

Universitäres Herzzentrum Hamburg gGmbH  
Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie  
Ärztlicher Leiter: Professor Dr. med. H. Reichenspurner, PhD

**Die Wirkung der Immunsuppressiva Tacrolimus,  
Sirolimus und FK778 auf die akute zelluläre xenogene  
Abstoßung im konkordanten Kleintiermodell**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von  
Isabel Gerlach  
aus Hamburg  
  
Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 11.12.2007  
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg am:  
Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Reichensperner  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. C. Detter  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. W.-H. Zimmermann

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Einleitung**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.1 Der Mangel an Organen für die Organtransplantation .....</b>      | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Realisierung der Xenotransplantation .....</b>                    | <b>3</b>  |
| <b>1.3 Abstoßungsreaktionen in der Xenotransplantation .....</b>         | <b>4</b>  |
| 1.3.1 Hyperakute Abstoßung .....   | 4         |
| 1.3.2 Akute vaskuläre Abstoßung und Akkomodation .....                   | 5         |
| 1.3.3 Akute zelluläre Abstoßung .....                                    | 6         |
| 1.3.4 Chronische Abstoßung .....   | 8         |
| <b>1.4 Unterschiede zwischen Versuchstier-Kombinationen in der .....</b> | <b>9</b>  |
| <b>Xenotransplantation .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.5 Immunsuppressiva .....</b>  | <b>10</b> |
| 1.5.1 Tacrolimus (FK506) .....   | 10        |
| 1.5.2 Sirolimus (Rapamycin) .....  | 12        |
| 1.5.3 FK778 .....  | 15        |
| <b>1.6 Ziel der Studie .....</b>   | <b>17</b> |

## **2. Material und Methoden**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.1 Xenogenes Tiermodell .....</b>                 | <b>19</b> |
| <b>2.2 Orthotope Aortentransplantation .....</b>      | <b>19</b> |
| <b>2.3 Dosierung und experimentelle Gruppen .....</b> | <b>21</b> |
| <b>2.4 Verabreichung der Medikamente .....</b>        | <b>22</b> |
| <b>2.5 Behandlung der Tiere .....</b>                 | <b>23</b> |
| <b>2.6 Explantation des Xenotransplantats .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.7 Histologische Färbungen .....</b>              | <b>25</b> |
| <b>2.8 Immunhistochemische Färbungen .....</b>        | <b>26</b> |
| 2.8.1 CD4-, CD8- und ED1-Färbung .....                | 26        |
| 2.8.2 Alpha-Actin-Färbung .....                       | 27        |
| <b>2.9 Statistik .....</b>                            | <b>28</b> |

## **3. Ergebnisse**

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>3.1 Medikamentenspiegel .....</b> | <b>29</b> |
| <b>3.2 Nebenwirkungen .....</b>      | <b>29</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.3 Makroskopisches Erscheinungsbild.....</b> | <b>30</b> |
| <b>3.4 Allgemeine Histologie .....</b>           | <b>30</b> |
| <b>3.5 Immunhistochemie .....</b>                | <b>35</b> |
| 3.5.1 Mononukleäres Zellinfiltrat.....           | 35        |
| 3.5.2 Medianekrose .....                         | 37        |
| <b><u>4. Diskussion.....</u></b>                 | <b>39</b> |
| <b><u>5. Zusammenfassung .....</u></b>           | <b>48</b> |
| <b><u>6. Literaturverzeichnis .....</u></b>      | <b>50</b> |
| <b><u>7. Danksagung.....</u></b>                 | <b>64</b> |
| <b><u>8. Lebenslauf .....</u></b>                | <b>65</b> |

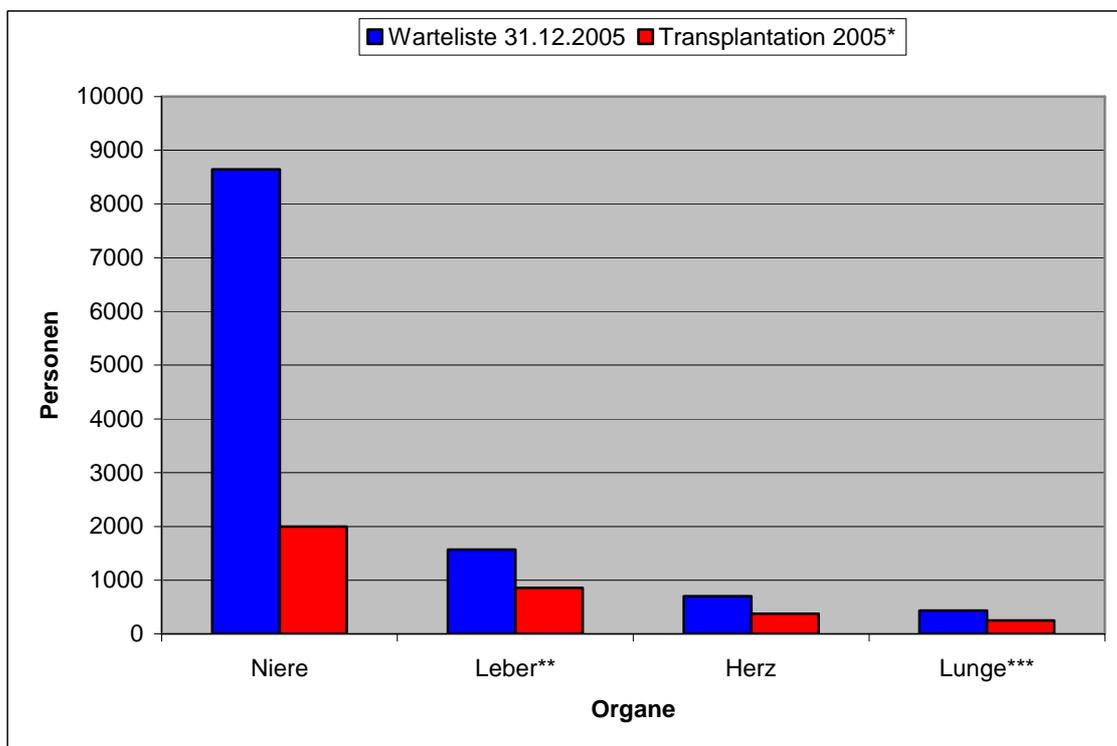
# **1. Einleitung**

## **1.1 Der Mangel an Organen für die Organtransplantation**

Die Transplantation von Organen ist heutzutage die letzte Möglichkeit, Patienten mit terminalem Organversagen zu helfen. Bislang sind diese Menschen auf humane Spenderorgane angewiesen, um eine allogene Transplantation (Mensch auf Mensch) durchzuführen. Durch die Erfolge in den 60er und 70er Jahren (Sayegh 2004, Cooper 2001, Barnard 1968, Starzl 1968) und mit der Einführung von Cyclosporin A als Immunsuppressivum in den 80er Jahren (Iwatsuki 1988, Starzl 1981), ist die Organtransplantation zu einem etablierten Verfahren geworden, das Überleben dieser Patienten zu sichern (Furukawa 2004, Pierson 2004, Wynn 2004). Da sie sich als eine gute Therapieoption herausgestellt hat, ist auch die Nachfrage nach humanen Spenderorganen gestiegen (Pierson 2004, Wynn 2004). Dadurch ergibt sich ein weltweiter Mangel an Spenderorganen für die Organtransplantation (Brown 2004, Pierson 2004, Evans 1992). Eine Erhöhung der Organspenderanzahl würde dieses Problem wahrscheinlich nur kurzfristig eingrenzen. Bis jetzt sind nur für die Niere längerfristige und kostenintensive Möglichkeiten gefunden worden, z.B. mit Hilfe der Blutdialyse, die Organfunktion zu ersetzen, die jedoch mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität verbunden sind. Herz-, Lungen- und Lebererkrankungen führen im Allgemeinen ohne Transplantation sehr schnell zum Tode. Patienten mit einer Indikation für eine Herz- oder Lungentransplantation müssen bis zu zwei Jahre auf ein Spenderorgan warten (Pierson 2004). Bei Nierentransplantationen können Wartezeiten von über fünf Jahren entstehen (Ketzler 1996). Nach den Angaben von Eurotransplant versterben auf der Warteliste für ein Herz 213 Patienten (22,5%), für ein Lungentransplantat 145 Patienten (19,6%) und für eine Niere bzw. eine Leber 565 (4,8%) bzw. 456 (21,4%) Patienten (Eurotransplant International Foundation Annual Report 2005). Die Ein-Jahres-Überlebensrate für Lungentransplantierte beträgt 78% (Pierson 2004), die für Nierentransplantierte liegt bei 94%, bei Lebendspende sogar bei 97% (Wynn 2004) und die für die Transplantation von Herz oder Leber befinden sich bei 86% (Brown 2004, Pierson 2004). Die

Organtransplantation ist somit eine Therapie mit sehr guten Überlebenschancen, das Hauptproblem ist der Mangel an Organen.

Die Xenotransplantation, d.h. die Transplantation von Tierorganen auf den Menschen, wäre eine passende Lösung für dieses Problem. Man hätte nicht nur für jeden Patienten ein passendes Organ und damit keine Wartezeiten mehr, sondern man könnte auch die Indikation für eine Organtransplantation weiter ausbauen und Menschen, bei denen es noch nicht zum Organversagen gekommen ist, schon rechtzeitig versorgen. Eine Transplantation wäre dann nicht mehr ein Notfall, sondern eine elektive Operation.



**Abb. 1** Anzahl der Patienten auf der Warteliste für Nieren-, Leber-, Lungen- und Herztransplantation und die erfolgten Transplantationen 2005 in Deutschland (Daten von Eurotransplant International Foundation Annual Report 2005), \* nur Leichen-Spenden und keine Kombinationstransplantationen, \*\* ganze Leber und Split-Leber, \*\*\* Einzel- und Doppellungentransplantationen.

Aus ethischen Gründen würden Menschenaffen, wegen ihrer phylogenetischen Nähe zum Menschen und der anatomischen Ähnlichkeit, nicht als geeignetes Tier für xenogene Spenderorgane dienen. Hierfür wäre das Hausschwein eine passende Alternative, da nicht nur eine keimarme Haltung einfach und die Fütterung billig ist, sondern dieses allgemein als Nutztier anerkannt wird (Ahn 2004). Zudem ist durch die

schnelle Vermehrung eine ausreichende Anzahl gewährleistet, und man kann nach Größe, Alter und Geschlecht für eine Transplantation auswählen (Logan 2000). Im Gegensatz zu Menschenaffen besitzt das Hausschwein darüber hinaus wahrscheinlich weniger pathogene Keime, die auf den Menschen übertragbar sind (Ahn 2004).

## **1.2 Realisierung der Xenotransplantation**

Schon in den 60er Jahren wurden Xenotransplantationen durchgeführt. Zwischen November 1963 und Februar 1964 transplantierten Reemtsma et al. Schimpansennieren in sechs Patienten mit terminalem Nierenversagen (Reemtsma 1964). Eines dieser Transplantate funktionierte neun Monate lang. Die Patienten wurden mit Azathioprin, Actinomycin C, Steroiden und Bestrahlung immunsuppressiv behandelt (Reemtsma 1969).

Inspiziert von diesen Erfolgen wurde am 23. Januar 1964 die erste Herztransplantation beim Menschen am University of Mississippi Medical Center durchgeführt (Hardy 1968). Der 68jährige Patient mit koronarer Herzerkrankung bekam ein Schimpansenherz transplantiert, nachdem er im Schock ins Krankenhaus eingeliefert wurde. Obwohl das Herz über zwei Stunden schlug, verstarb der Patient.



**Abb. 2** „Baby Fae“ kurz nach der xenogenen Herztransplantation.

Zwanzig Jahre später wurde ein weiterer Versuch gestartet, einem Neugeborenen mit hypoplastischem Linksherz-Syndrom mit einem Xenotransplantat das Leben zu retten (Walpoth 1986). Am 26. Oktober 1984 wurde der Säugling, welcher von den Medien „Baby Fae“ genannt wurde, am Loma Linda University Medical Center mit einem Pavianherz versorgt und mit Cyclosporin A, Azathioprin, Methylprednisolon und Atgam (animale anti-lymphozytäre Globuline) behandelt (Bailey 1985). Sie überlebte 20 Tage und verstarb dann an einem Multi-Organ-Versagen.

Diese Beispiele zeigen, dass die Transplantation und die Wiederaufnahme der Funktion von tierischen Organen im Menschen möglich sind, jedoch die geeignete immunsuppressive Therapie für eine Langzeit-Erhaltung gefunden werden muss.

Hierbei muss beachtet werden, dass die Abstoßungsreaktionen aufgrund des unterschiedlichen immunologischen Hintergrundes bei einer xenogenen Transplantation komplexer sind als bei einer Allotransplantation.

### **1.3 Abstoßungsreaktionen in der Xenotransplantation**

#### **1.3.1 Hyperakute Abstoßung**

In der Xenotransplantation unterscheidet man vier verschiedene Abstoßungsphasen. Innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden kommt es nach Transplantation eines xenogenen Organs zur hyperakuten Abstoßung durch präformierte Antikörper im Empfänger (XNA = xenoreactive natural antibody). Diese sind hauptsächlich gegen das Galaktosyl- $\alpha$ -1,3-Galaktosyl-Epitop (Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-Epitop) von Glykoproteinen und Glykolipiden an den Endothelzellen der Gefäße des Spenderorgans gerichtet (Logan 2000, Sandrin 1993). Diese Zucker-Reste werden von den meisten Säugetieren exprimiert, jedoch nicht vom Menschen (Galili 1987). Die XNAs gehören überwiegend zu den IgM-Antikörpern, jedoch befinden sich auch IgG-Antikörper im menschlichen Serum, die mit dem Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-Epitop reagieren (Sandrin 1993, Gambiez 1992, Platt 1991, Galili 1988). Es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die die Komplementkaskade sowohl über den klassischen (Platt 1991) als auch über den alternativen Weg aktivieren (Miyagawa 1988). Dies führt über den membranangreifenden Komplex zu einer proteinsyntheseunabhängigen Typ I Endothelzell-Aktivierung, bei der die blutgerinnungsverhindernde Oberfläche der Endothelzellen in eine gerinnungsfördernde umgewandelt wird. Im Gegensatz zu einer Typ II Aktivierung findet keine Hochregulation der Gen-Expression und/oder Proteinsynthese statt, daher beginnt dieser Prozess schon innerhalb von Minuten (Bach 1998). Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität treten charakteristischerweise interstitielle Hämorrhagien und Ödeme auf, wobei keine zellulären Infiltrate erscheinen (Logan 2000, Platt 1990).

Es gibt hauptsächlich zwei Wege um diese humorale Antwort auf das Xenotransplantat zu verhindern: Erstens durch die Hemmung der Komplementkaskade und zweitens durch Verminderung der XNAs. Eine Methode zur Elimination der XNAs ist die

Immunoabsorption. Dadurch können IgM-Antikörper oder spezifisch Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-Antikörper durch eine extrakorporale Immunoaffinitätssäule aus dem Blut entfernt werden (Taniguchi 1996, Leventhal 1995, Rydberg 1995). Das Komplement kann durch den Einsatz von Kobraschlangengift (CVF = cobra venom factor) oder sCR1 (soluble complement receptor type 1), welche den Komplementfaktor C3 verbrauchen, blockiert werden (Kobayashi 1997, Pruitt 1997). Eine Alternative wäre der Einsatz genmanipulierter (transgener) Schweine, die auf ihren Zellen humane membrangebundene Komplementregulatoren (CRP = complement regulatory proteins) exprimieren (McCurry 1995). Diese Proteine sind speziesspezifisch, d. h. dass nur humane CRPs humanes Komplement inhibieren können (Fodor 1994). Die Transplantation von transgenen Organen, die humane CRPs auf ihren Zellen exprimieren, hat den Vorteil, dass es nicht zu einer systemischen Komplement-Blockierung führt. Zusätzlich kann die Expression von Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-Epitopen an tierischen Zellen durch so genannte „knock out“-Tiere verhindert werden. Phelps et al. gelang es  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-defiziente Schweine herzustellen (das Enzym  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase dient zur Synthese von Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-Epitopen) und züchteten somit Schweine, die auf ihren Zellen vollständig Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-negativ waren (Phelps 2003).

### **1.3.2 Akute vaskuläre Abstoßung und Akkomodation**

Ist die hyperakute Abstoßung überwunden, folgt die akute vaskuläre Abstoßung (auch: verzögerte xenogene Abstoßung). Nach der Typ I Endothelzell-Aktivierung findet hier eine Typ II Endothelzell-Aktivierung statt, bei der es zu zellulären Syntheseleistungen kommt (Bach 1998). Es kommt u. a. zur Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und prokoagulatorischen Molekülen und dadurch zur Thrombenbildung in den Gefäßen (Bach 1996). Zusätzlich führt dies zur Infiltration und Aktivierung von Makrophagen (~75 %) und natürlichen Killerzellen (~20 %) (Hancock 1997, Blakely 1994). Durch die Produktion von Gewebefaktor wird die Gerinnungskaskade weiter angetrieben. Die akute vaskuläre Abstoßung wird ebenfalls zum größten Teil durch die XNAs verursacht (Lin 2000).

Millan et al. haben außerdem in ihrer Studie herausgefunden, dass Monozyten in vitro auch direkt Endothelzellen aktivieren können und es u. a. zur Induktion des antifibrinolytischen Moleküls Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI-1) kommt (Millan 1997). Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Studie von Goodman et al., in der entdeckt wurde, dass natürliche Killerzellen durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt mit ECs zur Expression von E-Selektin und zur Freisetzung von IL-8 in Endothelzellen führten (Goodman 1996). Candinas et al. haben gezeigt, dass diese Ereignisse auch in T-Zell-defizienten Empfängern stattfinden, so dass diese Art der Abstoßung T-Zell-unabhängig ablaufen kann (Candinas 1996).

Diese Mechanismen führen zu dem charakteristischen Bild der akuten vaskulären Abstoßung, bestehend aus einer Ischämie, einem Anschwellen des Endothels, ausgedehnter Thrombenbildung und inflammatorischen Veränderungen (McCurry 1997).

Lin et al. haben in ihrer Studie, in der transgene Schweineherzen in Paviane transplantiert wurden, durch die Verminderung der XNAs mittels extrakorporaler Immunoaffinitätsäulen nicht nur das Auftreten der akuten vaskulären Abstoßung vermindert, sondern eine Akkomodation der Transplantate erreicht, obwohl die XNAs wieder im Blut nachweisbar waren (Lin 2000). Akkomodation bedeutet, dass Transplantate in Anwesenheit von anti-Spender Antikörpern und Komplement überleben (Lin 1999 [A]). Einen weiteren Hinweis, dass es in der Xenotransplantation zu einer Akkomodation kommen kann, lieferten Lin et al. in einer Studie im Kleintiermodell unter Verwendung einer CVF und Cyclosporin A Kombinationstherapie (Lin 1999 [A]). Obwohl sie den Ratten mit akkomodierten Hamstertransplantaten zusätzlich noch anti-Hamster Rattenserum injizierten, kam es nicht zu einer Beschädigung des Transplantats, im Gegensatz zu den Kontrollgruppen.

### **1.3.3 Akute zelluläre Abstoßung**

Es wird angenommen, dass in der Xenotransplantation eine ähnliche zelluläre Abstoßung stattfindet wie in der Allotransplantation. Die akute allogene Abstoßung ist durch T-Zell-vermittelte Vorgänge charakterisiert (Batts 1999). Hierbei spielen drei Steuersignale eine wichtige Rolle (Halloran 1996). Die antigenpräsentierenden Zellen

(APCs), die aus dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen, aktivierten T-Zellen und aktivierten Endothelzellen bestehen, besitzen an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-II-Moleküle, welche Peptidantigene präsentieren (Lindenfeld 2004). Diese Peptidantigene können über den T-Zell-Rezeptor (TCR)-CD3 Komplex der T-Lymphozyten, welcher mit einem Corezeptor (CD4) assoziiert ist, erkannt und zusammen mit dem MHC-Molekül gebunden werden (Signal 1) (Halloran 1996). Die Antigenpräsentation kann auf direktem Wege, d.h. die APCs entstammen dem Transplantat, oder auf indirektem Wege ablaufen, indem die Empfänger-APCs Fremdmoleküle des Transplantats aufnehmen und den T-Zellen präsentieren (Lindenfeld 2004). Zur optimalen Aktivierung der T-Zelle wird jedoch ein costimulierendes Molekül, z.B. CD28 benötigt, welches an B7 Moleküle der APCs bindet (Signal 2) (Halloran 1996). Hierdurch wird die Calcium-Calmodulin-abhängige Serinphosphatase Calcineurin im Zytoplasma aktiviert (Lindenfeld 2004). Calcineurin bewirkt durch die Dephosphorylierung von inaktiven nukleären Faktoren von aktivierten T-Zellen (NFAT) die Translokation dieser Faktoren in den Zellkern und führt dadurch zur Transkription bestimmter Zytokine, z.B. IL-2, die in der Aktivierung von T-Lymphozyten involviert sind (McCaffrey 1993). Besonders NFAT1, NFAT2 und NFAT4, gehörig zu der NFAT-Familie, sind an der Transkription von IL-2, IL-4 und CD40L beteiligt (Kapturczak 2004). Das IL-2 aktiviert den IL-2-Rezeptor an der Oberfläche der T-Zelle, wodurch es zur vollständigen Aktivierung und Proliferation dieser Zellen kommt (Signal 3) (Lindenfeld 2004). Zusätzlich können diese T-Helfer-Zellen andere T-Helfer-Zellen, zytotoxische Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen aktivieren. Außerdem benötigen die T-Lymphozyten zur Proliferation zwingend die de novo Purin- und Pyrimidin-Synthese zur Herstellung der DNA im Zellzyklus (Lindenfeld 2004). In der Regel kann die akute Abstoßung in der Allotransplantation durch erhöhte Steroidgaben oder durch die Verabreichung monoklonaler Antikörper gegen Lymphozyten (z.B. OKT3) kontrolliert werden (Lindenfeld 2004, Halloran 1996).

