

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede

Kombinierte Leber - / Dünndarmtransplantation:  
Modellentwicklung und Analyse toleranzinduzierender  
Mechanismen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
**Wolf Michael Thorwarth**  
aus Jüchsen

Würzburg, Mai 2001

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Meyer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Herrmann

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2002

Der Promovend ist Arzt im Praktikum.

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. FRAGEN</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>6</b>
<b>3.1. VERSUCHSTIERE UND HALTUNG</b>	<b>6</b>
<b>3.2. VERSUCHSAUFBAU</b>	<b>7</b>
3.2.1. STAMMKOMBINATIONEN	7
3.2.2. CODIERUNG	7
<b>3.3. OPERATIONSTECHNIK</b>	<b>8</b>
3.3.1. LEBER- / ORTHOTOPE DÜNNDARMTRANSPLANTATION	8
3.3.2. HETEROTOPE HERZTRANSPLANTATION	10
3.3.3. HAUTTRANSPLANTATION	11
3.3.4. OPERATION ZUR ORGANENTNAHME	11
<b>3.4. DOSIERUNG DER IMMUNSUPPRESSION</b>	<b>12</b>
<b>3.5. POSTOPERATIVE ANALYSE DER EMPFÄNGER</b>	<b>12</b>
3.5.1. SEKUNDÄRE HERZ- UND HAUTTRANSPLANTATIONEN	12
3.5.2. MAKROSKOPISCHE NACHUNTERSUCHUNG	13
3.5.3. LABORCHEMISCHE ANALYSEN	13
3.5.4. MIKROSKOPISCHE NACHUNTERSUCHUNGEN	14
3.5.5. FOTODOKUMENTATION	18
3.5.6. STATISTIK	19
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
<b>4.1. MIKROCHIRURGISCHE ENTWICKLUNG EINES NEUEN MODELLS ZUR     KOMBINIERTEN LEBER- / ORTHOTOPEN DÜNNDARMTRANSPLANTATION</b>	<b>20</b>
<b>4.2. KLINISCHE BEURTEILUNG DER TIERE</b>	<b>23</b>
<b>4.3. ÜBERPRÜFUNG SPENDER-SPEZIFISCHER TOLERANZ</b>	<b>27</b>
<b>4.4. HISTOLOGIE</b>	<b>29</b>
<b>4.5. DIFFERENZIERUNG DER ZELLULÄREN VERÄNDERUNGEN</b>	<b>34</b>
4.5.1. NATÜRLICHE KILLERZELLEN	34
4.5.2. ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLEN	35

<b>4.6.</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZU T-LYMPHOZYTEN UND APOPTOSE</b>	<b>40</b>
4.6.1.	KINETIK DER CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -LYMPHOZYTEN	40
4.6.2.	AKTIVIERUNG INFILTRIERENDER T-LYMPHOZYTEN UND AUSWIRKUNGEN AUF DAS TRANSPLANTAT	42
4.6.3.	APOPTOSE NICHT-PARENCHYMATÖSER ZELLEN IM TRANSPLANTAT	45
<b>5. BEANTWORTUNG DER FRAGEN</b>		<b>48</b>
<b>6. DISKUSSION</b>		<b>51</b>
6.1.	MODELLENTWICKLUNG ZUR KOMBINIERTEN LEBER- / DÜNNDARMTRANSPLANTATION	51
6.2.	KLINISCHER VERLAUF NACH ORTHOTOPER LEBER- / DÜNNDARMTRANSPLANTATION BN→LEW	53
6.3.	ENTWICKLUNG SPENDERSPEZIFISCHER TOLERANZ	56
6.4.	DIE ROLLE DER T-ZELLEN	57
6.5.	DIE ROLLE DER APOPTOSE	59
<b>7. AUSBLICK</b>		<b>65</b>
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>66</b>
<b>9. LITERATUR</b>		<b>67</b>

**DANKSAGUNG UND LEBENS LAUF**

## 1. Einleitung

Wenngleich in den letzten Jahrzehnten auf dem Gebiet der Transplantationsforschung bemerkenswerte Fortschritte erzielt wurden und die erste Niere bereits 1955 (Merill, 1956), das erste Herz bereits 1967 (Barnard, 1981) verpflanzt wurden, sind zahlreiche Probleme weiterhin ungelöst.

So gehört die Transplantation einiger Organe (z.B. Niere, Herz, Leber) zwar inzwischen zum klinischen Alltag, für andere (z.B. Haut, Dünndarm) ist dies jedoch entweder nur experimentell gelungen oder bisher gar nicht möglich. Neben mangelnder Organverfügbarkeit bilden vor allem Abstoßungsreaktionen das Haupthindernis für eine breitere Anwendung dieser Therapieform – Zellen des Immunsystems des Empfängerorganismus zerstören das Transplantat.

Generell lassen sich drei Formen der Abstoßung unterscheiden.

① Die *hyperakute* Abstoßung erfolgt in den ersten drei Tagen nach Transplantation infolge einer humoralen Immunantwort. Durch sorgfältige Auswahl passender Spenderorgane lässt sich eine solche Reaktion jedoch vermeiden.

② Die *akute* Abstoßung stellt sich als Krise in den folgenden Tagen und Monaten nach Transplantation dar und tritt bei allen allogenen Organübertragungen auf. Es handelt sich hierbei um einen Prozeß, in dem vor allem T-Zellen entscheidende Bedeutung zukommt. Dabei ist Interleukin 2 (IL2) ein wichtiger Botenstoff, der die beteiligten Zellen stimuliert.

Ein entscheidender therapeutischer Durchbruch im Bereich akuter Abstoßungsreaktionen gelang Ende der achtziger Jahre mit Einführung potenter Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup>) und FK506 (Tacrolimus<sup>®</sup>). Während bis dahin verwendete Substanzen das gesamte Immunsystem hemmten, unterdrückten die beiden neuen Substanzen über Hemmung der IL2 Synthese erstmals selektiv die Proliferation der T-Zellen.

Obwohl sich damit der Transplantationsmedizin völlig neue Perspektiven erschlossen, besteht ein schwerwiegender Nachteil dieses Konzeptes doch darin, daß immer noch eine unspezifische Suppression des Empfängerimmunsystems erfolgt. Die Unterdrückung der IL2-Synthese reduziert die Aktivität aller T-Zelllinien, also

auch derjenigen Lymphozyten, die sich gegen potentielle Krankheitserreger oder transformierte Körperzellen richten. In Folge dessen kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit des Organismus für Infektionen und maligne Prozesse. Diese Problematik ist zum großen Teil für das schlechte Langzeitüberleben nach Transplantation verschiedener Organe verantwortlich (Asfar, 1996).

Daneben unterliegt der Einsatz von Cyclosporin A und FK506 durch bestehende Neuro- und Nephrotoxizität deutlichen Einschränkungen.

③ Die dritte Form der Abstoßung, die *chronische* Abstoßung, ist durch eine fortschreitende Verschlechterung der Transplantatfunktion charakterisiert. Ein überzeugender therapeutischer Ansatz zur Prävention dieser Veränderungen liegt derzeit nicht vor (Grant, 1999).

Hauptziel aller Bemühungen auf dem Gebiet der Transplantationsforschung muß es deshalb sein, selektivere Mechanismen zur Verhinderung der akuten und chronischen Abstoßung zu entwickeln: Bei ansonsten voll funktionsfähigem Immunsystem des Empfängers dürfen nur diejenigen Effektorzellen ausgeschaltet werden, welche unmittelbar an der Abstoßungsreaktion beteiligt sind. Damit wäre eine spezifische Nichtreaktivität des Empfängerimmunsystems gegenüber dem Transplantat erreicht, die sogenannte Toleranz.

Zwischen Abstoßung und Toleranz bewegt sich der Zustand der Akzeptanz eines Transplantates: Durch Immunsuppression wird im Empfänger die Abstoßung des Transplantates verhindert, ohne das für dieses Transplantat Toleranz besteht. Dabei bestehen für einzelne Organe große Unterschiede. Dies drückt sich in den jeweiligen Transplantatüberlebenszeiten aus. So sind z.B. nach Nierentransplantationen 5-Jahresüberlebensraten zwischen 80-90% (hier vor allem durch vielfältige Möglichkeiten, zwischen Spender und Empfänger eine gute Gewebsübereinstimmung zu erhalten), nach Lungentransplantationen nur 30-40% angegeben (Janeway, Travers 1995). Für die Lebertransplantation beträgt die 5-Jahresüberlebensrate ca. 60% (Pichlmayr, 1994). Sie ist heute etabliertes klinisches Standardverfahren bei der Behandlung der terminalen Leberinsuffizienz (D'Amico, 1999).

Im experimentellen Bereich sind Effekte der Leber beschrieben, die sich positiv auch auf ein zweites, mittransplantiertes Organ auswirken (Rasmussen, 1995). Die Leber beeinflusst die Immunantwort des Empfängers, für andere Organe des selben Spenders besteht verbesserte Akzeptanz. Obwohl die Mechanismen im Einzelnen noch nahezu unbekannt sind, scheint die Modulation der Immunantwort damit auf spezifischeren Mechanismen als die bisher zur Anwendung kommenden therapeutischen Konzepte zu beruhen. Das Verständnis dieses Prozesses könnte somit einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, die gegenwärtig eingesetzte unspezifische Immunsuppression durch selektivere Therapien zu ersetzen. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, diese bisher wenig erforschten Vorgänge bei gemeinsamer Transplantation einer Leber mit einem weiteren Organ genauer zu beleuchten.

Die Kombination aus Leber- / und Dünndarmtransplantation im Rattenmodell ist dafür hervorragend geeignet. Wie in den o.g. Versuchen von Rasmussen gezeigt, moduliert die Leber nicht nur die Toleranz des Empfängers gegenüber ihr selbst. Auch für andere Organe des selben Spenders lässt sich ein solcher protektiver Effekt nachweisen. Dieses Phänomen sollte an hoch immunogenen Gewebe untersucht werden. Der Dünndarm stellt als Grenzfläche des Organismus zur Außenwelt ein solches immunogenes Organ dar. Seine isolierte Übertragung ist bisher nur unter großen Schwierigkeiten und bei niedrigen Erfolgsquoten möglich (Grant, 1999). Mit dem Transplantat wird gleichzeitig ein eigenes lymphatisches System, das sogenannte Mucosa Associated Lymphatic Tissue (MALT) übertragen. Diese vermehrte Übertragung immunologisch kompetenter Zellen ist ein Grund für die hohe Komplikationsrate – das ablaufende immunologische Geschehen ist also sehr intensiv.

Obwohl sich verschiedene Studien bereits mit diesen Vorgängen beschäftigten, erfüllten die dabei verwendeten Modelle nicht die klinischen Anforderungen. So wurde der Dünndarm z.B. erst Wochen nach der Leber übertragen (Kobayashi, 1994) oder der Dünndarm nicht in die Nahrungspassage integriert (Meyer, 1998c). In unserem Modell sollten die immunologische Vorgänge jedoch unter möglichst

physiologischen Bedingungen untersucht werden, um die Ergebnisse auf klinische Erfordernisse übertragen zu können.

In der vorliegenden Arbeit mußte geklärt werden, welche zellulären Mechanismen die Akzeptanz eines Dünndarmes nach kombinierter Leber- / Dünndarmtransplantation fördern. Dabei galt es zu untersuchen, ob sich diese Mechanismen in der Leber oder im Dünndarm abspielen. Weiterhin sollten auch Prozesse der chronischen Abstoßung erfaßt werden, da gerade der Dünndarm nach Transplantation für chronische Abstoßungsprozesse anfällig ist (Timmermann, 2000).

Daneben galt es, die Kinetik der Immunsuppression und Wechselwirkungen zwischen Lebertransplantat und Immunsuppression zu beleuchten. Die hierbei verwendete Versuchsanordnung und erzielte Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt und am Ende eine Interpretation dieser Vorgänge erfolgen.

## 2. Fragen

Folgende Fragen bedurften im Verlaufe der Untersuchungen einer Klärung:

- ① Läßt sich der in der Literatur beschriebene protektive Effekte der Leber auf cotransplantierte Organe auch auf den hoch immunogenen Dünndarms ausdehnen?
- ② Kann dabei ein Modell etabliert werden, das sich auf die bestehenden klinischen Bedingungen übertragen läßt?
- ③ Bestehen in einem solchen Modell Prozesse einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion?
- ④ Beruht langfristige Akzeptanz eines Leber - / Dünndarmtransplantates auf der Induktion spezifischer Toleranz im Empfänger?
- ⑤ Verändert die verwendete Immunsuppression nur den zeitlichen Verlauf oder auch den grundlegenden Mechanismus der zu akuter und chronischer Abstoßung führenden Prozesse?
- ⑥ Welche Veränderungen in beiden Organen stehen mit einer etwaigen Toleranzentwicklung in Zusammenhang?

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

#### **3.1. Versuchstiere und Haltung**

Alle Versuche wurden gemäß der Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchsvorhaben der Regierung von Unterfranken durchgeführt (Nr. 621-2531.01-22/94, 621-2531.01-3/97, 621-2531.01-22/98).

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten, welche nach Erwerb in den Tierställen der Chirurgischen Universitätsklinik gehalten wurden. Zum Zeitpunkt der Transplantation waren diese 3-4 Monate alt und wogen zwischen 200-250 g. Es wurden Inzuchtstämme verwendet. Sie unterscheiden sich damit sowohl im „Major Histocompatibility Complex I“ (MHC I) und MHC II als auch im Non-MHC Komplex. Zum Einsatz kamen:

als Organspenderstämme

- Brown Norway (BN; MHC-Halotyp n) (Charles River GmbH, Sulzfeld),
- Dark Agouti (DA; MHC-Halotyp avl) (Harlan Winkelmann, Borchem)

und als Transplantatempfängerstamm

- Lewis (LEW; MHC-Halotyp l) (Charles River GmbH).

Die Haltung erfolgte jeweils paarweise in Lamina-airflow-Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) in Makrolon<sup>®</sup>-Käfigen. Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frisches Einstreu und Zellstoffunterlagen sowie Altromin<sup>®</sup>-Pressfutter und Wasser ad libitum. Ergänzend wurde täglich eine Ration aus Haferflocken und Sonnenblumenkernen gegeben. Zur Überbrückung der postoperativen Darmmotilitätsstörungen wurde für 5 Tage flüssige Kost ad libitum verabreicht. Tag 0-1: Wasser, Tag 2-3: 10% Glukose-Lösung, Tag 4-5: Fresubin (Fresenius, Bad Homburg) /Wasser in 1:2 Verdünnung. Von Tag 0-5 erfolgte eine perioperative Antibiotika-Prophylaxe der Empfängertiere mit Levofloxacin (7,5 mg/kg/d; Tavanic<sup>®</sup>, Höchst, Frankfurt/Main). Dies diente dem Schutz vor bakteriellen Infektionen (z.B. durch

eine bakterielle Translokation nach Dünndarmtransplantation oder als Folge der applizierten Immunsuppression).

### **3.2. Versuchsaufbau**

#### **3.2.1. Stammkombinationen**

Die kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantationen erfolgten sowohl in syngener (LEW→LEW) als auch in allogener (BN→LEW) Anordnung. Da bei Transplantationen zwischen genetisch identischen Tieren Abstoßungsreaktionen ausgeschlossen sind, konnte somit sicher zwischen operationsbedingten Veränderungen im Transplantat und immunologisch bedingten Veränderungen unterschieden werden. Die BN→LEW Kombination erschien wegen der z.T. spontan auftretenden Toleranz des LEW-Empfängers nach isolierter BN-Lebertransplantation (Engemann et al. 1982) für die Versuchsanordnung besonders geeignet. Bei den Versuchen zum Nachweis spenderspezifischer Toleranz kam eine weitere Kombination (DA→LEW) zum Einsatz.

Im gleichen Zeitraum führte eine weitere Arbeitsgruppe unter identischen Bedingungen isolierte Dünndarmtransplantationen durch (Timmermann, 2000). Diese Ergebnisse wurden z.T. zum Vergleich mit den eigenen Daten herangezogen.

#### **3.2.2. Codierung**

Zur Vereinfachung bei der Erörterung der Ergebnisse wurde eine Codierung eingeführt.

LDTx = kombinierte Leber- / Dünndarmtransplantation

### **3.3. Operationstechnik**

Alle Operationen erfolgten unter keimarmen Bedingungen am Operationsmikroskop (Leitz Wild, Typ M 650, Heerbrugg, Schweiz) in 10-15facher Vergrößerung des Operationssitus. Die Gefäßanastomosen wurden in fortlaufender Nahttechnik mit den Fadenstärken 6-0 (Seralene<sup>®</sup>, Nadel: DR-9, Serag-Wiessner, Naila) oder 8-0 (Prolene<sup>®</sup>, Nadel: BV-2, Ethicon, Hamburg) durchgeführt. Zur Darmnaht wurde ebenfalls 6-0 Seralene<sup>®</sup> in Einzelknopfnahntechnik verwendet. Die Darmnaht wurde mit einer passageren Stent-Einlage gesichert. Dieser bestand aus einer ca. 10mm langen und 3mm durchmessenden Makkaroni, der vom Darm in den ersten postoperativen Tagen resorbiert wurde. Der Bauchdeckenverschluß erfolgte in zweischichtiger Einzelknopf-Nahntechnik mit 4-0 Prolene<sup>®</sup> (Ethicon). Als Polyäthylen-Splint für die Gallenganganastomose wurden 22G Braunülen (Braun, Melsungen) verwendet, die mit einer 6-0 Seidenligatur (NC-Seide, Braun) im Gallengang fixiert wurden.

#### **3.3.1. Leber- / orthotope Dünndarmtransplantation**

##### *Spenderoperation*

Die Spenderoperationen erfolgten unter Ketanest<sup>®</sup> (Parke-Davis, Freiburg) / Rompun<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen) Narkose (0,025 ml Rompun / 50g und 0,1 ml Ketanest 50 / 50g i.m.). Am Ende der Operation erfolgte die Tötung der Tiere durch intracardiale T-61 Injektion. Obwohl anschließend getrennt von einander dargestellt, erfolgte die Präparation von Spenderleber und -dünndarm teilweise parallel. Nach Mittelbauchlaparotomie wurde das Ligamentum falciforme durchtrennt, die Vena cava inferior (VCI) suprahepatisch dargestellt und die einmündenden Zwerchfellvenen ligiert. Der linke und der rechte Leberlappen wurde zusammen mit den unterhalb des Ligamentum hepatoduodenale gelegenen Lebersegmenten mobilisiert. Die Leberarterie wurde bis zum Truncus coeliacus dargestellt, die abzweigenden Arteriae lienalis und gastrica sinistra durchtrennt und die Aorta weiter bis zur Bifurkation mobilisiert. Mit Ausnahme Arteria mesenterica superior und der Nierenarterien wurden hier alle Seitenäste ligiert und abgesetzt. Die VCI wurde infrahepatisch mobilisiert und die Vena suprarenalis ligiert. Der Gal-

lengang wurde leberfern unterbunden. Zur Vorbereitung der Perfusion wurde die Aorta in Höhe der Bifurkation ligiert, die Nierengefäße abgesetzt und die Aorta proximal des Truncus coeliacus abgeklemmt.

Der Dünndarm wurde vor die Abdominalhöhle gehoben und in eine Plastikfolie gehüllt, um so ein Austrocknen der Dünndarmschlingen zu vermeiden. Das Mesenterium des Colons wurde vom Dünndarmkonvolut gelöst, der Dünndarm distal abgesetzt. Die Vena portae wurde über den Confluens hinaus nach distal bis zur Einmündung der Vena mesenterica superior verfolgt und die Vena lienalis an ihrem Zufluß in den Confluens abgesetzt. Die Arteria mesenterica superior (AMS) wurde bis zum Abgang aus der Aorta dargestellt. Das Pankreas wurde schrittweise mit Ligaturen vom Mesenterium abgetrennt und der Dünndarm proximal durchtrennt. Über das Aortensegment erfolgte nun die Perfusion des kombinierten Transplantates mit 4°C kalter NaCl-Lösung unter einem Druck von 50 cm H<sub>2</sub>O. Die VCI wurde oberhalb des Zwerchfells zur Druckentlastung des venösen Systems durchtrennt. Der Dünndarm wurde an der ersten Jejunal-Schlinge und am terminalen Ileum vom verbleibenden Intestinum abgesetzt und das Organpaket zusammen mit dem Aortensegment entnommen. Die Gefäßversorgung war durch das Aortensegment, von dem Truncus coeliacus und AMS abgehen sowie durch den intakten venösen Abfluß des Dünndarmtransplantates über die Spenderpfortader sichergestellt. Der Dünndarm wurde intraluminär mit 4°C kalter NaCl-Lösung gespült und die so vorbereiteten Organe bis zur Implantation in NaCl-Lösung bei 4°C gelagert.

