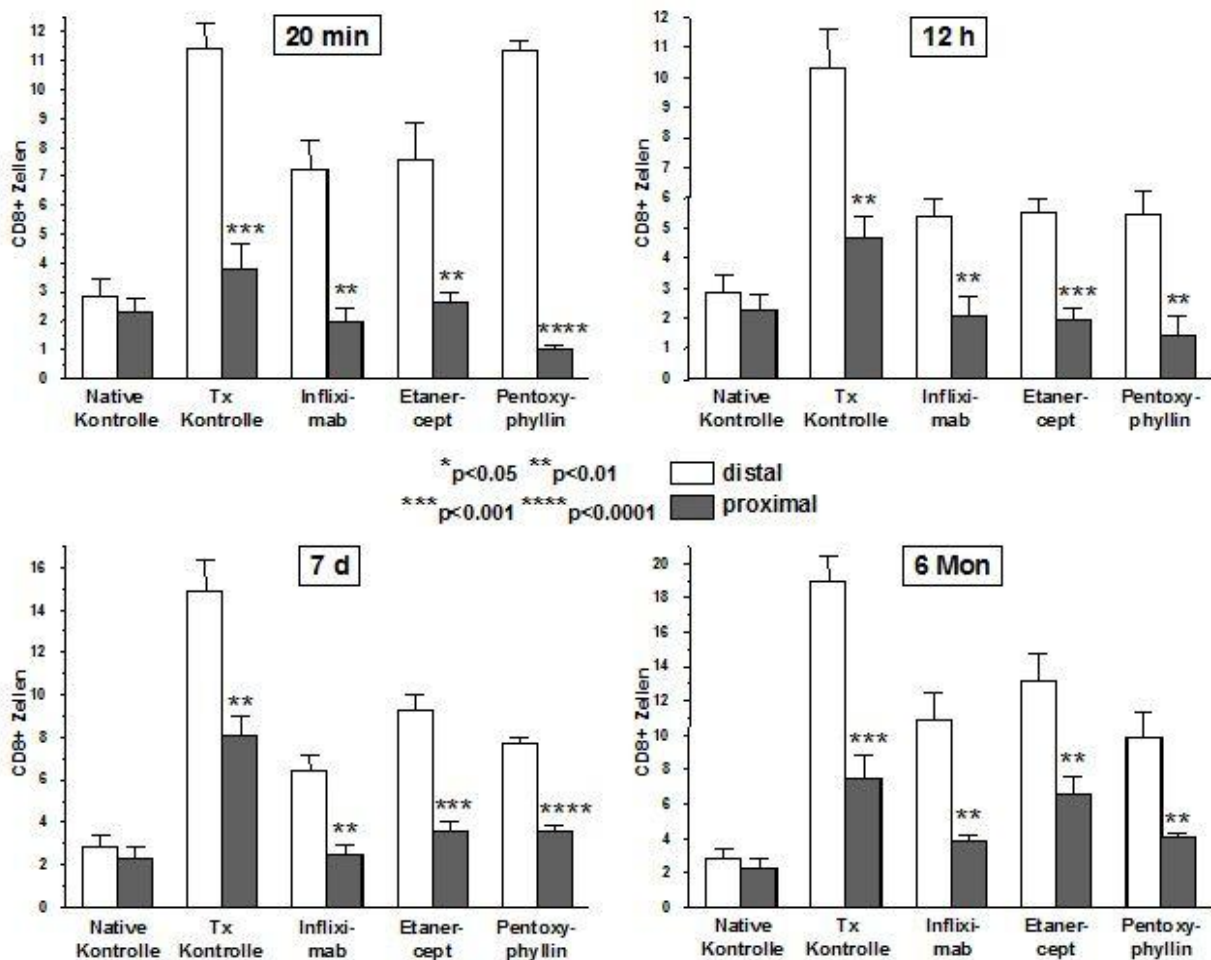


Abbildung 15.

Transplantatinfiltrierende Leukozyten (am Beispiel von CD8+ T-Zellen) im proximalen und distalen Dünndarmabschnitt.

5.5. Detektion apoptotischer Zellen

Um den Ausprägungsgrad der Apoptose in den proximalen und distalen Abschnitten des Dünndarmtransplantates am Ende der Beobachtungszeiträume zu charakterisieren, wurde ein TUNEL (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) -Assay durchgeführt. Analog zur Immunhistochemie wurden pro Organschnitt 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung im Blindtest ausgewertet. Das Ergebnis wurde als Mittelwert der apoptotischen Zellen pro $\frac{1}{4}$ Blickfeld \pm Standardfehler dargestellt.

Der Grad der Apoptose, die die Hauptform des zellulären Todes beim I/R-Schaden darstellt, war sowohl in der DTx-Kontrollgruppe als auch in den Behandlungsgruppen im Vergleich zu den nativen Kontrollen signifikant erhöht.

In den proximalen Transplantatabschnitten wurden nach anti-TNF- α -Behandlung keine Unterschiede im Ausprägungsgrad der Apoptose zwischen den Behandlungsgruppen und der DTx-Kontrollgruppe gesehen. Hingegen konnte in den distalen Abschnitten eine Tendenz zur Apoptosereduktion nach Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren beobachtet werden: Nach 20 Minuten bewirkte eine Behandlung mit Infliximab und Etanercept, nach 7 Tagen mit Etanercept und Pentoxiphyllin und nach 12 Stunden mit Infliximab eine signifikante Erniedrigung der Anzahl apoptotischer Zellen in der Mukosa und Submukosa (20 Minuten: I vs. TxK $p < 0,001$; E vs. TxK: $p < 0,01$; 12 Stunden: I vs. TxK $p < 0,01$; 7 Tage: E vs. TxK $p < 0,01$; P vs. TxK $p < 0,05$; Abbildungen nicht gezeigt). Nach 6 Monaten konnte nur eine Behandlung mit Pentoxiphyllin eine signifikante Minderung des Apoptosegrades erbringen. (P vs. TxK $p < 0,05$; Abbildungen nicht gezeigt).

5.6. Infiltration der Empfängerlung mit neutrophilen Granulozyten

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen des I/R-Schadens wird durch die Freisetzung von verschiedenartigen Entzündungsmediatoren reguliert. TNF- α nimmt eine zentrale Stellung in der Pathophysiologie dieses Geschehens ein. Als Folge der systemischen Entzündungsreaktion nach einem I/R-Schaden vermitteln die neutrophilen Granulozyten eine Schädigung der Empfängerlung.

Pro Organschnitt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung erfolgte im Blindtest. Das Ergebnis wurde als Mittelwert der infiltrierenden Zellen pro Gesichtsfeld \pm Standardfehler dargestellt.

Der Vergleich der Gruppen zeigte eine ausgeprägte Abnahme der Infiltration der Empfängerlung nach anti-TNF- α -Behandlung. Das Lungenparenchym der unbehandelten DTx-Kontrolltiere hingegen war stark mit neutrophilen Granulozyten infiltriert (12 Stunden: K vs.

TxK $p < 0,01$; Abb. 16). Es war ein homogenes Infiltrationsmuster zu beobachten; weder Zellhaufen noch bevorzugter Befall der Bronchioli oder des perivaskulären Raums konnten beobachtet werden (Abb. 17). 12 Stunden nach der Transplantation hatte die TNF- α -Blockade mit den drei unterschiedlichen Inhibitoren eine signifikant abgeschwächte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge der behandelten Tieren zur Folge, welche ähnlich oder sogar unterhalb des Infiltrationsniveaus der nativen Kontrollen war (12 Stunden: I vs. TxK $p < 0,01$, E vs. TxK $p < 0,001$, P vs. TxK $p < 0,001$) (Abb. 16). Sieben Tage nach Transplantation zeigte nur noch die Behandlung mit Etanercept und Pentoxiphyllin einen signifikanten Abfall der Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten (7 Tage: E vs. TxK $p < 0,01$; P vs. TxK $p < 0,01$) (Abb. 16). Nach 6 Monaten waren die Unterschiede nicht mehr signifikant.

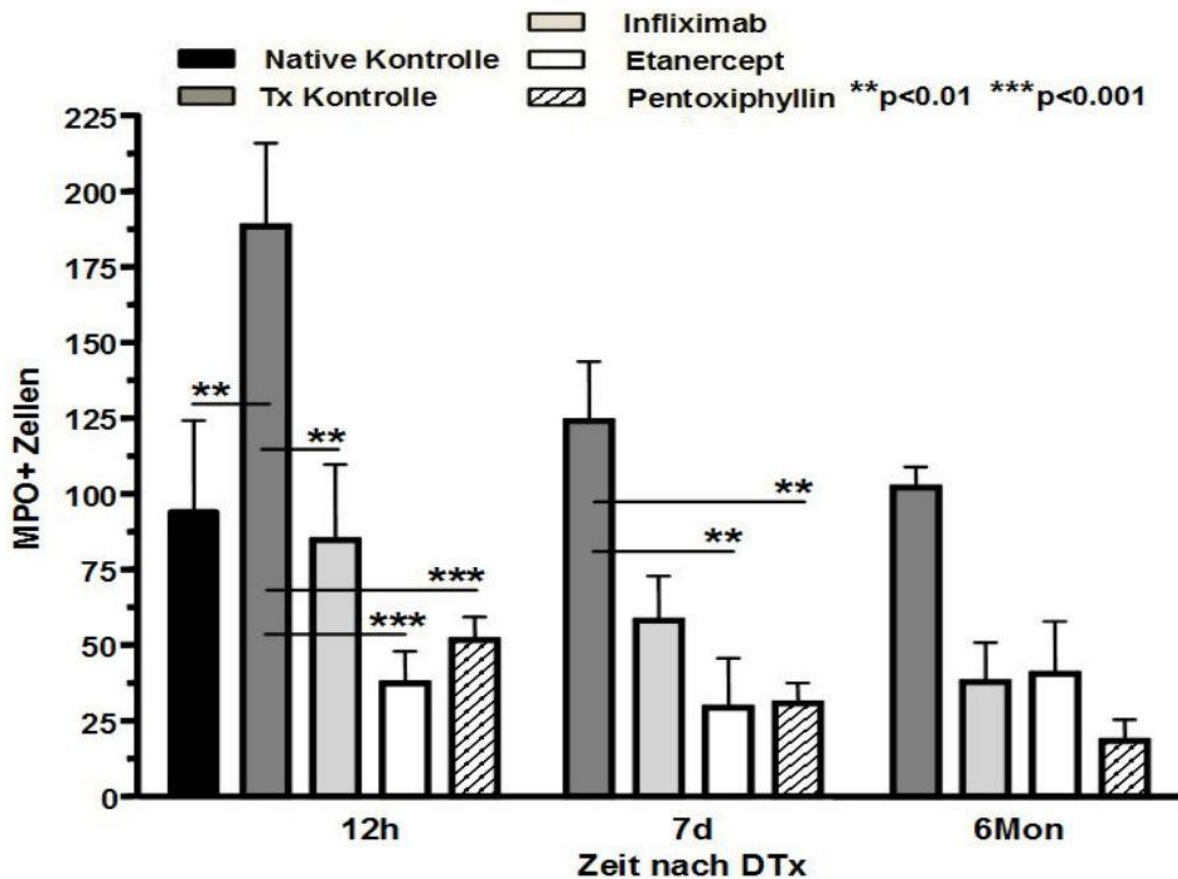


Abbildung 16.