In der Xenotransplantation funktionieren anscheinend beide Wege der Antigenerkennung, die in der Allotransplantation beschrieben wurden, allerdings ist das Vorkommen der direkten Antigenpräsentation abhängig von der verwendeten Spezies-Kombination, z.B. bei der Verwendung von humanen und porcinen Zellen (Bravery 1995, Yamada 1995, Auchincloss 1994). Die T-Zell-Antwort ist bei der direkten

Antigenpräsentation wesentlich stärker ausgeprägt als bei der indirekten (Brouard 1999). Anscheinend spielen zunächst CD4-positive T-Zellen eine entscheidende Rolle, da sie offenbar über MHC-II Moleküle xenogene APCs erkennen können (Moses 1997). Es wurde gezeigt, dass humane T-Zellen durch aktivierte porcine Endothelzellen, die an ihrer Oberfläche MHC-II Moleküle exprimierten, zumindest in vitro direkt stimuliert werden können und IL-2 freisetzen (Bravery 1995). Andererseits können murine APCs durch Zytokinfreisetzung humane T-Zellen nicht zur Proliferation stimulieren (Alter 1990). In in vivo Versuchen (Hamster und Ratte) konnten außerdem CD4-positive Zellen die Bildung von T-Zell-abhängigen XNAs bewirken (Lin 1999 [B]).

Später scheinen zytotoxische CD8-positive Zellen zu dominieren, da sie auch dazu fähig sind, xenogene MHC-I Moleküle zu erkennen (Moses 1997). Allerdings können sie anscheinend auch mit MHC-II Molekülen interagieren, im Gegensatz zu allogenen Reaktionen (Moses 1997). Lin et al. konnten belegen, dass durch CD8-positive T-Zellen, auch ohne die Hilfe von T-Helfer-Zellen, ein xenogenes Transplantat abgestoßen werden kann (Lin 1999 [B]). Man vermutet, dass Makrophagen und natürliche Killerzellen ebenfalls, in Abwesenheit von T- und B-Zellen, ein Xenotransplantat abstoßen können (Lin 1997).

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass ein Langzeit-Überleben eines Xenotransplantates mit immunsuppressiven Medikamenten möglich ist und die akute zelluläre Abstoßung mit der geeigneten Immunsuppression vermindert werden könnte (Briffa 2004, Brouard 1998, Scheringa 1994). Die akute zelluläre Abstoßung ist in der Xenotransplantation noch nicht hinreichend untersucht worden, um genauere Aussagen über die Abstoßungsmechanismen zu machen.

#### **1.3.4 Chronische Abstoßung**

Auch hier wurde gezeigt, dass ein Langzeit-Überleben (> 100 Tage) eines konkordanten Xenotransplantats mit der richtigen Medikation möglich ist (Bouwman 1992, Hasan 1992, van den Bogaerde 1991). Es wird vermutet, dass die chronische xenogene Abstoßungsreaktion der Transplantat-Vaskulopathie der Allotransplantation ähnelt (Shen 1998), bei der es durch Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen zur Bildung einer Neointima kommt (Häyry 1996, Häyry 1992). Dies führt, z.B. in Herz-,

Leber- und Nierentransplantaten, zu einer Verengung bzw. einem Verschluss der Gefäßlumina und zu Gewebsfibrosierungen (Häyry 1996, Azuma 1995). Es scheint außerdem, dass die chronische Abstoßung in der Xenotransplantation wesentlich schneller als in der Alлотransplantation auftritt (Steele 1993). Generell ist also auch in der Xenotransplantation mit einer chronischen Abstoßung zu rechnen, allerdings erscheint sie momentan noch nicht relevant, da erst die anderen Abstoßungsphasen überwunden werden müssen.

#### **1.4 Unterschiede zwischen Versuchstier-Kombinationen in der Xenotransplantation**

Die verschiedenen Versuchstier-Kombinationen werden in diskordant und konkordant unterschieden (DiSesa 1997). Während konkordante Xenotransplantate innerhalb von Tagen durch induzierte Antikörper abgestoßen werden, erfolgt die Abstoßung diskordanter Xenotransplantate innerhalb von Minuten (hyperakut) durch präformierte Antikörper (Allaire 1996). Diese charakteristischen Reaktionen in vaskularisierten Xenotransplantaten sind abhängig von der Versuchstier-Kombination und nicht vom transplantierten Organ (Allaire 1996). Je entfernter die Verwandtschaft der Spender-Empfänger Spezies, desto stärker ist die xenogene Abstoßung (Auchincloss 1988). In einem diskordanten Tiermodell, wie z.B. Schwein auf Mensch oder Meerschweinchen auf Ratte (Chaline 1994), kommt es innerhalb von Minuten bis Stunden ohne Verwendung von Immunsuppressiva zur Xenotransplantatabstoßung, während dies bei einer konkordanten Kombination (z.B. Hamster auf Ratte oder Affe auf Mensch) erst nach einigen Tagen erfolgt (Zaidi 1998). Daher wird ein diskordantes Modell für die Untersuchung der hyperakuten Phase und ein konkordantes Modell für die akute vaskuläre oder zelluläre Abstoßung verwendet, da hier keine präformierten xenoreaktiven Antikörper vorhanden sind.

In dieser Forschungsarbeit wurde ein konkordantes Modell gewählt zur Untersuchung der akuten zellulären Abstoßung, indem zwischen Syrischem Hamster und Lewis-Ratte transplantiert wurde. Phylogenetisch liegen diese beiden Spezies nicht weit auseinander und es sind keine präformierten Antikörper nachweisbar (Chaline 1994). Die spezifischen Immunglobuline müssen erst produziert werden, um eine Abstoßung

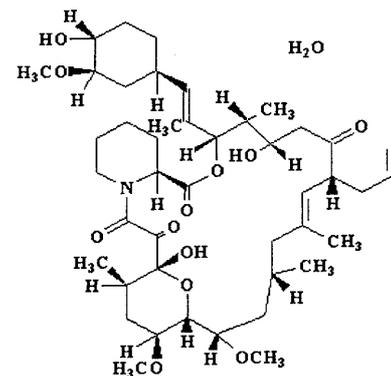
hervorzurufen (Allaire 1996). Diese Versuchstier-Kombination, Syrischer Hamster auf Ratte, ist in der Xenotransplantation etabliert und wird von mehreren Forschungsgruppen verwendet (Briffa 2004, Ginestá 2002, Sebille 2001, van den Bogaerde 1990). Dies ermöglicht somit den Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Studie mit den Daten anderer Studien.

## 1.5 Immunsuppressiva

### 1.5.1 Tacrolimus (FK506)

Tacrolimus ist ein isoliertes Makrolid aus dem Pilzstamm *Streptomyces tsukubaensis*, welches 1984 in Japan in einer Bodenprobe entdeckt wurde (Schreier 1993, Goto 1991).

Es gehört, wie Cyclosporin A, zu den Calcineurin-Inhibitoren und übermittelt seine immunmodulatorischen Effekte über die Bindung an intrazelluläre Proteine, so genannte Immunophiline (Schreier 1993). Die Immunophiline, die an Tacrolimus binden, sind FK-binding proteins (FKBPs) und besitzen eine cis-trans propyl-peptidyl Isomerase Aktivität (Schreier 1993). Tacrolimus bindet überwiegend an das FKBP12 (Kapturczak 2004). Die Bindung von Tacrolimus an das FKBP12 erhöht die Affinität dieses



**Abb. 3** Strukturformel von Tacrolimus (FK506).

Immunophilins zu der Calcium-Calmodulin-aktivierten Serinphosphatase Calcineurin und kann durch diesen Komplex in ihrer Aktivität gehemmt werden (Signal 1) (Kapturczak 2004). Tacrolimus inhibiert also frühe Ereignisse in der T-Zell-Aktivierung, die für die Produktion von Lymphokinen notwendig sind (Dumont 1990). Dumont et al. zeigten, dass Tacrolimus nur dann die Proliferation von T-Lymphozyten unterdrückt, wenn es innerhalb von drei Stunden nach Stimulationsbeginn hinzu gegeben wird (Dumont 1990). Die Progression von aktivierten T-Lymphozyten von der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase im Zellzyklus wird durch Tacrolimus unterbrochen (Morris 1991). Die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten und die daraus

resultierende Antikörperbildung werden durch Tacrolimus hingegen kaum beeinflusst (Aagaard-Tillery 1994).

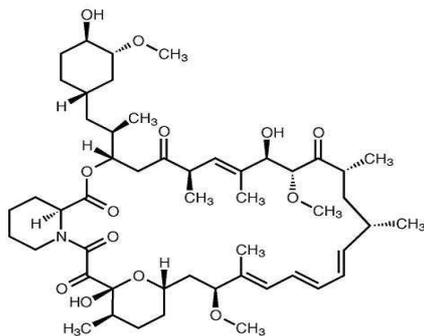
Da Tacrolimus durch das CYP3A4-System in der Leber metabolisiert wird, sind verschiedene Arzneimittel-Interaktionen bekannt (Baran 2002). Werden diese P450-Enzyme inhibiert, z.B. durch Ketoconazole, steigt die Bioverfügbarkeit von Tacrolimus und damit auch die Toxizität. Andererseits kann durch eine Induktion von CYP3A4, z.B. durch Phenobarbital, eine Wirkungsabschwächung hervorgerufen werden (Kapturczak 2004). Tacrolimus wurde erstmals in den USA im April 1994 zur Prophylaxe von Transplantatabstoßungen in der Lebertransplantation zugelassen (Kapturczak 2004). Seitdem hat es sich bereits in der Klinik in der Nieren- und Lebertransplantation bewährt (First 2004). Auch in der Herz- und Lungentransplantation sind mehrere klinische Studien erschienen (Baran 2002, Izbicki 2002, Reichenspurner 1999). Zusammen mit Mycophenolat Mofetil zeigte Tacrolimus in einer Studie mit 78 lungentransplantierten Patienten besondere Vorteile gegenüber einer Cyclosporin A-basierten Therapie (Reichenspurner 1999). Unter der Therapie mit Tacrolimus kam es weniger häufig zu akuten Abstoßungen und Rezidivabstoßungen. Tacrolimus stellte sich als wesentlich potenteres Immunsuppressivum dar als Cyclosporin A, ohne dabei eine höhere Komplikationsrate (z.B. Infektionen) aufzuweisen (Reichenspurner 1999). Dies wurde auch bestätigt von O'Grady et al., die in ihrer Studie mit 606 lebertransplantierten Patienten die Therapie mit Tacrolimus statt Cyclosporin A favorisierten (O'Grady 2002). Pirenne et al. zeigten, dass ebenfalls gute Langzeit-Ergebnisse in der Lebertransplantation mit der Verwendung von Tacrolimus ohne zusätzliche Gabe von Steroiden erzielt werden können (Pirenne 2003). Tacrolimus scheint außerdem ein günstigeres Nebenwirkungsprofil zu besitzen als Cyclosporin A. Es ist weniger nephrotoxisch und hat eine geringere Inzidenz von Hypertonus, Hyperlipidämie und kosmetischen Beeinträchtigungen, wie z.B. Hirsutismus (Martins 2004). Die Neurotoxizität scheint bei beiden Calcineurin-Inhibitoren ähnlich zu sein (O'Grady 2002). Die einzigen Nebenwirkungen, die bei Tacrolimus ausgeprägter erscheinen als bei Cyclosporin A, sind ein erhöhtes Auftreten von Diabetes mellitus und Alopezie (O'Grady 2002, Reichenspurner 1999).

In xenogenen Tiermodellen konnte Tacrolimus sowohl die akute als auch die chronische Transplantatabstoßung verhindern und somit ein Langzeit-Überleben erzielen, sogar

schon unter einer niedrigdosierten Therapie in Kombination mit antiproliferativen Substanzen (Ginesta 2002, Murase 1993).

### **1.5.2 Sirolimus (Rapamycin)**

Sirolimus ist ein makrozyklisches Lakton und wird durch den Pilzstamm *Streptomyces hygroscopicus* produziert, welches 1973 aus einer Bodenprobe der Osterinsel (Rapa



**Abb. 4** Strukturformel von Sirolimus (Rapamycin).

Nui) isoliert wurde (Camardo 2003). Da die gute antifungale Wirkung von schweren immunsupprimierenden Nebenwirkungen überschattet war, wurde zunächst die weitere Forschung in diesem Bereich eingestellt und erst wieder 1988 von Prof. Calne aufgenommen, um es in der Transplantationsmedizin zu testen (Camardo 2003). Hier zeigte sich nicht nur eine starke immunmodulatorische Wirkung, sondern auch ein besseres Nebenwirkungsprofil als bei Tacrolimus

oder Cyclosporin A (Camardo 2003). Sirolimus hemmt die Proliferation von T-Zellen, die über Calcium-abhängige oder Calcium-unabhängige Wege stimuliert wurden (Sehgal 1998, Dumont 1990). Es bindet ebenfalls, wie Tacrolimus, an das FKBP12, allerdings entfaltet es seine Wirkung über einen Calcineurin-unabhängigen Weg (Terada 1993). Auf der Suche nach dem Angriffspunkt des Sirolimus-FKBP12-Komplexes entdeckte man ein entscheidendes Protein für Wachstum und Proliferation von Zellen, welches „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) genannt wurde (Sabers 1995). Der Sirolimus-FKBP12-Komplex bindet an das mTOR, welches durch Zytokine, wie z.B. IL-2, Wachstumsfaktoren oder Aminosäuren bzw. Glucose aktiviert werden kann (Huang 2003, Saunders 2001), und blockiert damit die durch mTOR-vermittelten Signaltransduktionswege (Signal 3) (Sehgal 2003). Das mTOR-Protein ist eine multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase (Yakupoglu 2003) und reguliert die p70S6-Kinase sowie die nukleäre Isoform p85S6-Kinase (Sehgal 2003, Sehgal 1998). Diese Kinase bewirkt die Aktivierung des S6 Proteins der ribosomalen 40S Untereinheit durch Phosphorylierung und führt damit zu einer erhöhten Translation von mRNA-

Transkripten, die einen Polypyrimidin-Teil (5'TOP) enthalten, wie z. B. ribosomale Proteine und der eEF-2-Elongationsfaktor für die Proteinsynthese (Huang 2003, Sehgal 1998, Dumont 1996, Jefferies 1997). Die aktivierte p70S6-Kinase vermittelt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREM $\tau$  und induziert dadurch die Transkription von sogenannten „late genes“ und proliferating nuclear cell antigen (PNCA) (Sehgal 2003, Molnar-Kimber 1996). Außerdem wird durch das mTor-Protein das eIF-4E binding protein-1 (4E-PB1) über Phosphorylierung beeinflusst (Brunn 1997). 4E-PB1 interagiert mit dem mRNA 5' cap-binding Protein, eIF-4E, wodurch die cap-abhängige Translation spezifisch unterdrückt wird (Beretta 1996). Die Phosphorylierung von 4E-BP1 reduziert seine Affinität zu eIF-4E und führt zur Translation von spezifischen mRNAs, die notwendig sind für Zellwachstum und -proliferation (Sehgal 2003, Graves 1995). Dieser Prozess wird durch Sirolimus spezifisch gehemmt (Beretta 1996). Zusätzlich verhindert Sirolimus die Elimination des Kinaseinhibitors p27kip1 und vermindert dadurch erheblich die Kinase-Aktivität der cdk4/Cyclin D und cdk2/Cyclin E Komplexe, welche normalerweise in der mittleren bis späten G1-Phase ihre höchste Konzentration erreichen und für den Eintritt in die S-Phase der T-Lymphozyten erforderlich sind (Molnar-Kimber 1996, Nourse 1994). Folgeaktionen, wie z.B. die Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins, werden dadurch unterdrückt (Molnar-Kimber 1996). Desweiteren wird die CD28-vermittelte Down-Regulation des Regulatorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  und damit die Translokation des CD28-response-element-binding-Faktors c-Rel in den Nukleus der Zelle durch Sirolimus blockiert, wodurch die Genexpression von bestimmten Genen, wie z.B. IL-2 und Interferon- $\gamma$ , in T-Zellen gehemmt wird (Lai 1994).

Zudem werden durch Rapamycin die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und die Produktion von Antikörpern in vitro ebenfalls unterdrückt (Aagaard-Tillery 1994). Aagaard-Tillery et al. zeigten, dass Rapamycin die Aktivierung der p34cdc2- und p33cdk2-Kinase, die für den Eintritt in die S-Phase erforderlich ist, in B-Lymphozyten aufhebt (Aagaard-Tillery 1994, Terada 1993). Sirolimus kann zudem die Proliferation von endothelialen Zellen oder glatten Muskelzellen inhibieren, die zuvor mit Wachstumsfaktoren, wie z.B. basic fibroblast growth factor (bFGF) oder platelet-derived growth factor (PDGF), stimuliert wurden (Sehgal 2003). Wie Tacrolimus, wird Sirolimus ebenfalls über das CYP3A4-System metabolisiert (Yakupoglu 2004).

Sirolimus ist seit September 1999 in den USA in Kombination mit Cyclosporin A und Steroiden in der Klinik zugelassen und seit 2000 ebenfalls in Europa als Alternative zu Calcineurin-Antagonisten verwendbar (Yakupoglu 2004). In zwei Phase III Studien wurde die Wirksamkeit von Sirolimus verglichen mit einem Placebo bzw. mit Azathioprin, wobei Cyclosporin A und Kortikosteroide als Basistherapie verwendet wurden (MacDonald 2001, Kahan 2000). Hierzu wurden 576 bzw. 719 nierentransplantierte Patienten untersucht. In beiden Studien zeigte sich durch die Verwendung von Sirolimus ein signifikant geringeres Auftreten von akuten Abstoßungsepisoden, dabei erreichte die höher dosierte Gruppe (5mg/d Sirolimus) eine höhere Effizienz als die niedriger dosierte Gruppe (2mg/d Sirolimus) (MacDonald 2001, Kahan 2000). In den mit Sirolimus therapierten Gruppen konnte sogar ein verminderter histologischer Grad der akuten Abstoßung als in den Vergleichsgruppen nachgewiesen werden (Kahan 2000). Beide Studien zeigten als Nebenwirkungen eine Erhöhung der Cholesterin- und Triglyceridwerte und eine Thrombozytopenie (MacDonald 2001, Kahan 2000). Diese waren in den höher dosierten Sirolimus-Gruppen ausgeprägter als in den anderen Gruppen, und es kam dort auch häufiger zu Diarrhöe und Arthralgien (MacDonald 2001). Außerdem wurde ein erhöhtes Auftreten von Herpes-Simplex-Infektionen in den Sirolimus-basierten Gruppen bemerkt (MacDonald 2001). Im Gegensatz zu Cyclosporin A und Tacrolimus ist Sirolimus nicht nierentoxisch (Saunders 2001). Diekmann et al. zeigten auch gute Langzeit-Ergebnisse in nierentransplantierten Patienten, sogar mit Sirolimus als Monotherapie (Diekmann 2005). In einer Single-Center Studie, ebenfalls im Bereich der Nierentransplantation, konnte nach sechsjähriger Therapie mit Sirolimus weder eine signifikante Proteinurie, bei normaler renaler Funktion, noch ein gehäuftes Auftreten von Neoplasien festgestellt werden (Nungaray 2005).