### *Empfängeroperation*

Die Empfängeroperationen wurden unter Äthernarkose durchgeführt. Dies ermöglichte eine exakte Steuerung der Narkosetiefe während der anhepatischen Phase. Postoperativ wurden die Tiere analgetisch mit Tramadol i.m. (Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal, Stolberg) behandelt. Der Eingriff begann mit der Hepatektomie. Im Gegensatz zur Präparation der Leber im Spendertier wurde hier die Arteria hepatica durchtrennt und die VCI, Vena portae und der Gallengang nahe am Leberparenchym abgesetzt, wodurch ausreichend Platz zur Anastomosierung mit den Spendergefäße geschaffen wurde. Zur Implantation der Leber wurde zunächst die suprahepatische VCI von Spender und Empfänger in End-zu-End-Technik und

anschließend die Pfortader in End-zu-Seit-Technik anastomosiert. Mit dem Öffnen der Klemmen an diesen beiden Anastomosen war die anhepatische Phase (ca. 15-17 min) beendet. Durch Setzen eines Clips auf die Spender-Pfortader wurde gleichzeitig der Rückstrom des Empfängerblutes in das Dünndarmtransplantat verhindert. Die Blutzirkulation wurde freigegeben, als die VCI infrahepatisch und die Spender-Aorta (Truncus coeliacus und AMS) mit dem entsprechenden Empfängergefäßen anastomosiert waren. Letztere Anastomose wurde als eine End-zu-Seit-Verbindung zwischen dem Aortensegment des Spenders und der infrarenalen Aorta des Empfängers angelegt. Anschließend erfolgte die Anastomosierung des Gallenganges über einen Stent (Braun, Melsungen).

Der Empfängerdünnarm wurde von der ersten Jejunalschlinge bis zum distalen Ileum schrittweise an den Mesenterialgefäßen abgetrennt und entfernt. An den Absetzungsrandern des Empfängerdünnarms erfolgte nun, proximal wie distal, über einen Makkaroni-Splint die End-zu-End-Anastomose mit dem Spenderdünnarm, um diesen in die Nahrungspassage zu integrieren. Das Setzen eines subkutanen Flüssigkeitsdepots und Verschluss der Laparatomiewunde in zweischichtiger Nahttechnik beendeten die Operation.

### **3.3.2. Heterotope Herztransplantation**

Die heterotope Herztransplantation orientierte sich an der von Ono und Lindsey beschriebenen Methode (Ono, Lindsey, 1969).

#### *Spenderoperation*

Nach Sternotomie des Spendertieres wurde die VCI und die Vena cava superior unterfahren und ligiert, anschließend die Aorta ascendens und der Truncus pulmonalis durchtrennt. Das entnommene Herz wurde in 4°C kalter NaCl-Lösung gespült und bis zur Implantation darin aufbewahrt.

#### *Empfängeroperation*

Das Empfängertier eines Herz-Transplantates hatte 70 Tage zuvor ein kombiniertes Leber- / Dünndarmtransplantat erhalten. Nach Eröffnen des Abdomens wurden daher zunächst einige Verwachsungen gelöst und die Empfänger-Aorta und

die Empfänger-VCI in ihrem distalen Drittel aufgesucht. Hier erfolgte zwischen der Aorta ascendens des Herztransplantates und der Empfänger-Aorta sowie zwischen dem Truncus pulmonalis des Spenderherzens und Empfänger-VCI eine End-zu-Seit-Anastomose. Mit dem Öffnen der Klemmen wurde ein retrograder Blutstrom durch die Aorta → Coronargefäße → rechten Vorhof → rechte Herzkammer → Truncus pulmonalis erreicht. Das Herztransplantat begann wieder zu schlagen. Nach Verschluss der Bauchdecke ließ sich dieser Herzschlag perkutan ertasten.

### **3.3.3. Hauttransplantation**

Zur Hauttransplantation wurde nach gründlicher Rasur am Bauch des Spendertieres ein 1cm<sup>2</sup> großes Vollhauttransplantat entnommen, an die entsprechende Stelle am Empfängertier nach Entfernung eines identischen Hautareals in den entstandenen Defekt eingepaßt und mit einigen Prolene<sup>®</sup> 4-0-Nähten fixiert. Ein Druckverband für ca. 10 Tage verhinderte Manipulationen des Empfängertieres an seinem Transplantat. Nach Abnahme des Verbandes erfolgte die tägliche Inspektion.

### **3.3.4. Operation zur Organentnahme**

Zur Anästhesie bei der Organentnahme wurde wiederum Ketanest<sup>®</sup> / Rompun<sup>®</sup> verwendet. Nach medianer Laparotomie wurde zunächst der intraabdominelle Befund (z.B. das makroskopische Erscheinungsbild des Transplantates und die Durchgängigkeit der Anastomosen) protokolliert und dann die Blutentnahme zur Bilirubin- und FK-506-Spiegel-Bestimmung durchgeführt. Im zweiten Arbeitsschritt wurden Milz, Leber und mesenteriale Lymphknoten (MLK) entnommen. Der Dünndarm wurde nach Durchtrennung am Duodenum und Coecum vom Mesenterium gelöst, intraluminär gespült und zur histologischen Aufarbeitung abgegeben. Am Ende der Explantation erfolgte die Tötung der Tiere durch intracardiale T-61 Injektion.

### 3.4. Dosierung der Immunsuppression

Um später die Studien zu Akzeptanz und Toleranz durchführen zu können, mußte in einem ersten Schritt die einzusetzende Mindestdosis des verwendeten Immunsuppressivums FK 506 (Tacrolimus<sup>®</sup>) ermittelt werden, bei der ein Überleben der Versuchstiere gewährleistet war. Diese Untersuchungen basierten auf Erfahrungen mit isolierter, orthotoper Dünndarmtransplantation (Timmermann, 2000). Während dort eine Applikation von 2.0 mg FK506/kg/d von Tag 0-5 notwendig war, wurden für unsere Versuchsreihe zu Beginn drei unterschiedliche Therapie-schemata ausgetestet (① 1.0 mg FK506/kg/d, Tag 0-5; ② 0,5 mg FK506/kg/d, Tag 0-5; ③ keine Immunsuppression). Als Kontrolle dienten syngene Transplan-tationen (④ LEW→LEW).

- ① LDTx    BN→LEW    n = 5    1,0 mg FK506/kg/d, Tag 0-5
- ② LDTx    BN→LEW    n = 33    0,5 mg FK506/kg/d, Tag 0-5
- ③ LDTx    BN→LEW    n = 5    keine Immunsuppression
- ④ LDTx    LEW→LEW    n = 3    keine Immunsuppression

Die Applikation von FK 506 erfolgte i.m. im täglichen Wechsel in die Gluteal-muskulatur.

### 3.5. Postoperative Analyse der Empfänger

#### 3.5.1. Sekundäre Herz- (Tag +70) und Hauttransplantationen (Tag +100)

Bei sechs langzeitüberlebenden Tieren wurden am Tag +70 heterotope Herztrans-plantationen zur Überprüfung spenderspezifischer Toleranz durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2.). Drei Tiere erhielten dabei ein BN-Transplantat, die anderen Tiere ein Drittstamm-Herz (DA). Eine weitere, aus sechs Tieren bestehende Gruppe erhielt an Tag +100 ein Hauttransplantat (siehe Kapitel 3.3.3.). Drei Tiere erhiel-ten dabei ein BN-Transplantat, die anderen Tiere Drittstamm-Haut (DA).

### **3.5.2. Makroskopische Nachuntersuchung**

#### *Klinische Beurteilung der Empfänger*

Die Empfänger wurden täglich ein- bis zweimal visitiert. Mit Hilfe eines Bewertungsbogens wurden Freßverhalten, Bewegung und Reaktionsfähigkeit beurteilt. Hinsichtlich der zu erwartenden Abstoßungsreaktionen waren Diarrhoen, Ikterus oder eine Dermatitis exfoliata als Ausdruck einer "graft-versus-host reaction" von besonderem Interesse. Gewichtszu- und -abnahmen wurden täglich protokolliert (Waage: Heraeus, Hanau). Bei eindeutiger und anhaltender Verschlechterung des Allgemeinzustandes eines Tieres erfolgte die Tötung in Narkose mittels T 61-Injektion (Hoechst Veterinär-GmbH, Unterschleißheim).

Nach heterotoper Herztransplantation wurde postoperativ täglich das Abdomen des Tieres abgetastet und dabei Qualität und Quantität der Kontraktionen protokolliert.

Bei hauttransplantierten Tieren erfolgte ab Tag +10 die tägliche Inspektion des Transplantates.

#### *Makroskopische Beurteilung der Transplantate*

Zur Beurteilung der Veränderungen am Transplantat wurden zu festgelegten Zeiten jeweils 3 Tiere getötet und deren Transplantate und lymphatische Organe entnommen (siehe Kapitel 3.3.4.). Dies waren in der allogenen Gruppe die Tage +3,+7,+14,+28,+150; in der syngenen Vergleichsgruppe erfolgte die Organentnahme an Tag +150. Die Transplantate, die Lymphknoten und die Milz des Empfängers wurden hinsichtlich ihrer Größe, Farbe, Struktur und Konsistenz beurteilt. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle der Anastomosen auf Durchgängigkeit. Dieser makroskopischen Beurteilung folgte die histologische und immunhistologische Aufarbeitung der Präparate (siehe Kapitel 3.5.4.).

### **3.5.3. Laborchemische Analysen**

Mit der Organentnahme erfolgte neben der Beurteilung der Transplantate die Entnahme von 1 ml EDTA-Blut zur Bestimmung des Bilirubin-Plasmaspiegels. Das

Blut wurde zentrifugiert und der Bilirubin-Spiegel am Analysegerät Cobas Mira S (Universitäts-Kinderklinik Würzburg) bestimmt. Zudem wurde 1 ml Vollblut zur Bestimmung des FK-506 Plasmaspiegels gewonnen und bis zur endgültigen Bestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Analyse erfolgte später mittels "micro particle enzyme immunoassay" (MEIA) im Zentrallabor der Universität Würzburg.

### **3.5.4. Mikroskopische Nachuntersuchungen**

#### **3.5.4.1. Histologie**

Die bei der Organentnahme gewonnenen Formalin-fixierten Gewebeproben wurden in Paraffin-Blöcke gegossen und aus diesen am Schneidegerät (Histoslide 2000 R, Jung; Leica, Nussloch)  $1\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Zur Beurteilung der Histomorphologie wurden in Standardtechnik Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbungen durchgeführt.

#### **3.5.4.2. Immunhistologie**

Anteile der bei der Organentnahme gewonnenen Organe (Leber, MLK und Dünndarm) wurden mit Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura Finetek, Zoeterwande, Holland) auf Korkplättchen geklebt und in 2-Methylbutan, welches mit flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gekühlt wurde, entwässert. Bis zur endgültigen Verwendung wurden diese Gefrierblöcke in Alufolie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur immunhistologischen Färbung wurde von diesen Blöcken im Kryostaten (Frigocut N Reichert-Jung, Leica)  $4\mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt, auf Silan-beschichteten Objektträgern (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma, Deisenhofen) aufgebracht und bis zur endgültigen Färbung wiederum bei  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

#### *Peroxidase-Färbetechnik*

Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Schnitte wurden zunächst auf den Objektträgern Aceton-fixiert, anschließend in PBS (Sigma, Deisenhofen) äquilibriert. Dann erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit Natriumacid und Wasserstoff (2 mol Natriumacid / PBS Lösung + 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 60 min). Nach Waschen in PBS wurde in 2% BSA (Sigma) die unspezifischen Bindungen der Antikörper mit dem Präparat blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primäantikör-

per (siehe Tab. 1) für 30 min bei Raumtemperatur (RT). Jeweils durch Spülungen in PBS unterbrochen, wurde diese Markierung des Primärantikörpers durch Inkubation (30 min, RT) mit einem zweiten (Kaninchen-anti-Maus) und einem dritten, Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Antikörper (mAk) verstärkt. Durch Entwicklung der Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5% Diaminobenzidin (Sigma) in Tris-Puffer wurde diese Markierung optisch dargestellt. Die Entwicklung erfolgte unter Sichtkontrolle am Mikroskop; die Entwicklungszeit war dabei mAk-abhängig. Erneutes Spülen in PBS-Lösung, Gegenfärben in Hämatoxylin und Eindecken der Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt) beendeten die Färbung.

#### *Immunhistologische Doppelfärbung*

Die Doppelfärbetechnik wurde angewendet, um eine nachgewiesene Zellpopulation hinsichtlich ihrer Stammspezifität zu untersuchen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Im ersten Schritt erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben die Entwicklung bis zur Peroxidasereaktion.

In einem zweiten Schritt erfolgte nach Spülung mit PBS die Inkubation mit dem entsprechenden stammspezifischen Antikörper (siehe Tab. 1) für 30 min bei RT. Nach erneutem Spülen erfolgte für 5 min bei 37°C die Bindung mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (Biotin-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment IgG, Esel-anti-Maus, Jackson Immuno Research; West Grove, USA). An das Biotin bindet mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (Super Sensitive Detection Kit; Bio Genex, San Ramon, USA), wiederum bei einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C. Als Substrat der alkalischen Phosphatase diente Fast Red. Aufgrund der Wasserlöslichkeit dieses Farbstoffes erfolgte das Gegenfärben mit wässrigem Hämatoxylin, das Eindecken mit Kaiser's Glyceringelantine (Merck, Darmstadt).

**Tab. 1:** Monoklonale Antikörper für die Immunhistologie (n.d. = nicht diskriminiert)

<b>Antikörper</b>	<b>Cluster</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Herkunft</b>
<b>NDS 60</b>	n.d.	MHC-I-Antigen (LEW)	Dr.Dallmann, Oxford, England
<b>MRC-Ox 27</b>	n.d.	MHC-I-Antigen (BN)	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 6</b>	RT1.B	MHC-II-Antigen, monomorph, Ratte	Serotec, Oxford, England
<b>10/78</b>	CD 161	Natürliche Killerzellen	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 62</b>	n.d.	Dendritische Zellen	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 42</b>	CD 11 b+c	Makrophagen	Serotec, Oxford, England
<b>KiM2R</b>	n.d.	Residente Makrophagen (Kupffersche Sternzellen)	PD Dr. Wacker, Kiel
<b>MRC-ED 2</b>	n.d.	Residente Makrophagen (Kupffersche Sternzellen)	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 8</b>	CD8 $\alpha$ -Kette	Zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen, intraepitheliale Lymphozyten (IEL)	Serotec, Oxford, England
<b>341</b>	CD8 $\beta$ -Kette	zytotoxische T-Lymphozyten	Serotec, Oxford, England
<b>W3/25</b>	CD4	T-Helferzellen, Makrophagen	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 39</b>	CD25	IL2R (45-50 kD)	Serotec, Oxford, England
<b>MRC-Ox 33</b>	CD45 RB	B-Lymphozyten (common leu- kocyte antigen)	Serotec, Oxford, England
<b>NDS-61</b>	CD25	IL2R / anderes Epitop als Ox 39	Serotec, Oxford, England

#### **3.5.4.3. Apoptose-Färbung (TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated-digoxigenin-dUTP nick end labeling)**

Bei dem Nachweis der für die Apoptose typischen DNA-Doppelstrangbrüche im Gewebe wurde eine Kontamination von Gewebe-fremder DNA durch Verwendung DNA-freier Substanzen und Materialien vermieden. Die Färbung der Parafinschnitte erfolgte auf Silan-beschichteten Objektträgern.

Die entparaffinierten Objektträger (2x20 min in Xylol; 2x2 min in 100% Äthanol) wurden in Aqua bidest gewaschen und für 7 min bei 37°C in Proteinase K (Boehringer, Mannheim) inkubiert, danach mit PBS gespült. Es folgten die Blockade der endogenen Peroxidase mit Methanol / 7% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Lösung für 30 min, danach das Spülen der Präparate für 10 min bei RT in TdT-Puffer (25mM TrisBase, 200mM Cacodylic acid, 200mM Kaliumchlorid; Sigma; pH 6,6). In einem gemeinsamen Ansatz (50 µl / Schnitt) wurde den Schnitten terminale Desoxynucleotidyltransferase (25 IU, MBI Fermentas; St.Leon-Rot) zusammen mit 1µl Digoxigenin-gekoppelten Nukleotiden (10x Dig-DNA Labeling Mix; Boehringer, Mannheim), 10 µl TdT-Puffer, 2 µl Cobaltchlorid und 36,5 µl Aqua bidest. zugesetzt und diese bei 37°C 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde in 60°C heißer 3% Triton-X-100-Lösung beendet. Im Anschluß wurde mit 10% fetalem Kälberserum für 15 min bei 37°C gespült. Die Digoxigenin-gekoppelten Nukleotide wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper markiert (Verdünnung 1:100 in 10% FCS / PBS, Inkubation 30min bei 37°C, a-DIG-POD; Boehringer, Mannheim) und nach einem Spülschritt (PBS) mittels 5% Diaminobenzidin (Serva) in Tris-Puffer (pH 7,6; 0,05mol Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid; Merck, Darmstadt auf 1000ml Aqua bidest.) dargestellt. Die Entwicklung erfolgte unter Sicht am Mikroskop. Gegenfärben mit Hämatoxylin und Eindecken der Präparate mit Entellan (Merck) beendeten die Färbung.

#### **3.5.4.4. Etablierung einer Doppelfärbung (TUNEL / mAk Ox8)**

Mit den o.g. standardisierten Färbeverfahren war die Qualifizierung einzelner Zellpopulationen und das Darstellen der Apoptose möglich. Da bei letzterer DNA-Fragmente im Zellinneren zur Darstellung kommen, ist eine lytische Vor-

behandlung der Zellmembran erforderlich. Um die histologischen Präparate jedoch so zu erhalten, daß am Ende auch eine Auswertung bezogen auf die Organstruktur möglich ist, können nur Paraffinschnitte verwendet werden. Entsprechende Versuche mit kryofixierten Präparaten führten zu keinem Erfolg (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei auf diese Weise vorbehandelten Präparaten bestehen jedoch durch die erfolgte Formalin-Fixation Quervernetzungen von Epitopen auf der Zelloberfläche. Dadurch wird wiederum die normale Immunhistologie erschwert. In dieser Arbeit war es aber von besonderem Interesse, apoptotische Zellen immunhistologisch näher zu klassifizieren (v.a. CD8<sup>+</sup>T-Zellen). Daher war es notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem sich Immunhistologie und TUNEL-Verfahren kombinieren lassen.

Erster Schritt: Zur Doppelfärbung mit mAk Ox8 im Paraffinschnitt wurde die Vorbehandlung der Paraffinschnitte zur Apoptose-Färbung variiert. Die entparaffinierten Schnitte wurden nicht mit Proteinase K und Methanol / 7% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelt, sondern mit Enhancer-Lösung (Histosafe, Camon; Verdünnung 1:4 mit Aqua dest.) im Wasserbad für 20min bei 96°C inkubiert und danach sofort in PBS auf RT abgekühlt. Neben der Aufhebung Formalin-bedingter Quervernetzungen von Epitopen auf der Zelloberfläche wurde durch das Erhitzen auch die endogene Peroxidase blockiert. Es folgten das Spülen der Präparate für 10 min bei RT in TdT-Puffer und alle weiteren Schritte des beschriebenen Färbeprotokolls.

Zweiter Schritt: Nach der Entwicklung am Mikroskop schloß sich die beschriebene immunhistologische Färbung an.

### **3.5.5. Fotodokumentation**

Die Fotodokumentation des OP-Situs bei Organentnahme oder bei Herztransplantation erfolgte durch eine Kamera Typ Nikon FE2 mit Zoomobjektiv 35-70 mm und Ringblitzsystem. Als Film wurde ein Kodak-Ektachrom 100 verwendet. Histologische Präparate wurden mit dem Olympus Fotomikrographic-System (Modell PM-10AD) am Mikroskop Olympus BH-2 fotografiert. Als Film diente hier der Fuji RTP 135.

### **3.5.6. Statistik**

Signifikanz-Berechnungen erfolgten nach Feststellung einer Normalverteilung der Daten mittels Student-T-Test. Dabei wurde bei einem p-Wert  $< 0,005$  von einem signifikanten Unterschied der verglichenen Daten ausgegangen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Mikrochirurgische Entwicklung eines neuen Modells zur kombinierten Leber- / orthotopen Dünndarmtransplantation**

Bei Organtransplantationen in der Anordnung BN→LEW wird ohne Immunsuppression der isoliert übertragene Dünndarm stets abgestoßen, Lebertransplantate jedoch spontan toleriert (Engemann, 1982). Derartige Lebertransplantate haben einen protektiven Effekt auf weitere übertragene Organe, z.B. die Nieren (Rasmussen, 1995). In neueren Versuchen wird dieser protektive Lebereffekt nun auch für den sehr immunogenen Dünndarm beschrieben (Meyer, 1998a). Dabei wurde ein Modell der kombinierten Transplantation von Leber und Dünndarm verwendet, bei dem der Dünndarm heterotop transplantiert wurde, d.h. nicht in die eigentliche Nahrungspassage integriert war. Dies ermöglichte zwar das Studium ablaufender immunologischer Vorgänge, wurde aber mit dem Nachteil unphysiologischer Verhältnisse im Empfängerorganismus erkaufte.