MPO+ neutrophile Granulozyten in der Lunge von nativen und unbehandelten DTx-Kontrollen und nach anti-TNF- α -Therapie.

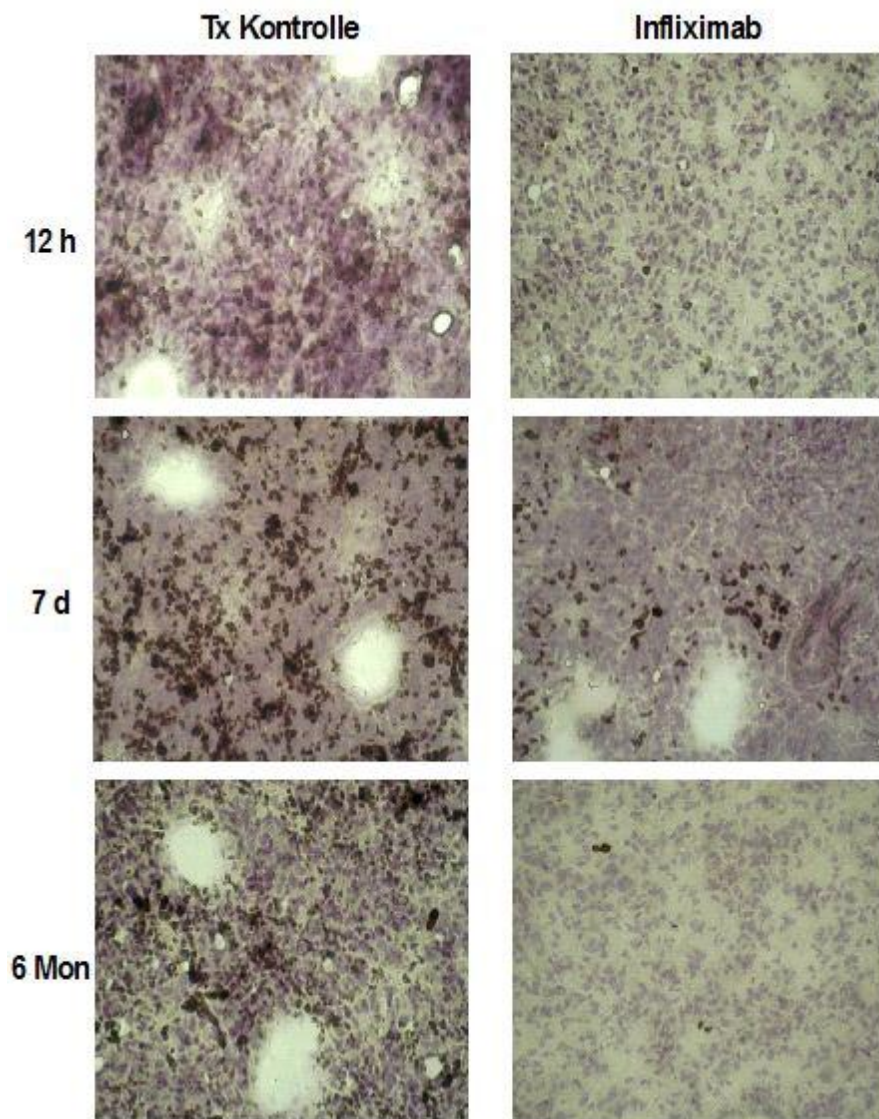


Abbildung 17.

MPO-Färbung der Empfängerlunge am Beispiel von unbehandelten DTx-Kontrollen und nach TNF- α -Blockade mit Infliximab (Lichtmikroskopie, 400-fache Vergrößerung).

5.7. Zytokinkonzentrationen in den Dünndarmtransplantaten und den Empfängerlymphknoten

Aus den Zellkulturüberständen *in vitro* stimulierter Lymphozytensuspensionen der Lymphknoten und homogenisierter Dünndarmproben der Empfänger- und Kontrolltiere wurden mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) die Konzentrationen folgender Zytokine bestimmt:

IL-4 als antiinflammatorisches Zytokin der TH2-Zellen

IL-6 als proinflammatorisches Zytokin der Makrophagen

TNF- α als Indikator proinflammatorischer T-Zell- und Makrophagenaktivität

Wegen der beobachteten Unterschiede in der Immunhistologie wurden auch Veränderungen im Expressionslevel dieser Zytokine in den Transplantaten und den Empfängerlymphknoten erwartet.

Das Expressionsniveau von TNF- α und IL-6 in den Dünndarmtransplantaten war nach Transplantation erhöht, allerdings wurden keine Unterschiede nach TNF- α -Blockade beobachtet. Der Spiegel von IL-4 wurde weder durch die Transplantation noch durch die TNF- α -Blockade signifikant beeinflusst.

In den mesenterialen Lymphknoten zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten TNF- α - und IL-6-Spiegeln nach der Transplantation. Die Konzentration von TNF- α nach der Behandlung mit Pentoxiphyllin war 12 Stunden nach der Reperfusion signifikant reduziert (P vs. TxK $p < 0,01$). Die Anti-TNF- α -Therapie mit Infliximab bewirkte eine signifikante Reduktion an Tag 7 nach der Reperfusion im Vergleich zur DTx-Kontrollgruppe (I vs. TxK $p < 0,005$).

Die Zytokinexpression von IL-4 in den mesenterialen Lymphknoten der behandelten Empfänger zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Vergleich zu den DTx-Kontrolltieren.

6. Diskussion

Die Organtransplantation stellt die einzige kurative Therapie des irreversiblen Kurzdarmsyndroms dar. Seit ihren Anfängen in den 1980er Jahren zeigte sie beeindruckende Fortschritte beim 1-Jahres-Patienten- und Transplantat-Überleben von mittlerweile mehr als 90% in selektierten Patientengruppen. Die Langzeitergebnisse nach Dünndarmtransplantationen sind, verglichen mit den Überlebensdaten nach Transplantation anderer vaskularisierter Organe, jedoch enttäuschend. Das Langzeitüberleben hat sich im Vergleich zu den Frühzeiten der Dünndarmtransplantation zwar leicht verbessert, jedoch bleibt die jährliche Rate an Organverlusten nahezu gleich. Das Ausmaß des I/R-Schadens hat einen signifikanten Einfluss auf das Transplantatüberleben. Auf der anderen Seite hat dieser Vorgang einen direkten Einfluss auf die unspezifische Inflammationsreaktion in den ersten Stunden nach dem chirurgischen Eingriff. Des Weiteren spielt diese Gewebefrühschädigung in der Pathogenese von chronischer Abstoßung und Transplantatdysfunktion eine erhebliche Rolle. Diese Tatsache hat dazu geführt, dass in Klinik und Forschung die Wichtigkeit der Minimierung des I/R-Schadens und damit die Modulation der frühen Transplantatschädigung erheblich an Bedeutung zunahm.

Der I/R-Schaden des Darms ist ein wichtiger Faktor, der mit hoher Morbidität und Mortalität bei chirurgischen Patienten assoziiert ist (87). Von allen inneren Organen besitzt der Dünndarm wahrscheinlich die größte Vulnerabilität im Rahmen des I/R-Schadens (88, 89). Parenchymschädigung ist die Folge sowohl der Ischämie als auch der nachfolgenden Entzündungsreaktion im Rahmen der Reperfusion. Akute Ischämie resultiert in direkter Parenchymschädigung durch Nekrose und Apoptose im betroffenen Gewebe. Nach Reanastomosierung und Freigabe des Blutflusses kommt es im Transplantat zu einer Inflammationsreaktion, welche sowohl durch die akute Ischämie als auch die Reperfusion verursacht wird (90). Gesteigerte Chemokinproduktion und Adhäsionsmolekülexpression des Gefäßendothels initiieren die Infiltration neutrophiler Granulozyten. Ihnen folgen Monozyten, NK-Zellen und Lymphozyten. Die bei der Reperfusion am Endothel adhärierenden Leukozyten tragen dann durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Transplantatschädigung bei. Gleichzeitig wird der Blutfluss in den Kapillaren reduziert, die dadurch verstopfen können und es kommt zu erhöhter Endothelpermeabilität. Zusätzlich werden reaktive Sauerstoffverbindungen ausgeschüttet, die den Schaden aggravieren (91).

Ein I/R-Schaden des Dünndarms kann gravierende Konsequenzen für das transplantierte Organ und den gesamten Empfängerorganismus auslösen. Eine Beeinträchtigung der absorptiven Funktion des Darmes kann im funktionellen Kurzdarmsyndrom resultieren. Ferner birgt die bakterielle Translokation die Gefahr der Sepsis und der Entwicklung eines MOF in sich. Im

Rahmen der verstärkten Neutrophileninfiltration in die Empfängerlunge kann ein acute respiratory distress syndrome (ARDS) entstehen.