Sirolimus konnte auch in der Xenotransplantation die Überlebensrate von konkordanten Herztransplantaten im Kleintiermodell erhöhen (Alexander 1994, Chen 1992). In einem xenogenen konkordanten Hauttransplantationsmodell, in dem die Transplantatempfänger Antilymphozytenserum und Donor-spezifisches Knochenmark als Basistherapie bekamen, zeigte sich, dass Sirolimus das Transplantatüberleben signifikant verlängern konnte (75 Tage), während Cyclosporin A keine Wirkung dieser Art aufweisen konnte (Hale 1997). Ein dreimonatiges Transplantatüberleben konnte

sogar in Pavianen, denen Herzen von transgenen Schweinen heterotop transplantiert wurden, mit einer immunsuppressiven Medikation, bestehend aus Sirolimus, Tacrolimus, Steroiden und TPC (ein Anti-Gal-Antikörper-Therapeutikum), erreicht werden (McGregor 2005).

### 1.5.3 FK778

FK778 ist ein synthetisches Malononitrilamid (MNA) und leitet sich von dem aktiven Metaboliten A771726 der Leflunomide ab (Fitzsimmons 2004). Im Gegensatz zu den Leflunomiden besitzt FK778 eine wesentlich kürzere Halbwertszeit (6-45 Stunden vs. 15-18 Tage) und ist daher besser geeignet für die Verwendung in der Organtransplantation (Fawcett 2004). Leflunomide besitzt immunmodulatorische und antiinflammatorische Effekte und wird bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, eingesetzt (Jin 2002, Silva

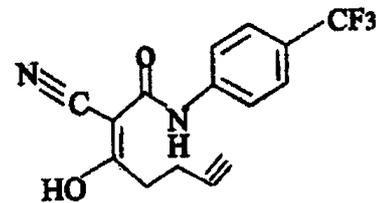


Abb. 5 Strukturformel von FK778.

1997). Daher wird angenommen, dass das Derivat dieser Substanz mit einer kürzeren Halbwertszeit und einer besseren Bioverfügbarkeit für die Transplantationsmedizin besonders interessant ist (Bilolo 2003). MNAs inhibieren das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH), welches die de novo Pyrimidinsynthese katalysiert (Xu 1996). Die DHODH ist das vierte Enzym der de novo Synthese und ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Silva 1997). Schnell proliferierende Zellen, wie aktivierte Lymphozyten, benötigen beide Wege der Pyrimidinsynthese, den „salvage pathway“ und die de novo Synthese, um ihren Bedarf an Nukleinsäuren für die Herstellung von RNA und DNA zu decken (Schorlemmer 1998 [A]). Die Hemmung der DHODH kann durch die Zugabe von Uridin in in vitro Versuchen antagonisiert werden, da dadurch der Nukleotid-Pool wieder aufgefüllt wird (Silva 1997, Xu 1996). Schrepfer et al. zeigten in in vitro Versuchen, dass durch FK778 eine dosisabhängige Reduktion von CD25-exprimierenden T-Zellen bewirkt werden kann, die zuvor über den TCR/CD28-Signalweg stimuliert wurden (Schrepfer 2006). Dieser Effekt konnte nicht durch die Zugabe von Uridin aufgehoben werden und könnte somit auf eine zusätzliche DHODH-unabhängige Wirkung hinweisen (Schrepfer 2006). Die MNAs inhibieren

zusätzlich die Aktivität der Tyrosin-Kinase, die eine wichtige Rolle in der Induktion der Zell-Proliferation spielt (Xu 1996). Des Weiteren wurde in einer Studie von Kreijveld et al. herausgefunden, dass FK778 eine regulatorische Aktivität in stimulierten humanen CD4-positiven-CD25-negativen T-Zellen hervorrufen kann (Kreijveld 2007). Diese Zellen scheinen wichtig zu sein, um ein Transplantat ohne fortwährende Immunsuppression zu erhalten (Toleranzinduktion).

Die MNAs wirken nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf B-Zellen, da die Proliferation beider Zellreihen gehemmt werden kann (Kurrle 1997, Kurrle 1996). Pan et al. zeigten, dass die Verwendung von FK778 in einem chronischen Allotransplantationsmodell in Ratten zu einer Reduktion der allo-spezifischen Immunglobuline (IgM und IgG) und einer Verminderung des mononukleären Zellinfiltrates führt (Pan 2003). Die MNAs wirken also auf die zelluläre und humorale Immunantwort. Ferner wird auch die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1, reduziert und dadurch die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel verhindert (Deuse 2004 [B]). Diese Reaktion kann anscheinend ebenfalls nicht durch Uridin antagonisiert werden (Schrepfer 2006). Außerdem kann FK778 in ausreichender Dosierung die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in vitro inhibieren, und zwar wesentlich effektiver als Sirolimus (Deuse u. Schrepfer 2006). Die Wirkung von FK778 auf die Migration der glatten Muskelzellen kann offenbar auch hier nicht durch Uridin rückgängig gemacht werden (Schrepfer 2006).

FK778 besitzt ebenfalls einen vaskuloprotektiven Effekt, indem es die Bildung einer Neointima verhindert, unabhängig von seiner immunsuppressiven Hauptwirkung (Savikko 2003). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Replikation von einigen Herpes Viren gehemmt wird, insbesondere therapieresistente Cytomegalieviren, die besonders nach einer Transplantation Probleme bereiten können (Fitzsimmons 2004). Auch in der Therapie der Graft-versus-Host-Krankheit konnten die MNAs die Überlebensrate in Tierversuchen erhöhen (Schorlemmer 2001, Schorlemmer 1998 [A], Silva 1997). In experimentellen Studien wurde belegt, dass MNAs in der allogenen Versuchstier-Kombination sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung verhindern können (Bilolo 2003, Jin 2002, Schorlemmer 1998 [A]).

Vanrenterghem et al. haben in einer randomisierten doppelblinden Phase II Multicenter-Studie mit 149 nierentransplantierten Patienten die Wirkung von FK778 in zwei verschiedenen Dosierungen untersucht, in Kombination mit Tacrolimus und Steroiden (Vanrenterghem 2004). Die Frequenz akuter Abstoßungen war in den beiden FK778/Tacrolimus/Steroide-Gruppen wesentlich geringer als in der Placebo-Gruppe (26,5% (hochdosiertes FK778) vs. 25,9% (niedrigdosiertes FK778) vs. 39,1% (Placebo)). Allerdings wurden die gewünschten Blutspiegel in der hochdosierten FK778-Gruppe erst in der zweiten Woche erreicht und die Hälfte der akuten Abstoßungen erfolgte vor diesem Zielwert. Bei der Untersuchung der Subgruppe mit dem gewünschten Blutspiegel betrugen die Abstoßungsraten 7,7% in der hochdosierten Gruppe, 27,1% in der niedrigdosierten Gruppe und 39,1% in der Placebo-Gruppe. Die Hauptnebenwirkung in dieser Studie von FK778 war eine Anämie, die nach Absetzen des Medikamentes reversibel war. Außerdem ist aufgefallen, dass in den mit FK778 behandelten Gruppen die Werte für das Gesamt- und LDL-Cholesterin um 20% niedriger waren als in der Placebogruppe.

Auch in der Xenotransplantation werden die MNAs bereits getestet. Die xenogene Abstoßung konnte in Ratten mit einem transplantierten Hamsterherzen dosisabhängig mit MNAs verzögert werden, und zusammen mit Cyclosporin A gelang sogar ein Langzeit-Überleben des Xenotransplantats von mehr als 30 Tagen (Schorlemmer 1998 [A]). In einem xenogenen Hauttransplantationsmodell (Maus und Ratte) erreichte man zudem durch die Verwendung von MNAs eine signifikante Reduktion der XNAs (IgM und IgG), wodurch es zu einem verlängerten Transplantat-Überleben kam (Schorlemmer 1998 [D]).

Durch ihre vielfältigen Effekte auf verschiedene Mechanismen in der Transplantatabstoßung scheinen die MNAs nicht nur in der Allotransplantation, sondern auch in der Xenotransplantation, eine privilegierte Rolle zu spielen (Waer 2001).

## **1.6 Ziel der Studie**

Aus den oben genannten Erläuterungen der xenogenen Abstoßung wird ersichtlich, dass die hyperakute Abstoßung heute nicht mehr die größte Hürde in der Transplantation

zwischen verschiedenen Spezies darstellt und es schon mehrere gute Ansätze gibt, diese Abstoßungsphase zu vermeiden.

In dieser Studie wird daher die akute zelluläre Abstoßung in der Xenotransplantation anhand der orthotopen Aortentransplantation in der etablierten konkordanten Versuchstier-Kombination Syrischer Hamster auf Lewis-Ratte untersucht. Nach 14 Tagen bildet sich in diesem Xenotransplantationsmodell ein mononukleäres Zellinfiltrat, welches histologisch und immunhistochemisch genauer analysiert werden kann (Briffa 2004). Diese Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit der Verteilung der T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+) und der Makrophagen im Transplantat und den Veränderungen in der Gefäßmorphologie. Durch die Verwendung der Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und FK778 wird weiterhin versucht eine wirksame Therapie gegen die Xenotransplantatabstoßung in dieser Phase zu finden.

Zusammenfassend werden folgende Fragen in dieser Arbeit diskutiert:

1. Welche Zellpopulation dominiert innerhalb des entstandenen Infiltrats im Xenotransplantat?
2. Inwiefern verändert sich die Gefäßmorphologie bei der Xenotransplantatabstoßung?
3. Welches Medikament oder welche Medikamentenkombination kann die Xenotransplantatabstoßung am besten verhindern bzw. aufhalten?
4. Welche Dosierung erzielt die beste Wirkung und ist dabei nebenwirkungsarm?
5. Führt die Kombination von FK788 und Tacrolimus bzw. Sirolimus zu einer Wirkungssteigerung, ohne die Nebenwirkungen zu verstärken?

Das Ziel der Studie ist herauszufinden, ob die Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und FK778 die akute zelluläre Abstoßung in der Xenotransplantation beeinflussen können. Dadurch wird ein wichtiger Beitrag zur Realisierung der Xenotransplantation geliefert, um ein Langzeit-Überleben eines Xenotransplantats potentiell möglich zu machen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Xenogenes Tiermodell**

Als konkordantes Tiermodell für die xenogene Aortentransplantation wurden männliche Syrische Hamster als Transplantatspender und männliche Ratten vom Stamm Lewis als Empfänger benutzt. Die Lieferung der Tiere erfolgte von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Am Tag ihrer Ankunft waren die Tiere 10-12 (Spender) bzw. 6-8 (Empfänger) Wochen alt und das Gewicht betrug bei den Hamstern ca. 100g-150g und bei den Ratten 150g-200g. Die Tiere wurden genehmigt von der Behörde für Umwelt und Gesundheit (Hamburg) mit der Genehmigungsnummer: 51/04 BUG auf Grund des § 8 des Tierschutzgesetzes.

### **2.2 Orthotope Aortentransplantation**



**Abb. 6** Syrischer Hamster.

Am Operationstag wurde das Spendertier durch eine subkutane Injektion mit Fentanyl (0,08 mg/kg) narkotisiert und anschließend am Bauch rasiert, gewogen und auf einer Korkplatte fixiert.

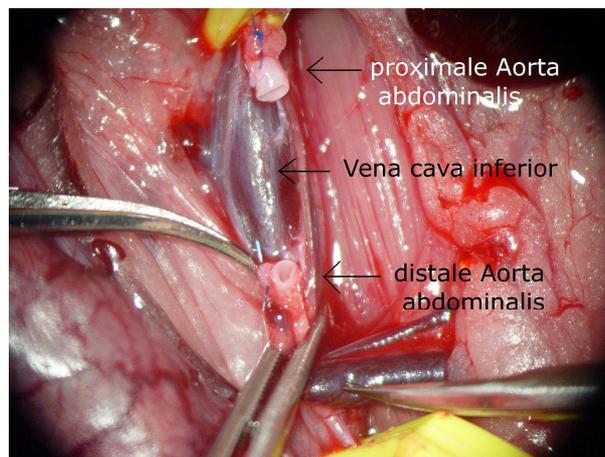
Das Abdomen wurde durch einen medianen Längsschnitt eröffnet, die Aorta und die Vena cava inferior freipräpariert und durchtrennt. Nach seitlicher Thoraxeröffnung wurde das Herz entfernt zur besseren Übersicht im OP-Gebiet. Als Transplantat wurde die thorakale Aorta benötigt, da der Durchmesser des Gefäßes annähernd dem der Empfänger-Aorta entspricht. Die Aorta wurde distal der A. subclavia sinistra abgesetzt und distal bis zum Zwerchfell präpariert. Kleinere Gefäße wurden verödet. Das Transplantat wurde bis zu seiner weiteren Verwendung in eisgekühlter Kochsalz-Lösung bei etwa 4°C aufbewahrt.



**Abb. 7** Lewis-Ratte.

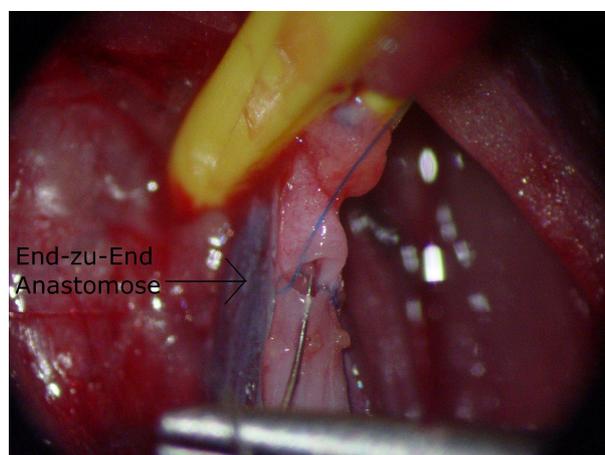
Die Lewis-Ratte wurde ebenfalls durch eine subkutane Gabe von Fentanyl (0,08 mg/kg) in Narkose versetzt und auf die gleiche Weise für die Operation vorbereitet wie das Spendertier.

Nach Eröffnung des Abdomens und Darstellung der Aorta abdominalis wurde infrarenal sowie proximal der Bifurkation der Blutfluss mit Gefäßklemmen unterbrochen, abgehende Gefäße ligiert (7-0 Prolene, Ethicon Norderstedt) und ein ca. 1 cm langes Segment der Empfänger-Aorta entnommen.



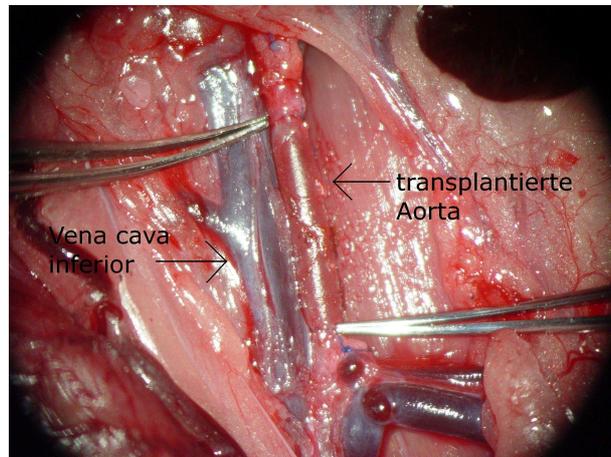
**Abb. 8** Empfänger-Aorta nach Entnahme des Segmentes.

Das Transplantat wurde mit der Empfänger-Aorta durch zwei End-zu-End Anastomosen verbunden (8-0 Prolene, Ethicon Norderstedt). Die Ischämiezeiten variierten zwischen 15 und 20 Minuten. Bei den syngeneten Kontrolltieren wurde die abdominelle Hamster-Aorta für 15 bis 20 Minuten abgeklemmt und mit einer gekühlten NaCl-Lösung umspült.



**Abb. 9** End-zu-End Anastomose mit genähter Hinterwand.

Nach Entfernung der Klemmen und Wiederherstellung des Blutflusses wurden die Anastomosen auf Bluttrockenheit kontrolliert.



**Abb. 10** Transplantierte Spenderaorta im Empfänger.

Nachdem der Blutfluss gesichert war, erfolgte der Verschluss des Abdomens mit einer Fasziennaht und einer Hautnaht (5-0 Prolene, Ethicon Norderstedt). Die Narkose antagonisierte man durch eine subkutane Injektion von Narcanti (Naloxon).

Die Tiere erhielten postoperativ für zwei Tage Novalgine® mit dem Trinkwasser als Analgetikum.

### **2.3 Dosierung und experimentelle Gruppen**

Insgesamt wurden zwölf experimentelle Gruppen mit jeweils sechs Versuchstieren untersucht (siehe Tabelle 1). Die Versuchstiere wurden zufällig auf die verschiedenen Gruppen verteilt und kein Tier starb durch technisches Versagen.

Die Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe und bestand aus den autologen Transplantaten der Hamster. Hier wurde keine Abstoßung erwartet. Die Versuchstiere aus Gruppe 2 erhielten xenogene Transplantate. Beide Gruppen bekamen postoperativ keine Medikation.

Die Gruppen 3 bis 8 erhielten ebenfalls Xenotransplantate und wurden mit einer Monotherapie, bestehend aus FK778, Tacrolimus oder Sirolimus, in unterschiedlichen Dosierungen immunsuppressiv behandelt.

In den Gruppen 9 bis 12 wurde die Kombinationstherapie mit FK778 und Tacrolimus bzw. Sirolimus ebenfalls in verschiedenen Dosierungen untersucht.

**Aufbau der Gruppen:**

| Gruppe | Name           | Kombination | n | Medikation                        |
|--------|----------------|-------------|---|-----------------------------------|
| 1      | syngen         | SH          | 6 | ---                               |
| 2      | no medication  | SH → Lew    | 6 | ---                               |
| 3      | FK778 LD       | SH → Lew    | 6 | FK778 (5 mg/kg)                   |
| 4      | FK778 HD       | SH → Lew    | 6 | FK778 (20 mg/kg)                  |
| 5      | Tac LD         | SH → Lew    | 6 | Tac (1 mg/kg)                     |
| 6      | Tac HD         | SH → Lew    | 6 | Tac (4 mg/kg)                     |
| 7      | Sir LD         | SH → Lew    | 6 | Sir (0,5 mg/kg)                   |
| 8      | Sir HD         | SH → Lew    | 6 | Sir (2 mg/kg)                     |
| 9      | FK778 + Tac LD | SH → Lew    | 6 | FK778 (5 mg/kg) + Tac (1 mg/kg)   |
| 10     | FK778 + Tac HD | SH → Lew    | 6 | FK778 (20 mg/kg) + Tac (4 mg/kg)  |
| 11     | FK778 + Sir LD | SH → Lew    | 6 | FK778 (5 mg/kg) + Sir (0,5 mg/kg) |
| 12     | FK778 + Sir HD | SH → Lew    | 6 | FK778 (20 mg/kg) + Sir (2 mg/kg)  |

**Tab. 1** Experimentelle Gruppen; Abkürzungen: Tac = Tacrolimus; Sir = Sirolimus; LD = low-dose; HD = high-dose; SH = Syrischer Hamster; Lew = Lewis-Ratte

**2.4 Verabreichung der Medikamente**

Die Medikamente FK778 und Tacrolimus wurden von der Astellas GmbH (München, Deutschland) und Sirolimus durch den Hersteller Wyeth (Münster, Deutschland)

bereitgestellt. Die Substanzen wurden täglich über 14 Tage, beginnend am Operationstag, verabreicht. Die Lösung von FK778 erfolgte in 1%iger Carboxymethylcellulose. Tacrolimus wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Sirolimus gab es als Rapamune Trinklösung und wurde ebenfalls mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

Diese Lösungen wurden jeden Tag frisch angesetzt und mittels einer Schlundsonde (Firma World Precision Instruments, USA) den Tieren per os appliziert.

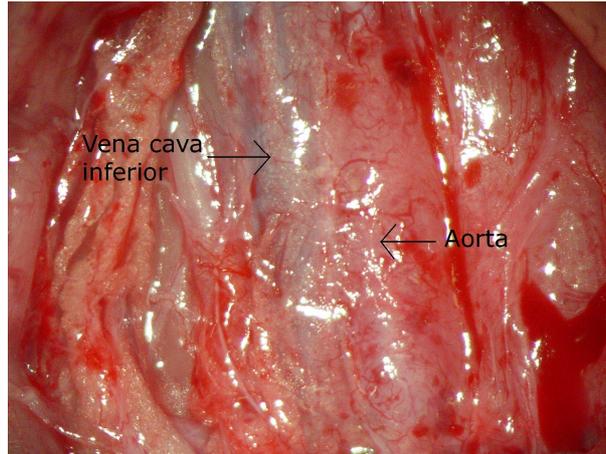
## **2.5 Behandlung der Tiere**

Die Tiere wurden in den klimatisierten Räumen des Tierstalles im Universitätsklinikum Eppendorf mit Wasser ad libitum und Ratte-Maus-Pellets bzw. Hamster-Pellets versorgt. Jeweils vier Ratten teilten sich einen Käfig. Die Hamster wurden zu acht in einem Käfig gehalten. Es herrschte eine konstante Umgebungstemperatur von 20°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und ein 12 Stunden hell-dunkel-Rhythmus.