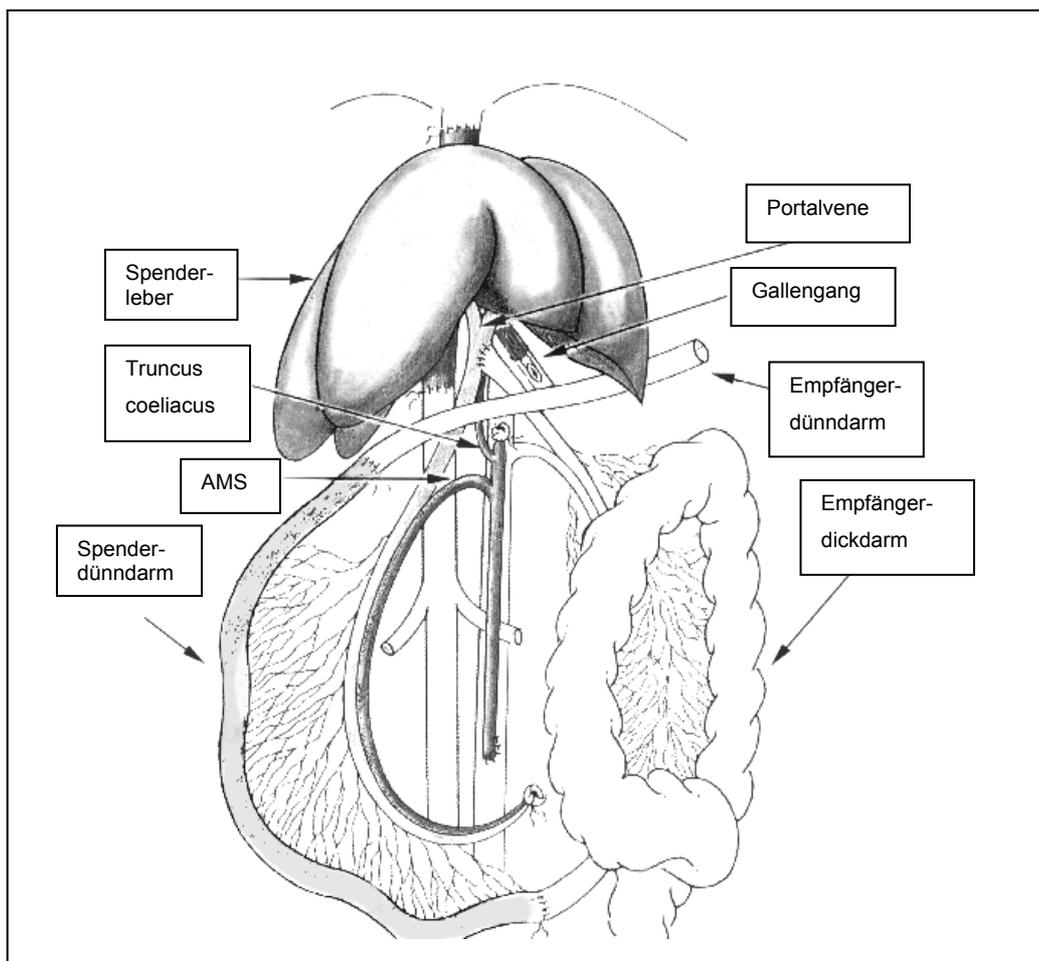
Unter dem Aspekt, die geplanten Untersuchungen unter möglichst physiologischen Verhältnissen durchzuführen, wurde die Integration des Dünndarms in die Nahrungspassage (orthotope Lage) angestrebt. Versuche dazu scheiterten zunächst aus verschiedenen Gründen. Bei Anastomosierung des Dünndarms unmittelbar während der Erstoperation kam es im postoperativen Verlauf zu direktem Organversagen des Dünndarmtransplantates oder die Versuchstiere verstarben an septischen Komplikationen (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich kam aufgrund einer rapide verlaufenden Abstoßungsreaktion der von Rasmussen und Meyer beschriebene tolerogene Effekt der Leber nicht zum tragen.

Ebensowenig war es möglich, den Dünndarm nach zunächst erfolgter heterotoper Transplantation später, in einem zweiten Schritt, in die Nahrungspassage zu integrieren. Dieses verhinderten operative Schwierigkeiten, die durch Atrophie des Dünndarms und Verwachsungen des Operationssitus bedingt waren.

Als Konsequenz hieraus ergab sich somit die Notwendigkeit, bei orthotoper Transplantation die akute Abstoßungsreaktion gegen den Dünndarm initial mit adäquater Immunsuppression zu unterdrücken. Die nur kurzfristige Immunsuppression sollte der Leber ermöglichen, einen protektiven Effekt auf das Dünndarmtransplantat auszuüben. Die hierbei angewendete Operationstechnik mit

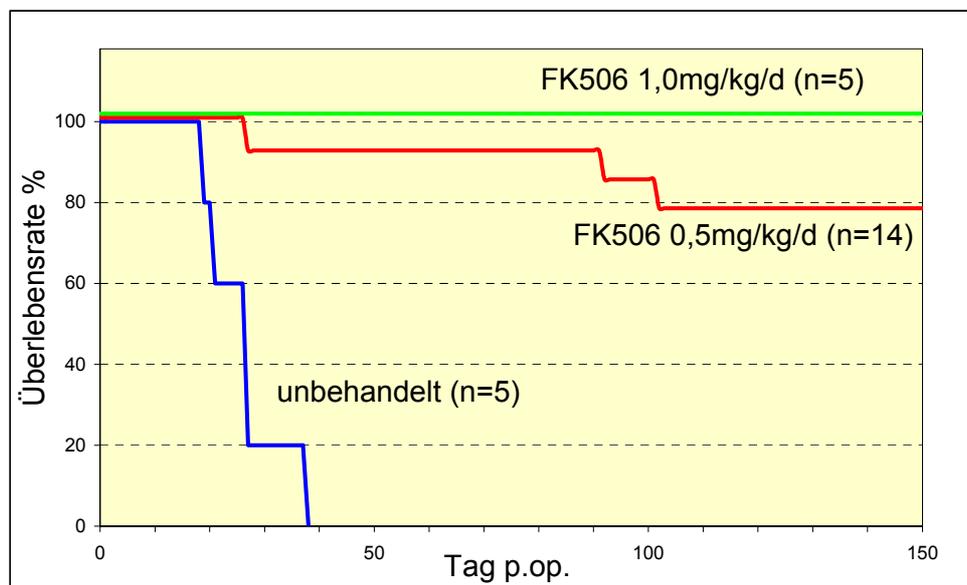
- En-bloc Entnahme des Leber-Dünndarmtransplantates,
- Reanastomose der Arteria hepatica des Lebertransplantates über ein Aortensegment an die Aorta des Empfängers und
- venöser Drainage des Dünndarmtransplantates in den Portalkreislauf des Empfängers

wurde in Kapitel 3.3.1. ausführlich beschrieben und ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantation; Abdomen mit Transplantat (grau) und Empfängerorganen (weiß) (AMS – Arteria mesenterica superior)

Da die Beobachtung immunologischer Vorgänge im Mittelpunkt stand, waren dabei die Einflüsse der Immunsuppression so gering wie möglich zu halten. Deshalb mußte zunächst die minimal zu verabreichende Dosis der verwendeten Substanz FK506 ermittelt werden. Aus einem von Timmermann etablierten Modell war bekannt, daß in der BN→LEW Stammkombination bei isolierter Dünndarmtransplantation (DTx) eine Verabreichung von 2mg FK506 T0-5 postoperativ zum längerfristigen Überleben der Versuchstiere führt (Timmermann, 2000). Ausgehend von dieser Dosierung konnte nun in verschiedenen Versuchsreihen (siehe Kapitel 3.4.) eine Reduktion der Dosis auf zunächst 1,0 mg FK506 T0-5 und letztlich auf 0,5 mg FK506 T0-5 erreicht werden. Bei dieser Dosierung überlebten 80% der Versuchstiere die postoperative Periode.



**Abb. 2:** Überlebensrate nach LDTx (BN→LEW ) bei verschiedenen FK506-Dosierungen

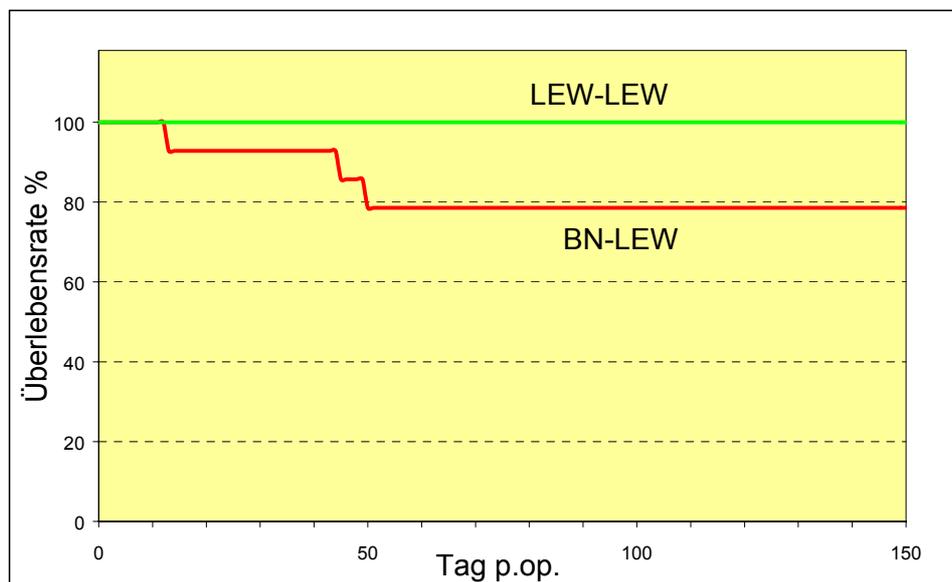
Mit dem neu entwickelten Modell war es nun möglich, immunologische Vorgänge nach Leber- / Dünndarmtransplantation unter Verhältnissen zu untersuchen, die dem physiologischen Normalzustand angepaßt waren. Durch die Untersuchungen zur Dosierung von FK506 gelang es dabei, die Einflüsse der initial notwendigen Immunsuppression auf ein Minimum zu reduzieren. Damit war ein erstes wichtiges Ergebnis erreicht. Alle weiteren Versuche wurden mit einer Dosierung von 0,5 mg FK506 T0-5 fortgesetzt.

## 4.2. Klinische Beurteilung der Tiere

Wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben wurde, war die Etablierung eines neuen Operationsmodells gelungen. Sowohl der unmittelbar postoperative als auch der Langzeitverlauf zeigten, daß beide Transplantate ihre Funktion ohne Einschränkung wahrnahmen. Um eventuell auftretende chronische Abstoßungsprozesse zu erfassen, diese waren von Meyer für die heterotope Leber- / Dünndarmtransplantation in 10 % der Fälle ab Tag +70 beschrieben worden (Meyer, 1998a), wurde die Versuchsdauer in der vorliegenden Arbeit von den üblichen 100 auf 150 Tage ausgedehnt.

### *Überlebensdaten*

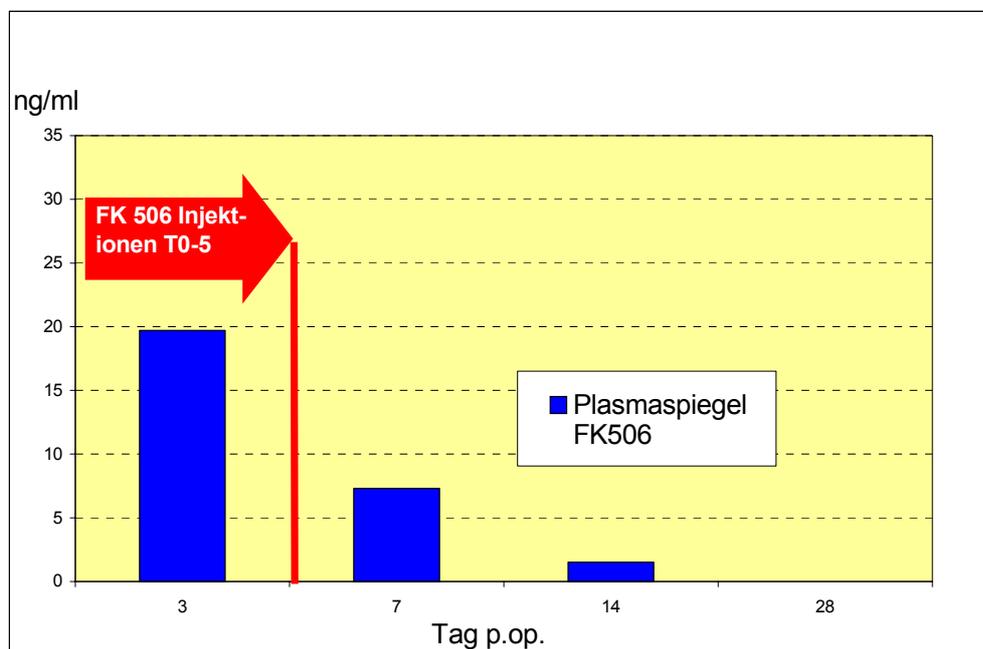
In Phase 1 der Versuche war, wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, die notwendige Dosis der Immunsuppression ermittelt worden. Im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe überlebten im Versuchsverlauf dann 80 % der Versuchstiere (11/14 Tiere, Abb. 3).



**Abb. 3:** Überlebensrate nach allogener LDTx (BN→LEW, n = 14) im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe LDTx (LEW→LEW, n = 3)

### *Bestimmung des FK506-Plasmaspiegels*

Die verwendete Kombination eines Dünndarmtransplantates mit einem Lebertransplantat ermöglichte eine deutliche Verringerung der notwendigen Suppression des Empfängerimmunsystems. Um in der von uns verwendeten Konstellation diesen Effekt zweifelsfrei der Leber zuordnen zu können, galt es in diesem Zusammenhang festzustellen, in welchem Zeitraum das applizierte FK506 im Empfängerorganismus wirksam war (siehe Kapitel 3.5.3.). Die Untersuchungen ergaben, daß spätestens ab Tag +14 kein therapeutisch relevanter Spiegel mehr vorlag (Abb. 4).



**Abb. 4:** FK-506-Plasmaspiegel nach LDTx

Durch Langzeitüberleben war langfristige Akzeptanz des allogenen Dünndarms nachgewiesen worden. Nun sollte der zu dieser Transplantatakzeptanz führende postoperative klinische Verlauf in den Empfängern evaluiert werden. Anhand folgender klinischer Kriterien wurde die Transplantatfunktion bewertet:

- Gewichtsverlust, Ikterus und Veränderungen des Serumbilirubins des Empfängers als Zeichen eines Funktionsverlustes des Lebertransplantates;
- Gewichtsabnahme und Diarrhöen als Zeichen verminderter Funktion des Dünndarmtransplantats.

Daneben wurde das makroskopische Erscheinungsbild der transplantierten Organe zum Entnahmezeitpunkt zur Beurteilung herangezogen.

### *Gewichtsverlust*

Der postoperative Gewichtsverlust der Tiere in der BN→LEW Stammkombination war mit dem Verlauf nach syngener Transplantation, also LEW→LEW zu vergleichen. Der dort beobachtete diskrete Gewichtsverlust - induziert durch das Operationstrauma - war in der BN→LEW Gruppe im Vergleich zur LEW→LEW Gruppe um etwa zwei Wochen verlängert. Im Anschluß nahmen die Tiere in beiden Gruppen kontinuierlich an Gewicht zu. Die in Abb. 5 dargestellte stärkere prozentuale Gewichtszunahme nach BN→LEW-Transplantationen erklärt sich daraus, daß die in der allogenen Versuchsgruppe operierten Tiere zum OP-Zeitpunkt jünger waren und damit ein geringeres Ausgangsgewicht aufwiesen. Bei Versuchsende an Tag +150 wogen sowohl die Tiere der allogenen und der syngenen Gruppe zwischen 350 und 450g.



**Abb. 5:** Gewichtsentwicklung nach allogener LDTx (BN→LEW, n = 14) im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe LDTx (LEW→LEW, n = 3)

### *Ikterus / Serumbilirubin*

Dysfunktionen der Leber äußern sich u.a. in einer Abbaustörung von Hämoglobin. Die daraus resultierenden Veränderungen können somit als verlässlicher Parameter zur Beurteilung der Organfunktion herangezogen werden.

So trat zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation bei den Tieren eine sich klinisch als Ikterus äußernde Erhöhung des Serumbilirubins auf. Dieser Befund wurde laborchemisch abgesichert. Dabei waren keine relevanten Erhöhungen gegenüber der syngenesischen Vergleichsgruppe zu verzeichnen, die Bilirubinkonzentration lag sogar stets unterhalb der Nachweisgrenze (Daten daher nicht gezeigt).

Als Parameter für einen funktionell intakten Gastrointestinaltrakt wurde das Auftreten von Diarrhöen herangezogen – auch hier ließen sich keine pathologischen Befunde erheben.

### *Makroskopische Beurteilung*

Im gesamten Versuchsverlauf war kein Funktionsverlust des kombinierten Leber-/Dünndarmtransplantats erkennbar. Der intraabdominelle Situs am Tag +150 zeigt ein makroskopisch nahezu unverändertes Transplantat (Abb. 6).



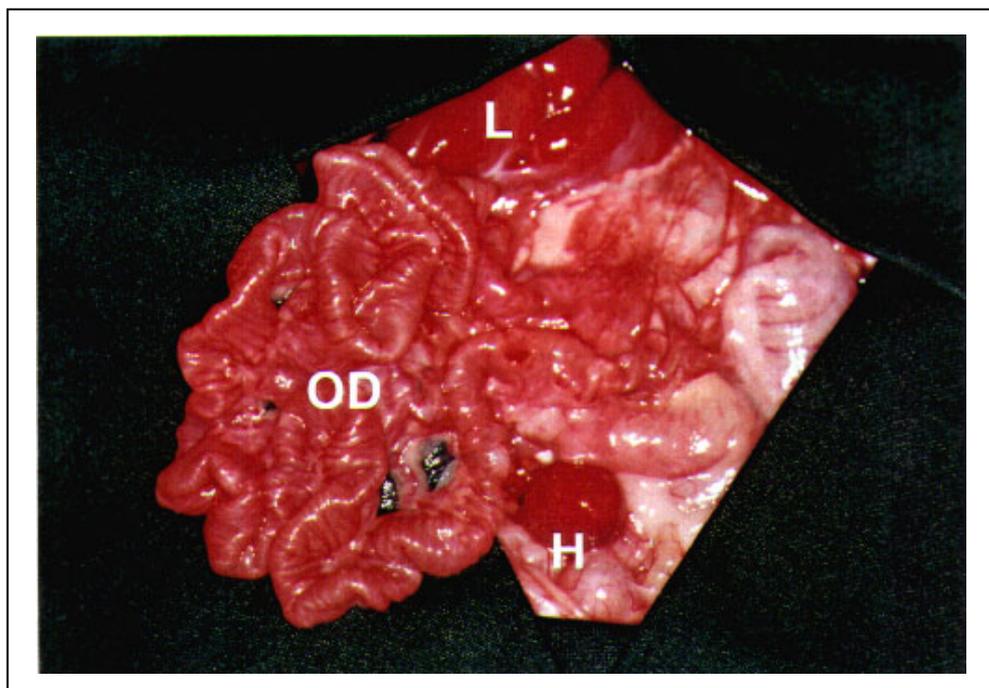
**Abb. 6:** Intraabdomineller Situs am Tag +150 nach LDTx (BN→LEW); (L): orthotopes Lebertransplantat, (OD): orthotopes Dünndarmtransplantat

### 4.3. Überprüfung Spender-spezifischer Toleranz

Die Untersuchungen zur Modellentwicklung hatten gezeigt, daß in der verwendeten Modellkombination ca. 80% der Transplantate überlebten. Um diese langfristige Akzeptanz zu beurteilen, galt es die Frage zu klären, ob dieser Prozeß auf spenderspezifischer Toleranz beruht. Dies geschah mittels sekundärer Herz- und Hauttransplantation.

#### *Herztransplantation:*

An Tag +70 nach LDTx wurden in der BN→LEW Stammkombination heterotope Herztransplantationen gemäß der in Kapitel 3.3.2. beschriebenen Operationstechnik durchgeführt (Abb.7):



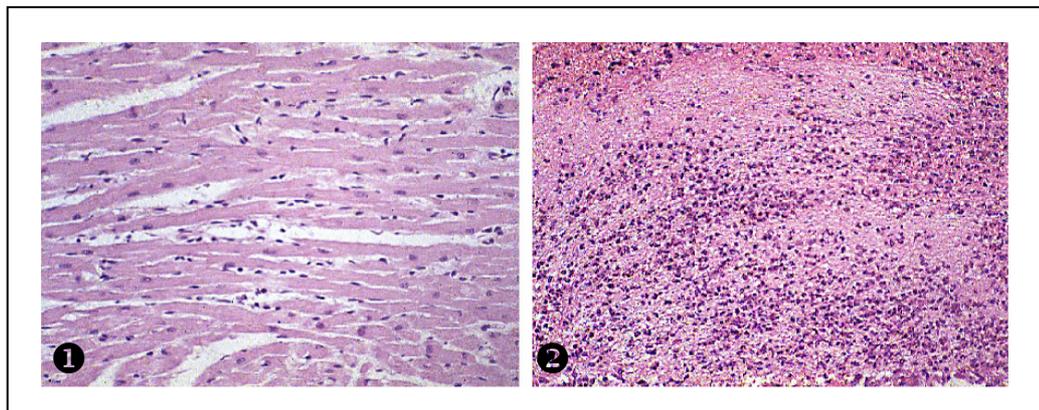
**Abb. 7:** Operationssitus einer heterotopen Herztransplantation am Tag +70 nach LDTx (BN→LEW); (L): orthotopes Lebertransplantat, (OD): orthotopes Dünndarmtransplantat, (H): heterotopes Herztransplantat

Langfristig überlebende LEW-Empfänger erhielten BN-Herzen (BN war Leber- und Dünndarmspender) und Drittstamm-Herzen.