Die entscheidende Rolle von TNF- α bei der Vermittlung und Unterhaltung des I/R-Schadens in der Transplantation vaskularisierter Organe wurde in den letzten Jahren zunehmend eruiert und zahlreiche experimentelle Hinweise haben die große Bedeutung der TNF- α -Inhibitoren bei der Modulation der inflammatorischen Reaktion im Rahmen des I/R-Schaden gezeigt (18). Infliximab ist ein monoklonaler, chimärer Maus-anti-Mensch IgG1 anti-TNF- α -Antikörper, der die konstante Region des menschlichen IgG1 und die antigenbindende, variable Region der Maus besitzt. Infliximab ist sowohl gegen den löslichen als auch den membrangebundenen Anteil des TNF- α -Moleküls wirksam. Etanercept, ein Fusionsprotein bestehend aus dem TNFRII und der Fc-Region eines humanen IgG1 Antikörpers, bindet spezifisch lösliches TNF- α . Pentoxiphyllin, auch als rheologisches Medikament bekannt, ist jedoch ein aktiver TNF- α -Inhibitor und verfügt über ein breites Wirkungsspektrum gegen Inflammation und Zellproliferation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die perioperative TNF- α -Blockade des Empfängers auf folgende Parameter hat:

1. Empfängerüberleben, I/R-Schaden und histomorphologische Organveränderungen
2. Expression einer Reihe immunologischer Markermoleküle und entzündlicher Zytokine, Apoptoserate und Protektion der Empfängerlunge

Dazu wurden drei unterschiedliche Behandlungsgruppen und eine nicht behandelte Kontrollgruppe, die alle ein Dünndarmtransplantat erhielten, gebildet. Gewebeproben der Empfänger wurden 20 Minuten, 12 Stunden, 7 Tage und 6 Monate nach der Transplantation gewonnen. Um normale Vergleichswerte für die untersuchten Variablen zu bekommen, diente eine weitere Tiergruppe, die weder eine Transplantation noch eine Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren erhielt, als native Kontrollgruppe.

Nach Durchführung einer isogenen Dünndarmtransplantation wurden zusätzlich zum I/R-Schaden und der Morphologie auch das Expressionsniveau proinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-6, TNF- α), immunologischer Marker (CD8, CD4, CD25, ED1, OX62, MHC-Klasse II und HSP-70) und die Stärke der Apoptoserate in den Transplantaten zu den genannten Zeitpunkten nach Reperfusion untersucht. Da im Rahmen der Dünndarmtransplantation auch extraintestinale Organe wie die Lunge geschädigt werden, wurde zur Charakterisierung des Grads der Lungenschädigung eine spezifische Färbung von neutrophilen Granulozyten des

Lungenparenchyms durchgeführt.

Das Empfängerüberleben als klinischer Zielparameter war mit 100% für die Empfängertiere, die mit Infliximab behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, signifikant verbessert. Ein systematischer Fehler bei Gruppenzuordnung und Behandlung kann hierbei ausgeschlossen werden: Die Zuordnung der Versuchstiere zu den unterschiedlichen Behandlungsgruppen erfolgte randomisiert und unmittelbar vor der Operation. Als kausal für das bessere Empfängerüberleben im Fall der Therapie mit Infliximab muss stattdessen eine geringere Schädigung des Transplantates im Rahmen des I/R-Schadens angenommen werden. Eine anti-TNF- α -Therapie mit Etanercept und Pentoxiphyllin zeigte einen deutlichen Trend zum verbesserten Empfängerüberleben, jedoch konnte in diesen Gruppen keine Signifikanz erreicht werden.

Auch in der Histomorphologie zeigte sich eine geringere strukturelle Transplantatschädigung nach Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand der Histologie untersucht werden, wie stark der Grad des I/R-Schadens bzw. der nachfolgenden Entzündungsreaktion nach isogener Dünndarmtransplantation und anti-TNF- α -Therapie ausgeprägt bzw. gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verbessert ist. Die üblichen morphologischen Bewertungssysteme, wie z. B. die Klassifikation von Park oder die Gradeinteilung nach Chiu, berücksichtigen dabei nur den Ausprägungsgrad der epithelialen Schädigung nach der Reperfusion im Transplantat (92, 93). Um den Schweregrad dieser Schädigung umfassender und präziser charakterisieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Bewertungssystem entwickelt. Mittels dieses Systems konnten folgende drei Charakteristika mit jeweils einem Schweregrad von 0 bis 5 beurteilt werden: 1. die Entzündungsreaktion bzw. Infiltration des Transplantates mit inflammatorischen Zellen, 2. der Grad der epithelialen Apoptose und 3. die Schädigung im Bereich der Zotten und Krypten des transplantierten Dünndarms. Die Ergebnisse zeigten, dass eine TNF- α -Blockade einen ausgeprägten Einfluss auf die morphologischen Veränderungen nach einem I/R-Schaden hat. Der Grad des I/R-Schadens war bei den behandelten Tieren, verglichen mit den unbehandelten DTx-Kontrollen, 20 Minuten nach Reperfusion signifikant reduziert. Bemerkenswert ist, dass die Inhibition der TNF- α -Aktivität die Transplantatschädigung zum Zeitpunkt 6 Monate nach der Reperfusion vermindern konnte. Bei Infliximab- und Etanerceptgabe war diese Verminderung signifikant. Die Inflammationsreaktion nach dem I/R-Schaden des Dünndarms führt im Langzeitverlauf nach Transplantation zu morphologischen Veränderungen im transplantierten unbehandelten Organ, die die Entstehung einer chronischen Transplantatdysfunktion nach sich ziehen. Die Daten zeigen, dass die TNF- α -Blockade die strukturelle Transplantatschädigung

minimiert und infolgedessen die Langzeitfunktion des transplantierten Organs verbessert.

Ferner war auffällig, dass nach 6 Monaten nur in der Gruppe der mit Infliximab behandelten Empfänger deutlich weniger Anzeichen einer mesenterialen Fibrose festzustellen waren. Im distalen Abschnitt des Transplantats zeigten sich bei 4 von 6 und im proximalen Abschnitt bei 3 von 6 Tieren keinerlei Zeichen einer Fibroseentwicklung im Bereich des Mesenteriums und der Darmwand. Im Unterschied dazu hatten die korrespondierenden DTx-Kontrollen nach 6 Monaten eine starke Fibrose entwickelt. Im Fall einer Therapie mit Etanercept und Pentoxiphyllin gab es zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Verminderung der Ausprägung der Fibrose im Vergleich zu den unbehandelten DTx-Kontrollen.

Wie Koca et al. feststellten, führte die einmalige intraperitoneale Applikation von Infliximab in einem experimentellen Modell der nichtalkoholischen Steatohepatitis in der Ratte zu einer signifikanten Minderung des Grades von Fibrose, Nekrose und Inflammation (94). Die Aktivierung der Kupffer-Zellen in der Leber, die Formation von freien Radikalen und die Synthese proinflammatorischer Zytokine führten über mehrere Zwischenschritte zur Leberschädigung und nachfolgender Fibrogenese. Eine mögliche Erklärung der minimierten Fibroserate in den transplantierten Dünndärmen der Infliximabgruppe bietet die als Folge der TNF- α -Blockade und der Linderung des I/R-Schadens geminderte Makrophagenaktivierung. Der Prozess der Fibrose ist eine dynamische Kaskade, die durch die erhöhte Nekroserate im Entzündungsgebiet initiiert wird und über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten und nachfolgender Deposition von extrazellulären Matrixkomponenten führt. Des Weiteren haben experimentelle Arbeiten gezeigt, dass TNF- α zur Zellproliferation im Bereich der Gefäßintima und, zusammen mit IL-1 β , zur Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten führt (95, 96). Jedoch stehen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten im Widerspruch zu klinischen Ergebnissen, die in Fallberichten zeigen konnten, dass eine anti-TNF- α -Therapie besonders mit Infliximab mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer chronischen Lungenfibrose bzw. Pneumonitis in Patienten mit zugrundeliegender Lungenerkrankung einhergeht (97). Diese Daten sprechen dafür, dass eine Blockade der TNF- α -Aktivität über unterschiedliche Wirkmechanismen die Entstehung der Fibrose beeinflussen kann. Klinische und experimentelle Ergebnisse konnten demonstrieren, dass der I/R-Schaden des Transplantats mit erheblichen Kurz- und Langzeitauswirkungen einhergeht. Diese können sich als gehäufte Episoden einer chronischen Transplantatdysfunktion und Transplantatabstoßung äußern (98). Im Rahmen der Transplantation vaskularisierter Organe sind sowohl die kalte als auch die warme Ischämie häufig unvermeidbar, können aber minimiert werden. Jedoch existiert bislang keine spezifische Therapie für die Prävention oder Behandlung des I/R-Schadens. Im

klassischen Modell ist die Entzündungsreaktion als Antwort auf die akute Ischämie hauptsächlich eine unspezifische 'angeborene' Immunantwort, an welcher das Komplementsystem, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen entscheidend beteiligt sind. T-Lymphozyten gehören zu den Hauptmediatoren des spezifischen 'erworbenen' Immunsystems und früher wurde angenommen, dass sie an der Entstehung und Propagierung des I/R-Schadens nicht beteiligt sind. Neuere Erkenntnisse in der Pathogenese des I/R-Schadens konnten jedoch zeigen, dass Lymphozyten keine 'passiven Beobachter', sondern als wesentliche Mediatoren in dieses Geschehen involviert sind (90).

T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von CD8⁺ T-Zellen sind für die spezifische Erkennung von Antigenen auf MHC-Klasse I-Molekülen, die auf der Membran aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden, verantwortlich. Nach Antigenpräsentation und Stimulation können sich die CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische T-Lymphozyten differenzieren, die ihre direkte zellschädigende Funktion mittels Produktion und Freigabe von Perforin und Granulysin wahrnehmen. CD4⁺ T-Zellen stellen die für die klonale Expansion der CD8⁺ T-Zellen notwendigen Stimuli bereit, indem sie verstärkt IL-2 produzieren und CD40 exprimieren. CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors. CD25 wird auf der Oberfläche unstimulierter T-Zellen nicht exprimiert. Nach Aktivierung der T-Zellen wird jedoch dieses Molekül zügig transkribiert und auf der Membran der aktivierten T-Zelle exprimiert (99).