Die Lewis-Ratten wurden am Operationstag sowie am 5., 10. und 14. Tag nach Transplantation gewogen. Während dieser Zeit wurde täglich auf Nebenwirkungen der Medikamente geachtet, wie z. B. gastrointestinale Beschwerden in Form von Diarrhöen oder Gewichtsabnahmen. Es erfolgten außerdem am 5. und 10. Tag Blutentnahmen (0,5 ml) zur weiteren Medikamentenspiegel-Bestimmung.

## **2.6 Explantation des Xenotransplantats**

Nach 14 Tagen erfolgte bei jedem Versuchstier die Explantation. Unter Vollnarkose (mit Fentanyl s.c. 0,08 mg/kg) wurde die Lewis-Ratte rasiert, die Bauchhöhle durch einen Medianschnitt eröffnet und die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior freigelegt.



**Abb. 11** Intraabdomineller Situs bei Explantation.

### **Blutentnahmen:**

Insgesamt wurden 5-6 ml venöses Blut entnommen:

- EDTA-Blut zur Erstellung eines Differentialblutbildes und für die Bestimmung des Medikamentenspiegels von Sirolimus
- Plasma für die Medikamentenspiegel von FK778 und Tacrolimus

Zur Gewinnung des Serums und des Plasmas wurde das Blut zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

Das Blutbild wurde am jeweiligen Tag direkt bestimmt, die anderen Blutproben wurden bis zu ihrer Messung bei -20°C aufbewahrt. Die Medikamentenspiegel von Tacrolimus und Sirolimus sowie das Blutbild wurden im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) gemessen. Die Spiegel von FK778 bestimmte man im Institut für Pharmakologie (UKE) mittels HPLC (High Power Liquid Chromatography).

### **Explantation des Xenotransplantats:**

Die abdominelle Aorta wurde proximal bzw. distal der Anastomosen durchtrennt und entnommen. Nach Säuberung des Transplantates mit Kochsalz-Lösung, wurde es mit einem Skalpell in zwei Abschnitte geteilt.



**Abb. 12** Explantierte Aorta.

Eine Probe kam in ein Eppendorf-Cup mit Tissue Tek (Firma Sakura, Giessen) und wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde bei -20°C im Gefrierschrank für die spätere Herstellung von Kryoschnitten gelagert. Der andere Teil wurde direkt nach Entnahme in 4%igem Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet zur Anfertigung von histologischen Schnitten.

## **2.7 Histologische Färbungen**

Nach mindestens 24 Stunden Fixierung der Transplantate in Formalin wurden sie in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden an einem Mikrotom mit einem Durchmesser von 5 µm hergestellt.

Zur Übersicht wurde eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Mayer Hämatoxylin und Eosin-G-Lösung 0,5%, beides von der Firma MERCK, Darmstadt) durchgeführt. Das Eindecken der gefärbten Präparate erfolgte mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg).

Um das Ausmaß des entstandenen Infiltrats zu beurteilen, wurden die Media und die Adventitia der Gefäßquerschnitte an vier repräsentativen Stellen ausgemessen und der Mittelwert berechnet.

Eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner wurde zur Beurteilung der Gefäßstruktur, insbesondere des Bindegewebes, verwendet. Hier werden das Zytoplasma rot, die

Zellkerne braun, die kollagenen Bindegewebsfasern grün und die Muskelfasern orange-rot angefärbt.

## **2.8 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.8.1 CD4-, CD8- und ED1-Färbung**

Zur näheren Untersuchung des Infiltrats wurden spezielle immunhistochemische Färbungen erstellt, um die einzelnen Zellen identifizieren zu können. Die in Tissue Tek eingefrorenen Proben wurden mit einem Kryostat in 8 µm dicke Schnitte auf Superfrost-Objektträger verarbeitet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Es wurden CD4-, CD8- und ED1-positive Zellen mittels spezifischen Antikörpern identifiziert. Die CD4-Färbung dient zur Darstellung von T-Helferzellen, zur Detektion von zytotoxischen T-Lymphozyten wurde gegen CD8 gefärbt. ED1 wurde als Marker für Makrophagen benutzt.

#### **Herstellung der Färbungen:**

Nach 10minütiger Fixierung in Aceton, wurden die Präparate 15 Minuten luftgetrocknet. Als Primär-Antikörper wurden monoklonale Antikörper der Maus gegen Ratten-Antigene (CD4, CD8, ED1) verwendet.

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit PBS-Puffer (Biochrom AG, Berlin) nach folgendem Schema:

| <u>Primär-Antikörper</u>                       | <u>Verdünnung</u> |
|--|-------------------|
| Mouse-anti-Rat CD4 (OX38, Serotec, Düsseldorf) | 1:800             |
| Mouse-anti-Rat CD8 (OX8, Serotec, Düsseldorf)  | 1:800             |
| Mouse-anti-Rat ED1 (ED1, Serotec, Düsseldorf)  | 1:1000            |

Die Objektträger wurden mit dem Primär-Antikörper eine Stunde lang in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend in PBS-Puffer gewaschen.

An den ersten Antikörper wurde nun ein zweiter, gegen Maus-Antikörper gerichteter Kaninchen-Antikörper (Firma Dako, Hamburg) gebunden. Die Verdünnung betrug 1:50 und erfolgte mit PBS-Puffer und verdünnten Ratten-Serum. Dieses wurde benutzt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls eine Stunde in einer feuchten Kammer mit anschließender Waschung in PBS-Puffer.

Als dritten Antikörper verwendete man einen mit dem Enzym Peroxidase konjugierten goat-anti-rabbit Antikörper (Firma Caltag Laboratories, Hamburg). Dieser wurde auf die gleiche Weise verdünnt wie der Sekundär-Antikörper. Die Präparate kamen für 30 Minuten in eine feuchte Kammer zur Inkubation.

Die eigentliche Färbung der Schnitte erfolgte durch Zugabe des Substrats der Peroxidase Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (Firma Sigma, München), welches zuvor mit 10 µl Wasserstoffperoxid und 10 ml PBS-Puffer vermischt wurde. Hierdurch färben sich positive Präparate nach 10 Minuten braun. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt (Blaufärbung des Chromatins) und für 10 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Zum Schluss folgte das Eindecken mit Aquatex (MERCK, Darmstadt).

Die Schnitte wurden mittels eines Computerprogramms (Leica, Bensheim, Deutschland) untersucht und die jeweilig positiv gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup> ausgezählt.

### **2.8.2 Alpha-Actin-Färbung**

Es wurde eine Alpha-Actin-Färbung (Serotec, Düsseldorf) hergestellt, um glatte Muskelzellen in der Media darzustellen. Die Färbung wurde im Institut für Pathologie (UKE) angefertigt.

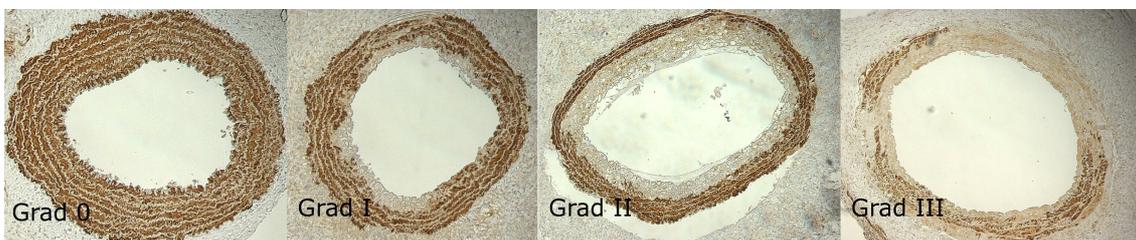
Um den Grad der Medianekrose festzustellen, wurde eine semiquantitative Einteilung vorgenommen (Abb. 13):

**Grad 0:** Glatte Muskelzellen ohne nekrotische Areale und Gefäßstruktur gut erhalten.

**Grad 1:** Nicht-zirkuläre Nekrose, nur die inneren Schichten der Media sind betroffen.

**Grad 2:** Die zirkuläre Nekrose nimmt mehr als die Hälfte der Gefäßquerschnittsfläche ein, ohne sich auf die äußeren Bezirke auszubreiten.

**Grad 3:** Schwere Nekrose, die gesamte Gefäßwand betreffend mit zerstörter Gefäßarchitektur.



**Abb. 13** Semiquantitative Gradeinteilung zur Bewertung der Medianekrose im Aorten-Xenotransplantat.

## **2.9 Statistik**

Um die experimentellen Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde die Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem LSD Post Hoc Test für mehrere Gruppen eingesetzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $(p) < 0,05$  wurde als signifikant bewertet. Zur statistischen Analyse wurde das SPSS statistical software package 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) verwendet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Medikamentenspiegel**

Es erfolgten venöse Blutentnahmen am 5. und 10. Tag (0,5 ml), während der 14tägigen Laufzeit, und am Tag der Explantation (2-3 ml) zur Bestimmung der Medikamentenspiegel. Die Versuchstiere in Gruppe 3 mit einer niedrigdosierten Therapie von 5 mg/kg FK778 wiesen einen mittleren Plasmaspiegel von  $31,6 \pm 14,1$  mg/l auf. In der hochdosierten Gruppe, in der die Tiere mit 20 mg/kg FK778 behandelt wurden, konnte im Durchschnitt ein Medikamentenspiegel von  $104,8 \pm 56,5$  mg/l gemessen werden. Es gab eine signifikante Verminderung der Plasmakonzentration von FK778 in der jeweiligen Versuchszeit. In der niedrigdosierten Gruppe fielen die Werte von  $46,4 \pm 16,3$  mg/l an Tag 5 auf  $14,3 \pm 7,5$  mg/l an Tag 14 ( $p < 0,05$ ). In Gruppe 4 wurde ebenfalls ein Abstieg von  $185,4 \pm 23,5$  mg/l an Tag 5 auf  $27,5 \pm 19,3$  mg/l an Tag 14 bemerkt ( $p < 0,05$ ). Dies könnte auf einen induzierten Stoffwechselprozess hinweisen.

Die Medikamentenspiegel von Tacrolimus waren dagegen wesentlich stabiler. In der Gruppe 5, mit einer Medikation von 1 mg/kg pro Tag, zeigten sich Plasmaspiegel von  $1,6 \pm 0,6$  µg/l und in der hochdosierten Therapiegruppe mit 4 mg/kg betragen sie durchschnittlich  $12,4 \pm 6,7$  µg/l.

Bei Sirolimus konnte man in der Gruppe 7, in der mit 0,5 mg/kg pro Tag therapiert wurde, einen Medikamentenspiegel von  $2,9 \pm 1,2$  µg/l nachweisen. In der hochdosierten Gruppe 8, in der 2 mg/kg verabreicht wurde, zeigten sich Blutspiegel von  $8,2 \pm 1,7$  µg/l. Es wurde eine leichte aber nicht signifikante Abnahme der Medikamentenspiegel von Tacrolimus und Sirolimus festgestellt, wenn sie mit FK778 kombiniert wurden.

#### **3.2 Nebenwirkungen**

Keiner der Transplantatempfänger verstarb während der 14tägigen Versuchslaufzeit. Es wurden ebenfalls keine gastrointestinalen Nebenwirkungen, die auf die Therapie zurückführbar gewesen wären, während dieser Zeit beobachtet. Die hochdosierte FK778 Gruppe und die Kombinationstherapie mit Tacrolimus in hoher Dosierung tendierten zu

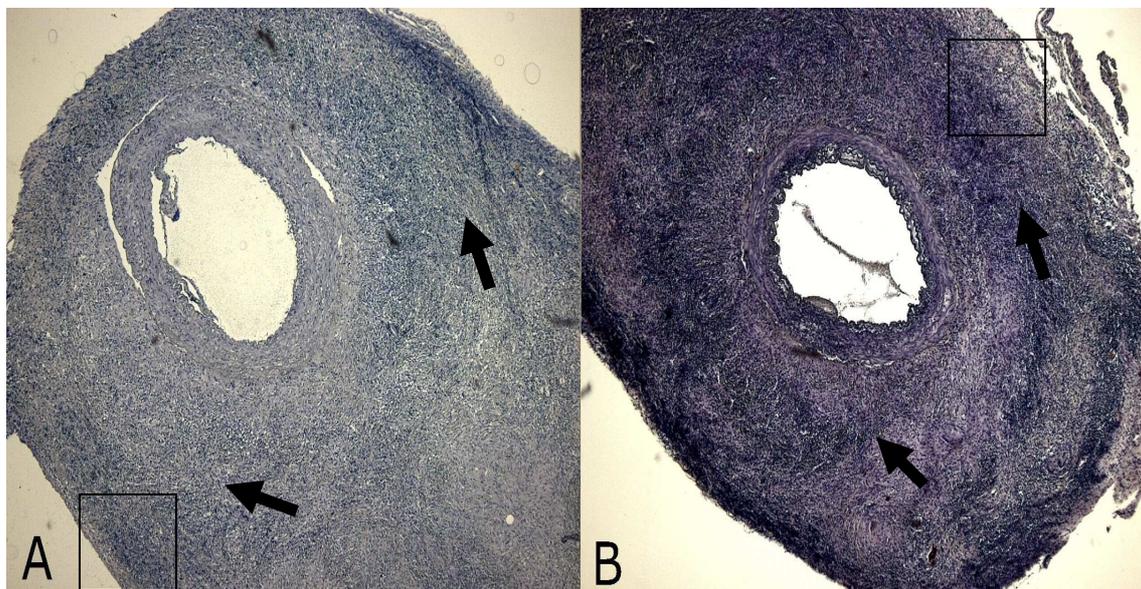
einer leichten, aber nicht signifikanten Abnahme der Hb-Werte im Differentialblutbild. Die Gewichtsprotokolle wiesen keine signifikanten Auffälligkeiten zwischen der unbehandelten Gruppe 2 und den Therapie-Gruppen auf.

### **3.3 Makroskopisches Erscheinungsbild**

Nach einer Laufzeit von 14 Tagen zeigten die Xenotransplantate der verschiedenen Gruppen ein sehr unterschiedliches makroskopisches Erscheinungsbild. Es fanden sich darunter intakt erscheinende und gut durchblutete Aortensegmente, aber auch stark veränderte und destruierte Gefäße. Alle Xenotransplantate wiesen bei Explantation ein offenes Lumen auf und keine relevante Thrombusformation konnte im Inneren des Gefäßes festgestellt werden.

### **3.4 Allgemeine Histologie**

Die H.E.-Färbung gibt eine gute Übersicht über das Ausmaß der Infiltrate, da sich die Kerne der eingewanderten Zellen durch eine intensive Blaufärbung ausreichend abgrenzen.



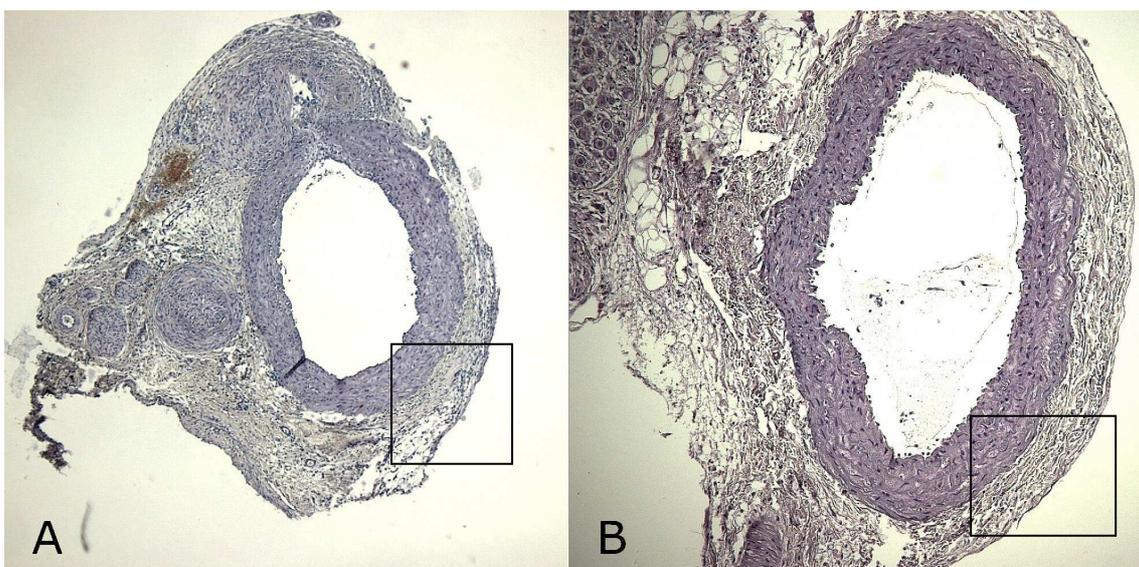
**Abb. 14** Xenotransplantat der unbehandelten Gruppe 2 mit ausgeprägter Infiltration der Gefäßadventitia (A). Im Vergleich dazu ein Transplantat aus der FK778 LD-Gruppe (B) mit ähnlichem Aspekt. Schwarze Pfeile: hochgradige Infiltration der Adventitia. H.E.-Färbung, 50x vergrößert.

Es zeigte sich, dass in den unbehandelten Xenotransplantaten besonders die Adventitia, und weniger die Media, von den infiltrierenden Zellen betroffen war (Abb. 14 A und 15 A). In der FK778 LD-Gruppe konnte keine wesentliche (Abb. 14 B und 15 B) und in den anderen niedrigdosierten Mono- und Kombinationstherapien nur eine geringe Reduktion der Infiltration erzielt werden.

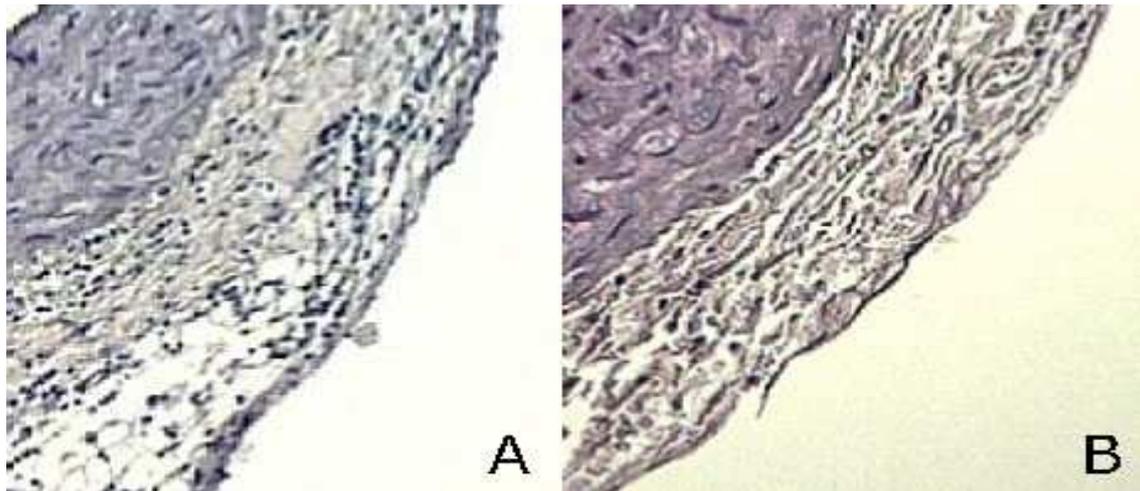


**Abb. 15** Vergrößerter Ausschnitt aus dem Xenotransplantat der unbehandelten Gruppe 2 (A) und der FK778 LD-Gruppe (B). H.E.-Färbung.

Im Vergleich hierzu präsentierten sich die Transplantate in den hochdosierten Therapien, hauptsächlich in der Tacrolimus-Monotherapie und in Kombination mit FK778, ähnlich denen der syngenen Gruppe mit einer geringeren Anzahl von mononukleären Zellen in der Adventitia (Abb. 17 A und B). Hier konnte ein fast normaler Gefäßstatus nachgewiesen werden (Abb. 16 A und B).