**Tab. 2:** Funktionsdauer heterotoper Herztransplantate, operiert an Tag +70

<b>vorhergehende Transplantation</b>	<b>Immunsuppression FK506</b>	<b>Herztransplantat</b>	<b>n</b>	<b>Funktionsdauer (d)</b>
<b>LDTx</b> BN→LEW	0,5 mg/kg/d, Tag 0-5	BN	3	>80
<b>LDTx</b> BN→LEW	0,5 mg/kg/d, Tag 0-5	DA	3	7,8,8

Die BN-Herzen schlugen langfristig (>80 Tage), während die heterotopen DA-Herzen zwischen dem 7. und 8. Tag abgestoßen wurden (Tab. 2). Die tolerierten BN-Herzen zeigten histologisch eine regelrechte Architektur ohne Infiltrate, während in den DA-Herzen lymphozytäre Infiltrate und ausgedehnte Nekrosen als Zeichen der Abstoßung sichtbar wurden (Abb. 8).



**Abb. 8:** Histologie von Herztransplantaten an Tag + 150, welche nach B.LDTx an Tag +70 übertragen wurden; ① BN-Herztransplantat nach ununterbrochener Funktion, ② DA-Herztransplantat nach Funktionsverlust; H&E-Histologie, x200 Vergrößerung

#### *Hauttransplantation:*

Das Hauttransplantat gilt infolge seines hohen Gehalts an dendritischen Zelle (Langerhans'sche Zellen) im Vergleich zum Herzen als das immunogenere Transplantat. Daher wurden zur weiteren Austestung der spezifischen Non-Reaktivität nun in der BN→LEW Stammkombination an Tag +100 Hauttransplantate vom

primären Spenderstamm (BN) und einem Drittstamm (DA) auf langfristig überlebende Empfänger übertragen.

Den Ergebnissen der Herztransplantation entsprechend wurden Hauttransplantate des genetisch identischen Spendertieres (BN) langfristig akzeptiert, Hauttransplantate des Drittstammes (DA) im Mittel nach 7 Tagen abgestoßen (Tab.3).

**Tab. 3:** Funktionsdauer der Hauttransplantate, operiert an Tag +100

<b>vorhergehende Transplantation</b>	<b>Immunsuppression FK506</b>	<b>Hauttransplantat</b>	<b>n</b>	<b>Funktionsdauer (d)</b>
<b>LDTx</b> BN→LEW	0,5 mg/kg/d, Tag 0-5	BN	3	>80
<b>LDTx</b> BN→LEW	0,5 mg/kg/d, Tag 0-5	DA	3	7,8,8

Damit war festzustellen, daß nach orthotoper kombinierter Leber- / Dünndarmtransplantation langfristig überlebende Empfänger MHC-identische Herz- und Hauttransplantate akzeptieren – es wurde spenderspezifische Toleranz erreicht.

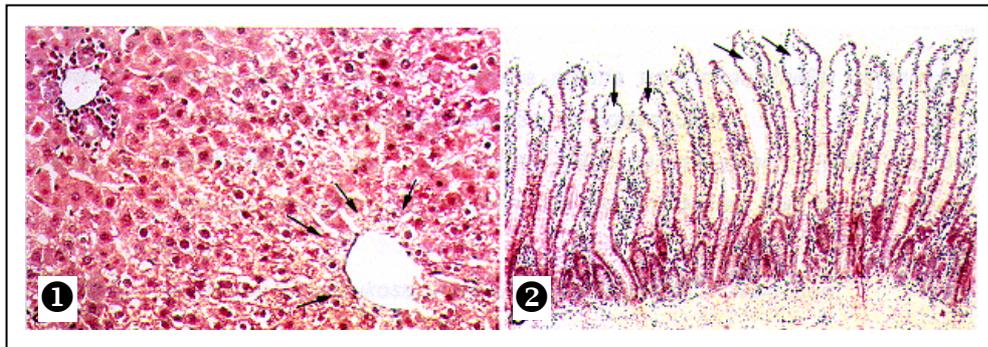
#### **4.4. Histologie**

Der Verlauf der in-vivo Versuche hatte gezeigt, daß in unserem Modell der orthotopen kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantation spezifische Toleranz entsteht. Dieser klinische Befund sollte nun auch histologisch abgesichert werden. Entsprechend dem zeitlichen Ablauf der Reaktionen nach Organtransplantation war beim Untersuchen der Präparate dabei auf folgendes zu achten:

- ① den Ischämie/Reperfusionsschaden
- ② die akute Abstoßungsreaktion und
- ③ die chronische Abstoßungsreaktion.

### *Ischämie/Reperfusionsschaden*

Der Ischämie/Reperfusionsschaden, der in der Leber sowohl nach syngener als auch nach allogener Transplantation die Folge ist (Momii, 1990; McKeown, 1988), zeigt sich i.d.R. als eine Region mit schlechter arterieller Perfusion im Bereich der Zentralvene. Diese Minderperfusion äußert sich histologisch als Ödembildung, Vakoulisierung der Hepatozyten sowie Einzelzellnekrosen. Am Dünndarm ist der Reperfusionsschaden gekennzeichnet durch ein Zottenödem mit Lösung des Epithels von der Basalmembran an der Zottenspitze. Zottenbasis und Kryptenregion bleiben im Gegensatz zur Abstoßungsreaktion von diesen Veränderungen unbeeinflusst (Müller, 1994).



**Abb. 9:** Ischämie- / Reperfusionsschaden im Leber- und Dünndarmtransplantat an Tag +03 nach LDTx (BN→LEW), H&E-Histologie; ① Leber: Zellödem und Vakoulisierung der Hepatozyten entlang der Zentralvene, x200 Vergrößerung, ② Dünndarm: Zottenödem und Abheben des Epithels von der Basalmembran an den Zottenspitzen, x100 Vergrößerung

In beiden Transplantaten fanden sich an Tag +03 Veränderungen, die im Sinne eines solchen Reperfusionsschadens zu werten waren (Zellödem entlang der Zentralvene, perizentral geschwollene Hepatozyten mit vereinzelt intrazellulären Vakoulen, Zottenödem im Dünndarmtransplantat). Bis Tag +07 kam es jedoch zur vollständigen Rückbildung. Da diese Veränderungen allerdings auch in der syngenen Kontrollgruppe feststellbar waren, erklären sie sich deshalb wohl durch die kurzfristige Ischämie und nachfolgende Reperfusion während des Transplantationsvorganges.

### *Akute Abstoßungsreaktion*

Um im Rahmen dieses Prozesses auftretende Reaktionen klassifizieren zu können, mußten zunächst die für die Leber international gebräuchlichen Kriterien einer humanen akuten Abstoßung (Hübscher, 1996; Batts, 1996) für die Ratte modifiziert werden. Anhand der Infiltratdichte und –verteilung sowie dem Ausmaß der Organdestruktion wurden für den Grad der Abstoßung folgende Kriterien festgelegt:

- Grad I: geringgradiges lymphozytäres Infiltrat der Portalfelder; geringgradige Einzelzellnekrosen oder lobuläre Lymphozyteninfiltrate;
- Grad II: ausgeprägtes mononukleäres Zellinfiltrat in allen Portalfeldern, die Grenzlamelle der Portalfelder überschreitend; mäßig ausgeprägte Leberzellnekrosen und ausgeprägtes lobuläres Zellinfiltrat;
- Grad III: weiter ausgedehntes Zellinfiltrat, konfluierende Leberzellnekrosen.

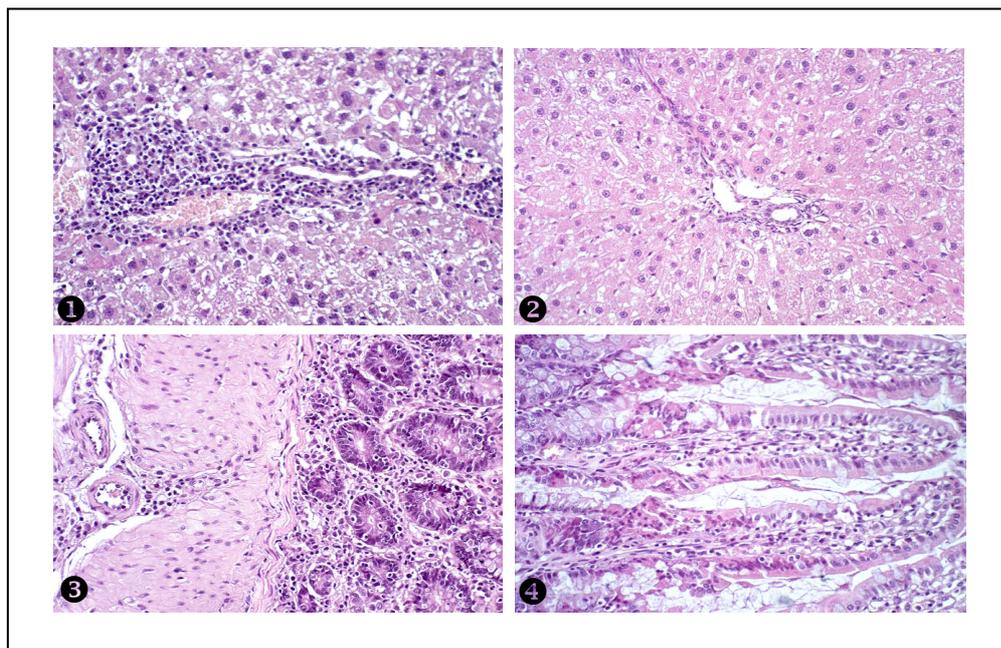
Mit einem ähnlichen Schema erfolgte die Graduierung der akuten Abstoßung am Dünndarm. Diese zeigt sich hier durch ein mononukleäres Zellinfiltrat zwischen den Epithelien der Krypten (Kryptitis) und in der Lamina propria. Die vermehrt abgeschilferten Mukosaanteile werden mangelhaft ersetzt; die Ausreifung in Becherzellen geht zugunsten vermehrter Proliferation verloren (Schmid, 1989; Kusanmäki, 1994). Die Beurteilung dieser Zeichen geschah mittels hier aufgeführter Regeln:

- Grad I: lymphozytäres Infiltrat der Lamina propria und intraepithelial beginnende Kryptitis, Verringerung der Becherzellen, Zottenödem
- Grad II: Epithelverlust an den Zottenspitzen („blunting“), Fehlen der Becherzellen, zunehmende Zelldichte des mononukleären Zellinfiltrats, Kryptitis;
- Grad III: weitestgehende Mukosazerstörung mit tiefreichenden Nekrosen.

Anhand dieser Parameter konnten die ablaufenden Veränderungen in beiden Transplantaten erfaßt und mit den Daten nach syngener Organübertragung verglichen werden.

In der Leber ließ sich nach allogener Transplantation erstmals an Tag +14 ein geringgradiges mononukleäres Infiltrat in den Periportalfeldern der Leber nachweisen, welches an Tag +28 einen Peak erreichte (Abb. 10).

Dieses Infiltrat konnte im Dünndarm perivaskulär und in der Kryptenregion bereits an Tag +07 beobachtet werden und dehnte sich bis zum Tag +28 maximal in der Lamina propria aus (akute Abstoßung Grad 1). In der Kryptenregion zeigte sich als Zeichen gesteigerter Regenerationsaktivität ein hoher Anteil an mitotischen Zellen. Epithelnekrosen im Sinne eines „villous blunting“ waren nicht erkennbar. Alle diese Veränderungen waren bis Tag +150 deutlich rückläufig, pathologische Zeichen waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar (Abb. 10).



**Abb. 10:** LDTx (BN→LEW), H&E-Histologie, x200 Vergrößerung  
Leber: ① Tag + 28 deutliches Portalfeld-Infiltrat, ② Tag + 150 Rückbildung des zellulären Infiltrates im Portalfeld  
Dünndarm: ③ Tag + 28 Kryptenregion mit lymphozytärem Infiltrat, ④ Tag + 150 Rückbildung des Infiltrates, intaktes Epithel

### *Chronische Abstoßungsreaktion*

Während sich die Prozesse der akuten Abstoßung wie bereits dargestellt histologisch v.a. durch zelluläre Infiltration äußern, manifestiert sich die chronische Abstoßung in der Leber v.a. durch Fibrosierung und Proliferation der Gallengänge, besonders in der Periportalregion. Desweiteren kommt es, bei gleichzeitig rückläufigem zellulären Infiltrat, zur Transplantatvaskulopathie, welche sich als Intimahyperplasie der Leberarterien darstellt (Geraghty, 1996; Demetris, 1997). Neben Zottenatrophie und Schleimhautfibrose stellt diese Transplantatvaskulopathie auch im Dünndarm das wesentliche Kriterium für die Entwicklung einer chronischen Abstoßung dar (Langrehr, 1993). Daneben zeigen sich Proliferationsvorgänge durch eine signifikante Verbreiterung der Tunica muscularis propria (Walgenbach, 1996b).

Bereits der in-vitro Langzeitverlauf der Versuchsgruppe mußte das Auftreten einer signifikanten chronischen Abstoßung bezweifeln lassen, dies war jedoch histologisch abzusichern.

In allen allogenen Transplantaten zeigte die Leber eine regelrechte Architektur ohne bestehendes Infiltrat, das Zottenepithel des Dünndarmtransplantates war intakt und wies als Zeichen der Differenzierung einen regulären Becherzellgehalt auf. Damit waren also bei den langfristig überlebenden Tieren (Tag +150) keinerlei Zeichen einer chronischen Abstoßung nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen: Zeichen der akuten Transplantatabstoßung traten in beiden Organen ab T+07 auf und erreichten ihren Höhepunkt an Tag +28. Während z.B. nach Leber- / heterotoper Dünndarmtransplantation in 1/10 Fällen Zeichen einer chronischen Abstoßung auftreten (Meyer, 1998a), ließen sich in dem hier verwendeten Transplantationsmodell Anzeichen für eine chronische Abstoßung zu keinem Zeitpunkt nachweisen.

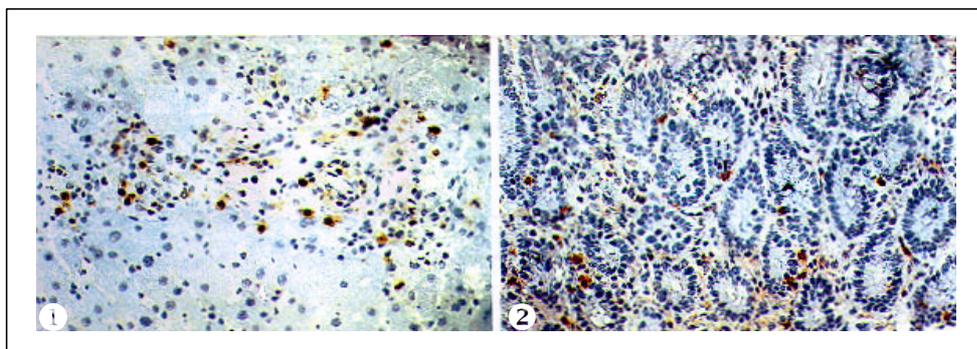
## 4.5. Differenzierung der zellulären Veränderungen

Mittels der einfachen HE-Histologie hatte sich eine der Toleranzentstehung vorausgehende passagere Abstoßungsreaktion nachweisen lassen, welche sich in einer bis zum Tag +28 zunehmenden Infiltration der transplantierten Organe Leber und Dünndarm äußerte. Dieses Geschehen galt es nun auf zellulärer Ebene genauer zu differenzieren. Hierzu wurden die Transplantate immunhistologisch aufgearbeitet (Gefrier- und Paraffinschnitt) und anschließend ausgewertet. Das Hauptaugenmerk mußte dabei auf drei große Zellpopulationen gelegt werden, die entscheidenden Anteil am Ablauf einer Abstoßungsreaktion tragen:

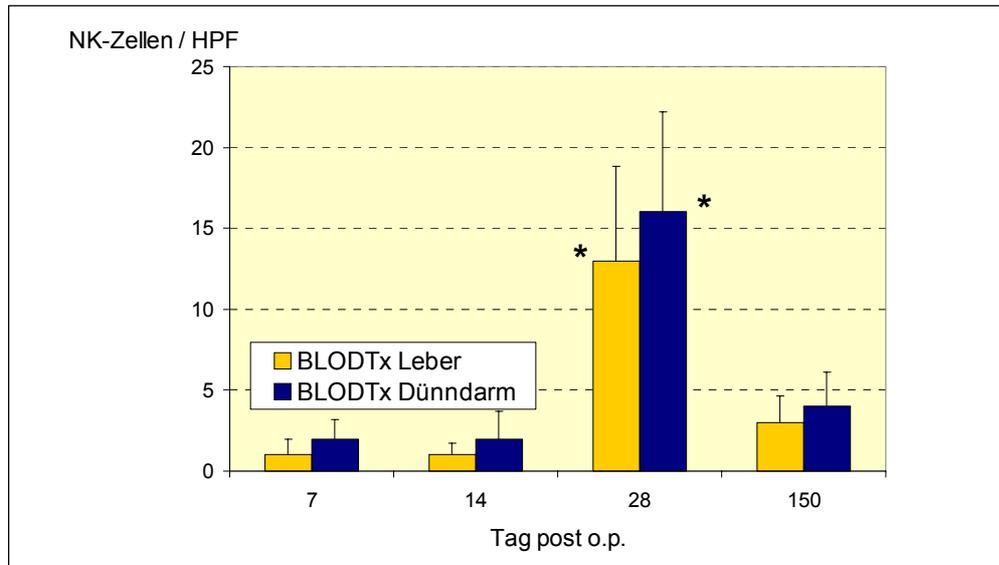
- ① Natürliche Killerzellen
- ② Antigen-präsentierende Zellen
- ③ T-Lymphozyten

### 4.5.1. Natürliche Killerzellen

Analog des Ablaufes einer Abstoßungsreaktion standen zunächst die Natürlichen Killerzellen im Mittelpunkt des Interesses. Sie bilden die Hauptpopulation der unspezifischen Immunantwort dar und attackieren nach dem "Missing Self" Prinzip alle jene Zellen, die kein körpereigenes MHC I exprimieren. Am Gefrierschnitt wurde mit dem mAk 10/78 Anzahl und Verteilung der NK-Zellen im Transplantat immunhistologisch ermittelt.



**Abb. 11:** NK-Zellinfiltrat am Tag +28: ① im Portalfeld des Lebertransplantates ② in den Krypten des Dünndarmtransplantates nach LDTx (BN→LEW ); Immunhistologie mit mAK 10/78, x200 Vergrößerung



**Abb. 12:** NK-Zellen im Leber- und Dünndarmtransplantat nach LDTx (BN→LEW); Immunhistologie mit mAk 10/78, HPF = “High power field“ = Gesichtsfeld in Vergrößerung x400 (Mittelwert +/- Standardabweichung), \*p<0,0001 vs Tag +7

Nach kombinierter orthotoper Leber- / Dünndarmtransplantation kam es in der allogenen Versuchsreihe ab Tag +07 zu einer signifikanten Anreicherung dieser Zellpopulation, die sowohl in Leber als auch Dünndarm ihren Höhepunkt an Tag +28 erreichte.

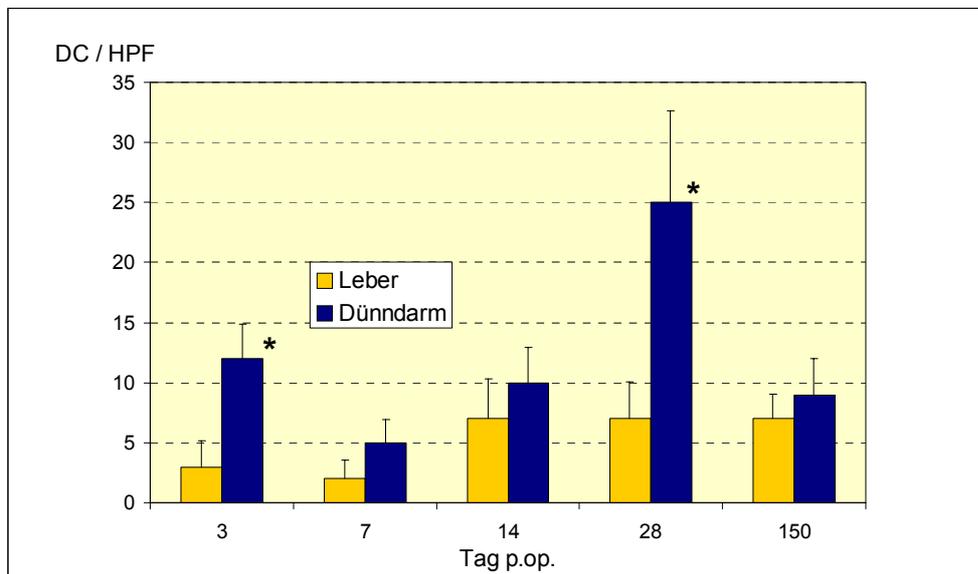
#### 4.5.2. Antigen-präsentierende Zellen

War mit der Untersuchung der Natürlichen Killerzellen zunächst eine Analyse der unspezifischen Immunantwort erfolgt, sollte sich im weiteren mit der Alloantigen-spezifischen Immunreaktion beschäftigt werden. Dabei stand zunächst die Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen im Vordergrund, welche im Transplantat an der Induktion der spezifischen Immunantwort beteiligt sind. Zu dieser Gruppe zählen dendritische Zellen (DC), aktivierte Makrophagen und B-Zellen.