Mehrere Arbeiten dokumentieren, dass T-Zellen als direkte Vermittler des I/R-Schadens eine bedeutende Rolle einnehmen (100-104). Yilmaz et al. konnten zeigen, dass CD4- und CD8-defiziente Mäuse, die einer Okklusion der A. cerebri media unterzogen wurden, signifikant reduzierte Infarktgröße und neurologische Symptomatik im Vergleich zu Wild-Typ (WT)-Mäusen entwickelten (105). Ferner führte die Rekonstitution der T-Zell-defizienten Mäuse mit Splenozyten einer WT-Maus zur Ausbildung eines Schadens, der in seinem Ausmaß mit dem in WT-Mäusen vergleichbar war. Parrot et al. gelang es, die Rolle der T-Zellen im I/R-Schaden der Lunge zu zeigen. In einem etablierten syngenem Lungentransplantationsmodell konnte demonstriert werden, dass CD4⁺ T-Zellen des Empfängers innerhalb einer Stunde nach Reperfusion das Transplantat infiltrieren und das CD25-Molekül in den nächsten 12 Stunden verstärkt exprimieren. Verglichen mit den T-Zell-defizienten Ratten zeigten die in dieser Arbeit verwendeten WT-Lewis-Ratten einen signifikant vergrößerten I/R-Schaden, der sich in erniedrigter Oxygenierung und vergrößertem peak airway pressure (PAP) äußerte (106). Um zu bestätigen, dass T-Zellen Schlüsselmediatoren in der Pathogenese des I/R-Schadens waren, wurde eine Rekonstitution der T-Zell-defizienten Ratten mit T-Lymphozyten von heterozygoten Ratten durchgeführt. Diese Tiere bildeten dasselbe Schädigungsmuster aus, das die WT-Ratten

12 Stunden nach der Reperfusion zeigten. Nach Okklusion der A. mesenterica superior sowohl in WT- als auch in severe combined immunodeficiency (SCID)- Mäusen konnten Shigematsu et al. demonstrieren, dass T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle beim I/R-Schaden des Dünndarms spielen (107). Auch hier zeigte sich nach adoptivem Transfer von T-Zellen ein ähnlicher Schädigungsgrad wie bei den WT-Mäusen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass eine kurzfristige Blockade der TNF- α -Aktivität in einem hochimmunogenen Transplantationsmodell signifikant die Anzahl von transplantatinfiltrierenden CD4+, CD8+ und CD25+T-Lymphozyten verringert. Diese Minimierung der Entzündungsreaktion nach der Therapie wurde sowohl für den proximalen als auch für den distalen Abschnitt des transplantierten Dünndarms gezeigt. Des Weiteren wurde auch klar, dass in diesem Modell eine kurzfristige anti-TNF- α -Therapie signifikant die Ergebnisse sogar 6 Monate nach der Reperfusion beeinflusst. Ein Erklärungsversuch dieser Daten muss von der als erwiesen anzusehenden Tatsache ausgehen, dass eine der Hauptfunktionen von TNF- α die Aktivierung von NF κ B und somit unter anderem die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen ist (91). Eine TNF- α -Blockade führt somit über die Hemmung der NF κ B-Aktivierung und konsekutive Hemmung der Sekretion von Entzündungszytokinen und Expression von Adhäsionsmolekülen zu reduzierter Gewebeeinfiltration von Leukozyten.

Ein zusätzlicher Mechanismus, über welchen die reduzierte Expression von T-Zellen im Transplantat indirekt zur Minimierung des I/R-Schadens führen könnte, ist die Beeinflussung der Adhäsion und Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Experimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass die Präsenz von T-Zellen in postischemischen Gebieten konsekutiv zu Erhöhung der Adhäsion und Infiltration dieser Zellen führt (108). Wie Kokura et al. feststellten, spielt von T-Zellen ausgeschüttetes TNF- α in der Modulation der Neutrophilenadhäsion eine kausale Rolle (109). Andere Autoren konnten demonstrieren, dass T-Zellen für die Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen des Gefäßendothels verantwortlich sind, indem sie TNF- α verstärkt sekretieren (110). Hier konnte unter anderem demonstriert werden, dass SCID-Mäuse im Vergleich mit den korrespondierenden WT-Mäusen eine reduzierte TNF- α -abhängige VCAM-1-Expression im Darm zeigen. Ein adoptiver Transfer von T-Zellen aus WT-Mäusen in T-Zell-defiziente Tiere konnte die TNF- α -induzierte VCAM-1-Expression wieder auf das Niveau in den WT-Mäusen herabregulieren (110).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse korrelieren mit den experimentellen Daten im I/R-Schaden von Herz, Leber und Niere, die die Schlüsselrolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Inflammation und der Vermittlung des I/R-Schadens unterstreichen (111-113).

Interessanterweise zeigten diese Arbeiten im Gegensatz zu vorliegender, dass der selektive Ausfall der CD4⁺ T-Zellfunktion, nicht jedoch der der CD8⁺ T-Lymphozyten zu signifikanter Reduktion des Ausprägungsgrads des I/R-Schadens und der konsekutiven Inflammationsreaktion führt. Des Weiteren sollte die in der vorliegenden Arbeit erzielte potente Inhibition der TNF- α -Aktivität und die daraus resultierende signifikante Reduktion der Infiltration mit CD4⁺, CD8⁺ und CD25⁺ T-Lymphozyten hinsichtlich folgenden Gesichtspunktes kritisch interpretiert werden: neue Erkenntnisse konnten eine einflussreiche Rolle der T-Lymphozyten bei der Genesung und Reparatur nach einem I/R-Schaden demonstrieren. Van Weel et al. stellten fest, dass es nach Okklusion der Femoralarterie in mit anti-CD4-Antikörper behandelten Mäusen und in WT-Mäusen zu einer signifikant beeinträchtigten Ausbildung von Kollateralen nach 7 Tagen in den CD4-depletierten Mäusen kam (114). Auf der anderen Seite überprüften Stabile et al. die Funktion der CD8⁺ T-Zellen in Hinsicht auf den Ausprägungsgrad der Angiogenese nach einem I/R-Schaden. Sie zeigten eine reduzierte Wiederherstellung des Blutflusses in homozygoten CD8-defizienten Mäusen. Ferner bildeten diese Mäuse eine verstärkte muskuläre Atrophie und Fibrose aus. Eine CD8-Rekonstitution führte zur Reduktion des Ausbildungsgrads dieser Parameter (115).

Diese Daten demonstrieren die Komplexität und Multidimensionalität der T-Zellfunktion, weshalb bei Veränderungen ihrer Expressionsrate in Entzündungsgebieten nicht ausschließlich von der Ausbildung einseitiger Effekte ausgegangen werden kann. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine protektive Funktion der T-Lymphozyten im Rahmen des I/R-Schadens und der nachfolgenden Inflammationsreaktion nach syngener Dünndarmtransplantation nicht nachvollzogen werden. Vielmehr korreliert die in der Histomorphologie sichtbare Verminderung der Kurz- und Langzeitschädigung mit einem positiven Effekt der TNF- α -Blockade und der damit minimierten Aktivierung von entzündlichen T-Zellen, wodurch I/R-Schaden und konsekutive Entzündungsreaktionen reduziert werden.

Die Pathophysiologie des I/R-Schadens des Dünndarms äußert sich sowohl in direkter zellulärer Schädigung als Folge der Ischämie als auch in chronischer Dysfunktion und Schädigung resultierend aus der Aktivierung von inflammatorischen Kaskaden (91). Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die eine Reihe von immunologischen Signalen wahrnehmen und die Immunantwort orchestrieren. Das 'Danger Model' von Matzinger besagt, dass die primäre Aufgabe des Immunsystems in der Detektion von und Protektion vor gefährlichen und schädigenden Ereignissen und Stimuli besteht (116). In diesem Model wird die Gewebedestruktion, die zu einer Aktivierung des Immunsystems führt, solchen Ereignissen gleichgestellt und TNF- α als eines der endogenen Gefahren-Signale, das von aktivierten T-Zellen

und dendritischen Zellen bereitgestellt wird, gekennzeichnet (117). Die dendritischen Zellen sind essenzielle Komponenten der spezifischen Immunabwehr im Bereich des Gastrointestinaltrakts (118). In ihrer Membran sind spezifische Rezeptoren für Zytokine, Chemokine, endogene Gefahren-Signale und mikrobielle Strukturen vorhanden (119). Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und Antigen-stimulierten T-Zellen sowohl eine gegen schädigende Ereignisse gerichtete Immunantwort als auch eine Toleranz induzieren können und dass ihnen eine entscheidende Bedeutung in der Ätiologie nicht nur von Autoimmunerkrankungen und Infektionen, sondern auch in der Transplantationsmedizin zugeschrieben werden kann (120, 121). Dendritische Zellen sind potente Modulatoren des Immunsystems, deren Funktion stark von der Expression von MHC-Klasse II-Molekülen abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der I/R-Schaden und die Entzündungsreaktion nach isogener Dünndarmtransplantation zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an transplantatinfiltierenden dendritischen Zellen führen. Die genauen Ursachen der Rekrutierung von dendritischen Zellen nach einem I/R-Schaden des Dünndarms sind ungeklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass der nekrotische Zelltod und nicht die Apoptose zur Rekrutierung und Aktivierung von dendritischen Zellen in unterschiedlichen Geweben führt (122, 123). Durch die Syngenetität des in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsmodells wurde die Expression von MHC-Klasse II wenig oder gar nicht von der Transplantation oder der TNF- α -Blockade beeinflusst. Dennoch konnte eine Therapie mit Infliximab eine signifikante Reduktion der in der DTx-Kontrolle erhöhten Anzahl an transplantatinfiltierenden OX62+ dendritischen Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach der Reperfusion bewirken. Diese Tatsache könnte von Bedeutung für die Induktion einer Immuntoleranz nach Transplantation vaskularisierter Organe sein. Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung einer Immunhomöostase, indem sie die initiale Immunantwort nach Gewebeschädigung und Zellnekrose über die Aktivierung und Signalvermittlung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) regulieren (124). Sie können nicht nur die primäre Immunantwort initiieren, sondern auch die Ausprägung einer Immunreaktion hemmen (125). Neue Daten weisen darauf hin, dass eine verminderte Expression von dendritischen Zellen nach der Transplantation vaskularisierter Organe zur Ausbildung einer Immuntoleranz und verbessertem Transplantatüberleben führen könnte (126). Des Weiteren deuteten Kang et al. an, dass der Minimierung des I/R-Schadens eine Schlüsselrolle in der Toleranzinduktion nach allogener Transplantation zukommt und Langrehr et al. konnten in einem etablierten allogenen Dünndarmtransplantationsmodell darauf hinweisen, dass die Immunmodulation mittels Hemmung der TNF- α -Aktivität, was in einem signifikant verlängerten Langzeitüberleben resultierte, die Entstehung einer Immuntoleranz begünstigen

könnte (127, 128).