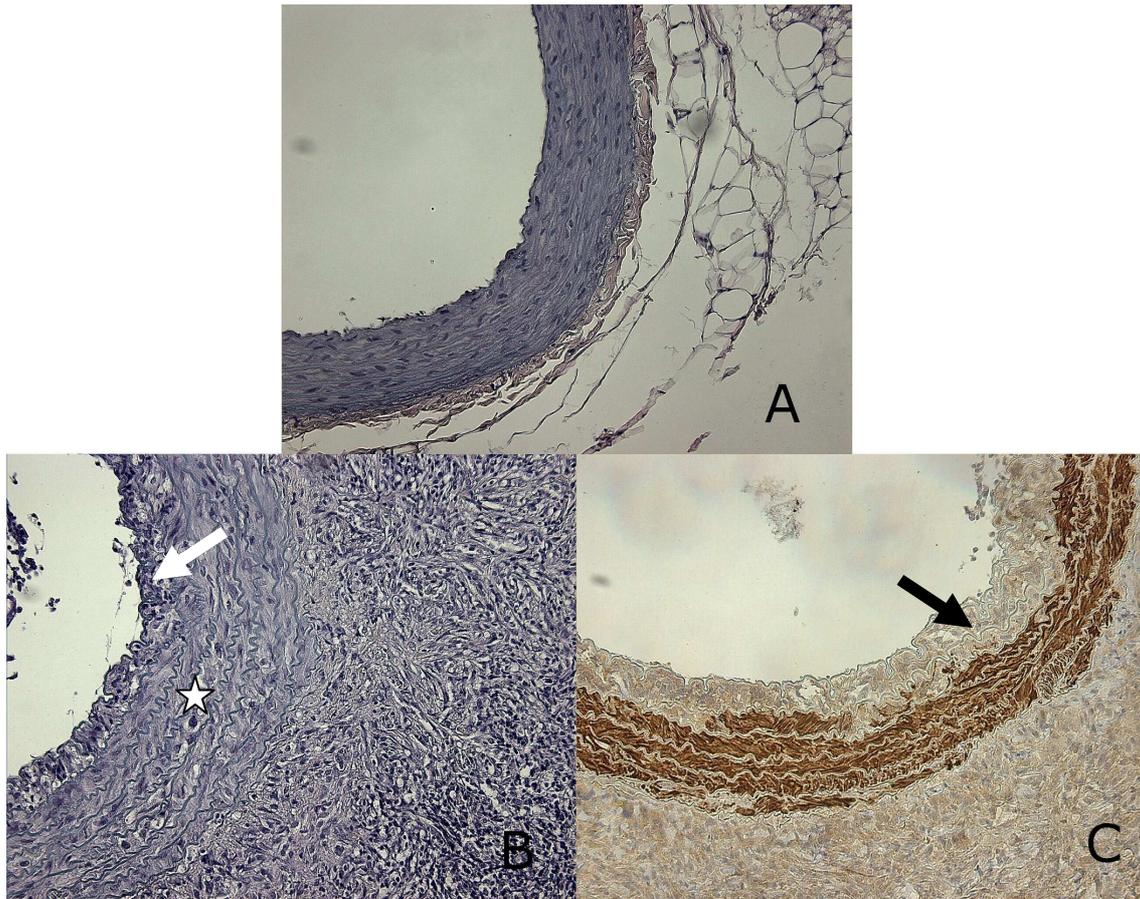
**Abb. 16** Geringfügige Infiltration der Adventitia in der Tac HD- (A) und der syngenen Gruppe (B). H.E.-Färbung, 50x vergrößert.



**Abb. 17** Vergrößerter Ausschnitt aus dem Xenotransplantat der TacHD- (A) und der syngenen Gruppe (B). H.E.-Färbung.

Diese ausgeprägte Infiltration in den unbehandelten Transplantaten der Gruppe 2 erweiterte den durchschnittlichen Adventitia-Durchmesser, im Vergleich zur syngenen Gruppe, von  $143 \pm 93 \mu\text{m}$  auf  $809 \pm 209 \mu\text{m}$  ( $p < 0,01$ ).

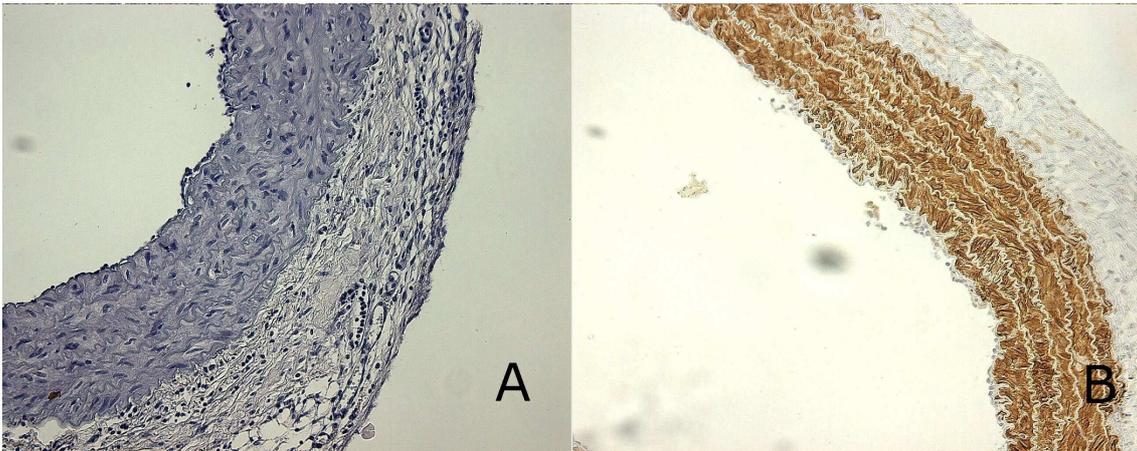
In der Media von unbehandelten Transplantaten sah man, insbesondere in den inneren Schichten, also dem Lumen des Gefäßes zugewandt, ebenfalls eine ausgeprägte Infiltration von mononukleären Zellen. Hier konnte auch eine stärkere Destruktion als in den äußeren Schichten der Media festgestellt werden, zumal besonders hier die elastischen Lamellen stark aufgelockert erschienen und keine typischen Zellkerne von glatten Muskelzellen mehr abgrenzbar waren (Abb. 18 B). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den Alpha-Actin-gefärbten Präparaten derselben Gruppe wider, da hauptsächlich in den inneren Schichten keine glatten Muskelzellen mehr auffindbar waren (Abb. 18 C). In den niedrigdosierten Mono- und Kombinationstherapien zeigten sich ähnliche Veränderungen mit stärkerer Infiltration und Destruktion in den inneren Schichten als in den äußeren Schichten der Gefäßmedia und hochgradiger Auflockerung der elastischen Lamellen. Auch dies manifestierte sich in den Alpha-Actin-Färbungen dieser Transplantate als fast vollständiges Fehlen glatter Muskelzellen in den inneren Mediaschichten, während die äußeren Schichten in fast allen Präparaten intakt erschienen.



**Abb. 18** Im Vergleich zu der syngenen Gruppe (A; H.E.-Färbung) zeigten die unbehandelten Transplantate aufgelockerte elastische Lamellen (Stern) und eine Infiltration von mononukleären Zellen (weißer Pfeil) in den inneren Schichten der Media (B; H.E.-Färbung); Alpha-Actin-Färbung desselben Transplantats mit fehlenden glatten Muskelzellen (schwarzer Pfeil) in den inneren Mediaschichten (C). 200x vergrößert.

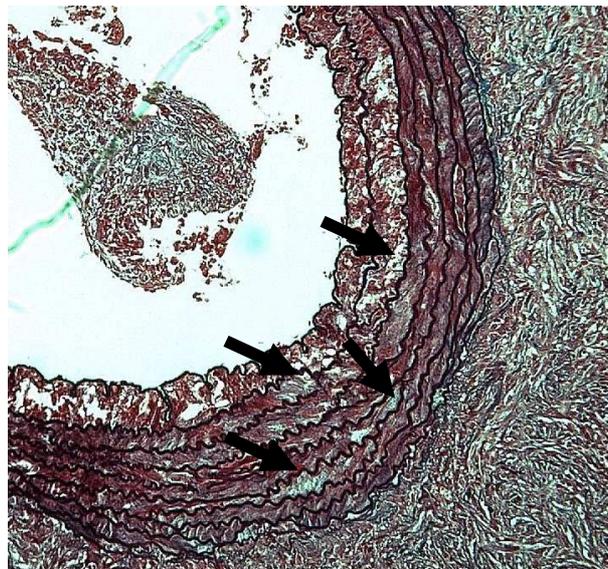
In den hochdosierten Mono- und Kombinationstherapien konnten nur leichte Veränderungen der Gefäßmedia festgestellt werden. Auch hier stellte sich die Medikation mit Tacrolimus als wirksamste Therapie heraus. Es zeigten sich eine milde Auflockerung der elastischen Lamellen und vereinzelte mononukleäre Zellen an der Gefäßintima und der obersten Schicht der Media (Abb. 19 A). Die Alpha-Actin-Färbung dieser Präparate bestätigte diese Wahrnehmung mit nahezu vollständig intakten glatten Muskelzellen in der gesamten Media (Abb. 19 B).

Es wurde in keinem Xenotransplantat eine Verengung der Gefäßlumina vorgefunden, und es konnte ebenfalls keine Ausbildung einer Neointima festgestellt werden. Sehr stark destruierte Transplantate mit nur noch vereinzelten glatten Muskelzellen in der Media tendierten zu einer breiteren Gefäßmedia mit einem größeren Media-Durchmesser als Präparate mit intakteren Mediaschichten.



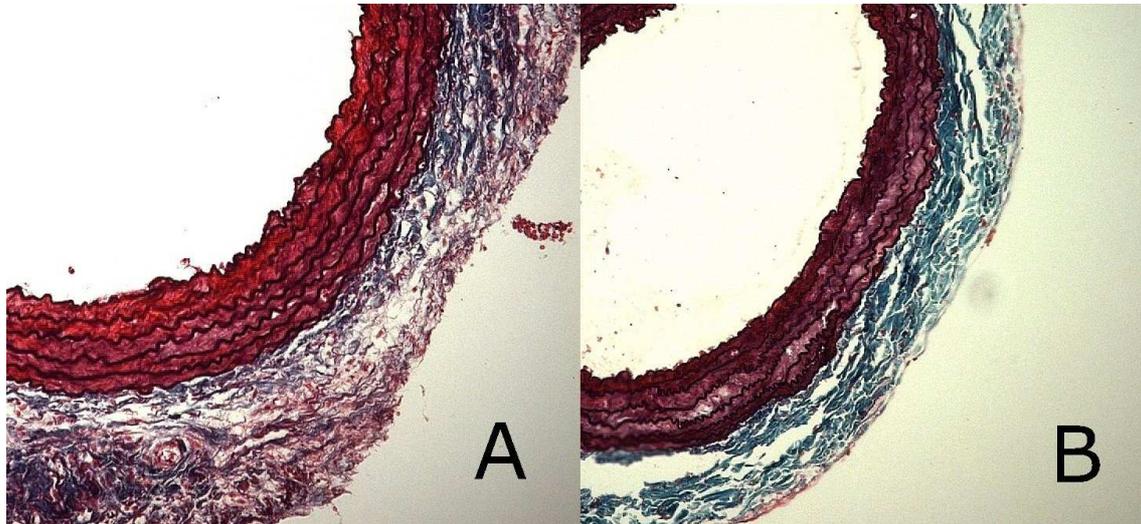
**Abb. 19** Die hochdosierten Gruppen zeigten ein fast geordnetes Bild der elastischen Lamellen und nahezu keine mononukleäre Infiltration der Media (A; Tac HD; H.E.-Färbung); Intakte Muskelschicht in der hochdosierten Tacrolimus-Gruppe (B; Alpha-Actin-Färbung). 200x vergrößert.

Durch die Trichromfärbung werden kollagenes Bindegewebe grün und glatte Muskelzellen orange-rot dargestellt. Dadurch konnte man in den Xenotransplantaten der Gruppe 2 zwischen den elastischen Lamellen der Media, besonders in den stärker destruierten Arealen, eine Bindegewebsproliferation beobachten, die sich als grünlich gefärbte Bezirke abzeichnete (Abb. 20). Diese Bindegewebsproliferation wurde möglicherweise durch die eingewanderten Makrophagen induziert. Die niedrigdosierten Gruppen zeigten ähnliche Umwandlungen der Gefäßmedia.



**Abb.20** Bindegewebsproliferation (grün) in der Gefäßmedia in den unbehandelten Xenotransplantaten (schwarze Pfeile). Trichromfärbung, 50x vergrößert.

In den hochdosierten Therapiegruppen, besonders in der Tacrolimus-Monotherapiegruppe und in Kombination mit FK778, konnten derartige Veränderungen im geschilderten Umfang nicht bestätigt werden und die Transplantate zeigten im Vergleich zur syngenen Gruppe 1 eine nahezu normale Media (Abb. 21 A und B).



**Abb. 21** Eine intakte Mediaschicht zeigte sich in den hochdosierten Gruppen (A; FK778+Tac HD) und in der syngenen Gruppe (B). Trichrom-Färbung, 50x vergrößert.

### **3.5 Immunhistochemie**

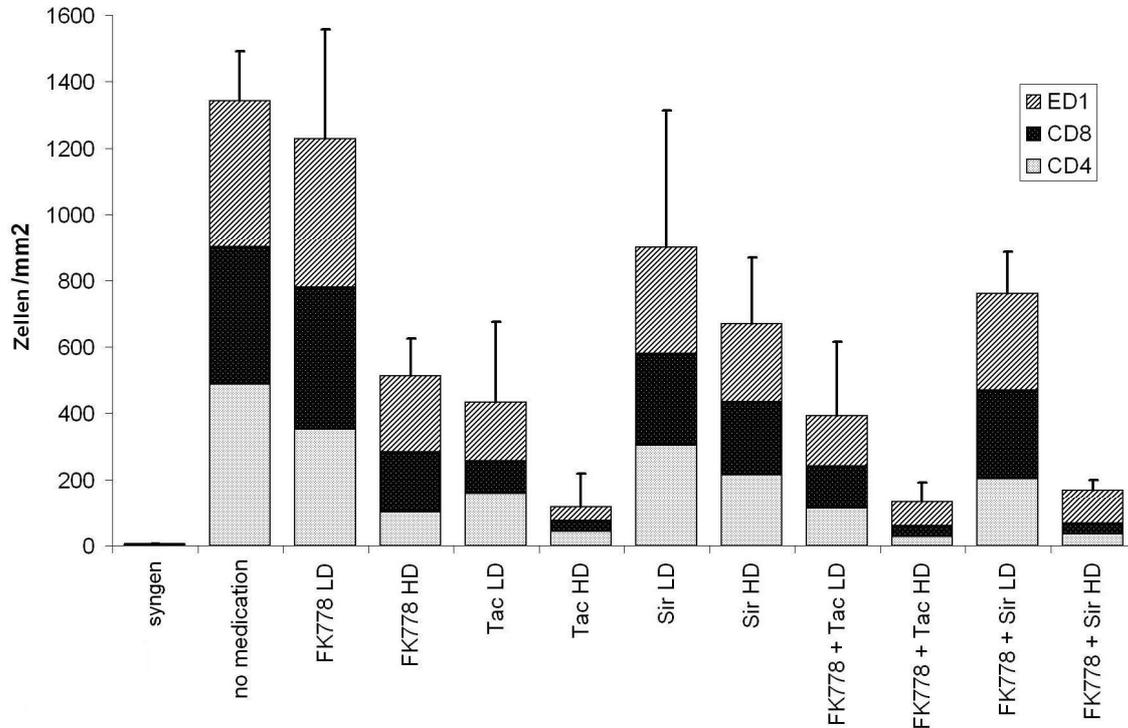
#### **3.5.1 Mononukleäres Zellinfiltrat**

Die immunhistochemischen Färbungen der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten und ED1-positiven Makrophagen dienen zur weiteren Differenzierung des Infiltrates. Dadurch kann nicht nur das Ausmaß der Infiltration beurteilt werden, sondern auch Aussagen über die Zusammensetzung gemacht werden.

Die autolog transplantierten Aorten zeigten nur eine geringe Anzahl von Immunzellen in der Adventitia, während in den unbehandelten Transplantaten dagegen eine heftige Immunreaktion mit einem ausgeprägten mononukleären Zellinfiltrat nachgewiesen werden konnte.

Wie in Abbildung 22 ersichtlich, konnte man in allen Therapie-Gruppen, außer in der Gruppe mit niedrigdosiertem FK778, eine signifikante Verminderung von CD4- und

CD8-positiven Lymphozyten und ED1-positiven Makrophagen, im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe, festgestellt werden ( $p < 0,05$  vs. Gruppe 2).



**Abb. 22** Mononukleäres Zellinfiltrat in der Adventitia unterteilt in die unterschiedlichen Subtypen (CD4- oder CD8-positive Lymphozyten und ED1-positive Makrophagen).

Betrachtet man nur die Gruppen mit einer Monotherapie, stellt sich die Behandlung mit hochdosiertem Tacrolimus am wirksamsten heraus, die Immunreaktion zu unterdrücken. Die Anzahl der CD4-positiven Zellen war hier signifikant geringer als in Gruppe 8, in der mit Sirolimus HD behandelt wurde ( $p=0,008$ ). Die Infiltration der CD8-positiven Zellen, verglichen mit FK778 HD und Sirolimus HD, konnte wesentlich besser supprimiert werden ( $p=0,015$  vs. Gruppe 4,  $p=0,005$  vs. Gruppe 8). Auch die Einwanderung von ED1-markierten Makrophagen wurde deutlich besser unterdrückt als in den anderen beiden hochdosierten Monotherapien ( $p=0,001$  vs. Gruppe 4 und 8).

Aufgrund der ausgeprägten Wirkung von Tacrolimus konnte keine weitere Suppression der infiltrierenden Zellen in Kombination mit FK778 festgestellt werden. Die Kombination von FK778 und Sirolimus in hochdosierter Form führte allerdings zu einer signifikanten Unterdrückung von CD8- ( $p=0,036$  vs. Gruppe 4,  $p=0,014$  vs.

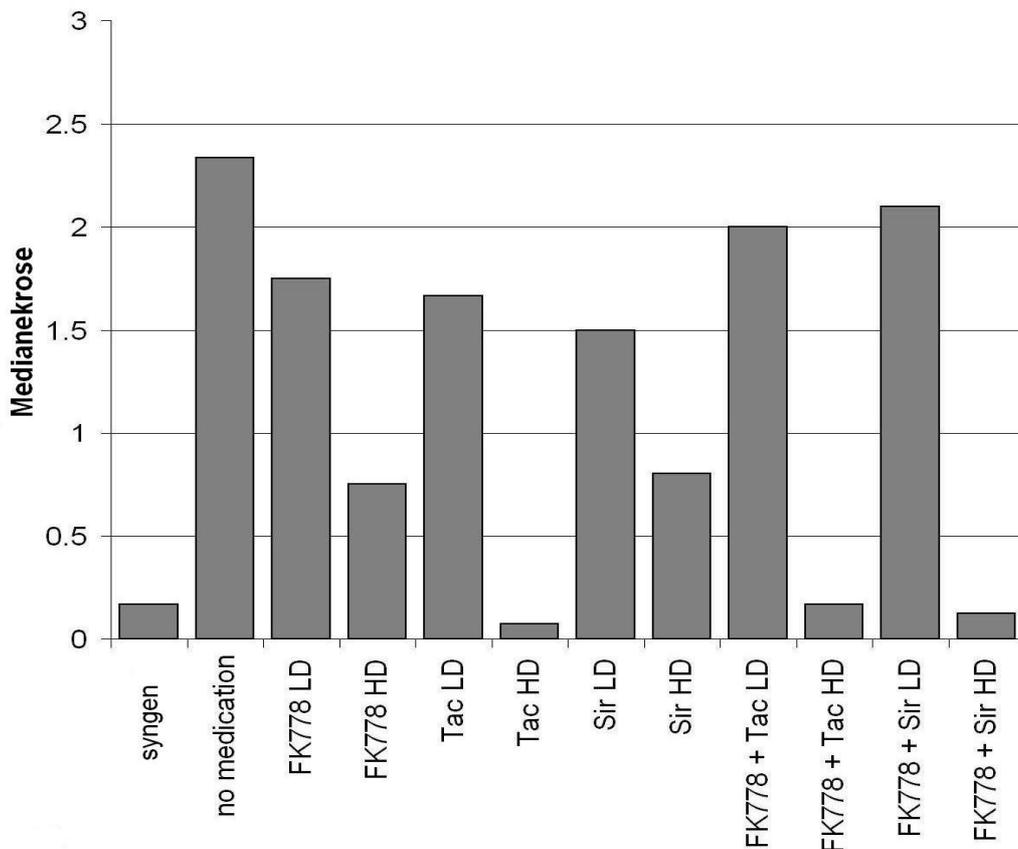
Gruppe 8) und ED1-positiven Zellen ( $p=0,040$  vs. Gruppe 4,  $p=0,036$  vs. Gruppe 8), verglichen mit ihren korrespondierenden hochdosierten Monotherapien.

Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der ED1-positiven sowie der CD4- und CD8-positiven Zellen in den jeweiligen Infiltraten konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Gefäßmedia zeigte sich eine geringere Infiltration von Immunzellen als in der Adventitia. Auch hier erwies sich Tacrolimus, insbesondere in hochdosierter Form, als effektivste Therapie gegen die Ausbildung dieses Mediainfiltrats. Im Gegensatz zur gleichmäßigen Verteilung der einzelnen Subtypen im Adventitiainfiltrat überwog die Anzahl der ED1-positiven Makrophagen im Infiltrat der Media.