#### 4.5.2.1. Dendritische Zellen

Im Verlauf der sich entwickelnden Abstoßungskrise reicherten sich nach allogener LDTx dendritische Zellen im kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantat an. Diese wurden mittels mAk Ox62 immunhistologisch dargestellt. Da der mAk Ox62 zusätzlich  $\gamma\delta$  T-Zellen markiert, mußten bei der Auswertung noch typische morphologische Kriterien - länglicher Zellkern und typische Cytoplasma-Ausläufer - herangezogen werden. Damit war eine eindeutige Charakterisierung dieser Zelllinie möglich.

Interessanterweise ließen sich auch an Tag +150 noch eindeutig vom Spender stammende DC nachweisen (Doppelfärbung Ox62/Ox27).



**Abb. 13:** Anzahl dendritischer Zellen in den Portalfeldern der Leber und den Krypten des Dünndarms nach LDTx (BN→LEW); Immunhistologie mit mAk Ox 62 (Mittelwert +/- Standardabweichung), \* $p < 0,0001$  vs Tag +7

In den Krypten des Dünndarms reicherten sich ebenfalls DC an. Ein Maximum wurde an Tag +28 erreicht. Diese Infiltration fand in einem biphasischen Verlauf statt. Einem initialen Peak an Tag +03 folgte ein signifikanter Rückgang bis Tag +07, das beschriebene Maximum am Ende der vierten Woche.

Eine frühe Infiltration durch DC in den Spenderdünndarm konnte auch bei der Analyse der mesenterialen Lymphknoten gezeigt werden, die hier zusätzlich einer Analyse unterzogen wurden. Diese unterlagen im Versuchsverlauf einem zuneh-

menden fibrotischen Umbau, so dass an Tag +150 eine Analyse der mesenterialen Lymphknoten nicht mehr möglich war.

**Tab. 4:** Anzahl dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten des Dünndarmtransplantates nach LDTx (BN→LEW ); Angabe als positive Zellen/pro HPF

<b>Stamm</b>	<b>Tag +03</b>	<b>Tag +07</b>	<b>Tag +14</b>	<b>Tag +28</b>
BN→LEW	79,7 ± 8,4	71,0 ± 14,0	63,7 ± 7,1	48,0 ± 6,6

#### 4.5.2.2. Makrophagen

Zur immunhistologischen Darstellung der Makrophagen wurde der mAk Ox 42 verwendet. Nach erfolgter Infiltration des Transplantates üben diese im Transplantat eine Doppelfunktion aus: Sie entfernen Zelldetritus und präsentieren Antigene an T- und B-Lymphozyten.

Solche Makrophagen ließen sich im Rahmen der protrahierten Abstoßungskrise mittels o.g. Färbung nur an Tag +28 in beiden Bestandteilen des Transplantates nachweisen.

**Tab. 5:** Anzahl der infiltrierenden Makrophagen in den Portalfeldern der Leber und Krypten des Dünndarms nach LDTx (BN→LEW ); Immunhistologie mit mAk Ox 42; semiquantitative Analyse, n = 3 pro Gruppe

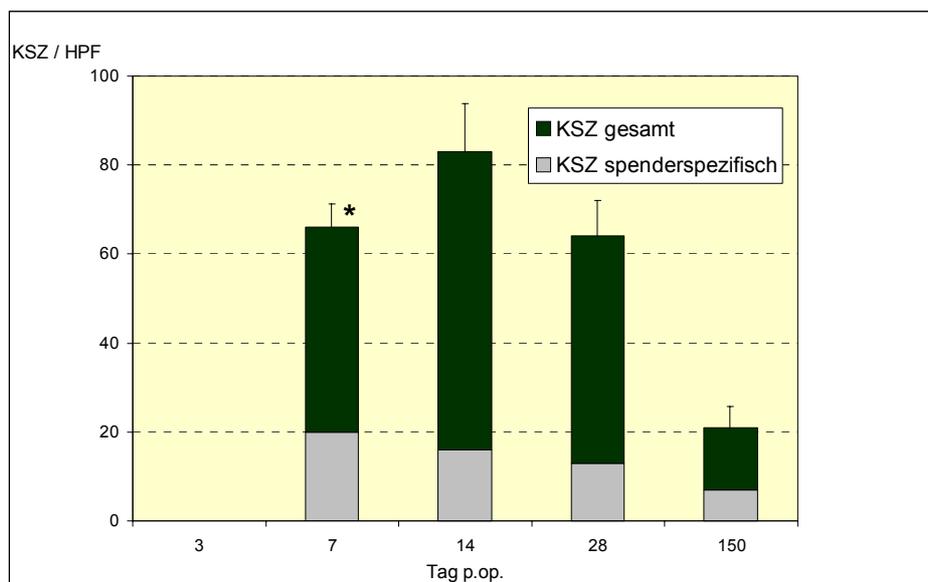
<b>Stamm</b>	<b>Transplantat</b>	<b>Tag +03</b>	<b>Tag +07</b>	<b>Tag +14</b>	<b>Tag +28</b>	<b>Tag +150</b>
BN→LEW	Leber	-	-	-	+	-
BN→LEW	Dünndarm	-	-	-	+	-

Eine Subpopulation der Makrophagen, sogenannte Kupffer'sche Sternzellen (KSZ), sollen als Gewebsmakrophagen der Leber eine zentrale Rolle bei der Präsentation des aus dem Portalkreislauf stammenden Alloantigene spielen. (Takara,

1993). Diese Lebermakrophagen wurden mit mAk KiM2R und mAk ED2 immunhistologisch nachgewiesen.

Im Parenchym des Lebertransplantates waren unter initialer Immunsuppression nach allogener Transplantation KSZ in der postoperativen Phase (Tag +07) vermehrt anzutreffen. Ihre Zahl stieg bis Tag +14 kontinuierlich an, um dann bis zum Tag +150 wieder zurückzugehen.

Wie schon bei der Analyse der DC kam abschließend wiederum eine Doppelmarmarkierung der KSZ mit ED 2 / Ox 27 zur Anwendung. Die Darstellung des spender-spezifischen Anteils dieser Population ergab eine kontinuierliche Abnahme im Versuchsverlauf. Wie schon für die DC ließ sich auch für Spender-KSZ langfristige Persistenz im Empfängerorganismus nachweisen.



**Abb. 14:** Anzahl der Kupffer'schen Sternzellen im Lebertransplantat nach LDTx (BN→LEW ); Immunhistologie mit mAk KiM2R und ED2 / HPF; n = 3 pro Gruppe, (Mittelwert +/- Standardabweichung), \*p<0,0001 vs Tag +03

Während in der Spätphase der Abstoßung in den Portalfeldern also hauptsächlich Makrophagen als Bestandteil des abstoßungsbedingten Infiltrates anzutreffen waren, ließ sich in der Frühphase eine deutliche Zunahme der residenten Gewebsmakrophagen im Leberparenchym, der Kupffer'schen Sternzellen verzeichnen.

#### 4.5.2.3. B-Lymphozyten

Als weitere Zellpopulation, die im aktivierten Zustand Antigene präsentiert, sollten letztlich noch die B-Lymphozyten analysiert werden. Sie wurden mit mAk Ox33 markiert und immunhistologisch dargestellt.

**Tab. 6:** Anzahl der B-Lymphozyten im Leber- und Dünndarmtransplantat nach LDTx (BN→LEW ); Immunhistologie mit mAk Ox 33; semiquantitative Analyse; n = 3 pro Gruppe

Stamm	Transplantat	Tag +03	Tag +07	Tag +14	Tag +28	Tag +150
BN→LEW	Leber	-	-	-	+	-
BN→LEW	Dünndarm	-	-	(+)	(+)	-

B-Lymphozyten traten zwar als Bestandteil des Infiltrates im kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantates während der passageren Abstoßungsreaktion auf, im Vergleich zu den beteiligten T-Lymphozyten und Makrophagen spielten sie allerdings zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle.

#### *Zusammenfassung*

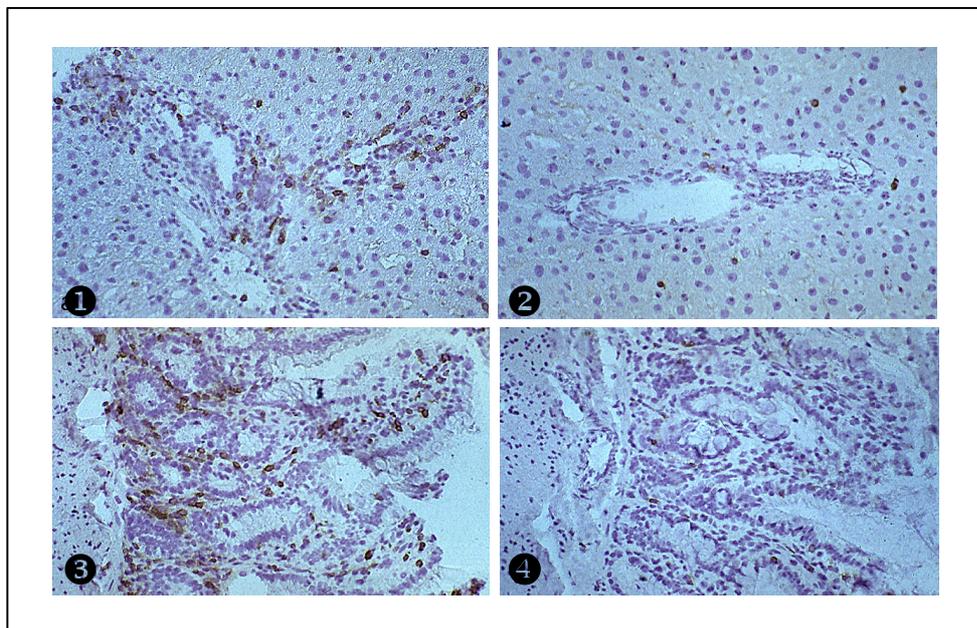
Zeitgleich mit der Abstoßung reicherten sich antigenpräsentierende Zellen in den kombinierten allogenen Transplantaten an. Schon in der Frühphase waren die residenten Makrophagen der Leber, die Kupffer'schen Sternzellen, vermehrt vorhanden. An Tag +28 fand sich im Rahmen der verzögert einsetzenden Abstoßungsreaktion der höchste Anteil an DC. Während der Anteil infiltrierender DC in der Leber kontinuierlich leicht zunahm, erfolgte die DC-Infiltration des Dünndarms in einem biphasischen Verlauf mit deutlichen Maxima an Tag +03 und Tag +28. Einen weiteren Hauptbestandteil des abstoßungsbedingten Zellinfiltrates bildeten an Tag +28 infiltrierende Makrophagen des Empfängers. B-Lymphozyten spielten dagegen im Rahmen der akuten Reaktion zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle.

## 4.6. Untersuchungen zu T-Lymphozyten und Apoptose

### 4.6.1. Kinetik der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten

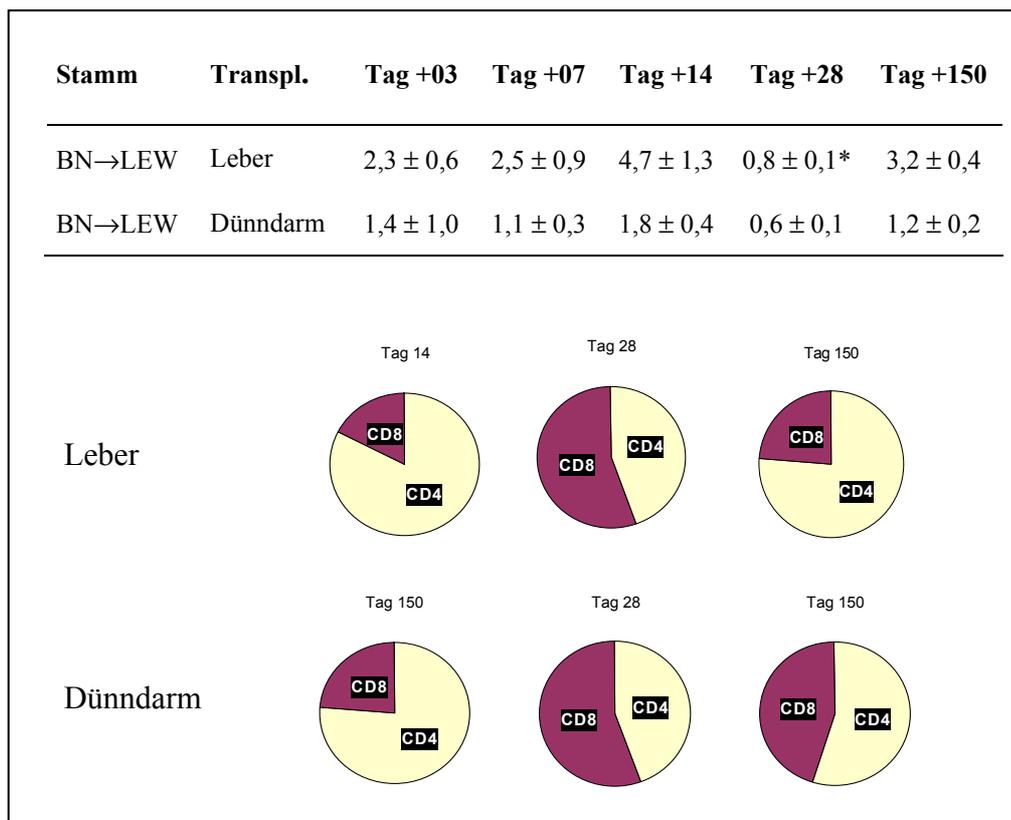
Die histologische Auswertung der allogenen Transplantate (siehe Kapitel 4.4.) hatte ein mononukleäres Zellinfiltrat in den Periportalfeldern der Leber und entlang der Lamina propria des Dünndarms gezeigt. Es hatte sich im Rahmen der zellulären Abstoßungsreaktion entwickelt. Mittels Immunhistologie war dann eine Differenzierung des Infiltrates durchgeführt und antigenpräsentierende Zellen, v.a. dendritische Zellen und Makrophagen in diesem Infiltrat nachgewiesen worden.

Nach Auswertung dieses sogenannten "afferenten" Schenkels galt es im Folgenden nun die Reaktionspartner dieser antigenpräsentierenden Zellen (APC), die T-Lymphozyten zu analysieren. Mittels mAk W3/25, Ox8, und 341 (siehe Tab. 1, Kap. 3.5.4.) wurden deren Subpopulationen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) immunhistologisch klassifiziert.



**Abb. 15:** Darstellung der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten im Leber- und Dünndarmtransplantat nach LDTx (BN→LEW); Immunhistologie mit mAk 341; x200 Vergrößerung; Lebertransplantat: ① Tag + 28 und ② Tag + 150; Dünndarmtransplantat: ③ Tag + 28 und ④ Tag + 150

Das Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  spiegelt den Verlauf einer Abstoßungsreaktion wieder (McCaughan, 1990). So finden sich unter physiologischen Bedingungen, d.h. in nicht transplantierten Organen, sowohl in Portalfeldern der Leber als auch in den Krypten des Dünndarms nur sehr wenige T-Lymphozyten. Dabei überwiegen immer die  $CD4^+$  Zellen, daß Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  ist damit also größer als 1. Die sequentiellen histologischen Untersuchungen hatten gezeigt, daß sich trotz des klinisch völlig unauffälligem Verlaufes an Tag +14 und Tag +28 ein mononukleäres Zellinfiltrat entwickelt hatte (siehe Kapitel 4.4.). Die Klassifizierung des T-Lymphozyten-Anteils dieses Infiltrates mittels Doppelfärbung ergab, daß dieses an Tag +14 zunächst überwiegend aus  $CD4^+$  T-Lymphozyten, an Tag +28 jedoch überwiegend aus  $CD8^+$  T-Lymphozyten bestand. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag +150 hatte sich das Infiltrat wieder zurückgebildet und der Quotient wieder umgekehrt. Damit konnte nachgewiesen werden, daß sich im hier verwendeten Modell das Verhältnis der T-Lymphozyten auf dem Höhepunkt der immunologischen Auseinandersetzung umkehrte.



**Abb. 16:**  $CD4^+/CD8^+$  Verhältnis im Empfänger-Zellinfiltrat nach LDTx (BN→LEW); Immunhistologie mit mAk W3/25, 341 und Ox 42; n=3 pro Gruppe; (Mittelwert +/- Standardabweichung), \*p<0,0001 vs Tag + 3

### *Zusammenfassung*

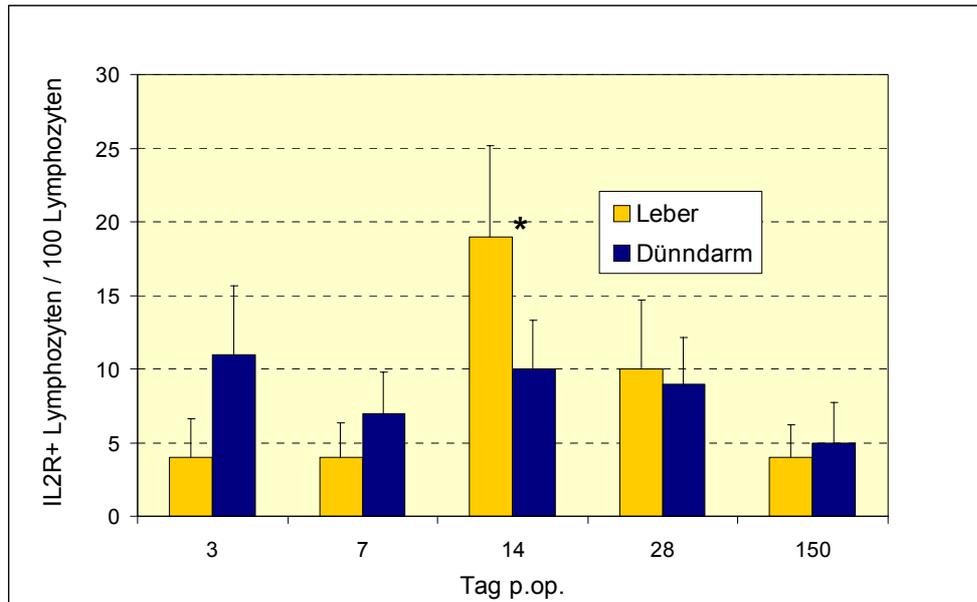
Das während der Abstoßung in den allogenen Transplantaten auftretende Zellinfiltrat bestand neben Dendritischen Zellen und Makrophagen (siehe Kapitel 4.5.) aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Der Abstoßungsprozeß ließ sich bezüglich der T-Lymphozyten anhand der Änderung des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Verhältnisses verfolgen. Während dieses Verhältnis zu Beginn des Versuches größer als 1 war und damit die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Infiltrat überwogen, konnte auf dem Höhepunkt der Reaktion an Tag +28 eine Umkehrung dieser Konstellation gezeigt werden. Am Ende der Untersuchung an Tag +150 glichen die Parameter der allogenen Transplantate im wesentlichen der syngenen Gruppe.

### **4.6.2. Aktivierung infiltrierender T-Lymphozyten und Auswirkungen auf das Transplantat**

#### *Aktivierung infiltrierender T-Lymphozyten*

Um den Verlauf der passageren Abstoßungsreaktion weiter zu charakterisieren, wurde die Aktivierung der T-Lymphozyten analysiert. Ihre IL2-Rezeptor-Expression gilt dabei als Parameter und wurde mittels mAK Ox 39 und NDS 61 (siehe Tab. 1, Kap. 3.5.4.) immunhistologisch dargestellt.

Im Dünndarmtransplantat befand sich bezogen auf die Gesamtinfiltratmenge ein nahezu gleichbleibender Anteil von T-Lymphozyten im aktivierten Zustand. In der Leber hingegen war der prozentuale Anteil aktivierter, also IL2-Rezeptor<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu Beginn der histologisch erfaßbaren Abstoßungsreaktion an Tag +14 besonders hoch. Obwohl die Gesamtmenge der T-Lymphozyten danach weiter zunahm und wie beschrieben an Tag +28 den Höhepunkt erreichte, nahm der Anteil aktivierter T-Lymphozyten bereits wieder ab.