Makrophagen gehören zu den Hauptproduzenten von TNF- α im Rahmen der Inflammation nach Transplantation vaskularisierter Organe. Über die Bedeutung und Funktion von im Bereich der Mukosa und Muskularis residenten Makrophagen in der Dünndarmtransplantation ist allerdings wenig bekannt. Schaefer et al. demonstrierten, dass diese Zellen kausal in die transplantationsassoziierte Inflammation und motorische Dysfunktion der Muskularis nach Dünndarmtransplantation involviert sind (129). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der I/R-Schaden nach Dünndarmtransplantation in einem signifikant verstärkten Auftreten von Makrophagen im Transplantat, welches selbst nach 6 Monaten noch sichtbar war, resultiert. Bemerkenswert ist, dass die Blockade der TNF- α -Aktivität mit allen drei Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der infiltrierenden ED1+ Makrophagen in den proximalen und distalen Abschnitten des Transplantats bis zum Beobachtungszeitpunkt an Tag 7 nach der Reperfusion führte. Jedoch nur durch die Therapie mit Infliximab kam es zu einer signifikanten Reduktion nach 6 Monaten. Die hier vorliegenden Daten korrelieren auch mit den Ergebnissen von Chen et al., die zeigen konnten, dass eine Depletion von residenten Makrophagen zu einer Verminderung des I/R-Schadens des Dünndarms führt (130).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass der I/R-Schaden nach Dünndarmtransplantation zu einer signifikant verstärkten Infiltration des distalen Transplantatabschnitts durch entzündliche CD4+, CD8+ und CD25+ T-Zellen sowie ED1+ Makrophagen führt. Dies korreliert mit den klinischen Beobachtungen, welche berichten, dass sich die chronische Transplantatenteropathie präferenziell im distalen Abschnitt des transplantierten Dünndarms manifestiert (17, 68). Pascher et al. beobachteten bei zwei Patienten nach allogener Dünndarmtransplantation, die eine kortikosteroid- und muromonab-resistente Abstoßung durchliefen, dass sich, verglichen mit den präoperativen Werten, persistent erhöhte TNF- α -Werte im Serum entwickelten, was zu der Annahme führte, dass TNF- α kausal in die Pathogenese der therapierefraktären oder chronischen Transplantatabstoßung involviert ist (18). Ferner zeigte die histologische Aufarbeitung der vom distalem Abschnitt des Transplantats entnommenen Proben ein Cobblestone-Muster, was typisch für den aktiven M. Crohn ist. Die Gabe von Infliximab führte bei beiden Patienten zur beeindruckenden Besserung sowohl der klinischen Symptomatik als auch der Transplantathistologie. In dem vorliegenden Transplantationsmodell hatte eine anti-TNF- α -Therapie keinen signifikanten Einfluss auf den Unterschied zwischen proximalem und distalem Transplantatabschnitt. Dennoch konnte diese Therapie den I/R-Schaden und die Inflammation nach Transplantation entscheidend minimieren. Diese Erkenntnisse können in der Vorbeugung der chronischen Transplantatdysfunktion und in

der Verbesserung der klinischen Langzeitergebnisse nach Dünndarmtransplantation eine wichtige Rolle spielen.

Stressproteine (Heat shock proteins, HSPs) sind intrazelluläre Eiweiße, die den Organismus gegen schädigende Noxen und Stimuli schützen. Die Akkumulation von HSPs wird durch verschiedene Reize wie I/R-Schaden, Hitzeschock, mikrobielle Infekte, NO und andere angeregt. Als Antwort darauf werden die HSPs verstärkt produziert und die Toleranz der Zellen gegen schädigende Stimuli wird erhöht; ein Phänomen, das als 'heat shock response' bekannt ist (131). Neue wissenschaftliche Erkenntnisse haben antiinflammatorische Eigenschaften der HSPs gezeigt, welche sich in einer Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB und der Reduzierung der Expression von entzündlichen Zytokinen äußerte, was eine verminderte Gewebeschädigung zur Folge hatte. Eine Verminderung in der Expression von HSPs führte hingegen zur Exazerbation der Entzündungsreaktion (132, 133). Mehrere wissenschaftliche Arbeiten konnten die protektive Wirkung von HSPs, insbesondere von HSP-70, im Rahmen des I/R-Schadens und der assoziierten Inflammationsreaktion demonstrieren. In der Rattenlunge konnten Long und Mitarbeiter beweisen, dass eine erhöhte HSP-70-Expression mit einer verbesserten pulmonalen Funktion nach einem I/R-Schaden einhergeht (134). Auf der anderen Seite erreichte in der Rattenniere die pharmakologische Präkonditionierung mit FK506 oder Cyclosporin eine signifikante Minderung des I/R-Schadens, indem es zu einer erhöhten Produktion von HSP-70 kam (135). In der Dünndarmmukosa der Ratte wurde gezeigt, dass die Produktion von HSP-70 zur Toleranz gegen ischämische Schädigung führte (136). In dem vorliegenden Dünndarmtransplantationsmodell konnte demonstriert werden, dass die Pharmakotherapie mit Infliximab eine signifikant erhöhte Expression von HSP-70 zur Folge hatte, welche mit einer Verminderung des I/R-Schadens und der nachfolgenden Entzündungskomponenten einherging. Es muss jedoch beachtet werden, dass neue Forschungsergebnisse zeigen, dass erhöhte HSP-Spiegel bzw. Expressionsniveaus mit einer proinflammatorischen Wirkung und der verstärkten Aktivierung des natürlichen und erworbenen Immunsystems assoziiert werden, was angesichts der allgemein akzeptierten anti-entzündlichen Rolle der HSPs als das 'heat shock paradox' bekannt wurde (131). Dieses Phänomen wird auf die folgende Tatsache zurückgeführt: nach einer zellulären Schädigung gelangen die intrazellulären HSPs in den Extrazellularraum und den Kreislauf und wirken dort als endogene Gefahren-Signale. Dies führt via Toll-like-Rezeptoren (TLR) zu einer verstärkten Aktivierung von APZ wie dendritischen Zellen und Makrophagen, die ihrerseits CD4+ und CD8+ T-Zellen aktivieren, was die Immunantwort aggraviert (126, 131). Im vorliegenden Modell könnte allerdings die ausschließlich in den Transplantaten der mit Infliximab behandelten Tiere erhöhte HSP-70-

Expression auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass Infliximab zur Lyse der TNF- α -exprimierenden Zelle führt (66). Somit wird HSP-70 durch die absterbende Zelle in die Umgebung freigesetzt, was die verstärkte Detektion in der Immunhistochemie erklären würde. Dieser Sachverhalt könnte sodann zu einer erhöhten Immunaktivierung und Gewebeschädigung führen, was allerdings im Widerspruch zu den hier gewonnenen Ergebnissen stünde. Die im vorliegenden Modell gewonnenen Daten sprechen jedoch insgesamt für eine entzündungshemmende und protektive Wirkung von HSP-70, was entscheidend durch die Histomorphologie und Immunhistochemie untermauert wurde, die eine signifikante Minimierung von I/R-Schaden bzw. Inflammation, besonders im Falle einer Behandlung mit Infliximab, zeigten. Des Weiteren könnte im Kontext des 'heat shock response und paradox' eine anti-TNF- α -Therapie dank der Minimierung der Gewebeschädigung und der damit bedingten geminderten Freigabe der intrazellulären HSPs auch zu einer konsekutiven Reduktion der Aktivierung des natürlichen und erworbenen Immunsystems führen, was der Entstehung einer chronischen Transplantatenteropathie entgegenwirken könnte.

Die Bindung von TNF- α an den TNFR kann zur Apoptose, der Hauptform des zellulären Todes in Assoziation mit dem I/R-Schaden, führen (18). In dieser Arbeit bewirkte der I/R-Schaden einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in allen Transplantaten. In den proximalen Abschnitten konnten kaum Unterschiede zwischen den einzelnen TNF- α -Inhibitoren gesehen werden. Im distalen Transplantat hingegen, das im vorliegenden Transplantationsmodell eine erhöhte Vulnerabilität zeigte, führte die TNF- α -Hemmung insgesamt zur Reduktion des Grads der Apoptose. Dies war jedoch von der Art der TNF- α -Inhibition abhängig. So erreichte die TNF- α -Blockade mit Infliximab eine signifikante Verminderung während der ersten 12 Stunden nach Reperfusion. Die Reduktion der Apoptose mit Etanercept war im Vergleich dazu in der Frühphase weniger ausgeprägt, was mit Daten aus der Literatur korreliert, die demonstrieren, dass Adalimumab, ein vollständig humanisierter mAK gegen TNF- α , eine effektivere Reduzierung der Apoptose als Etanercept in menschlichen Epithelzellen der Speicheldrüse bewirkt (137). Im Langzeitverlauf jedoch waren Etanercept und Pentoxiphyllin die effektiveren Medikamente. Hierbei resultierte besonders die Behandlung mit Pentoxiphyllin nach 6 Monaten in einer signifikanten Minimierung der Apoptoserate, was zeigt, dass diese Therapie aufgrund der Reduktion der Transkription und Produktion von TNF- α zwar zu einem verzögerten Einsetzen, jedoch zu einem länger anhaltendem Effekt auf dem Ausprägungsgrad der Apoptose nach einem I/R-Schaden führt.

Das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Dünndarms stellt das umfangreichste Kompartiment des Immunsystems dar. Hier sind mehr Lymphozyten präsent als in allen anderen

Bereichen des Immunsystems zusammengenommen (118). Die Transplantation des hochimmunogenen Dünndarms resultiert nicht nur in einer Schädigung des Transplantats, sondern auch von weiteren Organen, wie z. B. der Lunge, die von allen sekundär betroffenen Organen die größte Anfälligkeit für diese systemischen Entzündungszustände zeigt (138). Mehrere Arbeiten dokumentieren, dass ein I/R-Schaden des Dünndarms eine Lungenschädigung verursacht, die durch erhöhte Neutrophileninfiltration, mikrovaskuläre Permeabilität, Endothelschädigung im Bereich der Alveolarkapillaren und Lungenödem charakterisiert ist und die zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führt (139-141). Im vorliegenden Fall konnte demonstriert werden, dass eine kurzfristige Blockade der TNF- α -Aktivität eine protektive Wirkung auf die Empfängerlunge nach einer Dünndarmtransplantation hat, indem sie zu einer signifikanten Reduzierung der Infiltration mit MPO+ Leukozyten führt. Die Emigration der Entzündungszellen aus den postkapillären Venolen in das Inflammationsgebiet ist ein komplexer und höchst koordinierter Vorgang, der stark von der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Membran der Leukozyten und der Endothelzellen abhängig ist (91). Eine anti-TNF- α -Therapie führt zu verminderter Aktivierung von NF κ B und nachfolgender Hemmung der Transkription und Expression von Adhäsionsmolekülen, was in vorliegendem Modell eine Reduktion der Leukozytenemigration zur Folge haben könnte. Oltean et al. zeigen, dass eine Hemmung der Aktivität von NF κ B zu einer Verminderung des Grads der Leberschädigung nach isogener Dünndarmtransplantation und Empfängervorbehandlung mit Tacrolimus führt (142). Chen et al. wiesen jedoch in einem Modell des warmen I/R-Schadens des Dünndarms darauf hin, dass nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch Makrophagen MPO-Aktivität zeigen und dass letztere in die Frühphase des I/R-Schadens des Dünndarms kausal involviert sind (130).

Mehrere experimentelle Arbeiten demonstrieren, dass es nach isogener Dünndarmtransplantation in der Ratte zu einer signifikanten Erhöhung von Transkription und Konzentration diverser entzündlicher Zytokine im Transplantat und im Serum kommt (138, 143). Aufgrund der eindrucksvollen Minimierung der entzündlichen Infiltration, welche die immunhistochemischen Untersuchungen aufzeigten, wurden auch vergleichbare Ergebnisse in den mittels ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen im Transplantat und in den Empfängerlymphknoten erwartet. In den homogenisierten Dünndarmtransplantaten konnten im ELISA nach Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren keine Unterschiede in der Zytokinkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten DTx-Kontrollen gesehen werden. In den stimulierten Lymphozyten der Lymphknoten der therapierten Empfänger hingegen war ein Trend zur reduzierten TNF- α -Konzentration zu verzeichnen. Der Grund für diese Diskrepanz ist weitestgehend unbekannt. Eine mögliche Erklärung könnte in der zugrundeliegenden Methodik gesucht werden: Die

Zytokinbestimmung in den mesenterialen Lymphknoten geschieht nach zusätzlicher Stimulation aufgereinigter Leukozytensuspensionen, die ELISA-Messung in den Transplantaten jedoch wird direkt in den Überständen der Dünndarmproben durchgeführt.

Die Einführung von Infliximab im Jahr 1998 erfolgte nach in vivo-Versuchen bei Schimpansen und die Erweiterung des Zulassungsspektrums (M. Crohn u.a.) anhand von Ergebnissen in Mausmodellen (144-149). Eine Wirkung des anti-humanen TNF- α -Antikörpers Infliximab, bei der man im Mausversuch von der Wechselwirkung des Mausanteils des Antikörpers mit TNF- α ausgeht, wurde im vorliegenden Rattenmodell vorausgesetzt. Die hier erzielten Ergebnisse müssen daher kritisch hinterfragt werden, um unspezifische Reaktionen des chimären Maus/Mensch-Antikörpers Infliximab im Rattenmodell ausschließen zu können. Hierfür wurden mehrere experimentelle Arbeiten herangezogen. Diese demonstrieren, dass Infliximab eine Wirkung gegen TNF- α in Ratten- und Mausmodellen aufweist. In einem Rattenmodell der nichtalkoholischen Steatohepatitis wurde gezeigt, dass Infliximab signifikant die Entzündungsreaktion und den Grad der Nekrose und Fibrose in der Leber von Ratten reduzieren kann (94). Boettger et al. demonstrieren in einem Rattenmodell der Antigen-induzierten Arthritis, dass die durch die Administration von Infliximab erzielten antinozizeptiven Effekte auf die Neutralisation von TNF- α zurückzuführen sind (150). Des Weiteren wiesen Pech und Mitarbeiter die spezifische Bindung von Infliximab an TNF- α der Ratte in einem Versuch der LPS-induzierten Peritonitis nach (143). Sie konnten zeigen, dass die einmalige Gabe von Infliximab eine signifikante Reduktion des TNF- α -Serumspiegels um 98% ($p < 0,001$) in behandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrolltieren bewirkt. Die unbehandelten Tiere entwickelten eine ausgeprägte Peritonitis, die mit einer signifikanten Erhöhung von TNF- α im Serum einherging. Alle aufgeführten Literaturhinweise sprechen dafür, dass von einer spezifischen Wirksamkeit des humanen anti-TNF α -Antikörpers Infliximab im vorliegenden Rattenmodell und entsprechender Plausibilität der gewonnenen Daten ausgegangen werden kann.

Die eingangs gestellten Fragen können schlussendlich wie folgt beantwortet werden:

1. Eine kurzfristige perioperative anti-TNF- α -Therapie führt zur Verbesserung des Empfängerüberlebens, der Transplantatmorphologie und zu einer signifikanten Minimierung des I/R-Schadens und der Apoptose.
2. Die Hemmung der TNF- α -Aktivität führt zur signifikanten Reduktion der Expression einer Reihe transplantatinfiltrierender Entzündungszellen wie CD4+, CD8+ und CD25+ T-Lymphozyten, ED1+ Makrophagen und OX62+ dendritischen Zellen, sowie zu einer

erhöhten Akkumulation von zytoprotektiven Molekülen wie HSP-70. Ferner hat die Therapie einen protektiven Effekt auf die Empfängerlunge, indem die Infiltration des Lungenparenchyms durch neutrophile Granulozyten entscheidend gesenkt wird.

7. Zusammenfassung

Die Transplantation ist die einzige kurative Therapie des irreversiblen Kurzdarmsyndroms. Trotz guter Einjahres-Überlebensraten sind die Langzeitergebnisse jedoch unbefriedigend. Hauptursache hierfür ist die chronische Allograftenteropathie. Sie ist einerseits durch antigen-abhängige Immunreaktionen (akute und chronische Abstoßung); andererseits durch antigen-unabhängige Faktoren wie den Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bedingt. Zur Eliminierung der antigen-unabhängigen Faktoren wird langfristig die Reduktion des I/R-Schadens angestrebt. Eine im Tiermodell vielversprechende Therapie hierfür ist der Einsatz von TNF- α -Inhibitoren wie Infliximab, Etanercept und Pentoxiphyllin.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der perioperativen pharmakologischen Blockade der TNF- α -Aktivität auf den Ausprägungsgrad des I/R-Schadens, die assoziierte Inflammationsreaktion sowie die Schädigung von zusätzlichen Organen wie der Empfängerlunge. Im etablierten, syngenem Lewis-/Lewis Transplantationsmodell, in dem keine Abstoßungsreaktion stattfindet, wurde eine orthotope Dünndarmtransplantation durchgeführt, der eine kalte Ischämiezeit von sechs Stunden vorausging. Es wurden drei Empfängergruppen gebildet, die perioperativ jeweils einen der drei TNF- α -Inhibitoren erhielten. Zwei zusätzliche Tiergruppen dienten als Kontrollen. In der ersten davon wurde eine Transplantation durchgeführt, jedoch fand hier keine Therapie statt. Die Tiere der nativen Kontrollgruppe wurden weder transplantiert noch wurde diese Gruppe medikamentös behandelt. Nach einer Beobachtungszeit von 12 Stunden, 7 Tagen oder 6 Monaten wurden die Empfängertiere getötet und die Transplantate sowie die mesenterialen Empfängerlymphknoten und eine Empfängerlunge entnommen. Zusätzlich wurde intraoperativ 20 Minuten nach Reperfusion ein Segment von proximalem und distalem Dünndarmtransplantat entnommen.

Am Ende der Beobachtungszeiten wurden die gewonnenen Transplantate histomorphologisch sowie immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der Antigene CD4, CD8 und CD25 sowie ED1, OX62, OX3 und HSP-70 untersucht. Die Zytokinkonzentration von TNF- α , IL-6 und IL-4 wurde in den mesenterialen Lymphknoten und den Transplantaten mit Hilfe eines ELISA-Assays bestimmt. Zusätzlich wurden der Grad der Apoptose in den Transplantaten und die MPO-Aktivität im Parenchym der Empfängerlunge mittels TUNEL- bzw. MPO-Färbung quantifiziert.

Nach einer einmaligen Infliximab-Gabe überlebten 100% der Versuchstiere den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen. In den unbehandelten DTx-Kontrollen war das Überleben signifikant schlechter. Gleichzeitig war der histomorphologische Organzustand in den behandelten Transplantatgruppen signifikant besser als in den DTx-Kontrollen. Signifikante

Reduktion der Anzahl transplantatinfiltrierender CD4+, CD8+ und CD25+ T-Zellen sowie ED1+ Makrophagen und OX62+ dendritischer Zellen zeigte sich nach TNF- α -Blockade insgesamt für alle Zeitpunkte nach der Reperfusion. Interessanterweise wiesen die distalen Transplantatabschnitte signifikant höhere Frequenzen der infiltrierenden Leukozyten auf, was mit klinischen Beobachtungen korreliert. Des Weiteren war die Akkumulation des zytoprotektiven Markers HSP-70 nur nach einer Behandlung mit Infliximab signifikant verstärkt. Durch die Applikation von TNF- α Inhibitoren verminderte sich der Grad der Apoptose im distalen Transplantatabschnitt im Vergleich zu den DTx-Kontrollen. In der Empfängerlunge war nach einer Hemmung der TNF- α -Aktivität eine signifikant geminderte Infiltration mit MPO+ neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Im TNF- α -Zytokinmuster der mesenterialen Lymphknoten der behandelten Tiere war eine Tendenz zu reduziertem Spiegel gegenüber der Vergleichsgruppe zu verzeichnen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass I/R-Schaden und Inflammation nach Empfängerbehandlung mit TNF- α -Inhibitoren bei der Dünndarmtransplantation signifikant reduziert sind. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass mit einer anti-TNF- α -Therapie eine signifikante Besserung von Überleben und Lungenprotektion beim Empfänger erzielt werden kann.

8. Literaturverzeichnis

1. Irving M. Intestinal Failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:G26-9.
2. Pascher A, Kohler S, Neuhaus P, Pratschke J. Present status and future perspectives of intestinal transplantation. *Transpl Int* 2008;21(5):401–14.
3. Chan S, McCowen KC, Bistrain BR, et al. Incidence, prognosis, and etiology of end-stage liver disease in patients receiving home total parenteral nutrition. *Surgery* 1999;126(1):28-34.
4. Intestinal Transplant Registry data. (Accessed November 14 2011 at <http://www.intestinaltransplant.org>)
5. Starzl TE, Rowe MI, Todo S, et al. Transplantation of multiple abdominal viscera. *JAMA* 1989;261(10):1449-57.
6. Deltz E, Schroeder P, Gebhardt H, et al. Successful clinical small bowel transplantation: report of a case. *Clin Transplant* 1989;3:89-91.
7. Grant D, Wall W, Mimeault R, et al. Successful smallbowel/liver transplantation. *Lancet* 1990;335(8683):181-4.
8. Margreiter R, Koenigsrainer A, Schmid T, et al. Successful multivisceral transplantation. *Transplant Proc* 1992;24(3):1226-7.
9. Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, et al. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg* 2005;241(4):607-13.
10. Mueller AR, Pascher A, Platz KP, et al. Modified technique in clinical small bowel transplantation: donor and recipient management. *Transplant Proc* 2002;34(6):2265-7.
11. Müller AR, Platz KP, Neuhaus P. Dünndarmtransplantation. In: Pfitzmann R, Neuhaus P, Hetzer R (Hrsg). *Organtransplantation: Transplantation thorakaler und abdomineller Organe*. Walter de Gruyter, Berlin, New York 2001;217-238.
12. Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, et al. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001;234(3):404-16.
13. Sudan DL, Kaufman SS, Shaw BW Jr, et al. Isolated intestinal transplantation for intestinal failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95(6):1506-15.
14. Todo S, Tzakis A, Reyes J, et al. Small intestinal transplantation in humans with or without the colon. *Transplantation* 1994;57(6):840-8.
15. Ruiz P, Kato T, Tzakis A. Current status of transplantation of the small intestine. *Transplantation* 2007;83(1):1-6.
16. Fryer P. The current status of intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(3):266-72.

17. Pascher A, Radke C, Dignass A, et al. Successful infliximab treatment of steroid and OKT3 refractory acute rejection in two patients after intestinal transplantation. *Transplantation* 2003;76(3):615-8.
18. Pascher A, Klupp J. Biologics in the treatment of transplant rejection and ischemia/reperfusion injury: new application for TNFalpha inhibitors? *Biodrugs* 2005;19(4):211-31.
19. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (TNF) synthesis; mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232(4753):977-80.
20. Krakauer T, Stiles BG. Pentoxifylline inhibits superantigen-induced toxic shock and cytokine release. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(4):594-8.
21. Levings MK, Schrader JW. IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 1999;162(9):5224-9.
22. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghrayeb J. Chimeric anti-TNF-alpha mAb cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* 1995;7(3):251-9.
23. Kovarik JM, Burtin P. Immunosuppressants in advanced clinical development for organ transplantation and selected autoimmune diseases. *Expert Opin Emerg Drugs* 2003;8(1):47-62.
24. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(20):9784-8.
25. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364(9447):1814-27.
26. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997;51(5):1341-51.
27. Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 1997;63(4):495-500.
28. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003;76(1):50-4.
29. DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Semin Immunol* 2003;15(1):33-48.

30. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
31. Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2002;37(3):457-9.
32. Prasad R, Alavi K, Schwartz MZ. GLP-2alpha accelerates recovery of mucosal absorptive function after intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 2001;36(4):570-2.
33. Scolapio JS, Fleming CR. Short bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 1998;27(2):467-79.
34. Sileri P, Morini S, Schena S, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function. *Transplant Proc* 2002;34(3):984.
35. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, et al. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994;35(1 Suppl):S28-34.
36. Cicalese L, Sileri P, Green M, Abu-Elmagd K, Kocoshis S, Reyes J. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation* 2001;71(10):1414-7.
37. Aksöyek S, Cinel I, Avlan D, et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002;18(5):476-80.
38. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:11-30.
39. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care* 2003;9(2):127-32.
40. Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergün H, Gürhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001;88(3):464-8.
41. Marshall JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76(5):479-84.
42. Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 1969;221(5186):1155-7.
43. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320(6063):584-8.
44. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104(4):487-501.
45. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(6):867-70.
46. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(1):3-9

47. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997;64(2):190-7.
48. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):R577-95.
49. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC Jr, et al. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Surgery* 1998;124(2):291-6.
50. Meldrum DR, Cain BS, Cleveland JC Jr, et al. Adenosine decreases postischemic cardiac TNF-alpha production: anti-inflammatory implications for preconditioning and transplantation. *Immunology* 1997;92(4):472-7.
51. Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Cain BS, Meng X, Harken AH. Increased myocardial tumor necrosis factor-alpha in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1998;65(2):439-43.
52. Teoh N, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
53. Fouqueray B, Philippe C, Herbelin A, Perez J, Ardaillou R, Baud L. Cytokine formation within rat glomeruli during experimental endotoxemia. *J Am Soc Nephrol* 1993;3(11):1783-91.
54. Wanner GA, Ertel W, Müller P, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5(1):34-40.
55. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997;64(10):1398-403.
56. Ogle CK, Mao JX, Wu JZ, Ogle JD, Alexander JW. The 1994 Lindberg Award. The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: Effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 1994;15(6):470-7.
57. Mantey CL, Vogel SN. Interactions of lipopolysaccharide with macrophages. *Immunol Ser* 1994; 60:63-81.
58. Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 1996;60(1):8-26.
59. Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 1993;268(33):25009-14.

60. Sanghera JS, Weinstein SL, Aluwalia M, Girn J, Pelech SL. Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 1996;156(11):4457-65.
61. Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(13):6213-7.
62. Büscher D, Hipskind RA, Krautwald S, Reimann T, Baccarini M. Ras-dependent and independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. *Mol Cell Biol* 1995;15(1):466-75.
63. Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V, Ulevitch RJ. Molecular cloning of p38 MAP kinase. *Biochim Biophys Acta* 1995;1265(2-3):224-7.
64. Lee JC, Young PR. Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 1996;59(2):152-7.
65. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AK, et al. The role of tumor-necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury, *J Urol* 1999;162:196-203
66. Esposito E, Cuzzocrea S. TNF- α as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem* 2009;16(24):3152-67.
67. Couriel DR, Saliba R, de Lima M, et al. A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(12):1555-62.
68. Pascher A, Klupp J, Langrehr JM, Neuhaus P. Anti-TNF-alpha therapy for acute rejection in intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(3):1635-6.
69. Kovarik JM, Buritn P. Anti inflammatory immunosuppressants in advanced clinical development for organ transplantation and selected autoimmune diseases. *Expert Opin Emerg Drugs* 2003;8(1): 47-62.
70. Sandborn WJ. New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2005;5(1): 10-8.
71. Amgen – Wyeth Enbrel® Prescribing Informations 2006,18-24. (<http://www.enbrel.com>)
72. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117(2):244-79.
73. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Na KR, Shin YT, Lee KW. Pretreatment with the tumor necrosis factor-alpha blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury. *Transplant Proc* 2009;41(9):3590-6.

74. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001;121(5):1088-94.
75. Van Furth AM, Verhard-Seijmonsbergen EM, van Furth R, Langermans JA. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes. *Immunology* 1997;91(2):193-6.
76. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155(3):1230-6.
77. Rüdiger HA, Clavien PA. TNF-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122 (1): 202-10.
78. Yamashita M, Schmid RA, Okabayashi K, et al. Pentoxifylline in flush solution improves early lung allograft function. *Ann Thorac Surg* 1996;61(4):1055-61.
79. Savas CP, Nolan MS, Lindsey NJ, Boyle PF, Slater DN, Fox M. Renal transplantation in the rat - a new simple, non-suture technique. *Urol Res* 1985;13(2):91-3.
80. Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery* 2003;23(4):387-94.
81. Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971;70(5):693-702.
82. Kort WJ, Westbroeck DL, MacDicken I, Lameijer LD. Orthotopic total small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res* 1973;5(2):81-9.
83. Stangl MJ, Schraut WH, Moynihan HL, Lee T. Rejection of ileal versus jejunal allografts. *Transplantation* 1989;47(3):424-7.
84. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984 32(2):219-29.
85. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Ass* 1958;53:457-81.
86. Parmar MK, Machin D. *Survival analysis – a practical approach*. John Wiley & Sons, Chichester, New York 1995.
87. Koike K, Moore FA, Moore EE, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. *J Surg Res* 1993;54(5):469–473.
88. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548:47–63.

89. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 2001;99(1):134–141.
90. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev* 2009;23(1):1–10.
91. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia–Reperfusion Injury of the Intestine and Protective Strategies against Injury. *Dig Dis Sci* 2004;49(9):1359–77.
92. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery*. 1990;107(5):574-80.
93. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Asai N, Uchida T, Noguchi T. Dendritic cell activation in response to ischemia–reperfusion injury of the small intestine. *Surg Today* 2010;40(2):137-45.
94. Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF- α reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline- deficient diet. *Inflammation* 2008;31(2): 91-8.
95. Ma H, Wang J, Wang J, Li Y, Li J. Features of chronic allograft rejection on rat small intestine transplantation. *Pediatr Transplant* 2007;11(2):165-72.
96. Eugui EM. Fibrogenesis in chronic allograft rejection: underlying mechanisms and pharmacological control. *Transplant Proc* 2002;34(7):2867-71.
97. Thavarajah K, Wu P, Rhew EJ, Yeldandi AK, Kamp DW. Pulmonary complications of tumor necrosis factor-targeted therapy. *Respir med* 2009;103(5):661-9.
98. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 1997;64(7):945-7.
99. Waldmann TA. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science* 1986;232(4751):727-32.
100. Soda Y, el-Assal ON, Yu L, Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery* 1999;125(1):23-32.
101. Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, et al. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(4): 756-67.
102. Hancock WW, Wang L, Ye Q, Han R, Lee I. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):479-86.

103. Hancock WW. Chemokine receptor-dependent alloresponses. *Immunol Rev* 2003;196:37-50.
104. Akahori T, Sho M, Kashizuka H, Nomi T, Kanehiro H, Nakajima Y. A novel CCR5/CXCR3 antagonist protects intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006;38(10):3366-8.
105. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006;113(17):2105-12.
106. de Perrot M, Young K, Imai Y, et al. Recipient T cells mediate reperfusion injury after lung transplantation in the rat. *J Immunol* 2003; 171(10):4995-5002.
107. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002;9(2):99-109.
108. Horie Y, Wolf R, Chervenak RP, Jennings SR, Granger DN. T-lymphocytes contribute to hepatic leukostasis and hypoxic stress induced by gut ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 1999;6(4):267-80.
109. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ Res* 2000;86(2):205-213.
110. Horie Y, Chervenak RP, Wolf R, et al. Lymphocytes mediate TNF-alpha-induced endothelial cell adhesion molecule expression: studies on SCID and RAG-1 mutant mice. *J Immunol* 1997;159(10):5053-62.
111. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC et al. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 2006;114(19):2056-64.
112. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997;100(2):279-89.
113. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001;108(9):1283-90.
114. van Weel V, Toes RE, Seghers L, et al. Natural killer cells and CD4+ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2310-8.
115. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, et al. CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006;113(1):118-24.

116. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 2002;296(5566):301-5.
117. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001;13(1):114-9.
118. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;156:145-66.
119. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
120. Vlad G, Cortesini R, Suci-Foca N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol* 2005;174(14):5907-14.
121. Foti M, Granucci F, Pelizzola M, Beretta O, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol* 2006;79(5):913-6.
122. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12(11):1539-46.
123. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999;5(11):1249-55.
124. Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y. DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol* 2006;3(4):279-83.
125. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
126. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005;79(5): 505-514.
127. Kang SM, Tang Q, Bluestone JA. CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. *Am J Transplant* 2007;7(6):1457-63.
128. Langrehr JM, Gube K, Hammer MH, et al. Short-term anti-CD4 plus anti-TNF-alpha receptor treatment in allogeneic small bowel transplantation results in long-term survival. *Transplantation* 2007;84(5):639-46.
129. Schaefer N, Tahara K, Schmidt J, et al. Resident macrophages are involved in intestinal transplantation-associated inflammation and motoric dysfunction of the graft muscularis. *Am J Transplant* 2007;7(5):1062-70.
130. Chen Y, Lui VC, Rooijen NV, Tam PK. Depletion of intestinal resident macrophages prevents ischaemia reperfusion injury in gut. *Gut* 2004;53(12):1772-80.

131. Chen Y, Voegeli TS, Liu PP, Noble EG, Currie RW. Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007;6(2):91-100.
132. Park KJ, Gaynor RB, Kwak YT. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2003;278(37):35272-8.
133. Chen Y, Arrigo AP, Currie RW. Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of NF-kappa B pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(3):H1104-14.
134. Long SM, Laubach VE, Tribble CG, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces lung reperfusion injury. *J Surg Res* 2003;112(1):12-8.
135. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, et al. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001;72(11):1753-9.
136. Fleming SD, Starnes BW, Kiang JG, Stojadinovic A, Tsokos GC, Shea-Donohue T. Heat stress protection against mesenteric I/R induced alterations in intestinal mucosa in rats. *J Appl Physiol* 2002;92(6):2600-7.
137. Sisto M, D'Amore M, Caprio S, Mitolo V, Scagliusi P, Lisi S. Tumor necrosis factor inhibitors block apoptosis of human epithelial cells of the salivary glands. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171:407-14.
138. Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, et al. Exogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(4):482-94.
139. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989;106(2):195-201.
140. Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Demirpençe E, Zülfikaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg* 2000;231(1):105-11.
141. Ishii H, Ishibashi M, Takayama M, Nishida T, Yoshida M. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. *Respirology* 2000;5(4):325-31.
142. Oltean M, Zhu C, Mera S, et al. Reduced liver injury and cytokine release after transplantation of preconditioned intestines. *J Surg Res* 2009;154(1):30-7.

143. Pech, T. Finger, J. Fujishiro J, et al. Perioperative infliximab application ameliorates acute rejection associated inflammation after intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2010;10(11):2431–41.
144. Product Approval Information. FDA/Center for Drug Evaluation and Research. (Accessed May 11 2008, at <http://www.fda.gov/cder/foi/appletter/1998/inflcen082498L.htm>)
145. Pharmacology Review of the Infliximab. FDA/Center for Drug Evaluation and Research. (Accessed May 11 2008, at <http://www.fda.gov/cder/biologics/review/inflcen111099r2.pdf>)
146. First treatment for Crohn's Disease approved. U.S Department of Health and Human Services, August 24, 1998. (Accessed May 11 2008, at <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00651.html>)
147. REMICADE® (infliximab) for iv Injection. Centocor, Inc. 2005. (Accessed May 11 2008, at http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2005/Sep_PI/Remicade_PI.pdf)
148. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337(15):1029-35.
149. Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT, et al. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine* 1995;7(1):15-25.
150. Boettger MK, Hensellek S, Richter F, et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008; 58(8):2368-78.

9. Glossar

| | |
|---------------|--|
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrom |
| APAAP | Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase |
| APZ | Antigen präsentierende Zelle |
| ARDS | Acute respiratory distress syndrome |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| DTx | Dünndarmtransplantation |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FADD | Fas associated death domain protein |
| GvHD | Graft-versus-Host-Erkrankung |
| H&E | Hämatoxylin-Eosin |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| IFN- γ | Interferon gamma |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| I/R-Schaden | Ischämie-/Reperfusionsschaden |
| JNK | C-Jun-N-terminalen Kinase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mAk | Monoklonale Antikörper |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MOF | Multiorganversagen |
| MPO | Myeloperoxidase |
| NF κ B | Nuclear Factor kappa B |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAP | Peak airway pressure |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PTLD | Posttransplantations- Lymphoproliferativerkrankung |
| PMA | Phorbol Myristat Acetat |
| RAS | Rat Sarcoma Protoonkogen |
| RIP | Receptor interacting protein |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Medium) |
| SCID | Severe combined immunodeficiency |

| | |
|---------------|---|
| SIRS | Systemic inflammatory response syndrom |
| TACE | TNF- α -converting enzyme |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor- α |
| TGF- β | Tumor growth factor beta |
| TNFR1 bzw.II | Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor I bzw. II |
| TPN | Totale parenteraler Ernährung |
| TUNEL | Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling |
| UW-Lösung | University of Wisconsin-Lösung |
| VCAM | Vascular cell adhesion molecule |
| WT | Wildtyp |

10. Eigene Publikationen

1. Atanasov G, Kohler S, Jurisch A, et al. TNF-alpha inhibitors reduce ischemic/reperfusion injury in a rat intestinal transplant model. *European Journal of Medical Research* 2007. 12 (Supplement IV):108-9.
2. Atanasov G, Gerlach U, Wallenta L, et al. Short-term TNF-alpha Inhibition Reduces Ischemia-/Reperfusion Injury and Associated Short-Term and Long-Term Inflammatory Responses in a Rat Intestinal Transplantation. *Am J Transplant*; in review.

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus (Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum) für die Unterstützung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Pascher (Oberarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum) für die Überlassung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anja Reutzel-Selke, ohne deren unschätzbare Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie stand mir kritisch und konstruktiv bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite, unterstützte mich hilfreich mit Rat und Tat in allen Phasen dieser Studie sowie bei Publikationen und Vorträgen.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Anke Jurisch für die fachliche Betreuung und die Einführung in die Arbeitsmethoden bedanken. Zudem inspirierte sie mich mit ihrem offenen Herzen, was die Zeit meiner Doktorarbeit zu einer aufregenden Erfahrung werden ließ.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Sven Kohler (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Johann Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt am Main) für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dietrich Polenz, Herrn Steffen Lippert und Frau Marion Marksteiner danke ich für die unbegrenzte Unterstützung bei der Durchführung der umfangreichen Experimente und Arbeiten.

Herrn PD Dr. C. Grosse-Siestrup (Leiter der Tierexperimentellen Einrichtung, Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Hilfe bei der Betreuung der Versuchstiere.

Schließlich gilt mein Dank der Medizinischen Fakultät der Charite - Universitätsmedizin Berlin. Sie unterstützte diese Arbeit mit Mitteln der universitären Forschungsförderung.

12. Lebenslauf

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

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Georgi Atanasov, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Einfluss von TNF- α -Inhibitoren auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden und assoziierte Inflammationsreaktionen in der Dünndarmtransplantation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.

Georgi Atanasov

Berlin, 25.10.2012