### **3.5.2 Medianekrose**

Um glatte Muskelzellen in der Media gut darstellen zu können, wurde eine immunhistochemische Alpha-Actin-Färbung verwendet.



**Abb. 23** Semiquantitative Auswertung der Medianekrose in den verschiedenen Gruppen.

Zur Auswertung der Medianekrose diene die semiquantitative Gradeinteilung (siehe 2.8.1). In Abbildung 23 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

Die Resultate der niedrigdosierten Monotherapien zeigten im Vergleich zu den stark destruierten Xenotransplantaten der nicht-therapierten Gruppe nur eine milde Reduzierung der Medianekrose. In den Kombinationstherapien FK778 + Sir LD und FK778 + Tac LD konnte ebenfalls keine wesentliche Verhinderung der Mediadestruktion erzielt werden. Unter den hochdosierten Monotherapien erwies sich Tacrolimus als wirksamste Therapie. Hier wurde auch in Kombination mit FK778 keine Verbesserung erzielt. Nur die hochdosierte Kombination von FK778 und Sirolimus zeigte eine höhere Wirksamkeit als ihre jeweiligen Monotherapien (Abb. 23).

Es konnte außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der verstärkten Infiltration von Makrophagen und dem Medianekrosegrad festgestellt werden.

## **4. Diskussion**

Für die Versorgung von Patienten mit Organerkrankungen im Endstadium stellt der weltweite Organmangel ein großes Problem für die Transplantationsmedizin dar (Evans 1992). Die Transplantation von Tierorganen in den Menschen, also die Xenotransplantation, könnte eine passende Lösung für dieses Problem sein.

Im Gegensatz zu den allogenen Abstoßungsreaktionen treten in xenogenen Transplantationsmodellen generell vier verschiedene Abstoßungsmechanismen auf: 1. die hyperakute, 2. die akute vaskuläre, 3. die akute zelluläre und 4. die chronische Abstoßung (Ahn 2004). Da die hyperakute Abstoßung heute nicht mehr die größte Hürde in der Xenotransplantation darstellt (Taniguchi 1996, Kobayashi 1997, Phelps 2003), wurde in dieser Studie die akute zelluläre Abstoßung im konkordanten Kleintiermodell untersucht. Hier können keine präformierten Antikörper nachgewiesen werden (Chaline 1994) und somit ist dieses Modell zur Erforschung dieser Art der Abstoßung am besten geeignet. Die orthotope Aortentransplantation, in der Kombination Hamster auf Lewis-Ratte ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung der xenogenen Abstoßung (Briffa 2004, Allaire 1996, Scheringa 1996). Die vaskuläre Thrombosierung ist in diesem Modell weniger wichtig, da die zelluläre Abstoßung im histologischen Bild dominierend ist (Allaire 1996). Obwohl es zu Verletzungen der Gefäßwand im Abstoßungsprozess kommt, können die elementaren Funktionen der arteriellen Gefäßwand aufrechterhalten werden, anders als in komplexeren Organen (Plissonnier 1995). Vielleicht ist dies auf die Größe oder die hohe Blutflussgeschwindigkeit dieser Transplantate zurückzuführen. Dieses Modell erlaubt somit, mit seiner einfach organisierten Struktur in drei unterschiedliche Zellschichten (Adventitia, Media und Intima), die genaue Untersuchung der zellulären Abstoßungsreaktion in arteriellen Gefäßen (Plissonnier 1995).

Zusätzlich wurde die Wirkung der Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und FK778 auf diese spezielle Phase analysiert. Diese Medikamente haben sich bereits in der Klinik (Tacrolimus und Sirolimus) und in experimentellen Studien (FK778) in der Allotransplantation bewährt (First 2004, Yakupoglu 2004, Jin 2002). Daher wurde in dieser Studie ihre Wirksamkeit im xenogenen Versuchsmodell untersucht. Alle drei Substanzen können über unterschiedliche Wirkmechanismen das Immunsystem

supprimieren, deshalb ist es wichtig zu ermitteln, ob eine Kombination dieser Medikamente eine Verbesserung der Wirksamkeit auf die Abwendung der xenogenen akuten zellulären Abstoßung bewirken kann.

Nach 14 Tagen wurde das Xenotransplantat explantiert, da zu diesem Zeitpunkt das Infiltrat im histologischen Bild am ausgeprägtesten erscheinen soll (Briffa 2004). In dieser Forschungsarbeit zeigte sich ein massives Infiltrat in der unbehandelten Gruppe, insbesondere in der Adventitia, bestehend aus in etwa gleichen Anteilen von ED1-positiven Makrophagen sowie CD4-positiven und CD8-positiven T-Lymphozyten. Eine dominierende Zellart konnte im Infiltrat nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fand in der syngenesischen Gruppe keine relevante Infiltration von Immunzellen statt, sodass man nicht-immunologische Faktoren ausschließen konnte. Die niedrigdosierte FK778 Gruppe erwies sich als ineffektiv, um die Infiltration zu reduzieren. Allerdings steht dies im Einklang mit anderen Studien, in denen im allogenen Transplantationsmodell keine wirkungsvolle Abstoßungsprophylaxe erzielt werden konnte (Deuse 2004 [A], Bilolo 2003). Sirolimus zeigte in der geringeren Dosierung eine leichte antiinflammatorische Wirkung. Im Hochdosisbereich konnte keine signifikante Wirkungssteigerung erzielt werden. Die Wirksamkeit dieser Gruppe war vergleichbar mit der hochdosierten FK778 Gruppe. Am effektivsten stellte sich Tacrolimus in beiden Dosierungen heraus. Die Kombination von FK778 und Tacrolimus erbrachte allerdings keine signifikante Verbesserung. Demgegenüber konnte man mit der Kombinationstherapie FK778 und Sirolimus in hochdosierter Form eine bessere Unterdrückung der Immunantwort erzielen als in den entsprechenden Monotherapien.

In einer Studie von Briffa et al. wurde ebenfalls die akute xenogene Abstoßung eines Aortentransplantates im konkordanten Kleintiermodell (Hamster auf Lewis-Ratte) untersucht und zeigte ganz ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die immunologischen Vorgänge im Xenotransplantat. Hier wurden die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Leflunomide, auch in Kombination, verwendet. In der unbehandelten Gruppe zeigte sich ein leichtes mononukleäres Zellinfiltrat zunächst am 7. Tag in der Adventitia. Dieses erreichte sein Maximum am 14. Tag. Das Infiltrat bestand hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen, letztere waren aus gleichen Anteilen von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen zusammengesetzt. Während die Behandlung mit einer Monotherapie mit Cyclosporin A nur zu einer geringen Infiltration von mononukleären

Zellen führte, zeigten die allein mit Leflunomide therapierten Transplantate eine starke Infiltration von Immunzellen. Die Transplantate der Kombinationstherapie waren nicht unterscheidbar von der syngenen Gruppe und diese erzielte hiermit die beste Wirksamkeit gegen die xenogene Abstoßung. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine starke Migration von T-Lymphozyten und Makrophagen in die Adventitia des xenogenen Aortentransplantats (Scheringa 1996). Nur gelegentlich konnten B-Zellen nachgewiesen werden. Die T-Zellen waren auch hier gleichmäßig in CD4-positive und CD8-positive Zellen aufgeteilt. Die Anzahl der infiltrierenden Zellen erreichte am 14. Tag nach Transplantation ihr Maximum und nahm danach wieder ab.

Brouard et al. haben eine kinetische Studie über zelluläre Infiltration und Zytokin-Transkription mit dem Transplantationsmodell Syrischer Hamster auf Lewis-Ratte durchgeführt (Brouard 1998). Mit einer immunsuppressiven Therapie, bestehend aus Cyclosporin A und CVF, wurde ein Langzeit-Überleben der heterotop transplantierten Herzen von 60% erreicht. Die Transplantate mit dieser Kombinationstherapie zeigten ein geringes mononukleäres Zellinfiltrat (7 % der Gesamtoberfläche), welches seinen Höhepunkt am 15. Tag erreichte und danach wieder abnahm. Das Infiltrat bestand im wesentlichen aus Makrophagen (60 %), T-Zellen (12 %), einigen B-Zellen (14 %) und wenigen natürlichen Killerzellen (12 %). Allerdings wurden in allogenen Kombinationen mit derselben Medikation ebenfalls ähnliche Anteile der Leukozyten gefunden (T-Zellen:12%; Makrophagen: > 50%), und die niedrige T-Zell-Infiltration war wahrscheinlich auf die Cyclosporin A-Therapie zurückzuführen (Brouard 1998). Offensichtlich wird ein Maximum des mononukleären Zellinfiltrates in der Xenotransplantation nach ungefähr 14 Tagen erreicht, da es auch in anderen Transplantationsmodellen (Tracheentransplantation) zu diesem Zeitpunkt vorgefunden wird (Reichenspurner 1997). Auch in dieser Forschungsarbeit fand sich ein ausgeprägtes Infiltrat am 14. Tag nach Transplantation. Hier waren die zu untersuchenden Zellpopulationen gleichmäßig auf das Infiltrat verteilt, sodass es zu keiner Dominanz einzelner Zellarten kam. Im Vergleich hierzu wurde in allogenen Aortentransplantaten ebenfalls um den 18. Tag nach Transplantation ein Maximum des intensiven Infiltrates in der Adventitia festgestellt, und damit ähnelt diese Phase der xenogenen Abstoßung zunächst der allogenen Abstoßung (Plissonnier 1995). Das Infiltrat bestand hier jedoch hauptsächlich aus CD8-positiven (60 %) und CD4-

positiven T-Zellen (40 %), und es konnten weder Makrophagen noch B-Zellen detektiert werden.

Welche der einzelnen Zellpopulationen im mononukleären Infiltrat hauptsächlich verantwortlich sind für die akute zelluläre xenogene Abstoßung, ist weiterhin umstritten. Lin et al. fanden heraus, dass Makrophagen in der zellulären xenogenen Abstoßung eine entscheidende Rolle spielen (Lin 1997). In dieser Studie wurden T-Zell-defiziente Ratten mit Leflunomiden, welche die XNA-Bildung verhindern (Lin 1997), und ASGM-1 (anti-Ratten natürliche Killerzellen-Kaninchenserum) behandelt. Dies führte jedoch immer noch zu einer rapiden Abstoßung ( $6,3 \pm 0,8$  Tage) der xenogenen Herztransplantate, begleitet von einer sehr starken Infiltration von Makrophagen. Offenbar können Makrophagen in Abwesenheit von T-Zellen, XNAs und natürlichen Killerzellen ein Xenotransplantat auch direkt zerstören. Diese Vermutung, dass nicht T-Lymphozyten hauptsächlich zur Abstoßung des Transplantates führen, sondern dies vielleicht auch durch andere Zellen verursacht werden kann, wird durch die Forschungsarbeit von Van den Bogaerde et al. unterstützt (Van den Bogaerde 1990). Hier wurde ein xenogenes Herztransplantationsmodell in der Kombination Hamster und Ratte verwendet. Es wurde gezeigt, dass die Injektion von anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern in den Transplantatempfänger keine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens bewirkte, obwohl dies in den entsprechenden allogenen Kombinationen möglich war.

Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die T-Lymphozyten zumindest indirekt eine wichtige Rolle spielen. Durch die gezielte Verabreichung von CD4-positiven oder CD8-positiven Zellen in T-Zell-defizienten Ratten mit akkomodierten Hamsterherzen wurde herausgefunden, dass besonders die CD4-positiven Zellen durch die Induktion von XNAs zur akuten Abstoßung führten (Lin 1999 [B]). Diese Ergebnisse werden auch von Zhu et al. unterstützt. In dieser Studie wurden T-Zell-defizienten Mäusen, die zuvor Hamsterherzen transplantiert bekamen, Splenozyten statt T-Zellen, injiziert. Daraufhin wurde eine beschleunigte Abstoßung beobachtet, obwohl vor der Injektion ein Langzeit-Überleben ( $>100$  Tage) des Transplantates erreicht werden konnte (Zhu 2001). Sebille et al. gingen noch einen Schritt weiter und injizierten bestrahlten Ratten mit einem akkomodierten Xenograft CD4-positiven T-Zellen, wodurch es innerhalb von wenigen Tagen ( $5,5 \pm 0,6$ ) zur Rejektion kam (Sebille 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass

diese Zellpopulation schon ausreicht, eine akute zelluläre xenogene Abstoßung zu bewirken, sogar in Abwesenheit von induzierten anti-Hamster Antikörpern, und dadurch ebenfalls eine direkte Zytotoxizität vermuten lässt (Sebille 2001). In unserer Studie konnte man sowohl in der Adventitia als auch in der Media ED1-positive, CD4-positive und CD8-positive Zellen nachweisen. Durch die gleichmäßige Verteilung aller drei Zellpopulationen in der Adventitia könnte man vermuten, dass sowohl Makrophagen als auch T-Lymphozyten für die akute zelluläre xenogene Abstoßung verantwortlich sein können.

Die massive Infiltration der Adventitia in der unbehandelten Gruppe bewirkte eine erhebliche Vergrößerung des Durchmessers der Adventitia ( $809 \pm 209 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu der syngenen Gruppe ( $143 \pm 93 \mu\text{m}$ ). Scheringa et al. haben im gleichen Transplantationsmodell ebenfalls die Dicke der verschiedenen Wandschichten der Aorta ausgemessen (Scheringa 1994). Die Adventitia zeigte bei den unbehandelten Tieren ein Maximum am 14. Tag nach Transplantation ( $1,154\text{mm} \pm 0,158\text{mm}$ ), ähnlich den Ergebnissen dieser Studie.

Obwohl der Hauptteil des Infiltrats in der Adventitia lokalisiert war, zeigte sich eine leichte Anhäufung von infiltrierenden Immunzellen, insbesondere in den inneren, dem Lumen zugewandten Schichten der Media, bei den nicht-therapierten Transplantaten. Je stärker die zelluläre Abstoßung, desto mehr breitete sich diese Destruktion der Gefäßmedia in den äußeren Schichten aus. Es zeigten sich stark aufgelockerte elastische Lamellen und fehlende Muskelzellkerne. Dort, wo die Media besonders zerstört und keine glatten Muskelzellen mehr abgrenzbar waren, kam es zu einer verstärkten Kollagenablagerung mit gesteigerter proliferativer Aktivität. Die Zusammensetzung der infiltrierenden Zellen unterschied sich hier jedoch von der in der Adventitia. Während die ED1-positiven und CD4-positiven und CD8-positiven Zellen gleichmäßig in der Adventitia verteilt waren, stellten ED1-positive Makrophagen die dominierende Zellart in der Media dar. Je massiver die Infiltration von Makrophagen, desto ausgeprägter war die Medianekrose und desto destrukturierter die Gefäßmedia. Es kam zu einer signifikanten Korrelation zwischen der verstärkten Infiltration von Makrophagen und dem Medianekrosegrad. Im Vergleich hierzu führten die niedrigdosierte Mono- und Kombinationstherapien nur zu einer geringen Reduzierung der Medianekrose. Auch die hochdosierte Behandlung mit FK778 oder Sirolimus konnte diese nur mäßig

beeinflussen, aber stärker als ihre entsprechenden Therapien im Niedrigdosisbereich. Allerdings erwies sich ebenso hier die Kombination dieser beiden Substanzen als wesentlich wirkungsvoller, um die Medianekrose aufzuhalten. Schließlich zeigte Tacrolimus als hochdosierte Monotherapie die höchste Wirksamkeit, und es konnte auch keine weitere Wirkungverstärkung durch die Kombination mit FK778 erzielt werden.

In der Forschungsarbeit von Briffa et al. wurde ebenfalls festgestellt, dass die infiltrierenden Zellen zunächst über die luminale Seite der Media am 7. Tag einwanderten und am 14. Tag in der gesamten Media vertreten waren (Briffa 2004). Am 28. Tag nach Transplantation befanden sich gar keine Zellen mehr in der Gefäßmedia und es kam bis zum 56. Tag zur Bildung einer Neointima, bestehend aus mononukleären Zellen und glatten Muskelzellen. Diese Beobachtung wurde von der Studie von Allaire et al. mit dem gleichen Transplantationsmodell bestätigt (Allaire 1996). Am 15. Tag nach Transplantation penetrierten die Immunzellen die gesamte Gefäßmedia, allerdings gingen sie hier anscheinend von der Adventitia aus. Das Mediainfiltrat bestand überwiegend aus Makrophagen (90 %) und einigen T-Lymphozyten (10 %), wobei mehr CD8-positive Zellen vertreten waren als CD4-positive Zellen ( $CD4/CD8 = 0,75$ ). Das Überwiegen der Makrophagen im Zellinfiltrat der Media scheint ein charakteristisches Merkmal in der xenogenen Abstoßung zu sein und wurde noch in weiteren Studien beobachtet (Scheringa 1996). Hier waren die T-Zellen nur in geringer Anzahl in der Media vertreten, und keine B-Zellen konnten nachgewiesen werden (Scheringa 1996). Wie in dieser Forschungsarbeit waren also auch dort die ED1-positiven Zellen die dominierende Zellpopulation im Infiltrat der Mediaschicht.

Allaire et al. hatten auch bemerkt, dass mit der Invasion der Makrophagen eine zunehmende Zerstörung der elastischen Lamellen der Gefäßmedia auftrat, wodurch es später zu einer dichten kollagenen Fibrose in diesen Bereichen kam (Allaire 1996). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit, da auch hier eine vermehrte Kollagenablagerung in den destruierten Bereichen der Media festgestellt worden ist. Zusätzlich wurde in dieser konkordanten Kombination bemerkt, dass mit der zunehmenden Infiltration von monozytären Zellen eine Verminderung an glatten Muskelzellen in der Gefäßmedia einher ging (Allaire 1996). Zwischen dem 15. und 30.

Tag nach Transplantation verschwanden die glatten Muskelzellen vollständig aus der Media. In einer anderen Forschungsarbeit zeigte sich die Destruktion der elastischen Lamellen am markantesten am 28. Tag nach Transplantation, und ab dem 21. Tag verschwanden zunehmend die glatten Muskelzellen aus der Media (Scheringa 1996).

Die Infiltration von Immunzellen in die Gefäßmedia scheint eine spezielle Eigenschaft der arteriellen xenogenen Abstoßung zu sein, da diese bei den entsprechenden allogenen Aortentransplantationsmodellen in Ratten nicht auftritt, obwohl es ebenfalls zu einer Medianekrose kommt (Plissonnier 1995). Zusätzlich konnte in diesem allogenen Modell eine signifikante Korrelation zwischen chronischer Infiltration von Immunzellen in der Adventitia und der Medianekrose festgestellt werden (Plissonnier 1993).

In dieser Forschungsarbeit tendierte die Gefäßmedia in stark zerstörten Transplantaten der unbehandelten Gruppe zu einem größeren Durchmesser, jedoch kam es nicht zu einem signifikanten Unterschied zu den Präparaten der syngenen Gruppe. Scheringa et al. haben ebenfalls im gleichen Transplantationsmodell nur eine leichte Zunahme des Media-Durchmessers, ohne signifikante Bedeutung, bis zum 56. Tag nach Transplantation festgestellt, begleitet von einem beträchtlichen Verlust an glatten Muskelzellen (Scheringa 1994). Eine Verdickung der Intima war erst am 21. Tag ersichtlich und führte am 56. Tag zum Verschluss des Gefäßes durch die Bildung einer Neointima (Scheringa 1994). Da diese Doktorarbeit sich nur mit den Gefäßveränderungen bis zum 14. Tag nach Transplantation im konkordanten Xenotransplantationsmodell beschäftigt hat, wurde hier eine derartige Bildung einer Neointima nicht festgestellt, da diese sich anscheinend nach diesem Zeitraum ausbildet, wie auch andere Studien bestätigen (Briffa 2004, Allaire 1996).

Es lässt sich also sagen, dass die akute zelluläre xenogene Abstoßung der allogenen zellulären Reaktion ähnelt und sich hauptsächlich durch die Zusammensetzung des entstandenen Infiltrats in der Adventitia und die Infiltration von Immunzellen in die Media von dieser unterscheidet (Plissonnier 1995).

Abschließend lässt sich sagen, dass in diesem Xenotransplantationsmodell alle drei Immunsuppressiva die akute zelluläre xenogene Abstoßung beeinflussen konnten. Allerdings erwies sich Tacrolimus sowohl in niedriger Dosierung als auch im Hochdosisbereich als effektivste Substanz, um diese Phase der xenogenen Abstoßung abzuwenden, im Vergleich zu FK778 und Sirolimus. Keines der anderen beiden

Medikamente zeigte eine so starke Wirkung gegen die zelluläre Immunreaktion und auch die Gefäßstruktur war in diesen Transplantaten am besten erhalten. In anderen Forschungsarbeiten wurde gezeigt, dass eine wirksame Beeinflussung der xenogenen Abstoßung mit Tacrolimus erreicht werden kann, allerdings wurde meist nur in Kombination mit anderen Substanzen ein Langzeitüberleben erzielt (Murase 1993). Sogar im Niedrigdosisbereich in Verbindung mit antiproliferativen Medikamenten konnte, im Vergleich zu anderen Substanzen, ein signifikant verlängertes Überleben der xenogenen Herztransplantate bewirkt werden (Ginestá 2002). In einer Forschungsarbeit von Krook et al., in der xenogene Inselzelltransplantate von fetalen Schweinen in Lewis-Ratten transplantiert wurden, konnte Tacrolimus allein in einer Dosierung von 0,5 mg/kg und 1 mg/kg die xenogene Abstoßung verhindern und zeigte in diesem Modell die beste Wirksamkeit im Vergleich zu Cyclosporin A in verschiedenen Kombinationstherapien (Krook 2002). Hier wurde auch gezeigt, dass der protektive Effekt von Tacrolimus durch die Hinzugabe von Prednisolon teilweise aufgehoben werden konnte.

Obwohl die MNAs eine privilegierte Rolle in der Xenotransplantation spielen sollen (Waer 2001, Schorlemmer 1998 [A]), konnte in dieser Doktorarbeit nur eine mäßige Kontrolle der akuten zellulären xenogenen Abstoßung durch FK778 als Monotherapie im Vergleich zu Tacrolimus erzielt werden. MNAs besitzen jedoch synergistische Effekte mit mehreren Substanzen. In Kombination mit ineffektiven Dosen von Cyclosporin A zeigte sich ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben (Schorlemmer 1998 [A]). Ähnliches gilt auch für die Kombination von FK778 und Mykophenolat Mofetil im Niedrigdosisbereich, bei hohen Dosierungen zeigte sich ein antagonistischer Effekt mit einem erhöhten Auftreten von Nebenwirkungen (Deuse 2003). Bei der Verwendung von Tacrolimus mit FK778 bzw. MNAs wurde weiterhin ein dosisabhängiger Synergismus bestätigt (Deuse 2004 [A], Bilolo 2003, Schorlemmer 1998 [B]). In dieser Studie konnte jedoch keine Wirkungssteigerung in der Abwendung der zellulären Reaktion durch die Kombination von Tacrolimus und FK778 erreicht werden. Anscheinend waren die Ergebnisse mit Tacrolimus allein schon so ausgeprägt, dass keine weitere Verbesserung in diesem Modell mehr möglich war.

Sirolimus als Monotherapie zeigt in konkordanten Versuchsreihen nur eine geringe Verlängerung des Xenotransplantatüberlebens (Brazelton 1997, Alexander 1994, Chen

1992), es erscheint allerdings wirksamer als Cyclosporin A (Hale 1997). Die Kombinationstherapie von Sirolimus und Cyclosporin A erweist sich jedoch als wesentlich effektiver, um die xenogene Abstoßung zu verhindern (Alexander 1994). Durch die Kombinationstherapie von Sirolimus und FK778 in dieser Doktorarbeit konnte ebenfalls die Wirkung, zumindest in hochdosierter Form, auf die zelluläre Reaktion der xenogenen Abstoßung verbessert werden, im Vergleich zu ihren Monotherapien.

Diese Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zur Wirksamkeit der Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und FK778 und deren Kombinationsbenefit in der Phase der akuten zellulären xenogenen Abstoßung. Während Tacrolimus sich als potenteste Substanz erwies, um diese Art der Abstoßung zu verzögern, zeigte FK778 eine vergleichbare Wirksamkeit wie Sirolimus.

## **5. Zusammenfassung**

Die Transplantation von Organen dient als geeignete Therapieoption für Patienten mit terminalen Organversagen (Furukawa 2004, Pierson 2004, Wynn 2004). Durch die Xenotransplantation besteht die Hoffnung, den weltweiten Organmangel für Organtransplantationen zu beseitigen.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit einer speziellen Phase der xenogenen Abstoßung, der akuten zellulären Abstoßung. Hierzu wurde das etablierte konkordante Xenotransplantationsmodell in der Kombination Hamster und Lewis-Ratte verwendet (Briffa 2004, Allaire 1996, Scheringa 1996), um die zellulären Vorgänge und die Veränderungen in der Gefäßstruktur besser verstehen zu können. In diesem Versuchsmodell sind keine präformierten Antikörper vorhanden (Chaline 1994). Anscheinend erreicht die zelluläre Reaktion im konkordanten Modell um den 14. Tag nach Transplantation sein Maximum (Briffa 2004, Brouard 1998, Reichensperner 1997).

Die H.E.-Färbung diente als Übersichtsfärbung. Um das entstandene Infiltrat nach diesem Zeitraum genauer untersuchen zu können, wurden spezielle immunhistochemische Färbungen angefertigt. Dadurch konnte man ED1-positive Makrophagen und CD4-positive (T-Helferzellen) und CD8-positive T-Lymphozyten (Suppressor und zytotoxische Lymphozyten) voneinander unterscheiden. Die Gefäßstruktur wurde mit Hilfe der alpha-Actin- und Trichrom-Färbung analysiert. Zusätzlich wurde die Wirkung der Immunsuppressiva FK778, Sirolimus und Tacrolimus auf diese Art der xenogenen Abstoßung untersucht.

Es zeigte sich in der nicht-therapierten Gruppe ein ausgeprägtes Infiltrat, hauptsächlich in der Adventitia, welches zu einer extremen Vergrößerung des Adventitia-Durchmessers im Vergleich zur syngenen Gruppe führte. In der Media waren ebenfalls einige Immunzellen vorhanden, die anscheinend von luminal in diese Schicht eingewandert sind. Während diese in der Adventitia gleichmäßig in ED1-, CD4- und CD8-positive Zellen aufgeteilt waren, überwogen in der Media die Makrophagen. In der Media kam es zu einem ausgiebigen Verlust an glatten Muskelzellen, zur Auflockerung der elastischen Lamellen und zur verstärkten Kollagenablagerung mit gesteigerter proliferativer Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen

anderer Studien mit ähnlichen xenogenen Transplantationsmodellen (Briffa 2004, Allaire 1996, Scheringa 1994).

FK778 und Sirolimus konnten als hochdosierte Monotherapie und besonders in Kombination die akute zelluläre xenogene Abstoßung beeinflussen. Im Vergleich hierzu wurde jedoch durch Tacrolimus die zelluläre Reaktion am effektivsten unterdrückt, und die Gefäßstruktur war in diesen Transplantaten am besten erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Reaktion in dieser Phase anscheinend durch die hohe Effektivität von Tacrolimus beeinflussbar ist.

Diese gewonnenen Erkenntnisse liefern einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der akuten zellulären xenogenen Abstoßung und deren medikamentöse Beeinflussung.

## **6. Literaturverzeichnis**

**Aagaard-Tillery-KM**, Jelinek-DF: Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by Rapamycin. *Cell Immunol* 1994, 156:493-507.

**Ahn-C**, Kim-JY, Lee-BC, Kang-SK, Lee-JR, Hwang-WS: The Past, Present, and Future of Xenotransplantation. *Yonsei Med J* 2004, 45(6):1017-24.

**Alexander-JW**, Masroor-S, Levy-A, Galla-K: A new strategy for prolonging xenograft survival. *Transplantation* 1994, 58(1):14-17.

**Allaire-E**, Mandet-C, Bruneval-P, Bensenane-S, Becquemin-JP, Michel-JB: Cell and extracellular matrix rejection in arterial concordant and discordant xenografts in the rat. *Transplantation* 1996, 62(6):794-803.

**Alter-BJ**, Bach-FH: Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J Exp Med* 1990, 171:333-38.

**Auchincloss-H Jr.**: Cell-mediated xenoresponses: Strong or weak? *Clin Transplantation* 1994, 8:155-59.

**Auchincloss-H Jr.**: Xenogeneic Transplantation: A review. *Transplantation* 1988, 46:1-20.

**Azuma-H**, Tilney-NL: Immune and nonimmune mechanisms of chronic rejection of kidney allografts. *J Heart Lung Transplant* 1995, 14:S136-42.

**Bach-FH**: Xenotransplantation: Problems and prospects. *Annu Rev Med* 1998, 49:301-10.

**Bach-FH**, Ferran-C, Hechenleitner-P, Mark-W, Koyamada-N, Miyatake-T, Winkler-H, Badrichani-A, Candinas-D, Hancock-WW: Accommodation of vascularized xenografts: Expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 1997, 3(2):196-204.

**Bach-FH**, Winkler-H, Ferran-C, Hancock-WW, Robson-SC: Delayed xenograft rejection. *Immunol Today* 1996, 17(8):379-84.

**Bailey-LL**, Nehlsen-Cannarella-SL, Concepcion-W, Jilley-WB: Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 1985, 254(23):3321-29.

**Baran-DA**, Galin-I, Sandler-D, Segura-L, Cheng-J, Courtney-MC, Correa-R, Chan-M, Fallon-JT, Spielvogel-D, Lansman-SL, Gass-AL: Tacrolimus in cardiac transplantation: Efficacy and safety of a novel dosing protocol. *Transplantation* 2002, 74(8):1136-41.

**Barnard-CN:** What we have learned about heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968, 56(4):457-68.

**Batts-KP:** Acute and chronic hepatic allograft rejection: Pathology and classification. *Liver Transpl Surg* 1999, 5(4), Suppl 1:21S-29S.

**Beretta-L, Gingras-AC, Svitkin-YV, Hall-MN, Sonenberg-N:** Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996, 15(3):658-64.

**Bilolo-KK, Ouyang-J, Wang-X, Zhu-S, Jiang-W, Qi-S, Xu-D, Hebert-MJ, Bekersky-I, Fitzsimmons-WE, Chen-H:** Synergistic effects of Malononitrilamides (FK778, FK779) with Tacrolimus (FK506) in prevention of acute heart and kidney allograft rejection and reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* 2003, 75(11):1881-87.

**Blakely-ML, van der Werf-WJ, Berndt-MC, Dalmaso-AP, Bach-FH, Hancock-WW:** Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1994, 58(10):1059-66.

**Bouwman-E, de Bruin-RWF, Jeekel-J, Marquet-RL:** Recipient pre-treatment permits long-term xenograft survival on a relatively low dose cyclosporine maintenance therapy. *Transplant Proc* 1992, 24(2):519-20.

**Bravery-CA, Batten-P, Yacoub-MH, Rose-ML:** Direct recognition of SLA- and HLA-like class II antigens on porcine endothelium by human T cells results in T cell activation and release of Interleukin-2. *Transplantation* 1995, 60(9):1024-33.

**Brazelton-TR, Cheung-A, Morris-RE:** Pharmacologic immunosuppressants in xenotransplantation. In: Cooper-DKC (Hrsg): *Xenotransplantation: The Transplantation of organs and tissues between species*. Springer 1997, Berlin, pp 602-33.

**Briffa-NP, Shorthouse-R, Chan-J, Silva-H, Billingham-M, Brazelton-T, Morris-RE:** Histological and immunological characteristics of, and the effect of immunosuppressive treatment on, xenograft vasculopathy. *Xenotransplantation* 2004, 11:149-59.

**Brouard-S, Blanche-G, Moreau-A, Heslan-JM, Cuturi-MC, Souillou-JP:** Long-term survival of hamster-to-rat cardiac xenografts in the absence of a TH2 shift. *Transplantation* 1998, 65(12):1555-63.

**Brouard-S, Gagne-K, Blanche-G, Souillou-JP:** T cell response in xenorecognition and xenografts: A review. *Hum Immunol* 1999, 60:455-68.

**Brown-RS**, Rush-SH, Rosen-HR, Langnas-AN, Klintmalm-GB, Hanto-DW, Punch-JD: Liver and intestine transplantation. *Am J Transplant* 2004, 4, Suppl. 9: 81-92.

**Brunn-GJ**, Hudson-CC, Sekulic-A, Williams-JM, Hosoi-H, Houghton-PJ, Lawrence-JC Jr., Abraham-RT: Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of Rapamycin. *Science* 1997, 277:99-101.

**Camardo-J**: The Rapamune era of immunosuppression 2003: The journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc* 2003, 35, Suppl. 3A:18S-24S.

**Candinas-D**, Belliveau-S, Koyamada-N, Miyatake-T, Hechenleitner-P, Mark-W, Bach-FH, Hancock-WW: T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* 1996, 62(12):1920-27

**Chaline-J**, Cardoso-J, Houssin-D: Organ xenografting between rodents: an evolutionary perspective. *Transpl Int* 1994, 7:216-22.

**Chen-H**, Xu-D, Wu-J, Daloz-P: Prolongation of hamster to rat xenograft survival by Rapamycin. *Transplant Proc* 1992, 24(2):715-16.

**Cooper-DKC**: Christiaan Barnard and his contribution to heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001, 20:599-610.

**Deuse-T**, Schrepfer-S, Reichenspurner-H: Immunosuppression with FK778 and Mycophenolate Mofetil in a rat cardiac transplantation model. *Transplantation* 2003, 76(11): 1627-29.

**Deuse-T**, **Schrepfer-S**, Koch-Nolte-F, Haddad-M, Schäfer-H, Detter-C, Reichenspurner-H: Sirolimus and FK778: A comparison of two anti-proliferative immunosuppressants for prevention of experimental obliterative airway disease. *Transplant Int* 2006, 19:310-18.

**Deuse-T**, Schrepfer-S, Schäfer-H, Koch-Nolte-F, Schwedhelm-E, Böger-RH, Reichenspurner-H: FK778 attenuates lymphocyte-endothelium interaction after cardiac transplantation: In vivo and in vitro studies. *Transplantation* 2004 [B], 78(1):71-77.

**Deuse-T**, Schrepfer-S, Reichenspurner-H: The interaction between FK778 and Tacrolimus in the prevention of rat cardiac allograft rejection is dose dependent. *Transplantation* 2004 [A], 77(4):509-13.

**Diekmann-F**, Gutierrez-Dalmau-A, Vicente Torregrosa-J, Oppenheimer-F, Campistol-JM: Sirolimus monotherapy: Feasible immunosuppression for long-term follow-up of kidney transplantation – A pilot experience. *Transplantation* 2005, 80(9):1344-48.

**DiSesa-VJ**: Cardiac xenotransplantation. *Ann Thorac Surg* 1997, 64:1858-65.

**Dumont-FJ**, Staruch-MJ, Koprak-SL, Melino-MR, Sigal-NH: Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and Rapamycin. *J Immunol* 1990, 144(1):251-58.

**Dumont-FJ**, Su-Q: Mechanism of action of the immunosuppressant Rapamycin. Minireview. *Life Sciences* 1996, 58(5):373-95.

**Eurotransplant International Foundation Annual Report**. 2005

**Evans-RW**, Orians-CE, Ascher-NL: The Potential Supply of Organ Donors: An assessment of the Efficiency of Organ Procurement Efforts in the United States. *JAMA* 1992, 257:239-46.

**Fawcett-J**, Johnson-DW: FK778: A powerful immunosuppressive, But will it really be good for you?. *Transplantation* 2004, 78(1):7-8.

**First-MR**, Fitzsimmons-WE: New drugs to improve transplant outcomes. *Transplantation* 2004, 77(9):S88-92.

**Fitzsimmons-WE**, First-MR: FK778, a synthetic Malononitrilamide. *Yonsei Med J* 2004, 45(6):1132-35.

**Fodor-WL**, Williams-BL, Matis-LA, Madri-JA, Rollins-SA, Knight-JW, Velandar-W, Squinto-SP: Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:11153-57.

**Furukawa-H**, Todo-S: Evolution of immunosuppression in liver transplantation: Contribution of Cyclosporine. *Transplant Proc* 2004, 36, Suppl. 2S: 274S-84S.

**Galili-U**, Clark-MR, Shohet-SB, Buehler-J, Macher-BA: Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:1369-73.

**Galili-U**, Shohet-SB, Kobrin-E, Stults-CLM, Macher-BA: Man, apes, and Old World Monkeys differ from other mammals in the expression of  $\alpha$ -Galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988, 263:17755-62.

**Gambiez-L**, Salame-E, Chereau-C, Calmus-Y, Cardoso-J, Ayani-E, Houssin-D, Weill-B: The role of natural IgM in the hyperacute rejection of discordant heart xenografts. *Transplantation* 1992, 54(4):577-83.

**Ginestá-MM**, Ribas-Y, Mollevi-DG, Vidal-A, Mañez-R, Figueras-J, Jaurrieta-E: Acute xenograft rejection, late xenograft rejection and long term survival xenografts in the hamster-to-rat heart transplantation model: Histological characterisation under low-dose of FK506. *APMIS* 2002, 110:737-45.

**Goodman-DJ.**, von Albertini-M, Willson-A, Millan-MT, Bach-FH: Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation* 1996, 61(5):763-71.

**Goto-T**, Kino-T, Hatanaka-H, Okuhara-M, Kohsaka-M, Aoki-H, Imanaka-H: FK 506: Historical perspectives. *Transplant Proc* 1991, 23(6):2713-17.

**Graves-LM**, Bornfeldt-KE, Argast-GM, Krebs-EG, Kong-X, Lin-TA, Lawrence-JC Jr.: cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1995, 92:7222-26.

**Häyry-P**: Pathophysiology of chronic rejection. *Transplant Proc* 1996, 28(6), Suppl. 1:7-10.

**Häyry-P**, Mennander-A, Yilmaz-S, Ustinov-J, Räisänen-A, Miettinen-A, Lautenschlager-I, Lemström-K, Bruggeman-CA, Paavonen-T: Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. *Clin Investig* 1992, 70:780-90.

**Hale-DA**, Gottschalk-R, Fukuzaki-T, Wood-ML, Maki-T, Monaco-AP: Superiority of Sirolimus (Rapamycin) over Cyclosporine in augmenting allograft and xenograft survival in mice treated with antilymphocyte serum and donor-specific bone marrow. *Transplantation* 1997, 63(3):359-64.

**Halloran-PF**: Rethinking immunosuppression in terms of the redundant and nonredundant steps in the immune response. *Transplant Proc* 1996, 28(6), Suppl.1:11S-18S.

**Hancock-WW**: Delayed xenograft rejection. *World J Surg* 1997, 21:917-23.

**Hardy-JD**, Chavez-CM: The first heart Transplantation in man. Developmental animal investigations with analysis of the 1964 case in the light of current clinical experience. *Am J Cardiol* 1968, 22:772-81.

**Hasan-R**, van den Bogaerde-JB, Wallwork-J, White-DJG: Evidence that long-term survival of concordant xenografts is achieved by inhibition of antispecies antibody production. *Transplantation* 1992, 54(3):408-13.

**Huang-S**, Bjornsti-MA, Houghton-PJ: Rapamycins. Mechanism of action and cellular resistance. Review. *Cancer Biol Ther* 2003, 2(3):222-32.

**Iwatsuki-S**, Starzl-TE, Todo-S, Gordon-RD, Esquivel-CO, Tzakis-AG, Makowka-L, Marsh-JW, Koneru-B, Stieber-A, Klintmalm-G, Husberg-B: Experience in 1000 liver transplants under Cyclosporine-Steroid therapy: A survival report. *Transplant Proc* 1988, 20(1), Suppl.1:498-504.

**Izbicki-G**, Shitrit-D, Aravot-D, Sulkes-J, Saute-M, Sahar-G, Kramer-MR: Improved survival after lung transplantation in patients treated with Tacrolimus/Mycophenolate Mofetil as compared with Cyclosporine/Azathioprine. *Transplant Proc* 2002, 34:3258-59.

**Jefferies-HBJ**, Fumagalli-S, Dennis-PB, Reinhard-C, Pearson-RB, Thomas-G: Rapamycin suppresses 5' Top mRNA translation through inhibition of p70S6k. *EMBO J* 1997, 16(12):3693-704.

**Jin-MB**, Nakayama-M, Ogata-T, Fujita-M, Mino-K, Taniguchi-M, Suzuki-T, Shimamura-T, Furukawa-H, Todo-S: A novel leflunomide derivative, FK778, for immunosuppression after kidney transplantation in dogs. *Surg* 2002, 132(1):72-79.

**Kahan-BD**, for the Rapamune US Study Group: Efficacy of Sirolimus compared with Azathioprine for the reduction of acute renal allograft rejection: A randomised multicentre study. *Lancet* 2000, 356:194-202.

**Kapturczak-MH**, Meier-Kriesche-HU, Kaplan-B: Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004, 36(Suppl 2S):S25-32.

**Ketzler-K**: Organspende in Deutschland. *Langenbecks Arch Chir Suppl II* (Kongreßbericht 1996).

**Kobayashi-T**, Tanigushi-S, Neethling-FA, Rose-AG, Hancock-WW, Ye-Y, Niekrasz-M, Kosanke-S, Wright-LJ, White-DJG, Cooper-DKC: Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* 1997, 64(9):1255-61.

**Kreijveld-E**, Koenen-HJPM, Hilbrands-LB, van Hooff-HJP, Joosten-I: The immunosuppressive drug FK778 induces regulatory activity in stimulated human CD4+CD25- T cells. *Blood* 2007, 109(1):244-52.

**Krook-H**, Wennberg-L, Hagberg-A, Song-Z, Groth-CG, Korsgren-O: Immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation: a tool for gaining further insights in the mechanisms of the rejection process. *Transplantation* 2002, 74(8):1084-89.

**Kurrle-R**, Bartlett-R, Ruuth-E, Lauffer-L, Schorlemmer-HU: Malononitrilamides inhibit T- and B-cell responsiveness. *Transplant Proc* 1996, 28(6):3053-56.

**Kurrle-R**, Ruuth-E, Bartlett-R, Lauffer-L, Schorlemmer-HU: Malononitrilamides inhibit T- and B-cell responsiveness in different species. *Transplant Proc* 1997, 29:1302-03.

**Lai-JH**, Tan-TH: CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  which can be prevented by the immunosuppressant Rapamycin. *J Biol Chem* 269(48):30077-80.

**Leventhal-JR**, John-R, Fryer-JP, Witson-JC, Derlich-JM, Remiszewski-J, Dalmaso-AP, Matas-AJ, Bolman-RM: Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoabsorption: Results of in vitro and in vivo studies. *Transplantation* 1995, 59(2):294-300.

**Lin-SS**, Hanaway-MJ, Gonzalez-Stawinski-GV, Lau-CL, Parker-W, Davis-RD, Byrne-GW, Diamond-LE, Logan-JS, Platt-JL: The role of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* 2000, 70(12):1667-74.

**Lin-Y**, Soares-MP, Sato-K, Takigami-K, Csizmadia-E, Anrather-J, Bach-FH: Rejection of cardiac xenografts by CD4+ or CD8+ T cells. *J Immunol* 1999 [A], 162:1206-14.

**Lin-Y**, Soares-MP, Sato-K, Takigami-K, Csizmadia-E, Smith-N, Bach-FH: Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. *J Immunol* 1999 [B], 163:2850-57.

**Lin-Y**, Vandeputte-M, Waer-M: Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J Immunol*, 1997, 158:5658-67.

**Lindenfeld-J**, Miller-GG, Shakar-SF, Zolty-R, Lowes-BD, Wolfel-EE, Mestroni-L, Page-RL 2nd, Kobashigawa-J: Drug therapy in the heart transplant recipient: Part I: Cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004, 110:3734-40.

**Logan-JS**: Prospects for xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* 2000, 12:563-68.

**MacDonald-AS**, for the Rapamune Global Study Group: A worldwide, phase III, randomised, controlled, safety and efficacy study of a Sirolimus/Cyclosporine regimen for the prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001, 71(2):271-80.

**Martins-L**, Ventura-A, Branco-A, Carvalho-MJ, Henriques-AC, Dias-L, Sarmento-AM, Amil-M: Cyclosporine versus Tacrolimus in kidney Transplantation: Are there differences in nephrotoxicity?. *Transplant Proc* 2004, 36:877-79.

**McCaffrey-PG**, Perrino-BA, Soderling-TR, Rao-A: NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for Calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 1993, 268(5):3747-52.

**McCurry-KR**, Kooyman-DL, Alvarado-CG, Cotterell-AH, Martin-MJ, Logan-JS, Platt-JL: Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995, 1(5):423-27.

**McCurry-KR**, Parker-W, Cotterell-AH, Weidner-BC, Lin-SS, Daniels-LJ, Holzknicht-ZE, Byrne-GW, Diamond-LE, Logan-JS, Platt-JL: Humoral Responses to pig-to-baboon cardiac Transplantation: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Acute Vascular Rejection and for Accomodation. *Hum Immunol* 1997, 58:91-105.

**McGregor-CGA**, Davies-WR, Oi-K, Teotia-SS, Schirmer-JM, Risdahl-JM, Tazelaar-HD, Kremers-WK, Walker-RC, Byrne-GW, Logan-JS: Cardiac xenotransplantation: Recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005, 130:844-51.

**Millan-MT**, Geczy-C, Stuhlmeier-KM, Goodman-DJ, Ferran-C, Bach-FH: Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-Selectin, Interleukin-8, Monocyte Chemoattractant Protein-1, and Plasminogen Activator Inhibitor-Type-1 expression. *Transplantation* 1997, 63(3):421-29.

**Miyagawa-S**, Hirose-H, Shirakura-R, Naka-Y, Nakata-S, Kawashima-Y, Seya-T, Matsumoto-M, Uenaka-A, Kitamura-H: The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1988, 46(6):825-30.

**Molnar-Kimber-KL:** Mechanism of action of Rapamycin (Sirolimus, Rapamune). *Transplant Proc* 1996, 28(2):964-9.

**Morris-RE:** In vivo immunopharmacology of the Macrolides FK 506 and Rapamycin: Towards the era of rational immunosuppressive drug discovery, development, and use. *Transplant Proc* 1991, 23(6):2722-24.

**Moses-RD, Auchincloss-H Jr.:** Mechanism of cellular xenograft rejection. In: Cooper-DKC (Hrsg): *Xenotransplantation: The Transplantation of organs and tissues between species*. Springer 1997, Berlin, pp 141-74.

**Murase-N, Starzl-TE, Demetris-AJ, Valdivia-L, Tanabe-M, Cramer-D, Makowka-L:** Hamster-to-rat heart and liver xenotransplantation with FK506 plus antiproliferative drugs. *Transplantation* 1993, 55(4):701-08.

**Nourse-J, Firpo-E, Flanagan-WM, Coats-S, Polyak-K, Lee-MH, Massague-J, Crabtree-GR, Roberts-JM:** Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by Rapamycin. *Nature* 1994, 372:570-3.

**Nungaray-N, Arriola-M, Gutierrez-MJ, Oliva-E, Hernández-E, Gonzalez-E, Andres-A, Morales-JM:** Rapamycin at six years can exhibit normal renal function without proteinuria or neoplasia after renal transplantation. A single-center experience. *Transplant Proc* 2005, 37:3727-28.

**O'Grady-JG, Burroughs-A, Hardy-P, Elbourne-D, Truesdale-A, et al.:** Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002, 360:1119-25.

**Pan-F, Ebbs-A, Wynn-C, Erickson-L, Jang-MS, Crews-G, Fisniku-O, Kobayashi-M, Paul-LC, Benediktsson-H, Jiang-H:** FK778, a powerful new immunosuppressant, effectively reduces functional and histologic changes of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2003, 75(8):1110-14.

**Phelps-CJ, Koike-C, Vaught-TD, Boone-J, Wells-KD, Chen-SH, Ball-S, Specht-SM, Polejaeva-IA, Monahan-JA, Jobst-PM, Sharma-SB, Lamborn-AE, Garst-AS, Moore-M, Demetris-AJ, Rudert-WA, Bottino-R, Bertera-S, Trucco-M, Starzl-TE, Dai-Y, Ayares-DL:** Production of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science* 2003, 299:411-14.

**Pierson-RN III, Barr-ML, McCullough-KP, Egan-T, Garrity-E, Jessup-M, Murray-S:** Thoracic organ transplantation. *Am J Transplant* 2004, 4(Suppl. 9): 93-105.

**Pirenne-J**, Aerts-R, Koshiba-T, Van Gelder-F, Roskams-T, Schetz-M, Verhaegen-M, Lauwers-P, Fevery-J, Nevens-F: Steroid-free immunosuppression during and after liver transplantation – a 3-yr follow-up report. *Clin Transplant* 2003, 17:177-82.

**Platt-JL**, Fischel-RJ, Matas-AJ, Reif-SA, Bolman-RM, Bach-FH: Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 1991, 52(2):214-20.

**Platt-JL**, Vercelotti-GM, Dalmaso-AP, Matas-AJ, Bolman-RM, Najarian-JS, Bach-FH: Transplantation of discordant xenografts: A review of progress. *Immunol Today* 1990, 12:450-56.

**Plissonnier-D**, Amichot-G, Lecagneux-J, Duriez-M, Gentric-D, Michel-JB: Additive and synergistic effects of low-molecular-weight, heparin-like molecule and low doses of cyclosporin in preventing arterial graft rejection in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13:112-19.

**Plissonnier-D**, Nochy-D, Poncet-P, Mandet-C, Hinglais-N, Bariety-J, Michel-JB: Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995, 60(5):414-24.

**Pruitt-SK**, Bollinger-RR, Collins-BH, Marsh-HC, Levin-JL, Rudolph-AR, Baldwin-WM, Sanfilippo-F: Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 1997, 63(6):900-14.

**Reemtsma-K**: Heterotransplantation. *Transplant Proc* 1969, 1(1):251-55

**Reemtsma-K**, McCracken-BH, Schlegel-JU, Pearl-MA, Pearce-CW, DeWitt-CW, Smith-PE, Hewitt-RL, Flinner-RL, Creech-O: Renal Heterotransplantation in man. *Ann Surg* 1964, 160(3):384-410.

**Reichenspurner-H**, Kur-F, Treede-H, Meiser-BM, Deutsch-O, Welz-A, Vogelmeier-C, Schwaiblmair-M, Müller-C, Fürst-H, Briegel-J, Reichart-B: Optimization of the immunosuppressive protocol after lung transplantation. *Transplantation* 1999, 68(1):67-71.

**Reichenspurner-H**, Soni-V, Nitschke-M, Berry-GJ, Brazelton-TR, Shorthouse-R, Huang-X, Reitz-BA, Morris-RE: Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: Pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents. *Transplantation* 1997, 64(3):373-83.

**Rydberg-L**, Hallberg-E, Björck-S, Magnusson-S, Strokan-V, Samuelsson-BE, Breimer-ME: Studies on the removal of anti-pig xenoantibodies in the human by plasmapheresis/immunoabsorption. *Xenotransplantation* 1995, 2:253-63.

**Sabers-CJ**, Martin-MM, Brunn-GJ, Williams-JM, Dumont-FJ, Wiederrecht-G, Abraham-RT: Isolation of a protein target of the FKBP12-Rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995, 270(2):815-22.

**Sandrin-MS**, Vaughan-HA, Dabkowski-PL, McKenzie-IFC: Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal( $\alpha$ 1-3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:11391-95.

**Saunders-RN**, Metcalfe-MS, Nicholson-ML: Rapamycin in transplantation: A review of evidence. *Kidney Int* 2001, 59:3-16.

**Savikko-J**, von Willebrand-E, Häyry-P: Leflunomide analogue FK778 is vasculoprotective independent of its immunosuppressive effect: potential applications for restenosis and chronic rejection. *Transplantation* 2003, 76(3):455-58.

**Sayegh-MH**, Carpenter-CB: Transplantation 50 years later – Progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004, 351(26):2761-6.

**Scheringa-M**, Buchner-B, de Bruin-RWF, Geerling-RA, Melief-MJ, Mulder-AH, Schraa-EO, Ijzermans-JNM, Marquet-RL: Chronic rejection of concordant aortic xenografts in the hamster-to-rat model. *Transplant Immunol* 1996, 4:192-97.

**Scheringa-M**, Buchner-B, Geerling-RA, de Bruin-RWF, Schraa-EO, Bouwman-E, Ijzermans-JNM, Marquet-RL: Chronic rejection after concordant xenografting. *Transplant Proc* 1994, 26(3):1346-47.

**Schorlemmer-HU**: Development of a novel drug for transplantation: Current results and future perspectives. *Transplant Proc* 2001, 33:2425-28.

**Schorlemmer-HU**, Bartlett-R, Kurrle-R: Malononitrilamides: A new strategy of immunosuppression for Allo- and Xenotransplantation. *Transplant Proc* 1998 [A], 30:884-90.

**Schorlemmer-HU**, Bartlett-RR, Lindner-JK, Kurrle-R: Long-term allograft survival and tolerance induction by the synergistic activity of Malononitrilamides and Tacrolimus. *Transplant Proc* 1998 [B], 30:4099-103.

**Schorlemmer-HU**, Kurrle-R: Combination therapy of Malononitrilamides and Tacrolimus (FK506) induced long-term xenograft survival. *Transplant Proc* 1998 [C], 30:4170-73.

**Schorlemmer-HU**, Kurrle-R: Malononitrilamides reduce IgM and IgG xenoantibodies and prolong skin xenograft survival in a mouse-to rat model. *Transplant Proc* 1998 [D], 30:976-79.

**Schreier-MH**, Baumann-G, Zenke-G: Inhibition of T-cell signalling pathways by immunophilin drug complexes: Are side effects inherent to immunosuppressive properties?. *Transplant Proc* 1993, 25(1):502-07.

**Schrepfer-S**, Deuse-T, Koch-Nolte-F, Detter-C, Reichensperner-H: FK778: New cellular and molecular mechanism of action. *Transplant Proc* 2006, 38:757-61.

**Sebille-F**, Guillet-M, Brouard-S, Gagne-K, Petzold-T, Blancho-G, Vanhove-B, Souillou-JP: T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant* 2001, 1:21-28.

**Sehgal-SN**: Sirolimus: Its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003, 35(Suppl. 3A):7S-14S.

**Sehgal-SN**: Rapamune (RAPA, Rapamycin, Sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998, 31(5):335-40.

**Silva-HT**, Morris-RE: Leflunomide and Malononitrilamides. *Am J Med Sci* 1997, 313(5):289-301.

**Shen-J**, Chong-ASF, Xiao-F, Liu-W, Huang-W, Blinder-L, Foster-P, Sankary-H, Jensik-S, McChesney-L, Mital-D, Williams-JW: Histological characterization and pharmacological control of chronic rejection in xenogeneic and allogeneic heart transplantation. *Transplantation* 1998, 66(6):692-98.

**Starzl-TE**, Groth-CG, Brettschneider-L, Penn-I, Fulginiti-VA, Moon-JB, Blanchard-H, Martin-AJ Jr., Porter-KA: Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968, 168(3):392-415.

**Starzl-TE**, Klintmalm-GBG, Porter-KA, Iwatsuki-S, Schröter-GPJ: Liver transplantation with use of Cyclosporin A and Prednisone. *N Engl J Med* 1981, 305(5):266-69.

**Steele-DM**, Hullett-DA, Bechstein-WO, Kowalski-J, Smith-LS, Kennedy-E, Allison-AC, Sollinger-HW: Effects of immunosuppressive therapy on the rat aortic allograft model. *Transplant Proc* 1993, 25(1):754-55.

**Tanigushi-S**, Neethling-FA, Korchagina-EY, Bovin-N, Ye-Y, Kobayashi-T, Niekrasz-M, Li-S, Koren-E, Oriol-R, Cooper-DKC: In vivo immunoadsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal $\alpha$ 1-3Gal column. *Transplantation* 1996, 62(10):1379-84.

**Terada-N**, Lucas-JJ, Szepesi-A, Franklin-RA, Domenico-J, Gelfand-EW: Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993, 154:7-15.

**Van den Bogaerde-J**, Aspinall-R, Wang-MW, Cary-N, Lim-S, Wright-L, White-D: Induction of long-term survival of hamster heart xenografts in rats. *Transplantation* 1991, 52(1):15-20.

**Van den Bogaerde-J**, White-D, Roser-B, Kampinga-J, Aspinall-R: In vitro and in vivo effects of monoclonal antibodies against T cell subsets on allogeneic and xenogeneic responses in the rat. *Transplantation* 1990, 50(6):915-20.

**Vanrenterghem-Y**, van Hooff-JP, Klinger-M, Wlodarczyk-Z, Squifflet-JP, Mourad-G, Neuhaus-P, Jurewicz-A, Rostaing-L, Charpentier-B, Paczek-L, Kreis-H, Chang-R, Paul-LC, Grinyó-JM, Short-C: The effects of FK778 in combination with Tacrolimus and Steroids: A phase II multicenter study in renal transplant patients. *Transplantation* 2004, 78(1):9-14.

**Waer-M**: Induction of Xenotransplantation tolerance: A privileged role for Malononitrilamides. *Transplant Proc* 2001, 33:2429-30.

**Walpoth-BH**, Nehlsen-Cannarella-SL, Bailey-LL: Xenotransplantation: Extended indications for pediatric cardiac Transplantation. *Transplant Proc* 1986, 18(4), Suppl 3:43-44.

**Wynn-JJ**, Distant-DA, Pirsch-JD, Norman-D, Gaber-AO, Ashby-VB, Leichtman-AB: Kidney and pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2004, 4(Suppl. 9): 72-80.

**Xu-X**, Williams-JW, Gong-H, Finnegan-A, Chong-ASF: Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 1996, 52:527-34.

**Yakupoglu-YK**, Kahan-BD: Sirolimus: A current perspective. *Exp Clin Transplant* 2003, 1(1):8-18.

**Yamada-K**, Sachs-DH, DerSimonian-H: Human anti-porcine xenogeneic T cell response Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J Immunol*, 1995; 155:5249-56.

**Zaidi-A**, Schmoeckel-M, Bhatti-F, Waterworth-P, Tolan-M, Cozzi-E, Chavez-G, Langford-G, Thiru-S, Wallwork-J, White-D, Friend-P: Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998, 65(12):1584-90.

**Zhu-T**, Zhang-L, Guo-H, Luo-YD, Xia-SS, Chen-ZK: T-cell-mediated immune response is crucial for hamster-to-mouse cardiac xenograft rejection. *Transplant Proc* 2001, 33:3823.

## **7. Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Reichenspurner, PhD, ärztlicher Leiter des Universitären Herzzentrums Hamburg gGmbH, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Sonja Schrepfer aus der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Universitären Herzzentrums Hamburg gGmbH für die hervorragende Betreuung, ihr stetes Interesse am Fortgang der Dissertation und die Einführung in wissenschaftliches Denken und Arbeiten. Ihr danke ich außerdem für die engagierte Vermittlung mikrochirurgischer Operationen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. med. T. Deuse und Tina Weber für die engagierte Zusammenarbeit und besonders C. Pahrman für ihre freundliche Unterstützung bei der Arbeit und die sorgfältige Anfertigung der histologischen Präparate.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. R. Boeger, Leiter des Arbeitsbereiches für klinische Pharmakologie (UKE), und Dr. M. Haddad aus dem Institut für klinische Chemie (UKE) für die Bestimmung der Medikamentenspiegel.

Bei Herrn Prof. Dr. med. H. Schäfer aus dem Institut für Pathologie (UKE) möchte ich mich für die außerordentlich kompetente, fachliche Beratung bei der Beurteilung der histologischen Präparate bedanken.

Alexander Gerlach, Julien Walther, Martin Klein und Dr. med. D. Mittelstrass danke ich für die hilfreiche, konstruktive Kritik und die Unterstützung beim Fertigstellen. Außerdem möchte ich meinen Eltern, Monika Weber und Moritz Mittelstrass für die emotionale Unterstützung und die Motivation zur Durchführung der Arbeit danken.

## **8. Lebenslauf**

### **Zur Person**

Name: Isabel Gerlach  
Geboren am: 06.07.1982  
Geburtsort: Hamburg  
Eltern: Ingo Gerlach, Informatiker  
Maria del Sagrario Bajo Martinez, Rechtsanwältin  
  
Geschwister: Alexander Gerlach

### **Schulbildung**

1988- 1992 Grundschule bei der Katharinenkirche in Hamburg  
1992- 2001 Helene-Lange-Gymnasium in Hamburg mit  
Abschluss Abitur

### **Studium**

Seit Oktober 2001 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
September 2003 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Vorraussichtlich Ende 2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen**

Februar 2004 Dermatologie, Praxis Dr. Hellenbroich, Hamburg  
Juli 2004 Herz- und Gefäßchirurgie, Universitäres  
Herzzentrum Hamburg gGmbH  
Juli 2005 Sonografie und Kardiologie,  
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg  
September 2005 Kardiologie, Hospital La Paz, Madrid

### **Praktisches Jahr**

August 2006 Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg  
(Innere Medizin)

|               |  |
|---------------|--|
| Dezember 2006 | Israelitisches Krankenhaus in Hamburg (Chirurgie,<br>1. Hälfte)            |
| Februar 2007  | Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien<br>(Chirurgie, 2. Hälfte) |
| April 2007    | Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg<br>(Radiologie)               |

### **Fremdsprachen**

|              |   |
|--------------|---|
| Spanisch:    | fließend, zweite Muttersprache                |
| Englisch:    | bilinguale Schulausbildung (Deutsch/Englisch) |
| Französisch: | 5 Jahre Schulkenntnisse                       |

### **Studienbegleitende Tätigkeit**

|                    |  |
|--------------------|--|
| Seit Dezember 2003 | Studentische Hilfskraft in der Anästhesiologie,<br>UKE |
|--------------------|--|

Hamburg, 02.07.2007

---

**Eidesstattliche Versicherung:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_ (Isabel Gerlach)