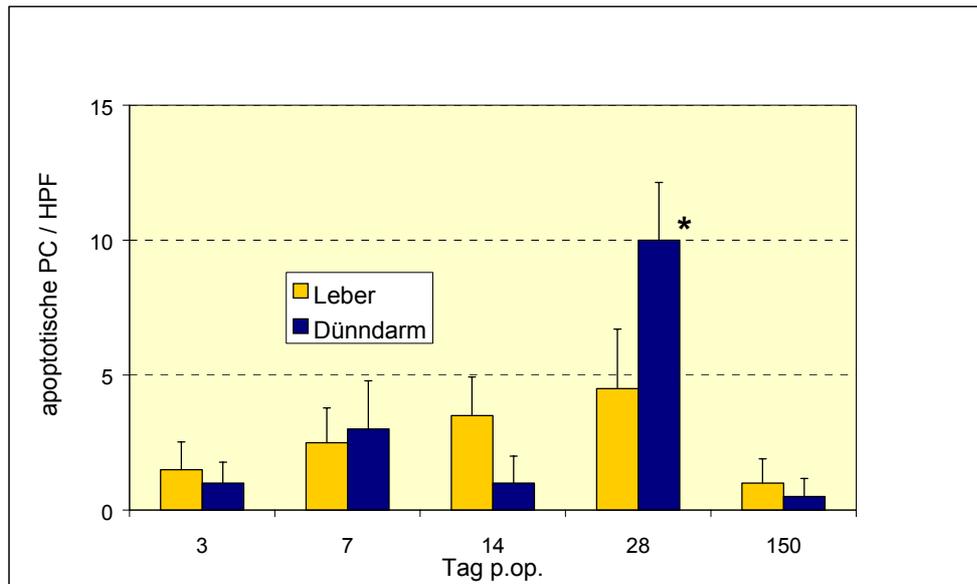
**Abb. 17:** IL2R-Expression im Zellinfiltrat des Leber- und Dünndarmtransplantates nach LDTx (BN→LEW); Immunhistologie mit mAk Nds 61/Ox 39; n=3 pro Gruppe, (Mittelwert +/- Standardabweichung), \*p<0,0001 vs Tag + 3

#### *Auswirkung auf das Transplantat*

Als Ausdruck einer Abstoßungsreaktion kommt es sowohl in Leber- als auch Dünndarmtransplantaten zum Tod parenchymaler Zellen durch Apoptose (Krams, 1997; Fayyazi, 1997). Dieses Phänomen sollte nun im Zusammenhang mit dem untersuchten Aktivierungsgrad der infiltrierenden T-Zellen beleuchtet werden.

Die höchsten Apoptoseraten parenchymatöser Zellen waren auf dem Höhepunkt der immunologischen Auseinandersetzung zwischen Tag +14 und Tag +28 zu verzeichnen. Im Dünndarm stieg, simultan zur zunehmenden lymphozytären Infiltration des Transplantates, der Anteil apoptotischer parenchymaler Zellen signifikant an.

Obwohl auch in der Leber die Gesamtmenge des Infiltrates deutlich zunahm, kam es in diesem Zeitraum hier zu nur einer diskreten Veränderung der Apoptoserate der PC.



**Abb. 18:** Apoptoserate der parenchymalen Zellen (PC) im Leber- und Dünndarmtransplantat nach LDTx (BN→LEW); n = 3 pro Gruppe, (Mittelwert +/- Standardabweichung), \*p<0,0001 vs Tag + 3

### Zusammenfassung

Im Dünndarmtransplantat ließen sich keine auffälligen Veränderungen des Aktivierungsgrades infiltrierender T-Lymphozyten beobachten. Parallel zum Anstieg der Gesamtmenge des zellulären Infiltrates nahm auch der Anteil apoptotischer Parenchymzellen zu.

Im Lebertransplantat war der Anteil der IL2-Rezeptor<sup>+</sup> T-Lymphozyten an der Gesamtmenge infiltrierender T-Lymphozyten schon zu Beginn der Abstoßungsreaktion an Tag +14 am höchsten. Trotz weiter zunehmender Zelldichte nahm der Anteil IL2-Rezeptor<sup>+</sup> T-Lymphozyten bis zum Höhepunkt der Abstoßungsreaktion an Tag +28 bereits wieder ab. Gleichzeitig kam es auch zu keinem weiteren Anstieg der Apoptoserate der Parenchymzellen der Leber. Diese Beobachtung muß daher mit der abnehmenden Aktivierung der T-Lymphozyten erklärt werden.

#### **4.6.3. Apoptose nicht-parenchymatöser Zellen im Transplantat**

Die in den Kapiteln 4.1.-4.5. beschriebenen Ergebnissen wiesen auf das Entstehen transplantatspezifischer Toleranz in den Empfängertieren hin. Die Differenzierung der zellulären Veränderungen hatte dabei besonders für T-Zellen ein charakteristisches Verteilungsmuster gezeigt. Als wichtigste Zellpopulation bei einer Abstoßungsreaktion waren sie im Transplantat auf dem Höhepunkt der immunologischen Auseinandersetzung an Tag +28 in hoher Anzahl, im Status der Toleranz an Versuchsende jedoch nur noch in geringer Menge anzutreffen.

Eine Untersuchung zum "Verbleib" dieser Zellen ergab sich daher aus den bisher beschriebenen Ergebnissen. Es war zu klären, auf welche Weise das zelluläre Infiltrat in den Spenderorganen reduziert wird. Wandern die infiltrierenden Zellen wieder aus dem Transplantat aus, oder werden sie vor Ort zerstört?

In der Literatur wird gehäuftes Auftreten von apoptotischem Zelltod infiltrierender Empfängerzellen für die isolierte Lebertransplantation im Mausmodell beschrieben (Qian, 1997). Daher wurden infiltrierende apoptotische Zellen mittels typischer histologischer Klassifikationskriterien (geschrumpfte Zelle, fragmentierter Nucleus) und TUNEL-Assay (siehe Kapitel 3.5.) identifiziert. Zur Beurteilung wurden Areale ausgewählt, die dem Prozeß der Infiltration am stärksten unterliegen. Dies sind in der Leber die Periportalfelder, im Dünndarm der Kryptenbereich. Anschließend erfolgte eine nähere Differenzierung mittels der neu etablierten Doppelfärbung mit mAk Ox 8 (siehe Kapitel 3.5.).

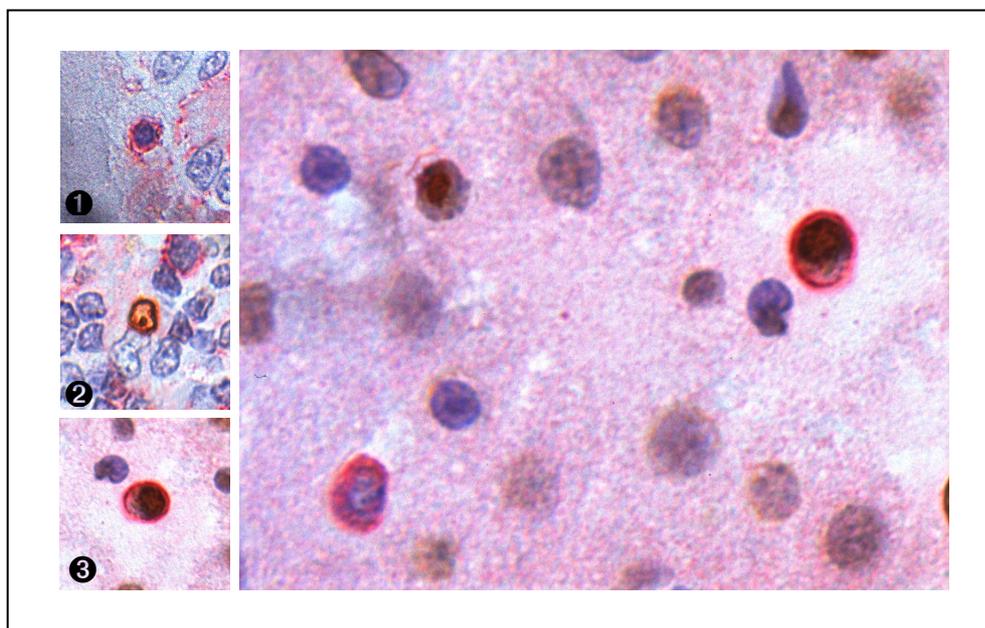
Die höchste Apotoserate von nicht-parenchymatösen Zellen (NPC) war in beiden Organen, korrelierend mit der Menge des Gesamtinfiltrates, an Tag +28 zu verzeichnen. Auch hier zeichnete sich allerdings eine unterschiedliche Kinetik für die beiden Transplantatbestandteile ab.

Die ermittelten Werte zeigten für die Leber einen konstanten Anstieg der Apotoserate von NPC. Ein solcher Verlauf ließ sich für den Dünndarm nicht erkennen.

**Tab. 7:** Semiquantitative Analyse apoptotischer nicht-parenchymatösen Zellen im kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantat nach LDTx (BN→LEW ) (Leber: Periportalfeld, Dünndarm: Kryptenbereich)

Transplantat	Tag +03	Tag +07	Tag +14	Tag +28	Tag +150
Leber	-	(+)	++	+++	(+)
Dünndarm	-	(+)	+	+	(+)

Dieser Anstieg der Apoptoserate von NPC in der Leber sollte mittels besserer Differenzierung dieser Zellen abschließend noch genauer charakterisiert werden. Mit der in Kapitel 3.5. beschriebenen Doppelfärbung TUNEL / mAk Ox8 konnten an Tag +28 30% aller apoptotischen Zellen als CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten identifiziert werden. Da zu diesem Zeitpunkt ein CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> Verhältnis von 0,8 besteht (siehe Kapitel 4.6.1.) und damit v.a. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten den Hauptbestandteil des Infiltrates bilden, bedeutet diese Beobachtung, daß auf dem Höhepunkt der Abstoßungskrise leberspezifisch v.a. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten durch Apoptose zu Grunde gehen.



**Abb. 19:** Apoptotische Zellen am Tag +28 nach LDTx (BN→LEW ); ① CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyt (mAk Ox 8, rot = fast red), ② apoptotische Zelle (TUNEL braun = Peroxidase), ③ apoptotischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyt Doppelfärbung TUNEL / Ox 8; x1000 Vergrößerung

### *Zusammenfassung*

In den beiden Transplantatbestandteilen ließ sich für die infiltrierenden NPC des Empfängers eine unterschiedliche Kinetik feststellen. Im Lebertransplantat unterliegen diese bis Tag +28 vermehrt dem apoptotischen Zelltod. Da dieses Phänomen im Dünndarm nicht auftrat, scheint es sich um einen leberspezifischen Prozeß zu handeln.

## 5. *Beantwortung der Fragen*

- ① Läßt sich der in der Literatur beschriebene protektive Effekte der Leber auf cotransplantierte Organe auch auf den hoch immunogenen Dünndarms ausdehnen?

Bereits 1969 beschrieb Calne den protektiven Effekt der Leber auf cotransplantierte Nieren im Schweinemodell (Calne, 1969). Für das Pankreas ist ein entsprechender Effekt der Leber für das Rattenmodell bekannt (Wang, 1998), Rasmussen beschreibt dieses Phänomen bei der humanen Transplantation für die Niere (Rasmussen, 1995). In der vorgestellten Arbeit wurde ein Modell zur orthotopen Leber- / Dünndarmtransplantation in der Ratte entwickelt. In der gewählten BN→LEW Stammkombination konnte dabei in 80% der Fälle Langzeitüberleben der Versuchstiere erzielt werden.

- ② Kann dabei eine Anordnung etabliert werden, die sich auf klinische Bedingungen übertragen läßt?

Ein von Meyer beschriebenes Modell zur kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantation mit heterotoper Lage des Dünndarms (Meyer, 1998b) konnte weiterentwickelt werden. Unter initialer, niedrig dosierter Immunsuppression gelang es, das Dünndarmtransplantat von Anfang an in die Nahrungspassage zu integrieren. Als Ergebnis dieser Arbeit wird damit ein Modell vorgestellt, bei dem es gelingt, die Verhältnisse nach Leber- / Dünndarmtransplantation unter exakt physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

- ③ Bestehen in einem solchen Modell Prozesse einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion?

Der postoperative Verlauf und alle zur Beurteilung der Tiere herangezogenen klinischen Parameter zeigten zu keinem Zeitpunkt Zeichen einer akuten Abstoßung. Histologisch war in beiden Transplantatbestandteilen eine ab Tag +07 beginnende Infiltration durch Zellen des Empfänger-Immunsystems zu erkennen, die ihren Höhepunkt an Tag +28 erreichte. Als Zeichen einer stattfindenden akuten Abstoßungsreaktion kam es parallel zur Apoptose parenchymaler Zellen der Transplantatbestandteile. Anzeichen für chronische Abstoßungsvorgänge ließen sich zu keinem Zeitpunkt nachweisen.

- ④ Beruht langfristige Akzeptanz eines Leber- / Dünndarmtransplantates auf der Induktion spezifischer Toleranz im Empfänger?

Die Versuchstiere überlebten im Langzeitverlauf mehr als 150 Tage. Durch Herztransplantationen an Tag +70 und Hauttransplantationen an Tag +100 konnte gezeigt werden, dass diese langfristige Akzeptanz im Empfängerorganismus nur für Organe genetisch gleicher Spender besteht. Es handelt sich also um einen spenderspezifischen Prozeß.

- ⑤ Verändert die verwendete Immunsuppression nur den zeitlichen Verlauf oder auch den grundlegenden Mechanismus der zu akuter und chronischer Abstoßung führenden Prozesse?

Die eingesetzte immunsuppressive FK506-Dosis war nur bis Tag +07 in therapeutischen Konzentrationen wirksam. Im Vergleich zu Modellen ohne Immunsuppression konnte gezeigt werden, daß zwar Stärke und zeitlicher Verlauf der Abwehrreaktion im Empfängerorganismus beeinflußt werden. Am grundlegenden zellulären Ablauf der Immunreaktion scheint jedoch nichts verändert zu werden.

- ⑥ Welche Veränderungen in beiden Organen stehen mit einer etwaigen Toleranzentwicklung in Zusammenhang?

Unter dem Aspekt, daß ein isoliertes Dünndarmtransplantat in der verwendeten BN→LEW Stammkombination ohne begleitende Lebertransplantation abgestoßen wird, scheinen die Veränderungen einzig von der Leber auszugehen. Hier fand sich im Vergleich zum Dünndarmtransplantat:

- ein verzögerter Anstieg an dendritischen Zellen,
- die Häufung von apoptotischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten.

## **6. Diskussion**

### **6.1. Modellentwicklung zur kombinierten Leber- / Dünndarmtransplantation**

Der Erfolg einer Organtransplantation wird durch Abstoßungsprozesse vital bedroht. Dem gegenüber steht das Phänomen des protektiven Effektes der Leber: Ein Lebertransplantat erleichtert im Empfänger die Akzeptanz eines weiteren, mittransplantierten Organs. Dies ist seit längerem bekannt und in der Literatur für eine ganze Reihe von Organen, wie z.B. Niere und Pankreas beschrieben (Rasmussen, 1995; Wang, 1998). Stets verbessert dabei die Mittransplantation der Leber die Akzeptanz des cotransplantierten Organs, die Abstoßungsreaktion im Empfängerorganismus wird in ihrer Intensität reduziert. Andere Arbeiten versuchen dieses Konzept auf ganze Organgruppen, sog. "Cluster" auszudehnen. Bei der gemeinsamen Transplantation von Leber, Magen, Dünndarm, Colon und Pankreas kann dieser Effekt der Leber durch die zusätzlichen Infektionsprobleme v.a. bei der Kolon-Transplantation jedoch nicht nachvollzogen werden (Murase, 1990).

Neuere Berichte befassen sich nun intensiv mit dem oben beschriebenen protektiven Effekt bei der kombinierten Transplantation von Leber und Dünndarm. Während ein von Zhong verwendetes Modell noch zur Abstoßung um Tag +18 führt (Zhong, 1993), gelang es Meyer in der gleichen Stammkombination (BN→LEW) durch Rekonstruktion der arteriellen Blutversorgung der Leber und Drainage des Dünndarmtransplantates über die Vena portae Langzeitüberleben der Versuchstiere zu erreichen (Meyer, 1998b).

Die Untersuchungen von Meyer erscheinen v.a. aus zwei Gründen als sehr bedeutsam:

① Bezüglich einer möglichen klinischen Anwendung gilt es zu bedenken, daß eine ganze Reihe von Krankheitsbildern, an erster Stelle das Kurzdarmsyndrom, eine Transplantation des Dünndarms erforderlich machen (Grant, 1999). Die iso-

lierte Dünndarmtransplantation führt aber zu einer Reihe von Komplikationen, die sich durch die Mittransplantation der Leber reduzieren lassen. Eine erfolgreich durchgeführte Kombinationstransplantation von Leber und Dünndarm stellt daher eine klinisch durchaus denkbare Alternative dar.

② Auch für immunologischen Untersuchungen stellt die von Meyer gewählte Anordnung ein geeignetes Modell dar. Die Leber wird mit einem hoch immunogenen Organ kombiniert, welches wie die Haut die Grenzfläche des Organismus zu seiner Umwelt markiert. Folglich unterliegt der Dünndarm einer besonders intensiven Immunantwort. Da in Meyers Modell Langzeitüberleben erreicht wird, ermöglicht es erstmals das Studium dieser immunologischen Vorgänge im Langzeitverlauf.

Obwohl demzufolge die Ergebnisse dieses Projekts vom immunologischen Standpunkt hochinteressant sind, offenbaren sich jedoch bezüglich der klinischen Anwendbarkeit Schwächen dieses Versuchsaufbaus. So wird in dem beschriebenen Modell der Dünndarm in eine heterotope Lage transplantiert, ein Verfahren, welches mit der klinischen Anwendung wenig vergleichbar scheint.

In der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmals, die Nachteile des von Meyer vorgestellten Modells auszugleichen – die Transplantation des Dünndarmes erfolgte orthotop. Neben der offensichtlichen größeren klinischen Beziehung erscheint dieses Vorgehen auch aus anderen Gesichtspunkten als geeigneter. Die fehlende Nahrungspassage im heterotopen Spenderdünndarm führt neben einer Zottenatrophie zu funktionellen Veränderungen, wie einer verminderten Kontraktionsfähigkeit glatter Muskelzellen (Heeckt, 1998). Zudem berichtet Heeckt interessanterweise über vermehrte chronische Abstoßungsprozesse am heterotopen Dünndarm. Eine mögliche Erklärung beschreibt Mayer: Über den Kontakt des Speisebreis mit der Mukosa soll es zur Aktivierung des mukosalen Immunsystems kommen und dadurch das Immunsystem des Empfängers supprimiert werden (Mayer, 1996).

Weiterhin orientiert sich das hier vorgestellte Modell nicht nur bezüglich der Nahrungspassage sondern auch der Gefäßversorgung des Transplantates sowohl bei arteriellem Zufluß als auch bei venöser Drainage am physiologischen Normalzustand.

*In der hier vorliegenden Arbeit konnte also ein Modell zur Organtransplantation entwickelt werden, an dem sich erstmals die Vorgänge nach kombinierter Leber- / Dünndarmtransplantation unter exakt physiologischen Bedingungen untersuchen lassen.*

## **6.2. Klinischer Verlauf nach orthotoper Leber- / Dünndarmtransplantation BN→LEW**

### *Akute Abstoßung*

In der Stammkombination BN→LEW werden isoliert übertragene allogene Lebertransplantate nach passagerer Abstoßungsreaktion in einem hohen Prozentsatz spontan toleriert (Houssin, 1983). Wird hingegen in gleicher Stammkombination der Dünndarm übertragen, kommt es innerhalb der ersten postoperativen Tage zu einer letalen Abstoßungsreaktion. Dieser Verlauf kann nur durch hochdosierte Gabe eines Immunsuppressivums verhindert werden. Wie von Timmermann gezeigt werden konnte, lassen sich diese akuten Prozesse bei isolierter Dünndarmtransplantation zwar zunächst durch Applikation von 2,0 mg FK506/kg/d von Tag 0-5 kontrollieren, trotzdem versterben die Versuchstiere zwischen Tag 80-100 an zunehmender Transplantatdysfunktion. Langfristige Akzeptanz läßt sich nur durch eine Verdoppelung der FK506 Gesamtdosis (2,0 mg FK506/kg/d von Tag 0-9) erreichen (Timmermann, 2000).

Auch in dem hier vorgestellten Modell für die kombinierte Transplantation von Leber und Dünndarm kann nicht vollständig auf Immunsuppression verzichtet werden. Schon ab einer Dosis von 0,5 mg FK506/kg/d von Tag 0-5 gelingt es jedoch, Langzeitüberleben in 80% der Fälle zu erreichen (siehe Kapitel 4.2.). Da unter den gleichen Bedingungen wie in der von Timmermann etablierten Versuchsanordnung gearbeitet wurde, läßt sich diese deutliche Reduzierung der erforderlichen immunsuppressiven Dosis nur durch die Kombination mit dem Lebertransplantat erklären.

Trotz des beträchtlichen operativen Eingriffes bei kombinierter Leber- / Dünndarmtransplantation gestaltete sich der postoperative Verlauf bei den langzeitüberlebenden Tieren völlig unauffällig. Für keinen der im folgenden aufgeführten klinischen Parameter konnte eine nennenswerte Abweichung festgestellt werden. Sensitivste Größe für die Beurteilung der Leberfunktion war hierbei der Serumbilirubinspiegel. Dieser Wert lag in der hier verwendeten Anordnung stets unterhalb des erfaßbaren Grenzwertes, d.h. die transplantierte Leber wies zu keinem Zeitpunkt eine Funktionseinschränkung auf. Dieses Ergebnis untermauert die Sonderstellung des Organs "Leber" in der Transplantation.

Da der Dünndarm direkt in die Nahrungspassage integriert war, ließ sich seine Funktion an Gewichtsentwicklung und eventuell auftretenden Malabsorptionssyndromen ablesen. Zu keinem Zeitpunkt war eine Diarrhöe als Ausdruck verminderter Resorptionskapazität zu verzeichnen. Der Gewichtsverlauf war, wie in der syngeneten Kontrollgruppe, völlig unauffällig.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die bei isolierter Dünndarmtransplantation in der BN→LEW Stammkombination auftretende letale Abstoßungskrise dramatisch verändert wurde. Bei Kombination des Dünndarmtransplantates mit einem Lebertransplantat des gleichen Spenders wird nicht nur Langzeitüberleben erreicht, sondern diese Entwicklung ging auch mit einem äußerst stabilen klinischen Verlauf nach der Operation einher.

*Der postoperative Prozeß muß wie folgt interpretiert werden: Die Leber übt einen protektiven Effekt auf ein mittransplantiertes Organ, in diesem Falle den Dünndarm aus. Die Versuchstiere zeigen bei regelrechter Gewichtsentwicklung zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung relevanter Laborparameter. Damit stellt die etablierte Versuchsanordnung ein Modell dar, an dem sich immunologische Vorgänge nach Transplantation, v.a. unter Berücksichtigung des besonderen immunologischen Status gastrointestinalen Gewebes, im Langzeitverlauf studieren lassen. Diese Untersuchungen erfolgen bei geringstmöglicher Immunmodulation.*

### *Chronische Abstoßung*

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, bestehen hinsichtlich der therapeutischen Beeinflussbarkeit wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklen der Abstoßung. Während sich die akute Abstoßung durch heute zur Verfügung stehende immunsuppressive Medikamente gut modulieren läßt, lassen sich die chronische Prozesse auch mit den modernen therapeutischen Möglichkeiten nicht beherrschen (Grant, 1999).

Typischerweise ist bei dieser Art der Abstoßung, einhergehend mit einem vergleichsweise zellarmen Infiltrat, das Gefäßendothel des transplantierten Organs Hauptangriffspunkt der ablaufenden Reaktion (deBruin, 1995). Im Ergebnis entwickelt sich eine perivaskuläre Fibrose, welche auch als Transplantatvaskulopathie bezeichnet wird (Müller-Hermelink, 1989). Die Pathogenese dieser chronischen Abstoßung ist nicht restlos aufgeklärt. Das Gefäßendothel spielt hier aber eine zentrale Rolle: Die abgelaufene akute Abstoßung, Wundheilungsprozesse zellulärer Nekrosen oder chronische Ischämiezustände durch Kapillarschädigung führen zur Proliferation endothelialer Intimazellen im Transplantat (Abbas, 1997). Da chronische Abstoßungsprozesse vom derzeitigen Standpunkt betrachtet irreversibel und nicht therapierbar sind, muß es also Ziel sein, diese bereits im Ansatz zu unterbinden. Unter diesen Gesichtspunkten erhalten die vorliegenden Ergebnisse eine besondere Bedeutung. Obwohl im vorgestellten Modell der Untersuchungszeitraum aus diesem Grund von den üblichen 100 Tagen auf 150 Tage ausgedehnt wurde, fanden sich im Langzeitverlauf keine Hinweise auf chronische Abstoßungsprozesse (siehe Kapitel 4.4.).

Ein Fehlen dieser chronischen Abstoßungsprozesse könnte in Zusammenhang mit einer schwachen, d.h. nur histologisch nachweisbaren akuten Abstoßungsreaktion stehen, eine Beziehung, welche gegenwärtig kontrovers diskutiert wird. Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bei schwacher akuter Abstoßung wesentlich geringer ausfallende Schädigung des Gefäßendothels zu einem Verlauf ohne chronische Abstoßung führt. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch die bereits zitierten Ergebnissen von Timmermann (Timmermann, 2000). Dort überleben die Versuchstiere in der BN→LEW Stammkombination bei isolierter Dünndarmtransplantation und einer Dosis von 2,0 mg FK506/kg/d von Tag 0-5,

versterben allerdings um Tag +100 an chronischer Dysfunktion des Transplantates. Wird jedoch der zeitliche Rahmen dieser initialen Immunsuppression verdoppelt (2,0 mg FK506/kg/d von Tag 0-9) und damit die Intensität der akuten Reaktion weiter reduziert, gelingt es auch dort, ein ähnliches Langzeitüberleben wie in der hier beschriebenen Anordnung zu erreichen. Auch Meyer beschreibt für sein Modell der Leber- / heterotopen Dünndarmtransplantation ohne Immunsuppression chronische Abstoßungsprozesse bei 10% der Versuchstiere (Meyer, 1998a). Die Ursache könnte hier ebenfalls in der in diesem Modell stärker ausgeprägten passageren akuten Abstoßungsreaktion liegen.

Dieses Phänomen ist nicht organgebunden. Vanrenterghem zeigt beispielsweise für die humane Nierentransplantation eine Reduktion chronischer Abstoßungsprozesse durch bessere Therapie rezidivierender akuter Abstoßungskrisen (Vanrenterghem, 1997).

*Das Fehlen chronischer Abstoßungsprozesse am Dünndarm in dem verwendeten Modell scheint, zumindest teilweise, durch eine geringere Intensität der akuten Abstoßungsreaktion bedingt zu sein. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß akute und chronische Abstoßung nicht als zwei voneinander getrennt ablaufende Mechanismen zu betrachten sind, sondern in einem engen pathophysiologischen Zusammenhang stehen.*

### **6.3. Entwicklung spenderspezifischer Toleranz**

Um die langfristige Akzeptanz der Spenderorgane durch die Empfängertiere zu analysieren, wurden Herz- und Hauttransplantationen durchgeführt (Kap. 4.3). Entsprachen die Transplantate genetisch dem Leber- / Dünndarmtransplantat, wurde sie akzeptiert, Drittstammtransplantate wurden hingegen abgestoßen. Damit handelt es sich um ein Phänomen, welches nicht auf einer allgemeinen Supprimierung des Empfänger-Immunsystems beruht, sondern, korrelierend mit den Beobachtungen von Kamada, um spenderspezifische Toleranz.

Toleranz ist definiert als das Fehlen einer Immunantwort gegenüber spenderspezifischen Antigenen bei normaler Immunantwort anderen Antigenen gegenüber. Sie entsteht als aktiv erworbener Prozeß durch Konfrontation des Empfänger-Immunsystems mit dem Transplantat (Qian, 1997). Obwohl der klinische Verlauf dafür keinerlei Hinweise gab, zeigten die Ergebnisse der histologischen Auswertung eine solche Auseinandersetzung. Nachzuweisen war sie in Form einer Abstoßungskrise mit zellulärer Infiltration und gleichzeitigem apoptotischem Zelltod parenchymaler Zellen. Beginnend an Tag +14 erreichten beide Parameter ihren deutlichen Höhepunkt an Tag +28 (siehe Kap. 6.5). Auch der vollständige fibrotische Umbau der mesenterialen Lymphknoten im Spenderdünndarm ist als Ausdruck dieser Reaktion zu werten. Im Vergleich zu den beschriebenen Modellen ohne Immunsuppression fand die Konfrontation des Empfänger-Immunsystems mit dem Transplantat im vorgestellten Modell jedoch mit geringerer Intensität und zeitlich verzögert und statt. Durch immunhistologische Darstellung wichtiger immunologisch kompetenter Zellpopulationen war diese Auseinandersetzung einer detaillierten Analyse unterzogen worden.

Bei Versuchsende an Tag +150 waren in der histologischen Untersuchung sowohl in Leber als auch Dünndarm weder Zeichen einer anhaltenden Reaktion, noch Hinweise auf eine Organschädigung auszumachen.

*Bei sekundärer Organtransplantation an Tag +70/+100 hat sich nach Leber- / Dünndarmtransplantation in den Versuchstieren ein Zustand eingestellt, der spenderspezifischer Toleranz entspricht. Das Erreichen dieses Zustandes im vorgestellten Modell konnte durch den Nachweis von Abstoßungsprozessen nach Transplantation nicht spenderspezifischer Herz- oder Hauttransplantate belegt werden.*

#### **6.4. Die Rolle der T-Zellen**

Obwohl zahlreiche Zellpopulationen an der immunologischen Auseinandersetzung zwischen Empfänger-Immunsystem und Transplantat beteiligt sind, fällt eine entscheidende Rolle den T-Lymphozyten zu. So zeigen T-Zell-defiziente

Knock-Out-Mäuse nach Allotransplantation keine Abstoßungsreaktion (Han, 2000). Es überraschte daher nicht, daß im vorgestellten Modell in der Phase der intensivsten Auseinandersetzung zwischen Spenderorgan und Empfängerorganismus an Tag +28 neben Makrophagen v.a. T-Zellen im Infiltrat zu finden waren. Im Rahmen der Abstoßung werden durch Kontakt mit den Alloantigenen dendritische Zellen stimuliert. Diesem Kontakt mit dendritischen Zellen kommt bei der Aktivierung der T-Zellen also eine Schlüsselfunktion zu.

Die eigenen Ergebnisse sprechen für eine solche enge Interaktion. Der protrahierte Anstieg dendritischer Zellen in beiden Transplantaten im Vergleich zu bereits mehrfach angesprochenen Modellen ohne Immunsuppression ist eine mögliche Erklärung für die deutlich zeitverzögerte Zunahme von Spender-T-Zellen im Transplantat.

Am Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  Lymphozyten läßt sich der Verlauf einer Abstoßungskrise ablesen (McCaughan, 1990). Im vorgestellten Modell fanden sich überwiegend  $CD4^+$  Lymphozyten im Infiltrat. An Tag +28 jedoch fiel der Quotient unter 1, zu diesem Zeitpunkt bestand das Infiltrat also vorwiegend aus  $CD8^+$  Lymphozyten. Dieses Überwiegen der  $CD8^+$  Lymphozyten sistierte im verwendeten Modell spontan. Eine Studie, bei der diese Umkehrung des  $CD4^+/CD8^+$ -Verhältnisses nur für Abstoßungsmodelle mit letalem Ausgang gezeigt werden konnte (Knechtle, 1987), ließ sich damit nicht bestätigen.

Aufgrund der zentralen Rolle von Interleukin 2 (IL2) erfolgten weitere Untersuchungen zu diesem Zytokin. Wie in Kapitel 4.5. erläutert, wurde die Expression des IL2-Rezeptors als Marker für die Lymphozytenaktivität herangezogen. Dabei manifestierte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Leber und Dünndarm. Im Dünndarm war die Rate der  $IL2-R^+$  Lymphozyten bezogen auf das Gesamtinfiltrat stets konstant. In der Leber ließ sich an Tag +14 ein im Vergleich zu den anderen Entnahmezeitpunkten deutlich erhöhter Anteil an aktivierten Lymphozyten verzeichnen.

Anhand dieses Ergebnisses konnte die Interpretation der Befunde erfolgen: T-Lymphozyten sind eine wichtige Zellpopulation bei den Prozessen der Abstoßung.

Die IL2-Rezeptor-Expression gilt als Parameter für ihre Aktivität. Während in der Leber am Anfang der Abstoßungskrise an Tag +14 der höchste Anteil an aktivierten T-Lymphozyten bestand, konnte dies für den Dünndarm nicht nachgewiesen werden. Auch Sun beschreibt nach Lebertransplantation den frühzeitigen Anstieg von Zytokinen (Sun, 1994).

Während im vorliegenden Modell die zelluläre Infiltration ab diesem Zeitpunkt aber noch deutlich zunahm, reduzierte sich in der Leber der prozentuale Anteil IL2-R<sup>+</sup> T-Lymphozyten bereits wieder. Da zu diesem Zeitpunkt CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten den Hauptbestandteil des lymphozytären Infiltrates bildeten, deutet dies auf eine Inaktivierung von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in der Leber hin. Erwähnenswert scheinen in diesem Zusammenhang Beobachtungen von Kronin, wonach bestimmte DC-Subpopulation zwar die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten stimulieren, gleichzeitig aber ihre Fähigkeit verringern, IL2 zu produzieren (Kronin, 1996). Es erscheint denkbar, daß eine solche Zellpopulation in der Leber an der Inaktivierung der T-Zellen beteiligt ist, da dieser Effekt zwischen Tag 14 und Tag 28 nicht mehr durch das verwendete Immunsuppressivum verursacht sein kann.

*In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein wichtiger Unterschied zwischen Leber- und Dünndarmtransplantat herausgearbeitet werden. Ein großer Teil der infiltrierenden CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten im Lebertransplantat ist nur zu Beginn der Abstoßungskrise aktiviert. Für das Dünndarmtransplantat konnte dieser Prozeß nicht nachgewiesen werden.*

*Der zeitlich begrenzte Einsatz immunsuppressiver Medikation unterdrückt nicht den Ablauf immunologischer Vorgänge. Sie treten nur in geringerer Ausprägung und zeitlich verzögert auf. Das erarbeitete Modell ist daher trotz Immunsuppression hervorragend für das Studium der zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen geeignet.*

## **6.5. Die Rolle der Apoptose**

Infiltrierende T-Zellen lösen während der akuten Abstoßung sowohl im Leber-, als auch Dünndarmtransplantat Apoptose in parenchymalen Zellen aus. Weiterhin

werden diese T-Zellen in den beiden Transplantatbestandteilen aber auch selbst apoptotisch - es findet also nicht nur eine Auseinandersetzung des Empfängerimmunsystems mit den Spenderallogenen statt (Fayyazi, 1997, Krams, 1995). Apoptotischer Zelltod ist durch folgende morphologische Kriterien gekennzeichnet: Zellschrumpfung, Defragmentierung des Zellkerns und Phagozytose der betroffenen Zelle, ohne vorhergehende Lyse (Woodle, 1998). Der TUNEL-Essay identifiziert DNA-Doppelstrangbrüche im Zellkern und weist damit nukleäre Veränderungen im Verlauf der Apoptose nach. Mit dieser Methode werden apoptotische Zellen ebenfalls während der Abstoßung von Herz- (Olivetti, 1997), Nieren- (Laine 1997) und Dünndarmtransplantaten (Fayyazi, 1997) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden Färbungen mit dieser in Kapitel 3.5. erläuterten TUNEL-Technik durchgeführt und zusätzlich o.g. morphologische Kriterien zur Identifizierung apoptotischer Zellen herangezogen. In den einzelnen Organen waren verschiedene Regionen ausgewählt worden, um zunächst die parenchymalen Zellen sicher analysieren zu können. V.a. im Dünndarmtransplantat fanden sich von Tag +14 bis Tag +28 ansteigende Werte. Bei Versuchsende entsprach die Apoptoserate der PC im transplantierten Gewebe dem der syngenen Kontrolle. Somit bestand in diesem Organ eine hohe Korrelation zwischen apoptotischen PC und der lymphozytären Infiltratdichte. In der Leber hingegen fiel, trotz ebenfalls zunehmendem Gehalts an Spenderlymphozyten, der Anstieg der Apoptoserate von PC nur sehr diskret aus.

Berücksichtigt man dabei die Ergebnisse der Untersuchungen zur IL2-R Expression, also der Aktivierung von T-Lymphozyten zeigt sich die Abhängigkeit der Apoptoserate der PC im Transplantat von diesem Parameter. So nimmt in der Leber der Anteil IL2-Rezeptor<sup>+</sup> T-Lymphozyten ab. Die T-Lymphozyten werden inaktiviert, was den geringen Anstieg der Apoptoserate von PC in der Leber erklären kann. Da es sich hierbei um ein organspezifisches Phänomen handelt, konnte nun im vorgestellten Modell mit einer weiteren Beobachtung unterlegt werden. Im Dünndarm findet eine solche Inaktivierung nicht statt, d.h. parallel zum Gehalt an T-Lymphozyten steigt auch die Rate apoptotischer PC.

*Die im vorliegenden Modell gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine direkte Abhängigkeit der Apoptoserate parenchymaler Zellen von der T-*

*Lymphozytenaktivierung hin. Die divergierende Entwicklung dieses Parameters in den beiden Transplantatbestandteilen zeigt erneut, daß es in der Leber als organspezifisches Phänomen zur Inaktivierung von T-Lymphozyten kommt.*

Zunächst hatten vor allem die Aktivierung der Immunantwort, ihr zeitlicher Ablauf und beteiligte Zellpopulationen im Mittelpunkt gestanden. Vor allem die Ergebnisse zur Kinetik von T-Lymphozyten in der Leber erforderten dann aber auch eine Betrachtung dieser dort stattfindenden Inaktivierung.

Unter physiologischen Bedingungen kann diese prinzipiell über zwei Wege erfolgen. Zum einen wird im Verlaufe der Immunreaktion die Costimulation beim Zell-Zell-Kontakt moduliert. So präsentieren aktivierte T-Zellen CTLA 4 an der Zelloberfläche, ein Molekül, welches im Ruhezustand nicht nachweisbar ist. Diese Expression erreicht ihren Höhepunkt ca. 48 Stunden nach erfolgter T-Zellaktivierung. CTLA 4 besitzt eine höhere Affinität zum B7-Komplex und besetzt demzufolge bei Interzellularkontakt zwischen aktiviertem und noch ruhendem Lymphozyten diesen Rezeptor anstelle von CD28 (Walunas, 1996). Das dadurch ausbleibende Cosignal führt zunächst zu Anergie, dann zu Apoptose der Zielzelle (Abbas, Lichtman, Pober, 1997).

Der andere Weg dieser Selbstlimitierung der Immunantwort ist der sogenannte aktivitätsinduzierte Zelltod (AICD). Am AICD sind verschiedene Rezeptorpaare beteiligt, am besten untersucht ist bisher die Bedeutung des CD95-Molekül (Janssen, 2000), welches auch als Fas-Rezeptor bezeichnet wird. Dieser ist strukturell mit dem Rezeptor für den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) verwandt. Beide lösen nach Bindung eines entsprechenden Liganden den Tod der eigenen Zelle aus (Abbas, 1997). Nach erfolgter Aktivierung exprimieren T-Lymphozyten einerseits den Fas-Rezeptor, gleichzeitig jedoch auch den Fas-Liganden. Kommt es nun zwischen zwei aktivierten Zellen zum Kontakt, die Wahrscheinlichkeit hierfür steigt natürlich mit zunehmender T-Zelldichte, wird damit eine Kaskade aktiviert, die letztlich zur Apoptose der beteiligten T-Zellen führt. Gefördert wird dieser Vorgang durch Interleukin 2 (van Parijs, 1996).

Beide dargestellten Szenarien stellen also Möglichkeiten zur Selbsteliminierung der zellulären Abwehr dar und sind als Regulatormechanismen für eine funktionierende Immunantwort essentiell. Am Ende der beschriebenen Vorgänge steht

damit unabhängig vom auslösenden Faktor die apoptotische Zelle. Aus diesem Grunde wurden die mittels TUNEL-Technik gefärbten Präparate hinsichtlich der non-parenchymalen Zellen untersucht.

Dabei waren erneut signifikante Unterschiede zwischen Leber und Dünndarm zu beobachten. So war in der Leber an Tag +28 ein besonders hoher Anteil der infiltrierenden Zellen apoptotisch, ein Anstieg, der im Vergleich zu Tag +14 deutlich erfaßbar war. Dies war im Dünndarm nicht der Fall. Durch den Einsatz der Doppelfärbung konnte dann ein bedeutender Anteil dieser apoptotischen Zellen als CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten erfaßt werden.

*Im vorgestellten Modell häufen sich in der Leber apoptotische non-parenchymale Zellen. Von diesem Prozeß sind v.a. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten betroffen.*

Bisher sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die dieses Phänomen erklären können. Crispe beschreibt die Leber aufgrund ihrer Organstruktur als "Elephantenfriedhof". Zellen, die in der Peripherie das auslösende Signal zur Initiierung der Apoptose erhalten, würden demnach "zum Sterben" in die Leber einwandern (Crispe, 1996). Diese scheint durch ihren histologischen Aufbau für eine solche Aufgabe prädestiniert. So erlaubt das hier vorhandene fenestrierte Endothel der Blutgefäße einen besonders intensiven Kontakt zwischen Parenchymzellen und Blutbestandteilen, also auch Lymphozyten. Dieser Interaktion wird eine entscheidende Bedeutung zugemessen (Crispe, 2000). Demnach sollen Hepatozyten bestimmte Membranveränderungen der T-Zellen erkennen oder Kupfferzellen Apoptose-typische Oberflächenmarker identifizieren. Die Initiierung dieses „Selbstmordprogrammes“ wäre demnach organunabhängig und apoptotische Zellen in der Leber als ein Epiphänomen der Toleranzinduktion zu betrachten. Auslösend dafür könnten Fas-Fas-Ligand Interaktion zwischen zwei T-Lymphozyten in der Peripherie sein.

Die Theorie des "Elephantenfriedhof" kann bei Einbeziehung der eigenen Resultate nicht erhärtet werden. Wie durch die Untersuchungen zur IL2-Rezeptor-Expression gezeigt wurde, finden sich im Gegensatz zum Dünndarmtransplantat im Lebertransplantat eine große Menge aktivierter T-Lymphozyten an Tag +14.

Bei weiter ansteigender Menge von infiltrierenden T-Lymphozyten in beiden Transplantatbestandteilen kam es jedoch wiederum nur in der Leber zu keinem gleichzeitigem Anstieg der Apoptoserate der Parenchymzellen. Diese Beobachtung erklärt sich wahrscheinlich mit der abnehmenden Aktivierung an T-Zellen in der Leber. Das im Unterschied zum Dünndarmtransplantat im Lebertransplantat dann an Tag +28 auch ein hoher Anteil apoptotischer T-Lymphozyten gesehen wurde, könnte somit darauf hin deuten, daß die zur Apoptose führenden Inaktivierungsmechanismen ein Phänomen darstellen, welches an das Organ "Leber" gebunden ist.

Eine andere in diesem Zusammenhang postulierte Theorie besagt, daß sich die Alloreaktivität des T-Zell-Klons an der großen Menge an in der Leber enthaltenem Antigen (Leber und darin enthaltende Leukozyten) erschöpft und damit zur Deletion dieses Zellklons führt (Bishop, 1997). Die eigenen Ergebnisse widersprechen diesen Beobachtungen. Im vorgestellten Modells wird neben der Leber ein weiteres Organ transplantiert, welches reich an immunologisch kompetenten Zellen ist. So wird auch hier der Empfängerorganismus mit einer weit größeren Menge an Antigen als bei isolierter Lebertransplantation konfrontiert. Somit müsste im vorgestellten Modell auch Spontantoleranz entstehen. Dies konnte nicht gezeigt werden, bei allen Versuchstieren war eine initiale Immunsuppression zum Überleben erforderlich.

Die Leber scheint bei der Eliminierung der alloreaktiven T-Zellen daher eine aktivere Rolle zu spielen. Verschiedene Mechanismen können auf zellulärer Ebene alleine oder in Ergänzung für diesen Prozeß verantwortlich sein. Zum einen wird vermutet, daß Hepatozyten in der Lage sind, lösliches MHC Klasse I zu produzieren (Buelow, 1995; Zavazava, 1996). Dadurch würden die T-Zellen zwar ein primäres Signal, jedoch keine Costimulation erhalten. Dies würde folglich im Lymphozyten zur Non-Reaktivität führen, noch bevor ein Zellkontakt stattgefunden hat.

Im Widerspruch zu dieser Beobachtung stehen allerdings Untersuchungen von Davies. Er weist verstärkte Sekretion dieses löslichen MHC für den Zeitraum der Abstoßungskrise nach, ohne das dadurch die T-Zell Aktivität gehemmt wird (Davies, 1989). Auch die eigenen Ergebnisse deuten auf einen anderen Mechanismus

– der Induktion von Apoptose über Expression von Fas-Ligand auf Hepatozyten. Aufgrund bisher mangelnder spezifischer monoklonaler Antikörper für Fas-L auf Ratten-Hepatozyten ist ein direkter Nachweis hierzu allerdings noch nicht zu erbringen.

*Die Häufung von apoptotischen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten auf dem Höhepunkt der Abstoßungsreaktion konnte als leberspezifischer Prozeß charakterisiert werden. Die Resultate führen zu der Schlußfolgerung, daß dieser Vorgang mit der in der Leber stattfindenden Inaktivierung dieser Zellpopulation in engem Zusammenhang steht. Obwohl ein direkter Nachweis aufgrund bislang fehlender Antikörper nicht erbracht wurde, stützen die im vorliegenden Modell erzielten Ergebnisse die Theorie, das Parenchymzellen der Leber Substanzen sezernieren, die in den infiltrierenden T-Lymphozyten Apoptose induzieren.*

## **7. *Ausblick***

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen den Vorteil der zusätzlichen Lebertransplantation für die langfristige Akzeptanz des Dünndarms unter den standardisierten Bedingungen des Tierversuches. Die Daten des Intestinal Transplant Registry (ITR) bestätigen dies für die humane Transplantation. Langfristiges Ziel ist die Übertragung dieser in der Leber induzierten Prozesse auch auf andere Organtransplantationen, ohne die Leber selbst zu transplantieren. Dies gilt insbesondere hinsichtlich bisher nicht therapierbarer chronischer Abstoßungsprozesse.

Toleranz nach Lebertransplantation genauso wie die tolerogene Wirkung des Lebertransplantates sind Lernprozesse des Empfänger-Immunsystems. Zukünftige in-vitro-Analysen müssen daher sowohl die Besonderheiten des Organs "Leber" als auch die unterschiedlichen Phasen dieses Lernprozesses (Abstoßung, Induktion und Erhaltung von Toleranz) berücksichtigen. Sie bedürfen deshalb der Überprüfung im in-vivo-Modell. Die Entwicklung eines solchen Modelles zur orthotopen Leber- / Dünndarmtransplantation in der Ratte hat hierfür ausgezeichnete Voraussetzungen geschaffen.

## 8. Zusammenfassung

Nach Transplantation moduliert die Leber nicht nur die Immunantwort des Empfängers gegenüber ihr selbst, sondern übt auch auf mittransplantierte Organe einen protektiven Effekt aus. Dieses Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit an dem hoch immunogenen Dünndarm untersucht. Diese Studie war dabei nicht nur unter immunologischen Gesichtspunkten von Bedeutung. So stellt die simultane Leber- / Dünndarmtransplantation für Patienten, die an einer Leberzirrhose infolge eines Kurzdarmsyndrom leiden, eine erfolgversprechende Therapieoption dar. Zur experimentellen Analyse dieser speziellen Transplantationsform existierte aber in der Ratte bisher kein vergleichbares Modell. In der vorliegenden Arbeit wird daher erstmalig ein Modell etabliert, in dem – orientiert an den Verhältnissen beim Menschen – Leber (arterialisiert) und Dünndarm simultan und orthotop transplantiert werden. Mittels kurzfristiger Immunsuppression wurde bei allogener Transplantation hier nicht nur Akzeptanz sondern Toleranz erreicht und mittels Indikator-Herz- und Hauttransplantation überprüft. Die dazu benötigte immunsuppressive Dosis unterschritt dabei die für eine erfolgreiche isolierte Dünndarmtransplantation notwendige Immunsuppression erheblich. Dieser Toleranzentwicklung geht eine zeitlich begrenzte Abstoßungsreaktion voraus. Die daran beteiligten zellulären Mechanismen wurden durch sequentielle Immunhistologie dargestellt. Während dieser Abstoßung sammeln sich überdurchschnittlich viele apoptotische T-Lymphozyten, hauptsächlich CD8<sup>+</sup> Zellen, im Lebertransplantat, nicht aber im transplantierten Dünndarm an. Dieses Phänomen konnte mittels einer neu etablierten Doppelfärbung dargestellt werden. Apoptoseinduktion in alloreaktiven T-Zellen könnte einer der Mechanismen sein, die den immunsuppressiven Effekt des Lebertransplantates erklären und den gleichzeitig transplantierten Dünndarm vor seiner Abstoßung bewahren.

## **9. Literatur**

Abbas AK (1996) Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 84: 655-657

Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS (1997) *Cellular and molecular immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sidney, Tokio

Asfar S, Atkinson P, Ghent C, Duff J, Wall W, Williams S, Seidman E, Grant D (1996) Small bowel transplantation. *Transpl.Proc.*28: 2751

Barnard CN, Cooper DK (1981) Clinical transplantation of the heart: a review of 13 years personal experience. *J R Soc Med* 74: 670-674

Batts K (1996) Liver allograft rejection: current status of classification and grading. *Transplant.Proc.* 28: 453-456

Bishop GA, Sun J, Ross Sheil AG, McCaughan GW (1997) High dose activation associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance. *Transplantation* 64: 1377-1382

Buelow R, Burlingham WJ, Clayberger C (1995) Immunomodulation by soluble HLA class I. *Transplantation* 59: 649-654

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davies DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DAL (1969) Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472-476

Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP (2000) The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 174: 47-62

- Crispe IN, Mehal WZ (1996) Strange brew: T-Cells in the liver. *Immunology Today* 17: 522-526
- D'Amico D, Bassi N, Tedeschi U, Cillo U, Ambrosino G, Boccagni Brolese A, Zanus G, Dalla Torre M, Bonariol L, Urbani L, Costant G, Sersen N, Bassanello M, Parimbelli P, Montin U, Benincau S, Gringeri L, Zerbo F (1999) Liver transplantation: a summary of our surgical practice. *Chir Ital* 51: 9-14
- Davies HffS, Pollard S, Calne RY (1989) Soluble HLA Antigens in the circulation of the liver graft recipients. *Transplantation* 47: 524-527
- DeBruin R, Stein-Oakley A, Jablonski P, Dowling J, Thomson N (1995) Chronic rejection after small bowel transplantation. *Transplant.Proc.* 27: 3580
- Demetris AJ, Murase N, Ye Q, Galvao FHF, Richert C, Saad R, Pham S, Duquesnoy RJ, Zeevi A, Fung JJ, Starzl TE (1997) Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy – possible contributions of donor antigen presenting cells and lymphatic disruption. *Am.J.Path.* 150: 563-578
- Engemann R, Ulrichs K, Thiede A, Müller-Ruchholtz W, Hammelmann H (1982) Value of a physiological liver transplant model in rats: induction of specific graft tolerance in a fully allogeneic strain combination. *Transplantation* 33: 566-568
- Fayyazi RA, Schlemminger R, Gieseler R, Peters JH, Radzun HJ (1997) Apoptosis in the small intestinal allograft in the rat. *Transplantation* 63: 947-951
- Fryer J, Leventhal J, Zhong R (1998) Macrophage depletion in small animal transplant models. In: Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A (eds) *Organtransplantation in rats and mice, microsurgical tech-*

niques and immunological principles. Springer Verlag, Heidelberg, pp 141-147

Gassel HJ, Timermann W, Meyer D, Gassel AM, Thiede A (1997) Investigations of the immunoprotective role of the liver after allogeneic orthotopic combined liver-small-bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc* 29: 693-694

Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW, Hulett DA (1996) Vascular smooth muscle cells and neonatal hyperplasia in chronic transplant rejection. *Transplantation* 62: 502-509

Grant D (1999) Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. *Intestinal Transplant Registry. Transplantation* 67: 1061-1064

Heeckt PF, Halfter WM, Schurer B, Schraut WH, Berger HG, Bauer AJ (1998) Heterotopic intestinal transplantation aggravates the insult of chronic rejection. *Transplantation* 65: 354-362

Houssin D, Charpentier B, Gugenheim J, Bandot P, Tamisier D, Lang P, Gigou M, Bismuth H (1983) Spontaneous long term acceptance of RT-1-incompatible liver allografts in inbred rats. *Transplantation* 36: 615-620

Hübscher S (1996) Diagnosis and grading of the liver allograft rejection: a european perspective. *Transplantation Proceedings* 28: 504-507

Janeway CA, Travers P (1995) *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 301: 85-99

- Kamada N (1985) The immunology of experimental liver rat transplantation in the rat. *Immunology* 55: 369-383
- Knechtle SJ, Wolfe JA, Burchette J, Sanfilippo F, Bollinger RR (1987) Infiltrating cell phenotypes and patterns associated with hepatic allograft rejection or acceptance. *Transplantation*. 43: 169-172
- Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, Toyama N, Walker NI, Miyata M (1994) Prevention by liver transplantation of the graft-versus-host-reaction and allograft rejection in a rat model of small bowel transplantation. *Transplantation* 57: 177-181
- Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM (1995) Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 59: 621-625
- Kronin V, Winkel K, Suss G, Kelso A, Heath W, Kirberg J, von Boehmer H, Shortman K (1996) A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T-cells by limiting their IL2 production. *J Immunol.* 157: 3819-3827
- Kuusanmäki P, Haltunen J, Paavonen T, Pakarinen M, Luukkonen P, Hävry P (1994) Acute rejection of porcine small bowel allograft. *Transplantation* 58: 757-763
- Laine J, Etelämäki P, Holmberg C, Dunkel L (1997) Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 63: 101-105
- Langrehr JM, Banner B, Lee KKW, Schraut WH (1993) Clinical course, morphology and treatment of chronically rejecting small bowel allograft. *Transplantation* 55: 242-250
- Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkins SC, Hoffman RA, Simmons RL,

- Thomson AW (1996) Nitric oxid production by mouse bone marrow derived dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T-cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 157: 3577-3586
- Mayer L (1996) Yin and Yang of mucosal immunology. *Transplantation Proceedings* 28: 2435-2473
- Mazariegos G, Reyes J, Marino I, Demetris A, Flynn B, Irisch W, McMichael J, Fung J, Starzl T (1997) Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation* 63: 243-249
- Mc Caughan GW, Davies FS, Waugh JA, Bishop A, Hall BM, Gallagher ND, Thompson JF, Sheil AGR, Painter DM (1990) A quantitative analysis of T-lymphocyte populations in human liver allografts undergoing rejection: the use of monoclonal antibodies and double immunolabeling. *Hepatology* 12: 1305-1313
- Mc Keown CMB, Edward V, Phillips MJ, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM (1988) Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of the liver allografts in the rat. *Transplantation* 46: 178-191
- Merill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR (1956) Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 160: 277-282
- Meyer D (1998a) Mikrochirurgische Entwicklung der Leber - / Dünndarmtransplantation: Untersuchungen zu Mechanismen funktioneller Toleranz. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi and der Julius-Maximillian-Universität Würzburg
- Meyer D, Otto C, Gassel HJ, Ulrichs K, Thiede A (1998b) Die Rolle der Apoptose in der Toleranzinduktion nach Leber- und Leber- / Dünndarmtransplantation. *Langenbecks Arch Chir I (Forumband 1998)*, pp 357-359

- Meyer D, Gassel HJ (1998c) Combined abdominal organ transplantation. In: Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A (eds) Organ-transplantation in rats and mice, microsurgical techniques and immunological principles. Springer Verlag, Heidelberg, pp 141-147
- Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gasser M, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A (1998d) Apoptosis as an instrument for immune regulation - study on a liver/small bowel tolerant rat model. *Transpl.Proc.* 30: 2362-2363
- Momii S, Koga A (1990) Time-related morphological changes in cold stored rat livers. *Transplantation* 50: 745-750
- Müller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffmann RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billar TR, Schraut WH (1994) The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and perfusion. *Transplantation* 58: 880-889
- Müller-Hermelink HK, Dämmrich JR (1989) Die obliterative Transplantatvaskulopathie: Pathogenese und Pathomechanismen. *Verh Deut Gesell Pathol* 73: 193-206
- Murase N, Demetris J, Kim DG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE (1990) Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small bowel and liver grafts. *Surgery* 108: 880-889
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nithara JA, Quaini E, Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P (1997) Apoptosis in a failing human heart. *N.Engl.J.Med.* 336: 1131-1141
- Ono K, Lindsey ES (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57: 225-229

- Pichelmayer R, Nagel E (1994) Organtransplantation und Transplantationsimmunologie. In: Berchthold R, Hammelmann H, Peiper HJ, Trenz O (eds) Chirurgie. Urban & Schwarzenberg München pp 265-272
- Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE (1994) Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 19: 916-924
- Qian S, Thai NL, Lu L, Fung J, Thomson AW (1997) Liver transplant tolerance: mechanistic insights from animal models with particular reference to the mouse. *Transplantation Reviews* 11: 151-164
- Rasmussen A, Davies HS, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY (1995) Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 59: 919-921
- Schmid T, Oberhuber G, Körösi G, Klima G, Margreiter R (1989) Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. *Gastroenterologie* 15: 29-32
- Starzl TE (1978) Liver transplantation. *Johns Hopkins Med J* 143: 73-83
- Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997) Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol* 159: 4772-4780
- Sun J, McCaughan GW, Gallagher ND, Sheil AGR, Bishop GA (1995) Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 60: 233-236
- Sun J, McCaughan GW, Matsumo Y, Sheil AGR, Gallagher ND, Bishop GA (1994) Tolerance to rat liver allograft I: differences between tolerance

and rejection are more marked in the B-cell compared with the T-cell or cytokine response. *Transplantation* 57: 1349-1357

Timmermann W, Gasser M, Meyer D, Kellersmann R, Gassel HJ, Otto C, Thiede A (1999) Progress in experimental intestinal transplantation in small animal models. *Acta.Gastroenterol.Belg.* 62: 216-220

Timmermann W, Otto C, Gasser M, Meyer D, Parthum E, Schad J, Koch M, Gassel HJ, Ulrichs K, Thiede A (2000) Long term small bowel allograft function induced by short term FK 506 application is associated with split tolerance. *Transpl.Int.* 13: 532-536

Tu Y, Arima T, Flye W (1997) Rejection of spontaneously accepted rat liver allografts with recipient interleukin 2 treatment or donor irradiation. *Transplantation* 69: 177-181

van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK (1997) Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J.Exp Med.* 186: 1119-1128

Vanrenterghem YF (1997) Impact of new immunosuppressive drugs on late graft outcome. *Kidney Int.* 63: 81-83

Wacker HH, Radzun HJ, Parwaresch MR (1986) Kinetics of Kupffer cells as shown by parabiosis and combined autoradiographic / immunohistochemical analysis. *Virchows Arch.B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 51: 71-78

Waldmann H, Cobbold S (1998) How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu.Rev.Immunol.* 16: 619-644

Walgenbach KJ, Heeckt PF, Stanson JD, Whiteside TL, Bauer AJ (1996) Increased expression of transforming growth factor-beta during chronic rejection. *Transplantation Proceedings* 28: 2450-2454

- Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996) CTLA 4 ligation blocks CD28 dependent T-cell activation. *J.Exp.Med.* 183: 2541-2550
- Wang C, Sun J, Li L, Wang L, Dolan P, Sheil AG (1998) Conversion of Pankreas allograft rejection to acceptance by liver transplantation. *Transplantation* 65: 188-192
- Watschinger B (1995) How T-cells recognise alloantigen: evidence for two pathways of allo-recognition. *Nephrol.Dial.Transplant.* 10: 1556-1558
- Woodle ES, Kulkarni S (1998) Programmed cell death. *Transplantation* 66: 681-691
- Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K (1997) Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 15: 144-53
- Zavazava N, Krönke M (1996) Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in allogeneic cytotoxic T lymphocytes. *Nature Medicine* 2: 1005-1010
- Zhong R, He G, Sakai Y, Zhang Z, Garcia B, Li X, Jevnikar A, Grant D (1993) The effect of donor recipient strain combination on rejection and graft versus host disease after small bowel / liver transplantation in the rat. *Transplantation* 56: 381-385

## ***Danksagung***

Herrn Prof. Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg gilt mein Dank für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in dem von ihm gegründeten mikrochirurgischen Labor der Universität Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Meyer, Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für Motivation, Gespräch und Hilfe über die Dissertation hinaus. Seine umfassende Anleitung zur wissenschaftlichen Tätigkeit und zuverlässige Betreuung hat wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie der Universität Würzburg, danke ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen in o.g. Einrichtung.

Herrn Dr. rer. nat. C. Otto, Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie der Universität Würzburg, danke ich für die große Hilfsbereitschaft bei Diskussion wissenschaftlicher und technischer Aspekte der durchgeführten Versuche. Dank gebührt ihm auch für die Hilfe und kritische Durchsicht bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau A. Gebert und Frau N. Martens für die unermüdliche Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie den immunologischen Nachuntersuchungen.

Am Ende gilt ein ganz besonderer Dank meinen lieben Eltern. Durch ihre unentwegte Hilfe und großzügige Unterstützung in allen Jahren haben sie die vorliegende Dissertation erst ermöglicht.

## *Lebenslauf*

- Name: Wolf Michael Thorwarth
- geboren am 24.05.1974 in Meiningen/Thür.
- Eltern: Eveline Thorwarth, Dipl.Chemikerin  
Dr. med. Eberhard Thorwarth, Arzt
- 1980-1990 Regelschule Jüchsen
- 1991-1992 Austauschschüler in Michigan/USA, Besuch der Jackson High-School, Abschluß mit Diploma
- 1990-1993 Henfling-Gymnasium Meiningen und Abitur 1993
- 1993-1994 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz Meiningen
- 1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Julius Maximilians-Universität Würzburg
  - September 1996 Ärztliche Vorprüfung („Physikum“)
  - März 1998 1. Staatsexamen
  - Juni 1998 USMLE Step 1
  - März 2000 2. Staatsexamen
- April 2000-März 2001 Praktisches Jahr
  - Klinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. N. Roewer)
  - Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. A. Thiede)
  - Kantonsspital Altstätten / Schweiz, Medizinische Abteilung (Chefarzt Dr. med. P. J. Hangartner)
- April 2001 3. Staatsexamen
- seit Mai 2001 Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Direktor Prof. Dr. Dr. F.W. Neukam) und Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg