

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

**Durchflußzytometrische Analysen zur  
spenderspezifischen Toleranzinduktion nach kombinierter  
orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Christoph Rummel**

aus Stuttgart

Würzburg, Juni 2002

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

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Rückle-Lanz

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

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Januar 2003

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

Meinem Großvater gewidmet

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>6</b>
3.1 Versuchstiere und Haltung .....	6
3.2 Versuchsaufbau .....	7
3.2.1 Stammkombinationen .....	7
3.2.2 Immunsuppressive Therapie .....	7
3.3 Mikrochirurgische Operationstechniken.....	8
3.3.1 Kombinierte orthotope Leber/Dünndarmtransplantation.....	8
3.3.2 Heterotope Herztransplantation.....	10
3.3.3 Hauttransplantation .....	11
3.4 Nachuntersuchung der Empfängertiere.....	11
3.4.1 Klinische Beurteilung der Tiere .....	11
3.4.2 Organentnahme der Empfängertiere und Makroskopische Begutachtung.....	12
3.4.3 Blutanalyse .....	12
3.4.4 Isolierung intraorganischer Leukozyten.....	13
3.4.4.1 Isolierung von Leukozyten aus der Leber .....	13
3.4.4.2 Isolierung von Leukozyten aus der Milz.....	13
3.4.4.3 Isolierung von Leukozyten aus den mesenterialen Lymphknoten.....	14
3.4.5 Färbung der vitalen Leukozyten für durchflußzytometrische Messungen.....	14
3.4.6 Färbung der apoptotischen Leukozyten für durchflußzytometrische Messungen .....	15
3.4.7 Messung und Auswertung.....	16
3.5 Fotodokumentation .....	17
3.6 Statistische Auswertung .....	17
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
4.1. Klinische Beobachtung der Tiere.....	19
4.2 Nachweis spenderspezifischer Toleranz .....	22
4.3 Durchflußzytometrische Untersuchungen nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation .....	25

4.3.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen in Leber, MLKs und Milz .....	25
4.3.1.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen des Chimärismus .....	25
4.3.1.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen der T-Zell-Subpopulationen .....	27
4.3.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen in der Leber .....	31
4.3.2.1	Analyse der isolierten Leukozyten .....	31
4.3.2.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen der spenderspezifischen Subpopulationen in der Leber .....	32
4.4	Durchflußzytometrische Untersuchungen der Apoptoseraten im Lebertransplantat .....	35
4.4.1	Etablierung der Apoptosefärbung mit Annexin V .....	35
4.4.2	Analyse der Apoptoseraten isolierter Leberleukozyten nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation .....	39
<b>5.</b>	<b>Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
6.1	Kombinierte orthotope Leber/Dünndarmtransplantation .....	50
6.1.1	Modellentwicklung .....	50
6.1.2	Klinischer Verlauf, Transplantatüberleben, Immunsuppression .....	50
6.1.3	Nachweis der spenderspezifischen Toleranz .....	51
6.2	Mechanismen der spenderspezifischen Toleranzinduktion .....	52
6.2.1	Chimärismus .....	52
6.2.2	Rolle der T-Zellen in Leber, Milz und MLKs .....	54
6.2.3	Bedeutung der Leukozyten in der Leber .....	55
6.2.4	Apoptose .....	56
<b>7.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>62</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>66</b>

# 1. Einleitung

Die Transplantation des Dünndarms ist bis heute ein komplikationsreiches Verfahren, welches sich im klinischen Alltag noch nicht in dem Maße etabliert hat, wie vergleichsweise die Transplantation anderer solider Organe, so z.B. Niere, Herz oder Leber. Die ersten klinischen Intestinaltransplantationen wurden zwischen 1964 bis 1970 durchgeführt und beschrieben (Fortner, 1972; Alican, 1971; Olivier, 1969; Lillehei, 1967). Die erste kombinierte Leber/Dünndarmtransplantation wurde aber erst 1988 am London Health Sciences Center in London / Ontario erfolgreich durchgeführt (Grant, 1990); die erste Transplantation eines gesamten Dünndarms gelang 1989 am Hopital Necker-Enfants-Malades in Paris (Goulet, 1992). Mit der Gründung des Intestinal Transplant Registry wurde 1994 die Grundlage geschaffen, einen internationalen Erfahrungsaustausch zwischen den weltweit 51 Zentren für Intestinaltransplantationen zu ermöglichen. Bis 1999 wurden weltweit 474 Intestinaltransplantationen durchgeführt, wovon annähernd die Hälfte dieser Transplantationen in den Zeitraum zwischen 1997 und 1999 fielen.

Große therapeutische Bedeutung hat die Transplantation des Dünndarms vor allem in der Kinderchirurgie. Relevante Indikationen für die Dünndarmtransplantation sind Motilitätsstörungen (z.B. viszerale Neuropathien, M. Hirschsprung), Malabsorptionsstörungen (z.B. autoimmune Enterokolitis) und polypöse Syndrome (z.B. Gardner Syndrom). Die häufigste Indikation stellt allerdings das Kurzdarmsyndrom dar, welches auf dem Boden unterschiedlichster Grunderkrankungen entstehen kann. So führen v.a. Volvulus, Gastroschisis, nekrotisierende Enterokolitis und die intestinale Atresie bei Kindern zu einem Kurzdarmsyndrom. Bei Erwachsenen sind besonders Darmischämie, Morbus Crohn, Trauma und Dermoidtumoren häufige Ursachen eines Kurzdarmsyndroms. Unterschreitet der Dünndarm eine Länge von 60-80cm, so ist eine ausreichende Resorption von Nahrungsbestandteilen über den Dünndarm nicht mehr möglich. Diese Patienten sind im weiteren Verlauf ihres Lebens auf eine Totale Parenterale Nutrition (TPN) angewiesen. Häufig führt eine über Jahre anhaltende TPN, neben rezidivierenden infektiösen Komplikationen, zu einer biliären

Leberzirrhose, deren Pathogenese noch weitgehend unklar ist. Bei Patienten, die auf eine lebenslange TPN angewiesen sind, sollte deshalb bei lebensbedrohenden Komplikationen der TPN eine isolierte Dünndarmtransplantation, oder bei schon bestehendem irreversiblen Leberschaden eine kombinierte Leber/Dünndarmtransplantation erwogen werden (Mittal, 2000).

Seit den Anfängen der Intestinaltransplantation, haben sich die Ergebnisse wesentlich verbessert. Besonders in der zweiten Hälfte der neunziger Jahre konnte durch die Einführung des potenten Immunsuppressivums FK506 (Goulet, 1998) ein therapeutischer Weg gefunden werden, v.a. die frühe Transplantatabstoßung zu behandeln. Trotz aller Erfolge und Fortschritte in der Transplantationsmedizin, gilt die Transplantation des Dünndarms jedoch bis heute als besonders schwierig und anspruchsvoll. Dafür werden mehrere Gründe diskutiert. Erstens führt die massive bakterielle Besiedlung des Darms häufig zu schwerwiegenden infektiösen Komplikationen nach der Transplantation. Das septische Multiorganversagen ist die häufigste Todesursache nach Dünndarmtransplantation. Zweitens werden mit dem transplantierten Dünndarm spendereigene Leukozyten, v.a. in den Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria übertragen. Dieses lymphatische Gewebe („Gut-Associated Lymphoid Tissue“) stellt dabei einen starken Stimulus für eine gegen das Transplantat gerichtete T-Zellreaktion des Empfängers (die sog. Abstoßungsreaktion) dar. Eine immunologische Sonderstellung nimmt in diesem Zusammenhang die Leber ein. So wurde experimentell ein protektiver Effekt der Leber auf mittransplantierte Organe desselben Spenders beschrieben (Rasmussen, 1995; Meyer, 2000). Dabei sind die Vorgänge in der Leber, welche die Immunantwort des Empfängers zugunsten einer besseren Akzeptanz der mittransplantierten Organe beeinflussen, noch weitgehend unbekannt. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Immunantwort durch Mechanismen moduliert wird, die zu einer für das Spenderorgan spezifischen Nichtreaktivität (spenderspezifische Toleranz) führen (Calne, 1995; Kamada, 1993; Gassel, 2000).

Generell wird die zentrale Toleranz von der peripheren Toleranz unterschieden. Die zentrale Toleranz ermöglicht es dem Organismus zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Dies wird durch Reifungsprozesse im

Thymus erreicht, bei denen T-Lymphozyten eliminiert werden, welche sich gegen körpereigene Strukturen wenden. Die periphere Toleranz auf der anderen Seite beschreibt zelluläre Abläufe außerhalb des Thymus. Diese verhindert, daß T-Lymphozyten gegen körpereigene Strukturen vorgehen und im Fall der Transplantation gegen ein allogenes Transplantat (d.h. ein Transplantat eines anderen Individuums der gleichen Spezies) wenden und dieses als „fremd“ erkennen und abstoßen. Unterschiedlichste Mechanismen werden dabei diskutiert, welche in den Organen des lymphatischen Systems (Lymphknoten, Milz, Leber) lokalisiert sind und zur Induktion der peripheren Toleranz führen. So wird der *Chimärismus*, d.h. das Vorkommen spendereigener Zellen im Organismus nach Organtransplantation, als eine mögliche zelluläre Grundlage angesehen (Starzl, 1993; Qian, 1994;). Die Anwesenheit von Spenderzellen im peripheren lymphatischen System des Empfängers, ermöglicht hier wahrscheinlich eine permanente Alloantigen-Präsentation gegenüber lymphatischen Zellen des Empfängers. Vor diesem Hintergrund könnte eine mangelhafte Expression co-stimulierender Signale dieser Spenderzellen eine T-Zellanergie des entsprechenden alloreaktiven Klon, und somit eine spenderspezifische Toleranz, bewirken.

Ebenso wird die *Apoptose* (programmierter Zelltod) aktivierter alloreaktiver T-Lymphozyten im Transplantat als Mechanismus diskutiert (Kamada, 1985; Meyer, 1998a), der spenderspezifische Toleranz induziert. Eine besondere Stellung im Rahmen der Toleranzinduktion haben dabei unterschiedlichste Leukozytenpopulationen in der transplantierten Leber selbst (Oliver, 1998).

In unserer Arbeitsgruppe (Meyer, 1998b) wurde mit der kombinierten orthotopen Leber/Dünndarmtransplantation der Ratte ein Modell etabliert, welches die Möglichkeit eröffnet, unter möglichst physiologischen Bedingungen die immunologischen Vorgänge in Leber und mesenterialen Lymphknoten, sowie der Milz als Vergleichsorgan, zu untersuchen. Damit soll eine möglichst große Relevanz und Praxisnähe, in Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse für den klinischen Alltag, erreicht werden. In dieser Arbeit wurden die zellulären Phänomene *Chimärismus* und *Apoptose*, die mit der Induktion von Transplantattoleranz in Verbindung stehen, durchflußzytometrisch untersucht. Speziell die qualitative und quantitative Erfassung der Apoptoseraten intrahepatischer Leukozyten stand im Mittelpunkt dieser Untersuchungen. Für die

Messung der Apoptose intrahepatischer Leukozytenpopulationen galt es zunächst, eine durchflußzytometrische Methode zu etablieren. Daten der eigenen Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, daß wesentliche zelluläre Veränderungen, welche an der Induktion peripherer Toleranz beteiligt sind, besonders in der frühen Phase post transplantationem stattfinden (Meyer, 1998c). Unsere Untersuchungen wurden deshalb in einem zeitlich engen Raster der Frühphase (Tag 3, 7, 14 p.op.) nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation durchgeführt. Der Tag 150 p.op. diente dabei als Zeitpunkt und Vergleichswert der späten Phase. Hierdurch sollte die Dynamik der zellulären Veränderungen im Rahmen der spenderspezifischen Toleranzinduktion genau erfaßt werden. Neben der Analyse der zellulären Vorgänge in der Transplantatleber und dem Dünndarmtransplantat (bzw. den mesenterialen Lymphknoten als korrespondierende lymphatische Abflußgebiete), war auch die Milz Gegenstand unserer Untersuchungen. Von besonderem Interesse war hierbei, ob sich in diesem empfängereigenen lymphatischen Organ die Einwanderung von Leukozyten aufzeigen läßt, welche mit der spenderspezifischen Toleranzinduktion in Zusammenhang steht.

## 2. Fragestellung

Ziel der durchflußzytometrischen Untersuchungen war die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Wird nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation ein Langzeitüberleben der allogenen transplantierten Tiere erreicht, welches auf der Induktion spenderspezifischer Toleranz basiert?
2. Kann mit durchflußzytometrischen Methoden der zeitliche Verlauf einzelner Zellpopulationen in Leber, MLKs und Milz quantitativ erfaßt werden, und wie verhalten sich die zellulären Abläufe in den untersuchten Organen?
3. Lassen sich in den Organen Leber, MLKs und Milz mit der Durchflußzytometrie spendereigene Leukozytenpopulationen (sog. Chimärismus) nachweisen, welche mit einer etwaigen Toleranzentwicklung in Zusammenhang stehen?
4. Läßt sich mit der kombinierten Annexin V und 7-AAD Färbung eine Methode etablieren, mit der Apoptosen von Leukozyten durchflußzytometrisch erfaßt werden können?
5. Kann mit der o.g. Färbemethode auch die Apoptoserate von Lymphozyten der Transplantatleber quantitativ erfaßt werden und zeigen sich dabei Unterschiede in der Früh- und Spätphase nach Transplantation? Welche Leukozytenpopulation im Lebertransplantat weist dabei durchflußzytometrisch die höchste Apoptoserate auf?

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

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

Alle Versuche wurden mit Genehmigung der Regierung Unterfranken zur Durchführung von Versuchsvorhaben (Nr. 621-2531.01-22/94, 621-2531.01-3/97, 621-2531.01-22/98) durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Ratten aus kontrollierten Inzuchtstämmen, die nach Erwerb in den Tierställen der Chirurgischen Universitätsklinik gehalten wurden. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren die Tiere 3-4 Monate alt und wogen zwischen 200-250 g. Folgende Inzuchtstämme wurden verwendet:

##### *Organspenderstämme:*

- Brown Norway (BN; MHC-Haplotyp n), erworben von der Firma Charles River GmbH, Sulzfeld
- Dark Agouti (DA; MHC-Haplotyp avl), erworben von der Firma Harlan Winkelmann, Borchem

##### *Transplantatempfängerstamm:*

- Lewis (LEW; MHC-Haplotyp 1), erworben von der Firma Charles River GmbH, Sulzfeld.

Die Haltung erfolgte jeweils paarweise in Makrolan<sup>®</sup>-Käfigen. Operierte Tiere wurden in keimarmen Klimaschränken (Scantainer<sup>®</sup>, Fa. Scanbur, Køgen, Dänemark) gehalten, um einen besseren Schutz vor opportunistischen Infektionen unter der bestehenden Immunsuppression zu gewährleisten. Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frisches Einstreu und Zellstoffunterlagen sowie Altromin<sup>®</sup>-Pressfutter und Wasser ad libitum. Zusätzlich wurde täglich eine Ration aus Haferflocken und Sonnenblumenkernen gegeben. Die postoperativen Motilitätsstörungen des Darms wurden überbrückt mit der Verabreichung von flüssiger Kost ad libitum für 5 Tage. (Tag 0-1: Wasser, Tag 2-3 10% Glukoselösung, Tag 4-5: Fresubin<sup>®</sup> (Fa. Fresenius, Bad Homburg) und Wasser in einer Verdünnung von 1:2. Von Tag 0-5 erfolgte eine perioperative

Antibiotikaprophylaxe der Empfängertiere mit Levofloxacin (Tavanic<sup>®</sup>, Fa. Höchst, Frankfurt/Main; 7,5 mg/kgKG/Tag s.c.). Damit sollte einer Infektion, durch eine eventuelle bakterielle Translokation nach Dünndarmtransplantation oder als Folge der applizierten Immunsuppression, vorgebeugt werden.

## **3.2 Versuchsaufbau**

### **3.2.1 Stammkombinationen**

Sowohl eine syngene (LEW→LEW) als auch eine allogene (BN→LEW) Anordnung wurde bei der kombinierten Leber/Dünndarmtransplantation durchgeführt. Da bei der Transplantation zwischen syngen Tieren eine Abstoßungsreaktion ausgeschlossen ist, konnte durch die syngene Anordnung sicher zwischen operativ-technisch und immunologisch bedingten Veränderungen im Transplantat unterschieden werden. Wegen der z.T. spontan auftretenden Toleranz des LEW-Empfängers nach isolierter BN-Lebertransplantation (Engemann, 1982) erschien diese Kombination für die Versuchsanordnung besonders geeignet.

### **3.2.2 Immunsuppressive Therapie**

Um Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie zu vermeiden und gleichzeitig einen sicheren Schutz vor einer initialen Abstoßung zu gewährleisten, war in Vorversuchen die notwendige therapeutische Dosierung ermittelt worden. Dabei wurden zusätzlich die gewonnenen Erfahrungen mit der isolierten orthotopen Dünndarmtransplantation (Timmermann, 2000) und die Ergebnisse der heterotopen Leber/Dünndarmtransplantation berücksichtigt. Wir verwendeten FK506 als Immunsuppressivum in der intramuskulären Darreichungsform (Prograf<sup>®</sup> /Tacrolimus<sup>®</sup>, Fa. Fujisawa, Japan). Den Tieren wurde 0,5 mg/kgKG/Tag FK506 an den Tagen 0-5 verabreicht. Die Verdünnung erfolgte mit 0,9%iger NaCl-Lösung, Portionen zu je 1 ml wurden tiefgefroren (-20°C) aufbewahrt.

### 3.3 Mikrochirurgische Operationstechniken

Bei allen mikrochirurgischen Operationen wurden Operationsmikroskope (Fa. Codman, Typ Mentor C III, Herbruggen, Schweiz) verwendet und der Operationssitus mit 10-25facher Vergrößerung unter keimarmen Bedingungen dargestellt. Die Gefäßanastomosen wurden in fortlaufender Nahttechnik mit den Fadenstärken 6-0 (Seralene<sup>®</sup>, Nadel: DR-9, Fa. Serag-Wiessner, Naila) oder 8-0 (Prolene<sup>®</sup>, Nadel: BV-2, Fa. Ethicon, Hamburg) durchgeführt. Zur Darmnaht wurde ebenfalls 6-0 Seralene<sup>®</sup> in Einzelknopfnahntechnik verwendet. Die Darmanastomose wurde mit einer passageren Stent-Einlage gesichert. Dieser bestand aus einer ca. 10mm langen und 3mm breiten Makkaroni, der vom Darm in den ersten postoperativen Tagen vollständig resorbiert wurde. Der Bauchdeckenverschluß erfolgte in zweischichtiger Einzelknopfnahntechnik mit 4-0 Prolene<sup>®</sup> (Fa. Ethicon, Hamburg). Als Polyäthylen-Splint für die Gallenganganastomose wurden 22G Braunülen (Fa. Braun, Melsungen) verwendet, die mit einer 6-0 Seidenligatur (NC-Seide, Fa. Braun) im Gallengang fixiert wurden. Die Anästhesie der Spendertiere erfolgte mittels Ketanest<sup>®</sup> (Fa. Parke Davis, Freiburg) und Rompun<sup>®</sup> (Fa. Bayer, Leverkusen) als Injektionsnarkose (0,025 ml Rompun<sup>®</sup> / 50gKG und 0,1 ml Ketanest<sup>®</sup> / 50gKG i.m.). Die Empfängertiere wurden mit einer Äther-Inhalationsnarkose (Fa. Hoechst, Frankfurt/Main) anästhesiert, um eine bessere Steuerung der Narkosetiefe während der anhepatischen Phase sicherzustellen. Zur postoperativen Analgesie wurde Tramal<sup>®</sup> (Fa. Grünenthal, Stolberg) eingesetzt. Am Ende der Explantation wurden die Tiere durch intracardiale Injektion von T61<sup>®</sup> (Fa. Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim) getötet.

#### 3.3.1 Kombinierte orthotope Leber/Dünndarmtransplantation

##### ➤ *Spenderoperation*

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 Gallengang 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 Spender-Pfortader 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>, Fa. 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 (Fa. Braun, Melsungen). Der Empfängerdünnarm wurde von der ersten Jejunalschlinge bis zum distalen Ileum schrittweise an den Mesenterialgefäßen abgetrennt und entfernt. An den Absetzungsrändern 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 orientiert sich an der von Ono und Lindsey beschriebenen Methode (Ono; Lindsey, 1969).

#### *➤ Spenderoperation*

Nach Sternotomie des Spendertieres wurde die Vena cava inferior 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 der Eröffnung des Abdomens wurden daher zunächst einige Verwachsungen gelöst und die Empfänger-Aorta und die Empfänger-

Vena cava inferior 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-Vena cava inferior eine End-zu-End-Anastomose. Mit dem Öffnen der Klemmen wurde ein retrograder Blutstrom durch die Aorta → Coronargefäß → rechten Vorhof → rechter Ventrikel → Truncus pulmonalis erreicht. Das Herztransplantat begann spontan 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 1 cm<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 4-0 Nähten fixiert. Ein Druckverband für ca. 5 Tage verhinderte Manipulationen des Empfängertieres an seinem Transplantat. Nach Abnahme des Verbandes erfolgte die tägliche Inspektion.

## **3.4 Nachuntersuchung der Empfängertiere**

### **3.4.1 Klinische Beurteilung der Tiere**

Die Tiere wurden einmal täglich visitiert. Dabei wurde besonders auf Anzeichen einer beginnenden Abstoßungsreaktion, Cholestase und einer gestörten Leber- bzw. Darmfunktion geachtet (Blutungen, Ikterus, dunkler Urin). Vigilanz, Körperhaltung, Fellbeschaffenheit und Gewichtsverlauf wurden als Parameter zur Beurteilung des Allgemeinzustandes herangezogen und in einem Bewertungsbogen dokumentiert. Dabei wurde eine 4-stufige Graduierungsskala benutzt (0: ohne Befund, 1-3: Merkmal leicht/mittel/schwer ausgeprägt). Befand sich ein Tier in einem anhaltend schlechten Allgemeinzustand, so wurde es in Äthernarkose mit einer intracardialen T61<sup>®</sup>-Injektion getötet. Nach heterotoper Herztransplantation wurde jeden Tag die Kontraktion des Transplantates palpirt, und anschließend schriftlich dokumentiert. Nach

Hauttransplantation erfolgte die tägliche makroskopische Inspektion nach Abnahme des Druckverbandes am 10. postoperativen Tag.

### **3.4.2 Organentnahme der Empfängertiere und Makroskopische Begutachtung**

Die Organentnahmen wurden zu festgesetzten Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7, Tag 14, Tag 28 und Tag 150 p.op.) durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit Ketanest<sup>®</sup> / Rompun<sup>®</sup> anästhesiert. Nach medianer Laparotomie erfolgte zunächst die makroskopische Inspektion des Situs und des Transplantats. Der Blutentnahme aus der Aorta abdominalis folgte die Entfernung der mesenterialen Lymphknoten (MLK) und die Splenektomie. Zur Perfusion der Leber in situ wurde die Pfortader dargestellt und mit Hilfe einer Perfusionskanüle das Organ mit 4°C kalter NaCl-Lösung perfundiert. Die Drainage erfolgte über die suprarenisch durchtrennte Vena cava inferior. Der Dünndarm wurde nach Durchtrennung am Duodenum und Coecum vom Mesenterium gelöst, intraluminär gespült und zur histologischen Aufarbeitung gegeben. Die entnommenen Organe Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in 4°C kalter NaCl-Lösung aufbewahrt. Am Ende der Explantation erfolgte die Tötung der Tiere durch intracardiale Injektion von T61<sup>®</sup>. Bei jeder Organentnahme der Empfängertiere wurden die Organe routinemäßig makroskopisch kontrolliert. Dabei wurde die Größe, Farbe und Konsistenz der Leber, Milz und Nieren beurteilt. Ebenfalls wurde die Passierbarkeit und Kontinuität der Dünndarmanastomosen überprüft.

### **3.4.3 Blutanalyse**

Ebenfalls bei jeder Organentnahme wurden ca. 1ml Vollblut zur Bestimmung des FK506-Blutspiegels und ca. 1ml EDTA-Blut zur Bilirubinbestimmung im Plasma gewonnen. Dazu wurde die Aorta abdominalis aufgesucht und punktiert. Die Blutprobe für die Bilirubinbestimmung wurde zentrifugiert und eine Messung in der Kinderklinik der Universität Würzburg durchgeführt (Analysegerät Cobas Mira S). Die Vollblutprobe für die FK506-Spiegelbestimmung wurde bei -20°C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mittels „Micro Particle Enzyme Immunoassay“ (MEIA, Zentrallabor der Universität Würzburg) analysiert.

### **3.4.4 Isolierung intraorganischer Leukozyten**

Aus den Organen Leber, Milz und mesenterialen Lymphknoten wurden zu durchflußzytometrischen Untersuchungen Leukozyten isoliert. Dabei erfolgte die Isolierung und Weiterverarbeitung der Leukozyten nach etablierten Protokollen.

#### **3.4.4.1 Isolierung von Leukozyten aus der Leber**

Nach der in situ Perfusion der Leber über die Vena portae mit 4°C kalter NaCl-Lösung, wurde die Leber entnommen, gewogen und in ca. 0,5cm große Stücke unterteilt. Die Stücke wurden durch ein Gitternetz (Fa. Sigma, Deisenhofen) passiert und in PBS-Lösung (phosphate-buffered saline; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) aufgenommen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde auf zwei 50ml Röhrchen verteilt und einmal gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden jeweils in 20ml PBS-Lösung aufgenommen und mit je 100 U/ml Kollagenase (Fa. Sigma, Deisenhofen) versetzt und für 30min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen einmal gewaschen. Es folgte die dreimalige Vorzentrifugation: nach jeder Zentrifugation bei 16g für 2 min. wurde der Überstand abgenommen, über 100µm Gaze (Fa. Hartenstein, Würzburg) gefiltert und abermals zentrifugiert. War dies dreimal durchgeführt worden, wurde einmal gewaschen, und die so gewonnenen Zellen in je 15ml 36%igem Percoll (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgenommen. Anschließend wurden die beiden Zellsuspensionen in jeweils einem 50ml Röhrchen auf 15ml 72%iges Percoll geschichtet. Es folgte die Zentrifugation der beiden Röhrchen mit 1118g für 30min. bei 20°C. Danach wurden die Interphase-Zellen abgenommen und über 100µm Gaze gefiltert, dreimal gewaschen und die Zellzahl auf 10<sup>4</sup> Zellen/µl eingestellt.

#### **3.4.4.2 Isolierung von Leukozyten aus der Milz**

Die entnommene Milz wurde zunächst durch ein Gitternetz (Fa. Sigma, Deisenhofen) passiert, in einem 50ml Röhrchen mit PBS-Lösung aufgenommen und anschließend einmal gewaschen. Zu den 10ml Zellsuspension wurde jetzt 10ml Lysepuffer (40 mM NH<sub>4</sub>Cl; 2,5 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,3 mM EDTA) zugegeben und für 3min. inkubiert. Nach der

Inkubation wurde 30ml PBS-Lösung beigefügt und bei 580g für 8min. zentrifugiert. Das gewonnene Zellpelet wurde in 20ml PBS-Lösung aufgenommen, über 100µm Gaze (Fa. Hartenstein, Würzburg) gefiltert und im nächsten Schritt mit PBS-Lösung auf ein Volumen von 50ml ergänzt. Nach einmaligem Waschen wurde die Zellzahl auf  $10^4$  Zellen/µl eingestellt.

#### **3.4.4.3 Isolierung von Leukozyten aus den mesenterialen Lymphknoten**

Die entnommenen Mesenterialen Lymphknoten (MLK) wurden zunächst durch ein Gitternetz (Fa. Sigma, Deisenhofen) passiert, in einem 50ml Röhrchen mit PBS-Lösung aufgenommen und anschließend einmal gewaschen. Das gewonnene Zellpelet wurde in 20ml PBS-Lösung aufgenommen, über 100µm Gaze (Fa. Hartenstein, Würzburg) gefiltert und im nächsten Schritt mit PBS-Lösung auf ein Volumen von 50ml ergänzt. Nach einmaligem Waschen wurde die Zellzahl auf  $10^4$  Zellen/µl eingestellt.

#### **3.4.5 Färbung der vitalen Leukozyten für durchflußzytometrische Messungen**

Zur Analyse der Spender- und Empfängerzellen mit durchflußzytometrischen Methoden wurde eine Dreifachfärbung wie folgt verwendet (siehe auch Färbeprotokoll im Anhang): die mit Hilfe eines Zellcounters auf  $10^4$  Zellen/µl eingestellte Zellsuspension wurde in Portionen zu 50µl ( $5 \times 10^5$  Zellen) pro Färbeansatz in einer 96iger Mikrowell-Platte (Fa. Eppendorf, Hamburg) verteilt. Anschließend wurde ein unkonjugierter Antikörper (Maus anti Ratte), in Sättigungskonzentration, zu jedem Färbeansatz pipettiert und für 20min. bei 4°C im Eisbad inkubiert. Nach einmaligem Waschen, wurde der Primärantikörper mit einem Phycoerythrin-gekoppelten (PE) Sekundärantikörper (Esel anti Maus) markiert. Dazu wurde jeder Sekundärantikörper in Sättigungskonzentration zu den Ansätzen gegeben und für weitere 20min. inkubiert. Nach dem Waschen der Ansätze wurden alle weiteren Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mit Mausserum (1:10 in PBS-Lösung verdünnt) für 20min. abgesättigt. Ein weiterer Biotin-gekoppelter Antikörper wurde in Sättigungskonzentration zu den Ansätzen zugegeben und für erneut 20min. inkubiert. Nach dem Waschen wurde der Biotin-gekoppelte Antikörper mit Tri-color<sup>®</sup>-gekoppeltem Streptavidin (Fa. Pharmingen, San Diego, USA) angefärbt. Nach einer

Inkubationszeit von 20min. und einem weiteren Waschvorgang, wurde ein direkt-FITC-gekoppelten Antikörper zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 20min. wurden alle Färbeansätze nochmals gewaschen, und die Zellen in 200µl PBS-Lösung aufgenommen. Die Untersuchung der dreifachgefärbten Zellen erfolgte anschließend im Durchflußzytometer. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 1.1 dargestellt.

### **3.4.6 Färbung der apoptotischen Leukozyten für durchflußzytometrische Messungen**

Bei der Messung der Apoptoserate isolierter Leberleukozyten wurde ebenfalls eine Dreifachfärbung verwendet. Die Färbung mit Annexin V-FITC (Fa. Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg) ermöglicht es, Apoptosen in einem frühen Stadium mit durchflußzytometrischen Messungen zu erfassen (Vermes, 1995). Annexin V-FITC bindet dabei,  $Ca^{2+}$ -abhängig und mit hoher Affinität, das Zellmembranphospholipid Phosphatidylserin (PS). Dieses wird in der frühen Phase der Apoptose von der Membraninnenseite auf die Membranaußenseite transloziert. PS wird danach von Annexin V-FITC gebunden. Die Darstellung und Differenzierung von nekrotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (Via-Probe™, Fa. Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg). Dieser bindet an DNA-Bruchstücke aus dem Zellkern, nachdem die Integrität der Zellmembran zerstört worden ist. Apoptotische Zellen erscheinen somit in der Durchflußzytometrie FITC-Annexin V positiv, aber 7-AAD negativ; nekrotische Zellen dagegen werden FITC-Annexin V positiv und 7-AAD positiv gefärbt. Um diese Methode zu etablieren, wurden Versuche durchgeführt, bei denen entweder Apoptosen mit Dexamethason (Montani, 1999) induziert wurden, oder die Zellen in RPMI 1640 Kulturmedium (25 mM HEPES; 2 mM L-Glutamin; 50µM 2-Mercaptoethanol; 50 µg/ml Streptomycin; 50 U/ml Penicillin; GibcoBRL™, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurden. Dexamethason (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde hierbei mit jeweils 80µg/Ansatz zu der RPMI-Zellsuspension gegeben, welche  $10^4$  Zellen/µl enthielt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 37°C für 3, 6 und 8 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal gewaschen und für die Durchflußzytometrie gefärbt. Erfolgte die Inkubation lediglich in reinem RPMI 1640 Kulturmedium, wurden die Zellen zunächst, nach Isolierung aus der Leber, in RPMI

aufgenommen. Die Hälfte der Zellen wurde bei 37°C für 3 Stunden inkubiert, und die andere Hälfte der Zellen wurde sofort gefärbt. Für jeden Färbeansatz wurde von der Suspension 50µl entnommen und in eine 96iger Mikrowell-Platte (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Die erste Färbung erfolgte mit einem direkt-PE-gekoppelten Antikörper, der nach Inkubation für 20min. bei 4°C anschließend gewaschen wurde. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 10µl 7-AAD pipettiert, und der Ansatz auf ein Färbevolumen von 100µl mit PBS-Lösung ergänzt. Nach Inkubation und Waschen der Ansätze, wurde das Zellpellet in 100µl Bindungspuffer (binding puffer; 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; Fa. Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg) aufgenommen und mit 5µl FITC-Annexin V für 15min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Es zeigte sich hierbei, daß es schon nach 3 Stunden zu einem Anstieg der nachweisbaren Apoptosen kam. Längere Inkubationszeiten führten aber zu keinem wesentlichen Anstieg der nachweisbaren Apoptosen. Alle weiteren durchflußzytometrischen Messungen wurden deshalb zu den Zeitpunkten 0 Std. (keine Inkubation) und 3 Std. durchgeführt, um die Dynamik des Apoptoseprozesses darstellen zu können.

### **3.4.7 Messung und Auswertung**

Mit Hilfe des Durchflußzytometers (FACScan, Fa. Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg) wurden die Messungen durchgeführt. Ausgestattet mit einem Argonlaser (488nm), ermöglichte das Durchflußzytometer eine Analyse der Proben nach 5 Parametern: Zellgröße, Zellgranularität, 1.-, 2.- und 3. Fluoreszenz. Verschiedene Kontrollansätze wurden bei jeder Messung angewendet: darunter kam eine Leukozytenpositivkontrolle mit dem MRC-Ox 1 Antikörper und als Negativkontrolle ein Ansatz mit dem Makrophagenmarker MRC-Ox 42 zum Einsatz. Um Kreuzreaktivität auszuschließen, wurden zwei Ansätze ausschließlich mit den Sekundärantikörpern (PE-Sekundärantikörper, Streptavidin-Tri-Color) inkubiert und gemessen; eine Eigenfluoreszenz der zu messenden Proben wurde durch einen gänzlich ungefärbten Ansatz ausgeschlossen. Ausgewertet wurde in den meisten Fällen die Lymphozytenpopulation, welche MRC-Ox 1 (CD45) positiv und gleichzeitig MRC-Ox 42 (Makrophagen) negativ war. Es wurden mindestens 6000 Zellen dieser Population

durchflußzytometrisch erfaßt. Bei speziellen Fragestellungen (NK-Zellen, apoptotische Zellen, nekrotische Zellen) wurde die gesamte Leukozytenpopulation (alle MRC-Ox 1 positive Zellen) erfaßt und ausgewertet. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit den Software Programmen PC-Lysis II (Fa. Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg) und WinMDI (Joseph Trotter). Mit Hilfe des Software-Programms Excel 97 (Fa. Microsoft) wurden die Daten aufgearbeitet und die Ergebnisse dargestellt.

### **3.5 Fotodokumentation**

Die Fotodokumentation des OP-Situs bei Organentnahmen erfolgte durch die Kamera Typ Nikon FE2 mit Zoomobjektiv 35-70 mm und Ringblitzsystem. Als Film wurde ein Kodak-Etachrom 100 verwendet.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Ermittelte Zahlenwerte, wie Gewichtsverläufe, Laborwerte und durchflußzytometrisch ermittelte Prozentwerte, wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Maximum und Minimum durch das Software-Programm Excel 97 (Fa. Microsoft) ermittelt. Ein signifikanter Unterschied verglichener Daten wurde dann postuliert, wenn der p-Wert  $< 0,05$  lag.

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Antikörper und Substanzen

Antikörper	Spezifität	Cluster	Herkunft
Ox27	MHC1-Antigen (RT-1A), BN-spezifisch	n.d.	Serotec
NDS60	MHC1-Antigen, LEW-spezifisch	n.d.	Serotec
JJ319		CD28	Serotec
MN4	MHC1-Antigen, DA-spezifisch	n.d.	Serotec
R73	$\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor	n.d.	Serotec
W3/25	T-Helfer-Zellen, Thymozyten, Makrophagen, Kupfer`sche Sternzellen	CD4	Serotec
Ox8	T-Killer-Zellen, T-Suppressor-Zellen	CD8	Serotec
Ox38	T-Helfer-Zellen, Thymozyten, Makrophagen, Kupfer`sche Sternzellen	CD4	PharMingen
341	$\beta$ -Kette	CD8	PharMingen
Ox33	B-Lymphozyten (leukocyte common antigen)	CD45RB	Serotec
10\78 (NKR P1)	NK-Zellen (NKR-P1A), T-Zellen	CD161	PharMingen
Ox22		CD45RC	PharMingen
Ox39	IL-2 Rezeptor	CD25	Serotec
ED2	Makrophagen Ratte, Kupfer`sche Sternzellen	n.d.	Serotec
Ox1	leukocyte common antigen	CD45	Serotec
Ox42	Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen	CD11	Serotec
Annexin V	Phosphatidylserin (Apoptose)	n.d.	PharMingen
binding puffer		n.d.	PharMingen
7-AAD	Nekrosemarker	n.d.	PharMingen
Strept. Tricol.		n.d.	Caltag/Medac
Donkey anti Mouse		n.d.	Dianova
Mausserum		n.d.	Serotec

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Klinische Beobachtung der Tiere

#### ➤ *Beobachtungszeitraum*

Aufgrund der Erfahrungswerte unserer Arbeitsgruppe mit der heterotopen Leber/Dünndarmtransplantation (Meyer, 1998b), unterteilten wir den zu untersuchenden Zeitraum nach orthotoper Transplantation in eine frühe Phase (Tag 3, 7, 14 und 28 p.op.) sowie eine späte Phase (Tag 150 p.op.). Da im heterotopen Modell besonders in der Frühphase eine starke zelluläre Infiltration der Leber/Dünndarmtransplantate stattfand (immunhistologisch dokumentiert; Meyer, 1998c), wollten wir diesen Zeitraum im orthotopen Modell besonders differenziert untersuchen.

#### ➤ *Immunsuppression und Überlebensraten*

Von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche ermittelten eine erforderliche Mindestdosis an FK506 von 0,5 mg/kgKG/d an Tag 0-5 p.op.(siehe Kap. 3.2.2). Diese Therapie führte zu einer Überlebensrate nach allogener Leber/Dünndarmtransplantation (BN→LEW, n = 14) von 80%, bei entsprechendem Vergleich mit einer syngenen (LEW→LEW, n = 3) Kontrollgruppe.

#### ➤ *Gewichtsverläufe*

Der zu erwartende postoperative Gewichtsverlust war in der allogenen Gruppe (BN→LEW) in etwa mit dem der syngenen Gruppe (LEW→LEW) zu vergleichen. In der allogenen Gruppe war der Gewichtsverlust lediglich um einen Zeitraum von ca. 14 Tagen verlängert. Beide Gruppen zeigten im weiteren Verlauf einen stetigen Gewichtsanstieg. Der in der Abb. 4.1 dargestellte größere prozentuale Gewichtsanstieg der allogenen Gruppe erklärt sich damit, daß die Tiere vor der Operation jünger waren als Tiere der Kontrollgruppe und ein geringeres Ausgangsgewicht aufwiesen. Am Ende des Versuchs wogen die Tiere beider Gruppe zwischen 350 und 450g.

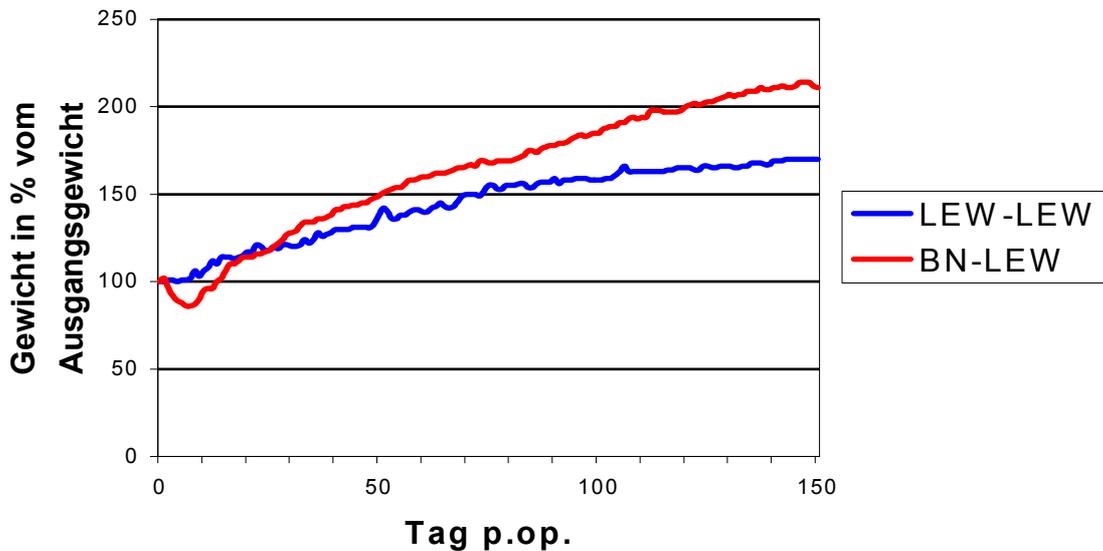


Abb. 4.1: Postoperativer Gewichtsverlauf der allogenen Gruppe (BN→LEW) und der syngenen Gruppe (LEW→LEW).

➤ *Plasmaspiegel FK506*

Um den protektiven Effekt der transplantierten Leber auf den Dünndarm unterscheiden zu können, war es wichtig den Einfluß der verabreichten Immunsuppression aufzuzeigen, um damit zwischen der reinen Organakzeptanz und der echten Organtoleranz zu unterscheiden.. Dazu bestimmten wir den Spiegel von FK506 im Plasma. Die Messungen zeigten, daß nach dem 14 p.op. Tag kein therapeutisch wirksamer Spiegel mehr vorlag (Meyer, 1998c). Somit mußte das Langzeitüberleben des allogenen Transplantates auf andere immunologische Mechanismen, und nicht auf den immunsuppressiven Effekt des FK506, zurückgeführt werden (Abb. 4.2).

➤ *Bilirubin, Ikterus, Diarrhoe*

Ein für die Leber wichtiger und geeigneter Funktionsparameter ist der Bilirubinwert im Serum. Messungen des Bilirubinwertes im Labor zeigten bei keinem der Tiere aus der allogenen Gruppe einen relevanten Anstieg über den Wert, welcher in der syngenen Gruppe ermittelt wurde. So war auch zu keinem Zeitpunkt nach der Transplantation ein deutlicher Ikterus klinisch erkennbar. Als klinischer Parameter zur Bestimmung der Dünndarmfunktion wurde besonders auf das Vorkommen von Diarrhoen bei den Tieren

nach der Transplantation geachtet. Nur bei vereinzelt Tieren kam es dabei in der ersten Woche post transplantationem zu einer vorübergehenden Diarrhoe.

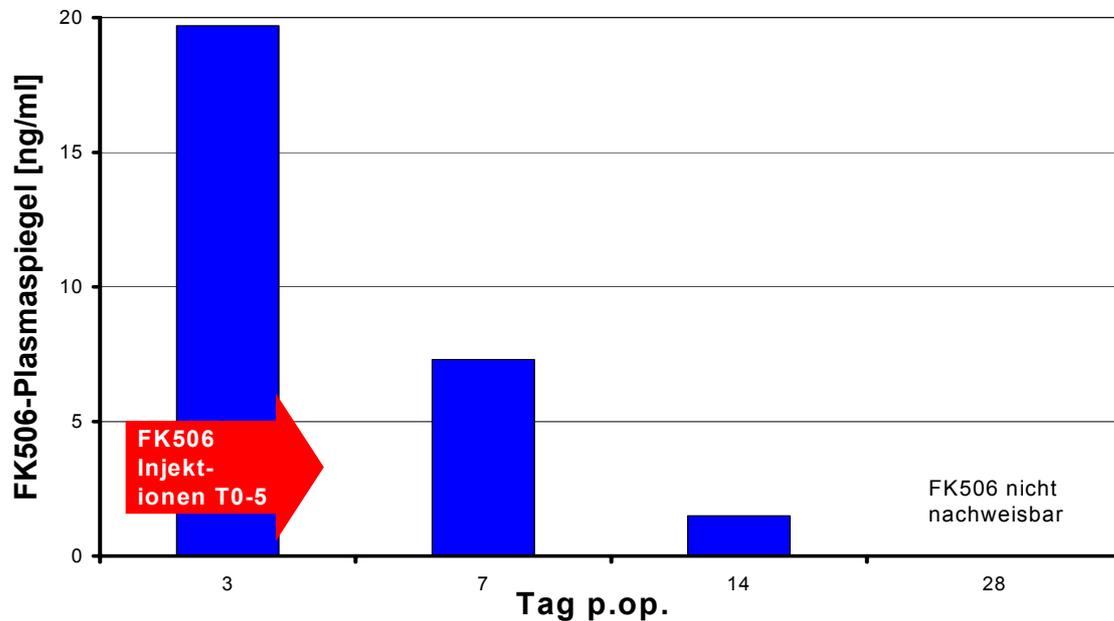


Abb. 4.2: FK506-Plasmaspiegel nach Leber/Dünndarmtransplantation.

➤ *Makroskopische Beurteilung der Transplantate*

Der Situs stellte sich zu allen Entnahmezeitpunkten unauffällig dar. Bis auf typische postoperative Verwachsungen im gesamten Abdomen vor allem an Tag 150 p.op., zeigten die Leber- und Dünndarmtransplantate ein organentsprechendes Bild, und es konnten makroskopisch keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (siehe Abb. 4.3).

## 4.2 Nachweis spenderspezifischer Toleranz

### ➤ Herztransplantation

Mit der Transplantation eines heterotopen Herzens (siehe Kap. 3.2.2), sollte die spenderspezifische Toleranz überprüft werden, welche nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation auftrat. Dazu wurde langzeitüberlebenden LEW-Tieren (n=3), welche zuvor ein Leber/Dünndarmtransplantat eines BN-Tiers erhielten, an Tag 70 p.op. ein BN-Herz implantiert (siehe Abb. 4.3). Als Kontrolle der spenderspezifischen Toleranz, wurde ebenfalls langzeitüberlebenden LEW-Tieren (n=3), ein „spenderfremdes“ DA-Herz implantiert. Nur die BN-Herzen zeigten eine regelrechte Funktion und schlugen länger als 80 Tage bzw. wurden nicht abgestoßen. Die DA-Herzen wurden am 7. bzw. 8. p.op. Tag funktionsuntüchtig bzw. der Herzschlag war nicht mehr palpabel. Histologisch konnten hier die für eine Abstoßung typischen lymphozytären Infiltrate und ausgeprägte Nekrosen des Myokards beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

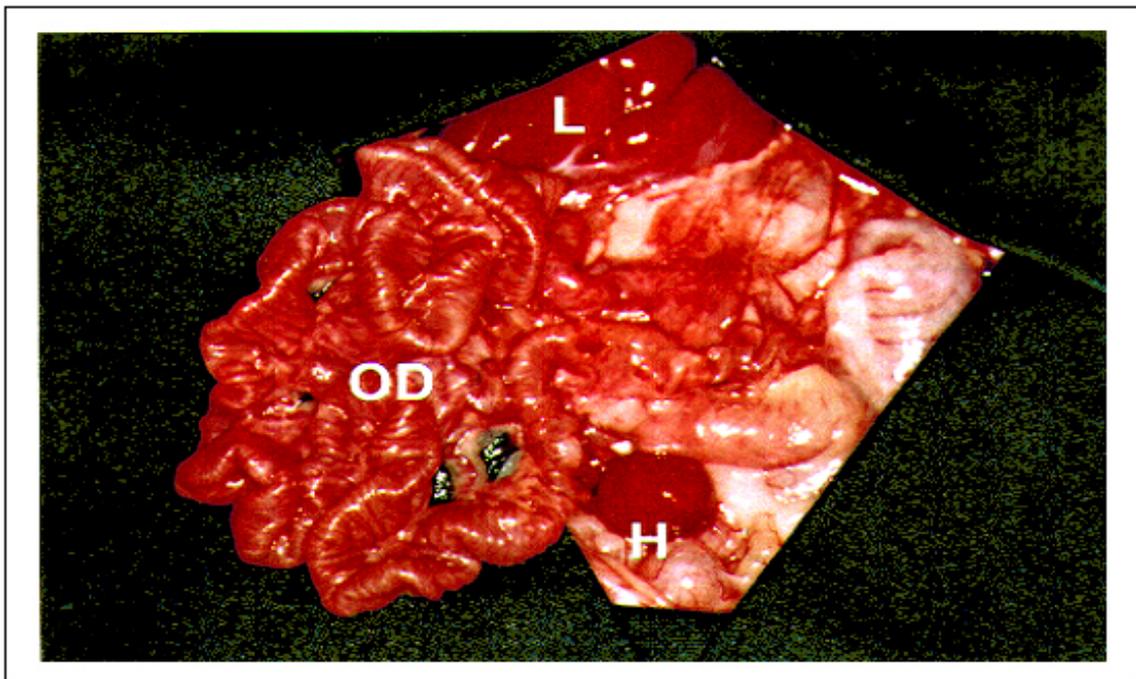


Abb. 4.3: Operationssitus einer heterotopen Herztransplantation am Tag 70 nach LDDTx (BN→LEW); (L): orthotopes Lebertransplantat, (OD): orthotopes Dünndarmtransplantat, (H): heterotopes Herztransplantat

➤ *Hauttransplantation*

Haut zeichnet sich durch eine wesentlich stärkere Immunogenität aus, und wird vom Transplantatempfänger wesentlich häufiger abgestoßen, als z.B. ein transplantiertes Herz. Ein möglicher Grund dafür ist das zahlreiche Vorkommen von immunogenen Zellen (v.a. dendritische Zellen) im Transplantat selbst. Wie bei den Herztransplantationen (s.o.) wurden wieder eine BN-Gruppe (n=3) und eine DA-Gruppe (n=3) verwendet. Jeweils an Tag 100 nach vorangegangener Leber/Dünndarmtransplantation (BN→LEW), wurde den Tieren entweder ein Hauttransplantat der BN- oder der DA-Gruppe übertragen. Auch in dieser Versuchsanordnung wurden die „spenderfremden“ Transplantate (in diesem Fall DA-Haut) abgestoßen. Die Abstoßung erfolgte durchschnittlich an Tag 8 p.op., wohingegen das Hauttransplantat der genetisch identischen BN-Tiere noch nach 80 Tagen vital war und nicht abgestoßen wurde (Abb.4.4 und Tabelle 2).

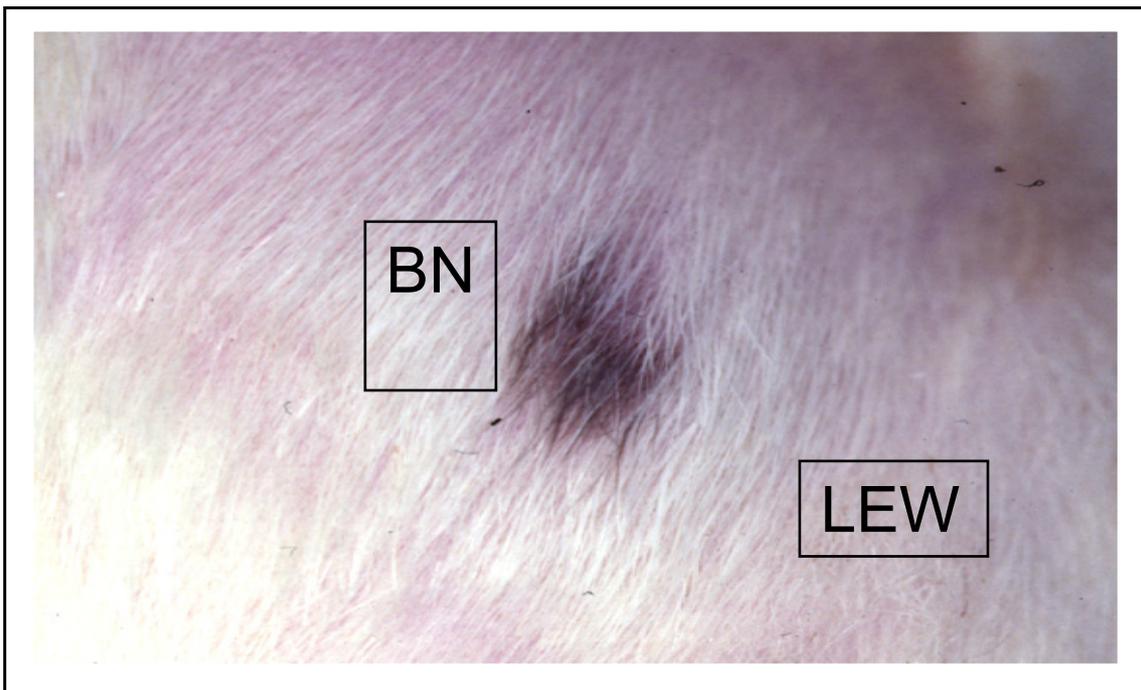


Abb. 4.4: Darstellung eines vitalen BN-Hauttransplantats, welches von einem LEW-Empfängertier nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation (Stammkombination BN→LEW) nicht abgestoßen wird.

Tabelle 2: Transplantatüberleben der an Tag 100 p.op. transplantierten Haut nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation (LDDTx).

<i>Vor-Op</i>	<i>Immunsuppression</i>	<i>Hauttransplantat</i>	<i>n</i>	<i>Transplantatüberleben</i>
<i>LDDTx</i> <i>BN→LEW</i>	0,5mg/kgKG/d Tag 0-5 p.op.	BN	3	>80 Tage
<i>LDDTx</i> <i>BN→LEW</i>	0,5mg/kgKG/d Tag 0-5 p.op.	DA	3	7/7/8 Tage

### Zusammenfassung

Wir untersuchten in unserem Versuchsaufbau eine frühe (Tag 3, 7, 14 und 28 p.op.) und späte Phase (Tag 150 p.op.) nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation. Als erforderliche Mindestdosis der Immunsuppression mit FK506 ermittelten wir 0,5 mg/kgKG/d, was zu einer Überlebensrate von 80% bei den transplantierten Tieren führte. Messungen des Plasmaspiegels von FK506 zeigten bereits nach dem 14. Tag p.op. keinen therapeutisch wirksamen Spiegel mehr. Nach einem temporären postoperativen Gewichtsverlust zeigten alle Tiere im weiteren Verlauf einen stetigen Gewichtsanstieg. Die Funktionsparameter der Leber (Bilirubin i.S. bzw. Ikterus) und des Dünndarms (Diarrhoe) waren im postoperativen Verlauf an allen Untersuchungszeitpunkten im Normbereich und ließen damit auf funktionstüchtige und vitale Leber- bzw. Dünndarmtransplantate schließen. Mit der heterotopen Herz- und Hauttransplantation konnten wir zeigen, daß im Rahmen der kombinierten Leber/Dünndarmtransplantation spenderspezifische Toleranz entsteht: trotz therapeutisch unwirksamem Spiegel des Immunsuppressivums FK506 im Plasma (Abb. 4.2), stößt ein LEW-Empfängertier weder das "fremde" BN-Leber/Dünndarmtransplantat noch das in einem zweiten Schritt übertragene „fremde“ BN-Herz- bzw. BN-Hauttransplantat ab. Wird allerdings ein vom BN-Leber/Dünndarmtransplantat genetisch differentes DA-Herz- bzw. DA-Hauttransplantat übertragen, so werden diese Transplantate innerhalb kürzester Zeit abgestoßen. Die zu dieser spezifischen Toleranz führenden immunologischen Mechanismen, galt es weiter mit der Durchflußzytometrie zu untersuchen.

### **4.3 Durchflußzytometrische Untersuchungen nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation**

Die isolierten Leukozyten aus Leber, mesenterialen Lymphknoten (MLK) und Milz wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben nach einem ausgewählten Färbeprotokoll immunzytologisch markiert (siehe Anhang). Anschließend erfolgte die Messung am FACScan<sup>®</sup>.

#### **4.3.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen in Leber, MLKs und Milz**

Für die durchflußzytometrischen Untersuchungen der Leber, MLKs und der Milz wurden durchschnittlich 70.000 – 100.000 Zellen je Einzelmessung im FACScan<sup>®</sup> aufgezogen und ausgewertet. Die Zellpopulation mit der höchsten Lymphozytendichte wurde als „Lymphozytengate“ eingegrenzt und stand in der späteren Auswertung im Mittelpunkt. Durch Voreinstellungen am FACScan<sup>®</sup> wurde die Anzahl der Zellen im Lymphozytengate auf 6000 Zellen festgelegt.

##### **4.3.1.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen des Chimärismus**

Für die Beobachtung des Chimärismus, verwendeten wir folgenden Untersuchungsansatz: mit Hilfe eines für den LEW-Stamm spezifischen Antikörpers (NDS60) und eines für den BN-Stamm spezifischen Antikörpers (Ox27), konnten die isolierten Leukozyten in spender- und empfängerspezifische Zellen differenziert werden. Von besonderem Interesse war der parallele Verlauf der spenderspezifischen Leukozyten in den untersuchten Organen Leber und MLKs (Abb. 4.5). Die Milz, die vom Empfängertier stammt, wurde von spenderspezifischen Zellen infiltriert (Abb. 4.6). Dabei zeigte sich, daß in allen Organen (Leber, MLKs und Milz) ein bis zum Tag 14 p.op. in etwa konstanter Verlauf vorlag. Lediglich ein geringes Maximum in allen Organen zeigte sich an Tag 14 p.op., und dieses lag für Leber bei 11,37%, Milz bei 14,20% und MLKs bei 21,85%. Zum Tag 28 p.op. sank dieser Wert in allen Organen signifikant ab ( $p < 0,05$ ) und betrug nur noch in der Leber 1,96%, in der Milz 1,10% und in den MLKs 2,17%. Auch am Tag 150 p.op. stieg dieser Wert nicht mehr wesentlich an

und erreichte in der Leber 2,14% und in der Milz 3,2%. Da an Tag 150 p.op. keine MLKs mehr isoliert werden konnten, liegt für diesen Zeitpunkt auch kein Meßwert vor.

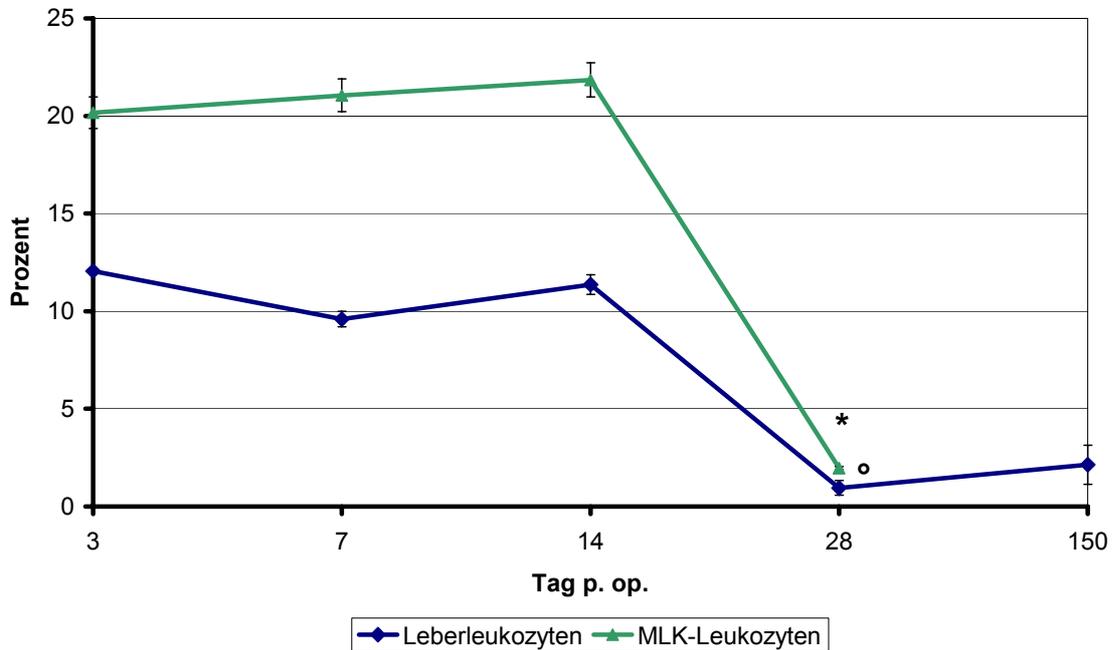


Abb. 4.5: Anteil spenderspezifischer Leukozyten (Ox27-positive Zellen) in Spenderleber und Spender-MLKs an Tag 28 p.op., n=3; \*p<0,05, °p<0,05 vs. Tag 14 p.op. .

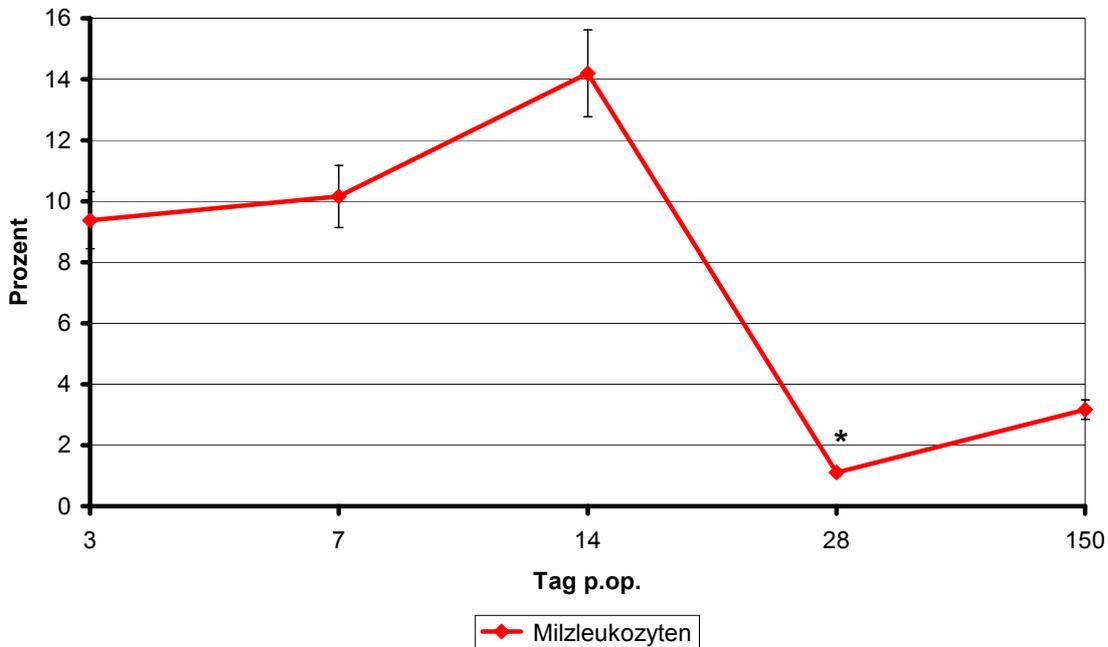


Abb. 4.6: Anteil der spenderspezifischen Leukozyten (Ox27-positive Zellen) in der Empfänger milz an Tag 28 p.op., n=3; \*p<0,05 vs. Tag 14 p.op..

Es zeigte sich, daß die Spenderzellen in Leber und MLKs im wesentlichen nur bis Tag 28 p.op. persistieren. Parallel zum Verlauf in Leber und MLKs sinkt der Anteil der spenderspezifischen Leukozyten in der Milz an Tag 28 p.op. signifikant ab (p-Wert <0,05).

#### 4.3.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen der T-Zell-Subpopulationen

Folgende Untersuchungen sollten die lymphozytären Veränderungen, welche sich in Leber, MLKs und Milz manifestieren, aufzeigen. Dabei wollten wir untersuchen, welche Subpopulationen die Organe infiltrieren.

##### ➤ Differenzierung der CD4- und CD8-Populationen

In Abb. 4.7 ist der Verlauf der CD4-positiven T-Zellen in Leber und MLKs dargestellt. So konnte gezeigt werden, daß in Leber und MLKs ein signifikantes Maximum (p-Wert <0,05) der CD4-positiven Zellen an Tag 14 p.op. erreicht wird (Leber: 54,76%; MLK: 49,13%). In der Milz zeigt der Verlauf der CD4-positiven Zellen hingegen kein Maximum an Tag 14 p.op. auf. Allerdings konnten wir einen signifikanten Abfall der

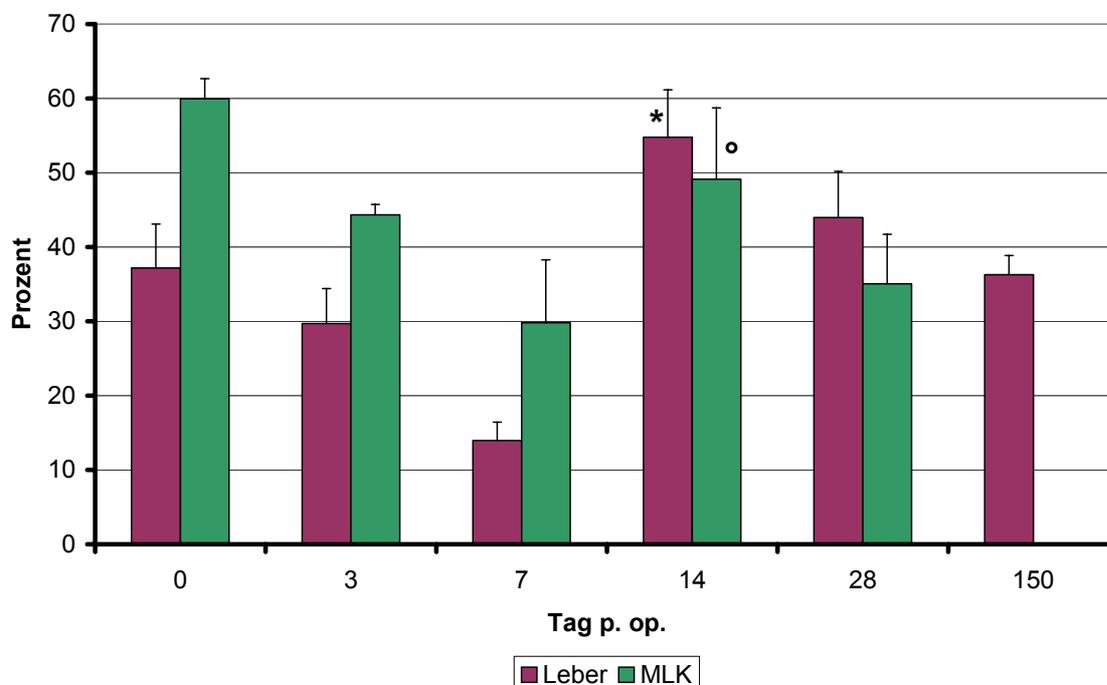


Abb. 4.7: Verlauf aller CD4-positiven T-Zellen (Spender- und Empfängerzellen) in Leber und MLKs. Das Maximum in beiden Organen liegt an Tag 14 p.op., n=3; \*p<0,05, °p<0,05 vs. Tag 7 p.op..

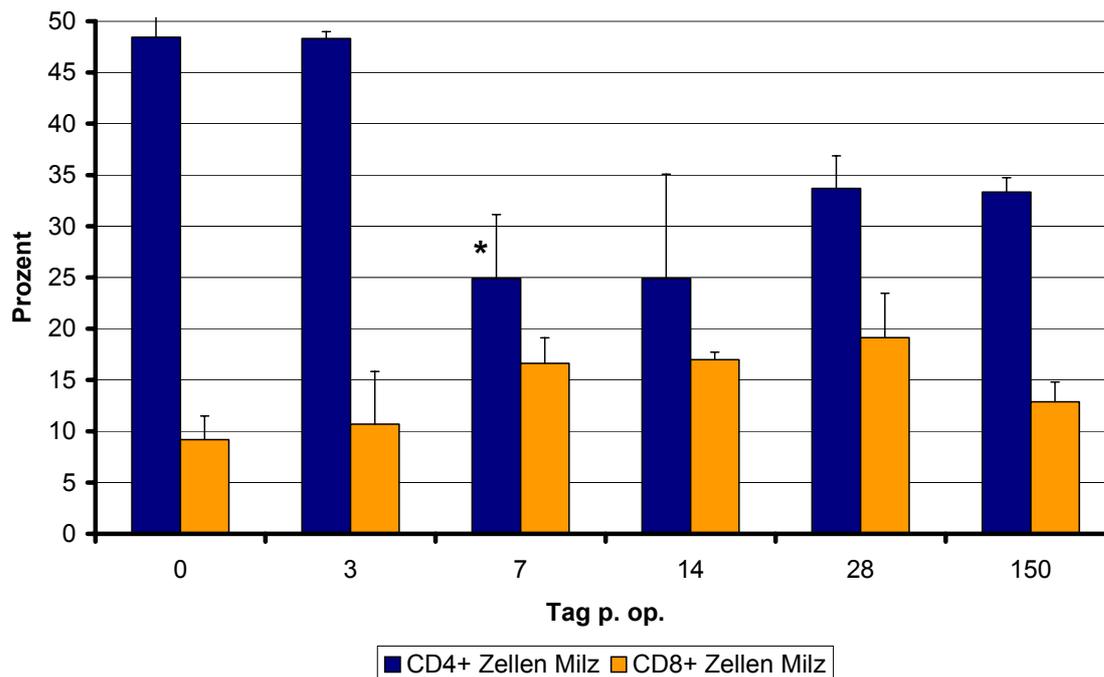


Abb. 4.8: Verlauf aller CD4- und CD8-positiven Zellen (Spender- und Empfängerzellen) in der Empfängermilz. Ein deutliches Maximum ist in der Milz für keine der genannten Zellpopulationen erkennbar. Es zeigt sich jedoch ein signifikanter Abfall der CD4-positiven Zellen an Tag 7 p.op. vs. Tag 3 p.op., \* $p < 0,05$ .

CD4-positiven Zellen an Tag 7 p.op. ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) zeigen (Abb. 4.8). Ebenfalls zeigte sich ein unterschiedlicher Verlauf der CD8-positiven T-Zellen in den Organen Leber und MLKs bzw. Milz auf der anderen Seite. So konnte gezeigt werden, daß für CD8- positive Zellen in der Leber und MLKs ein signifikanter Anstieg mit einem Maximum am selben Tag p.op. lag ( $p < 0,05$ ). Allerdings war dieses Maximum nicht wie bei den CD4-positiven T-Zellen an Tag 14 p.op., sondern an Tag 28 p.op. (Abb. 4.9). Der Mittelwert für CD8- positive Zellen an Tag 28 p.op. lag in der Leber bei 33,10%; in den MLKs bei 17,57%. Ein vergleichbarer Anstieg mit einem Maximum an Tag 28 p.op. konnte hingegen für die CD8-positiven T-Zellen in der Milz nicht gezeigt werden. Hier war der Verlauf weitgehend konstant (Abb. 4.8).

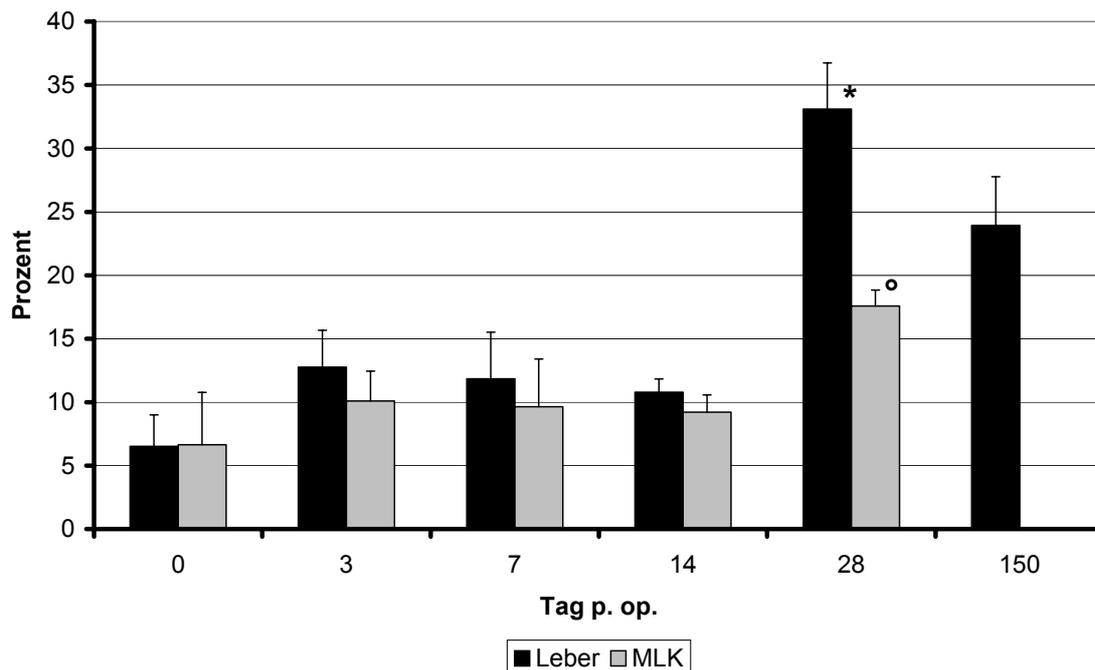


Abb. 4.9: Verlauf aller CD8-positiven T-Zellen (Spender- und Empfängerzellen) in Leber und MLKs. Das Maximum in beiden Organen liegt an Tag 28 p.op., n=3; \*p<0,05, <sup>o</sup>p<0,05 vs. Tag 14 p.op..

➤ *Differenzierung der Spender- und Empfängerlymphozyten in der Leber*

Die Untersuchung der Spender- bzw. Empfängerspezifität dieser Zellen erfolgte nur anhand der Lymphozyten der Leber. Es zeigte sich hierbei, daß es sich bei beiden Maxima fast ausschließlich um empfängerspezifische (NDS60-positive) Zellen handelt:

a.) Maximum der CD4-positiven Zellen (NDS60/Ox38) an Tag 14 p.op.: 41,70%;

p<0,05.

b.) Maximum der CD8-positiven Zellen (NDS60/341) an Tag 28 p.op.: 23,53%;

p<0,05 .

Bereits zum Tag 3 p.op. fallen die spenderspezifischen Zellen signifikant ab (p-Wert<0,05). An Tag 3 p.op. sind nur noch weniger als 7% spenderspezifische (Ox27-positive Zellen) CD4- und CD8-positive Zellen nachweisbar. Dieser Wert wird im weiteren Verlauf auch nicht überschritten und bleibt zu jedem weiteren Meßzeitpunkt unter 5% (Abb. 4.10 und Abb. 4.11).

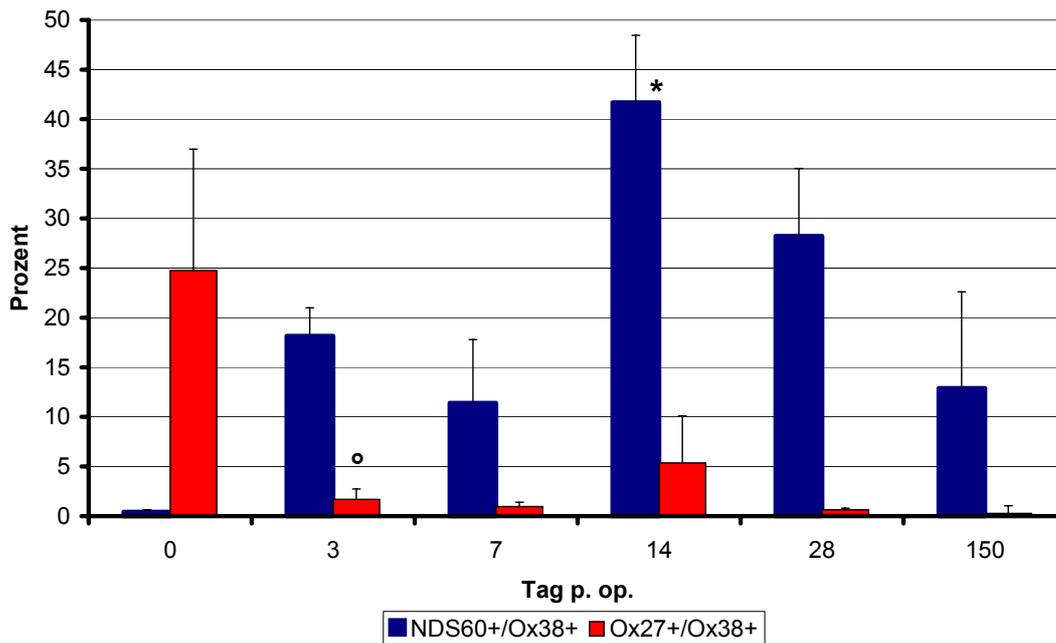


Abb. 4.10: Verlauf der spender- (Ox27+) und empfängerspezifischen (NDS 60+) CD4-positiven Zellen in der Leber, n=3; \*p<0,05 vs. Tag 0 p.op., °p<0,05 vs. Tag 0 p.op..

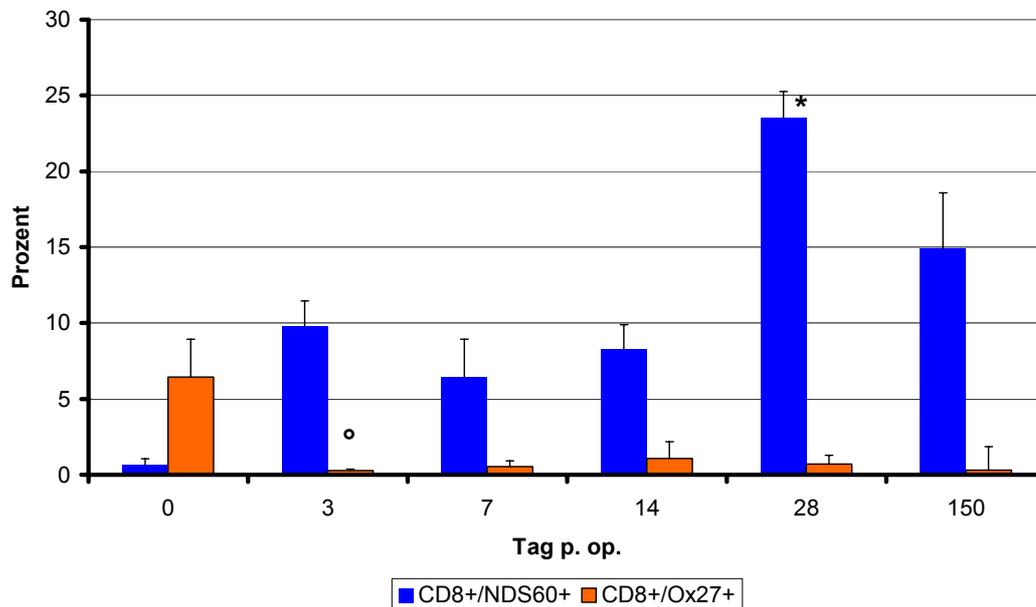


Abb. 4.11: Verlauf der spender- (Ox27+) und empfängerspezifischen (NDS 60+) CD8-positiven Zellen in der Leber, n=3; \*p<0,05 vs. Tag 0 p.op., °p<0,05 vs. Tag 0 p.op..

### 4.3.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen in der Leber

Da die Leber bei der Induktion spenderspezifischer Toleranz eine immunologische Sonderstellung einnimmt (Oliver, 1998), führten wir neben den in Kapitel 4.3.1 aufgeführten durchflußzytometrischen Untersuchungen, in diesem Organ weitergehende Analysen durch.

#### 4.3.2.1 Analyse der isolierten Leukozyten

Eine besondere Stellung im Rahmen der Toleranzinduktion haben unterschiedlichste Leukozytenpopulationen in der transplantierten Leber selbst (Oliver, 1998). Vor diesem Hintergrund analysierten wir zunächst *quantitativ* die Infiltration der Leber mit Leukozyten unabhängig davon, ob sie vom Spender oder Empfänger stammen. Es zeigte sich, daß das Maximum der Leukozyteninfiltration an den Tagen 7 und 28 p.op. lag (siehe Abb. 4.12). Der Tag 28 p.op. gilt in diesem Modell gemäß den immunhistologischen Untersuchungen als Zeitpunkt einer frühen und intensiven Auseinandersetzung des lymphatischen Systems mit dem Transplantat (Meyer, 1998c), was durch das hier gezeigte leukozytäre Infiltrat der Leber unterstützt wird.

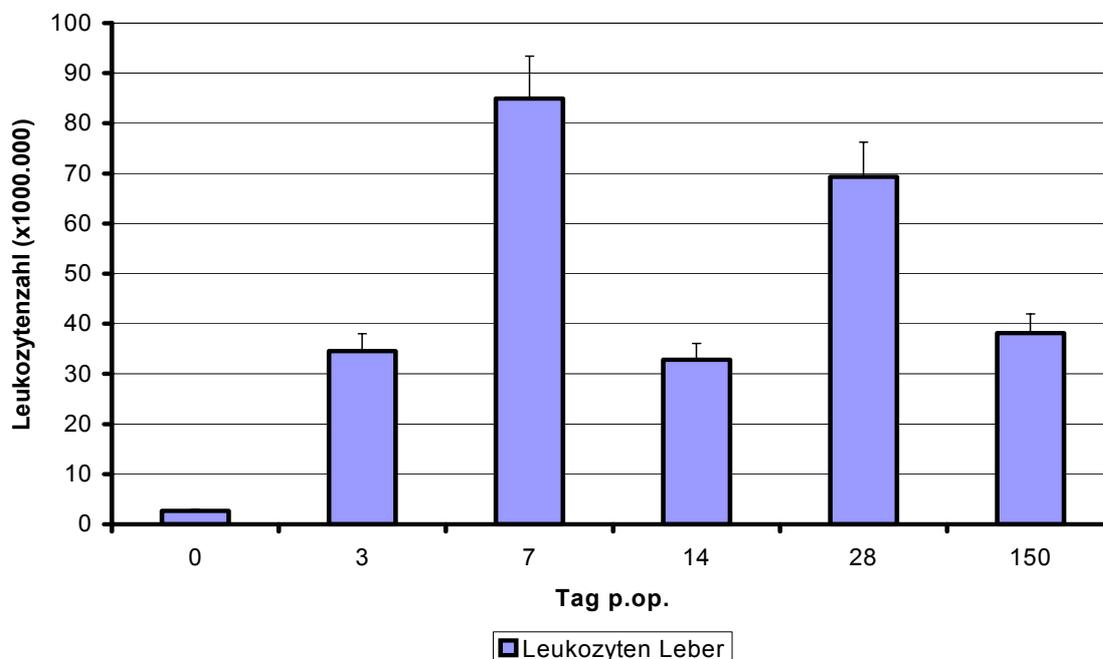


Abb. 4.12: Dargestellt ist die Infiltration der Transplantatleber mit spender- und empfangerspezifischen Leukozyten (*quantitative Analyse*).

Die *qualitative Analyse* des Leukozyteninfiltrats in der Leber zeigte, daß der überwiegende Anteil aus empfängerspezifischen Leukozyten bestand. Nur einen geringen Anteil dieses Leberinfiltrats bildeten die spenderspezifischen Leukozyten. Diese zeigten bis zum Tag 14 p.op. einen relativ konstanten Verlauf und fielen dann zum Tag 28 p.op. deutlich ab, sie waren jedoch noch bis zum Tag 150 p.op. durchflußzytometrisch nachweisbar (Abb. 4.13 und Abb. 4.5).

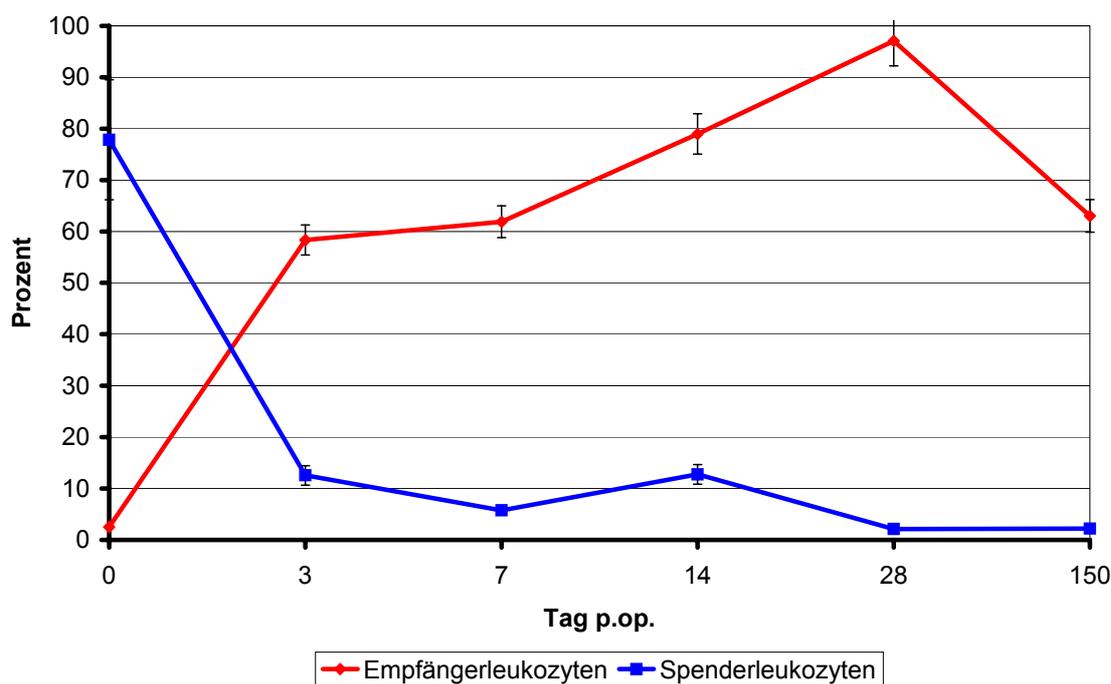


Abb. 4.13: Darstellung Infiltration der Transplantatleber durch Empfängerleukozyten und Spenderleukozyten (*qualitative Analyse*).

#### 4.3.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen der spenderspezifischen Subpopulationen in der Leber

Im nächsten Versuchsansatz griffen wir die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen durchflußzytometrischen Analysen des leukozytären Infiltrats der Leber auf. Ziel war es die nachgewiesenen Spenderleukozyten (Ox27-positive Zellen) in der Leber, welche möglicherweise in Zusammenhang mit der Induktion spenderspezifischer Toleranz stehen, mit Hilfe der Durchflußzytometrie weiter zu differenzieren und zu untersuchen. Wir differenzierten dabei CD4-positive Zellen (mAK Ox38), CD8-positive

Zellen (mAK 341) und Natürliche Killer (NK)-Zellen (mAK 1078). So konnte gezeigt werden, daß sich der größte Anteil der spenderspezifischen Zellen auch mit dem CD4-Marker färben ließ. Der Verlauf dieser doppelt positiven Zellen zeigte, daß auch diese Population ein Maximum an Tag 14 p.op. mit 7,70% hatte und ebenfalls signifikant zum Tag 28 p.op. hin abnahm (p-Wert <0,05) und nur noch einen Wert von 0,32% erreichte, (Abb. 4.14). Ein Teil der spenderspezifischen Zellen ließ sich ebenfalls mit dem CD8-Marker färben. Doch dieser Anteil lag immer weit unter den CD4/Ox27-doppelt-positiven Zellen, und er erreichte lediglich an Tag 14 p.op. ein Maximum von 1,07% (Abb. 4.14). Der Anteil der spenderspezifischen NK-Zellen lag von der Größenordnung immer zwischen den CD4- bzw. CD8-Zellen. Das Maximum der spenderspezifischen NK-Zellen lag auch an Tag 14 p.op. und betrug 2,77% (Abb. 4.14).

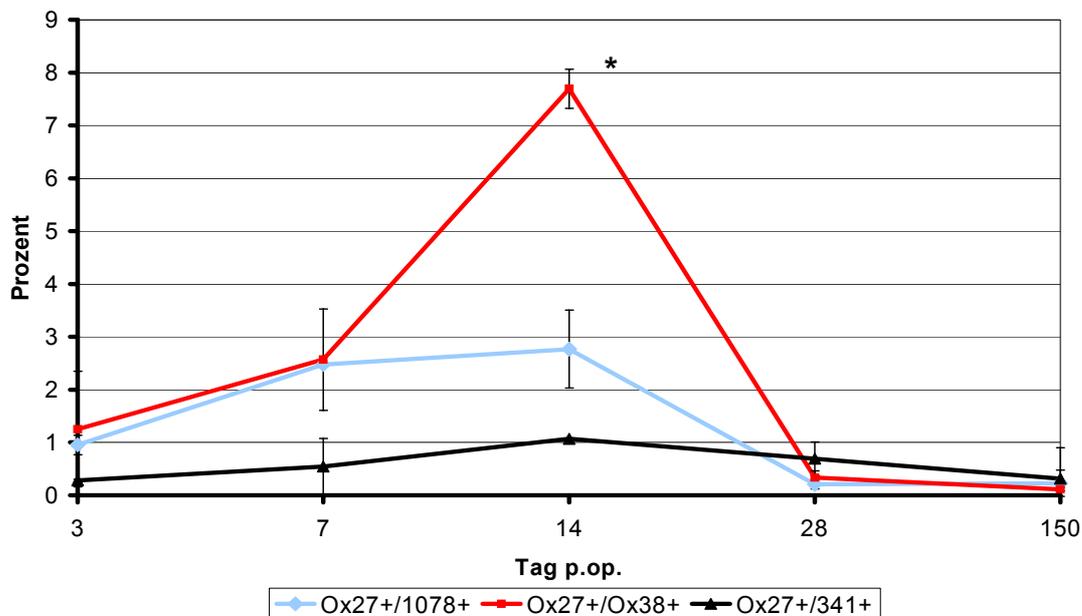


Abb. 4.14: Verlauf der Spendersubpopulationen: CD4-positive T-Lymphozyten (Ox27+/Ox38+), CD8-positive T-Lymphozyten (Ox27+/341+) und NK-Zellen (Ox27+/1078+), \*p<0,05 vs. Tag 28 p.op..

## Zusammenfassung

1. Wir konnten in allen untersuchten Organen (Transplantatleber, Transplantat-MLKs und Empfängermilz) einen Chimärismus nachweisen. Bereits zum Tag 3 p.op. fielen die spendereigenen Zellen signifikant ab. Im weiteren Verlauf war das Vorkommen dieser spendereigener Zellen jedoch bis zum Tag 14 p.op. konstant und fiel bis zum Tag 28 p.op. erneut weiter signifikant ab. Ein geringer Anteil war jedoch weiterhin an Tag 150 p.op. nachweisbar.
2. Die Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen in Leber, Milz und MLKs zeigte, daß das Maximum für CD4-positive Zellen an Tag 14 p.op. bzw. für CD8-positive Zellen an Tag 28 p.op., nur in Transplantatleber und Transplantat-MLKs lag. Ein solches Maximum konnte in der Empfängermilz für keine der beiden Lymphozytenpopulationen und zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden. Signifikant war allerdings der Abfall CD4-positiver Zellen an Tag 7 p.op. in der Empfängermilz.
3. Bei den Maxima an Tag 14 p.op. für CD4-positve Zellen und an Tag 28 p.op. für CD8-positve Zellen in der Transplantatleber, handelte es sich fast ausschließlich um empfängerspezifische Lymphozyten.
4. Die spenderspezifischen CD4- und CD8-positiven Lymphozyten aus der Leber fielen bereits zum Tag 3 p.op. signifikant ab. Sie blieben weiterhin bis Tag 150 p.op. durchflußzytomtrisch nachweisbar.
5. Die Differenzierung der spenderspezifischen Leukozyten der Leber zeigte an allen Untersuchungszeitpunkten folgende Populationen in absteigendem Mengenverhältnis: CD4-positive Zellen, NK-Zellen sowie CD8-positive Zellen.

## **4.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen der Apoptoseraten im Lebertransplantat**

Die Apoptose von Leukozytenpopulationen der Leber, wird als Mechanismus im Rahmen der spenderspezifischen Toleranzinduktion diskutiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte mit immunhistologischen Methoden den überdurchschnittlich häufigen apoptotischen Zelltod von nicht parenchymatösen Zellen in der Leber (d.h. Leberleukozyten) nach heterotoper LDDTx nachweisen (Meyer, 1998c), der in Zusammenhang mit der Induktion spenderspezifischer Toleranz zu sehen war. In den hier dargestellten Untersuchungen sollten apoptotische Vorgänge in der Leber nach orthotoper LDDTx mit durchflußzytometrischen Methoden erfaßt werden. Da besonders die genaue quantitative und qualitative Analyse zellulärer Veränderungen mit der Durchflußzytometrie möglich ist, wählten wir dieses Verfahren zur weiteren Untersuchung der genannten Phänomene aus.

### **4.4.1 Etablierung der Apoptosefärbung mit Annexin V**

Die Färbung mit Annexin V ermöglicht es, Apoptosen in einem frühen Stadium mit durchflußzytometrischen Messungen zu erfassen (Vermees, 1995). Apoptotische Zellen erscheinen in der Durchflußzytometrie Annexin V positiv, aber 7-AAD negativ; nekrotische Zellen dagegen werden Annexin V positiv und 7-AAD positiv gefärbt (Kap. 3.4.6). Mit ersten Versuchen sollte zunächst eine Methode etabliert werden, mit der eine Dreifachfärbung für durchflußzytometrische Analysen der Apoptoseraten möglich war, und mit der sich die verschiedenen Leukozytenpopulationen differenzieren ließen. Dazu wurden Leukozyten aus der Milz isoliert und anschließend in RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen. Jedem Ansatz wurde zur Apoptoseinduktion Dexamethason zugegeben, und die Zellsuspension anschließend inkubiert. Zur Kontrolle wurden bei jeder Messung ebenfalls Zellen analysiert, die nicht mit Dexamethason inkubiert wurden. Bei der durchflußzytometrischen Messung, wurde hauptsächlich jene Leukozytenpopulation (R1) berücksichtigt, welche fast ausschließlich apoptotische und nicht nekrotische Lymphozyten enthielt (siehe Abb. 4.15). Hier konnte ein signifikantes Maximum (p-Wert <0,05) der Apoptoseinduktion

an den Inkubationszeitpunkten 24 Std. (17,95%) und 48 Std. (16,73%) festgestellt werden (siehe Abb. 4.16). Die Apoptoseraten lagen zu beiden Zeitpunkten in der Kontrollgruppe unter diesen Werten ( 24 Std.: 9,53%; 48 Std.: 5,6%).

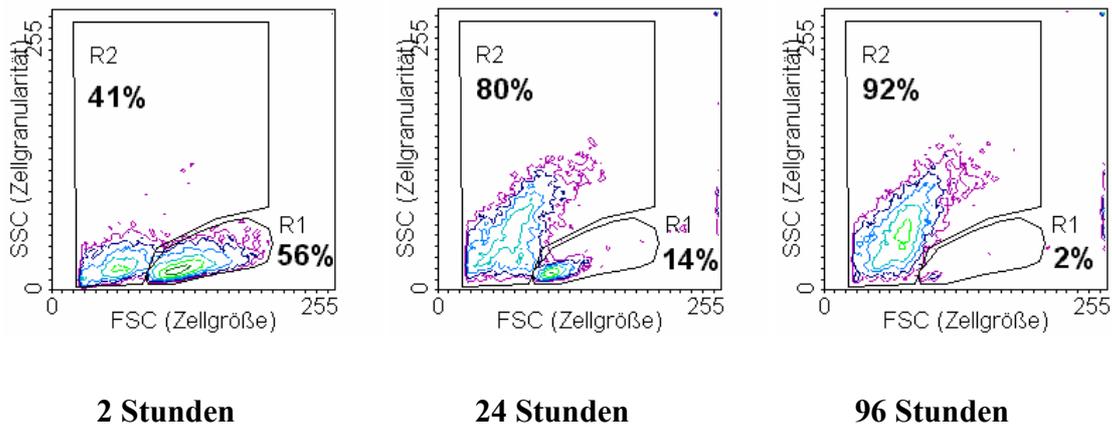


Abb. 4.15: Darstellung der Leukozytenpopulationen der Milz im Forward-/Sideward Scatter nach Inkubation mit Dexamethason für 2 Std., 24 Std. und 96 Std.. Region R1 enthält vitale und frühapoptotische Zellen; Region R2 enthält nekrotische Zellen: Dynamik des Apoptoseprozesses erfaßt mit der Durchflußzytometrie.

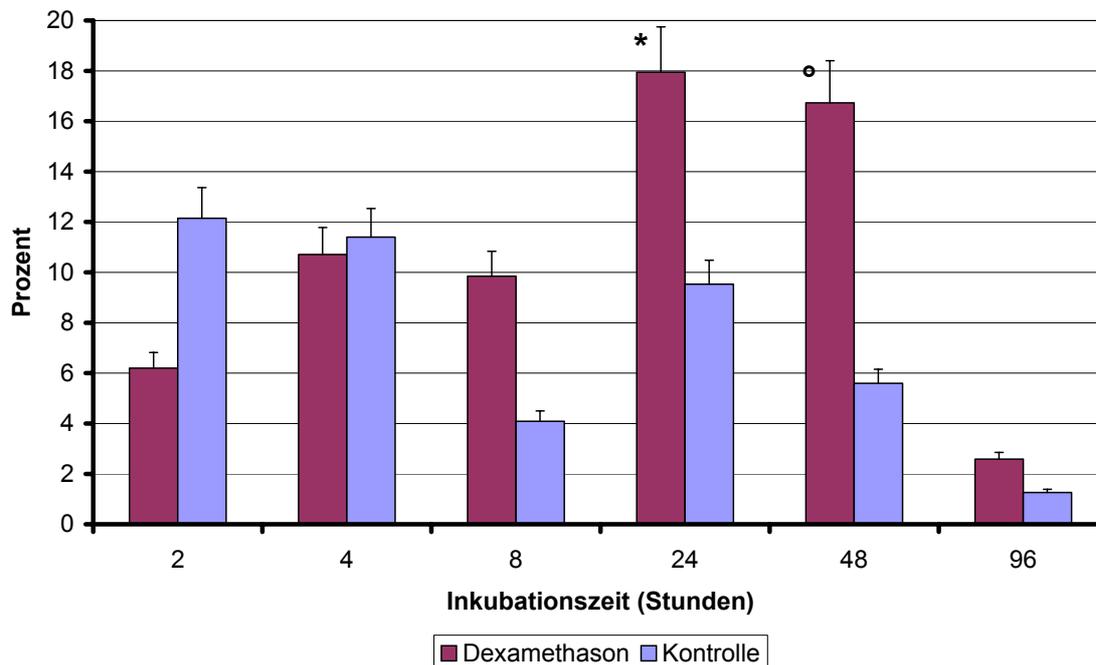


Abb. 4.16: Anteil der durch Dexamethason induzierten Apoptoseraten an unterschiedlichen Inkubationszeiten in Leukozyten der Milz, \* $p < 0,05$ ; ° $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Nach Etablierung der Apoptosefärbung mit Annexin V sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, ob die zuvor gewonnenen Erkenntnisse ebenso auf Leberleukozyten anwendbar sind. Dazu wurden die Leukozyten aus der Leber isoliert und ebenfalls mit Dexamethason in RPMI 1640 Kulturmedium unterschiedlich lang inkubiert. Als Inkubationszeitpunkte wurden diesmal gewählt: 0 Std., 3 Std., 6 Std. und 8 Std.. Die Apoptoserate der gesamten Leukozytenpopulation lag im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 8 Std. mit 35,68% signifikant am höchsten (Kontrollgruppe: 23,37%) (siehe Abb. 4.17). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß die Apoptoseraten für CD4-positive Zellen mit 7,89% und für CD8-positive Zellen mit 10,51% nach 8 Std. Inkubationszeit (graphisch nicht dargestellt) im Vergleich zur Kontrollgruppe am höchsten waren (CD4-positive Zellen in Kontrollgruppe: 6,61%; CD8-positive Zellen in Kontrollgruppe: 3,72%).

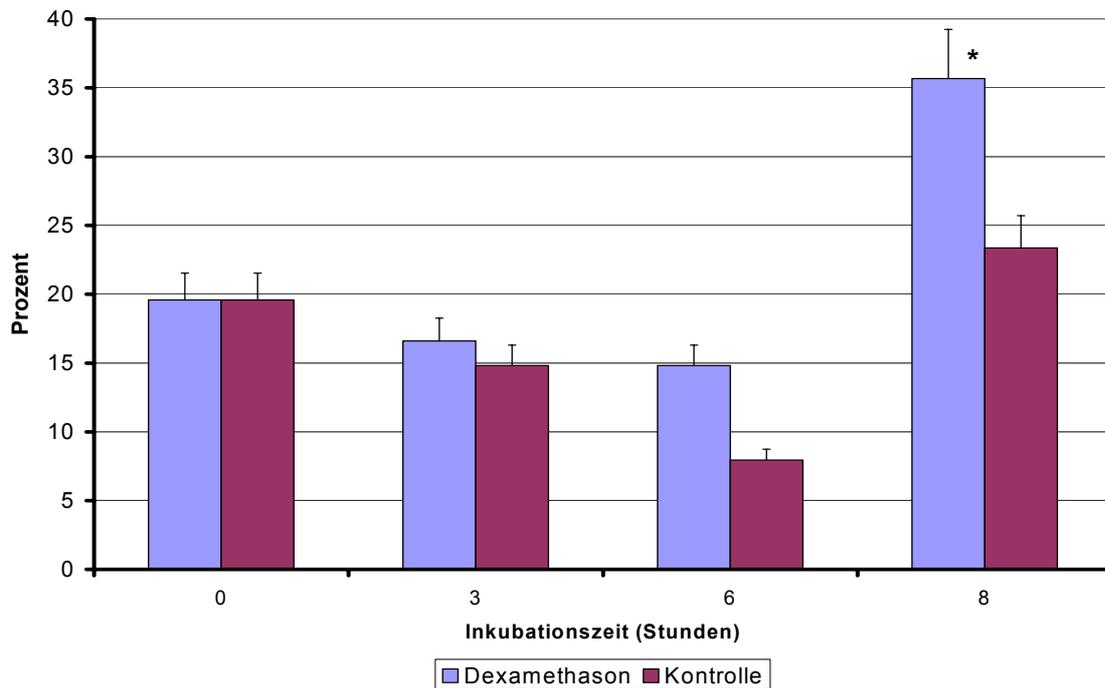


Abb.4.17: Apoptoseinduktion isolierter Leberleukozyten mit Dexamethason, n=3; \*p<0,05 vs. Kontrolle.

### Zusammenfassung

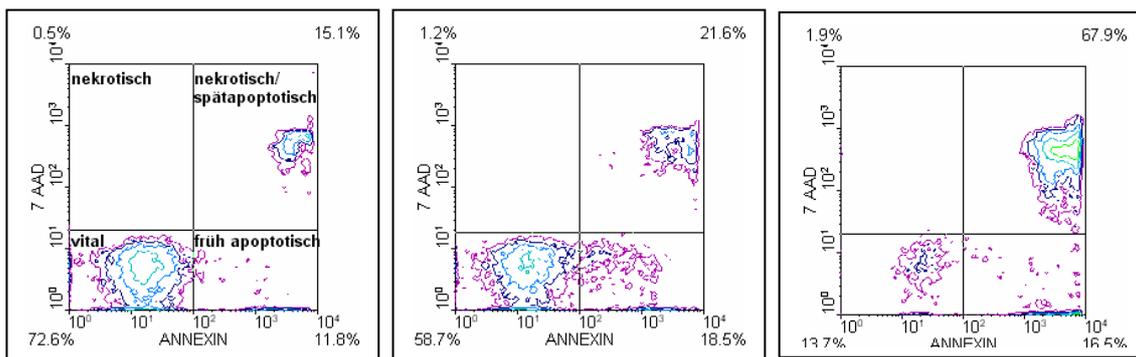
Mit unseren o.g. Versuchen konnten wir zeigen, daß mit Hilfe der Durchflußzytometrie der Anteil an apoptotischen Zellen der Leukozytenpopulationen der Leber bestimmt werden kann, und sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen möglich sind. Damit war für die Durchflußzytometrie eine Methode etabliert worden, die es uns ermöglichte auch nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation apoptotische Leukozyten der Leber zu analysieren.

#### **4.4.2 Analyse der Apoptoseraten isolierter Leberleukozyten nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation**

Die Organentnahmen fanden an Tag 28 p.op. und an Tag 150 p.op. statt. Wir wählten diese beiden Zeitpunkte für unsere Analysen, da die Ergebnisse von Meyer et al. (Meyer, 1998c) auf intensive immunologische Auseinandersetzungen mit dem Transplantat in der frühen Phase nach LDDTx hindeuteten. Dabei wurden mit immunhistochemischen Methoden an Tag 28 p.op. nach LDDTx, ein Maximum an apoptotischen Leukozyten beschrieben. Dabei korrelierte diese Rate mit der Gesamtmenge des leukozytären Infiltrats. Nach dem Tag 28 p.op. nahm die Apoptoserate wieder ab. Diese zellulären Mechanismen wurden dabei mit der spenderspezifischen Toleranzinduktion in Zusammenhang gebracht. Das beschriebene Phänomen sollte mit der Durchflußzytometrie verifiziert werden.

##### *Dynamik des Apoptoseprozesses*

Als Kontrollgruppe wurden nicht transplantierte Tiere vom Stamm Lewis herangezogen und als Standardtiere definiert. Nach Isolierung der Leberleukozyten, wurden die Zellen zunächst für unterschiedlich lange Zeitpunkte in reinem RPMI Nährmedium inkubiert. Dies erfolgte unter der Vorstellung, daß mit zunehmender Inkubationszeit auch die zu messenden Apoptoseraten ansteigen würden bzw. mit durchflußzytometrischen Untersuchungen genauer zu erfassen wären. Da keine Apoptoseinduktion mittels Dexamethason oder anderen Induktoren erfolgte, stellte die Zunahme der Apoptoseraten nach Inkubation jeweils nur den Anteil an apoptotischen Zellen dar, der ohnehin schon dem Apoptoseprozeß unterlag, aber zu einem früheren Zeitpunkt noch nicht mittels Annexinfärbung hätte detektiert werden können. Der Apoptoseprozeß isolierter Leukozyten muß als ein dynamischer Vorgang verstanden werden, bei dem folglich auch die Darstellung über die Zeit von entscheidender Bedeutung ist. Diese Dynamik kann anhand des Populationsverlaufs der Annexin V und 7-AAD gefärbten Zellen zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten veranschaulicht werden (siehe Abb. 4.15 und Abb. 4.18).



0 Std.

3 Std.

8 Std.

Abb. 4.18: Dynamik des Populationsverlaufs apoptotischer Leukozyten der Milz, dargestellt an den Inkubationszeitpunkten 0, 3 und 8 Std..

Durchflußzytometrische Messungen wurden gemäß den Erfahrungswerten aus den Vorversuchen zu den Zeitpunkten 0 Std., 3 Std. und 5 Std. durchgeführt. Allerdings zeigte sich, daß sich die Apoptoseraten bei reiner RPMI-Inkubation zu den Zeitpunkten 3 Std. und 5 Std. nicht wesentlich unterschieden. Deshalb wurden bei weiteren Messungen nur noch die Zeitpunkte 0 Std. und 3 Std. berücksichtigt.

#### *Differenzierung unterschiedlicher Leberzellpopulationen in der Durchflußzytometrie*

Stellt man die isolierten Leukozyten der Leber in der Durchflußzytometrie mittels Forward-/Sideward-Scatter dar, so lassen sich drei unterschiedliche Zellpopulationen differenzieren (siehe Abb. 4.19). Durch die Färbung mit monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität, lassen sich diese Populationen genauer charakterisieren (siehe Abb. 4.20).

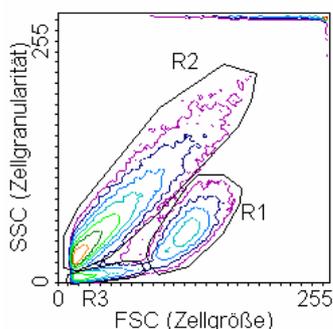
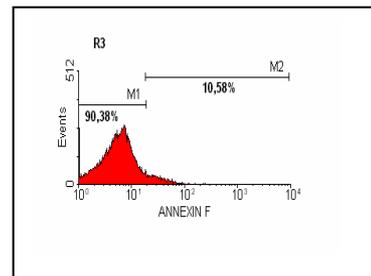
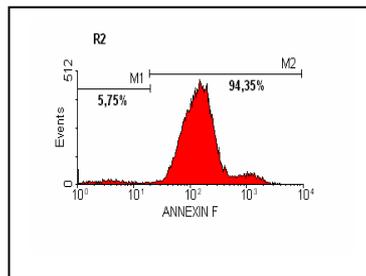
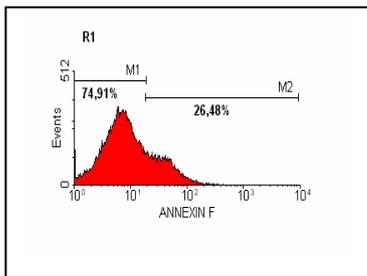
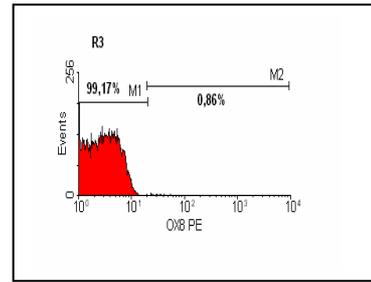
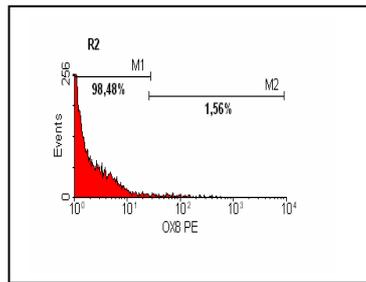
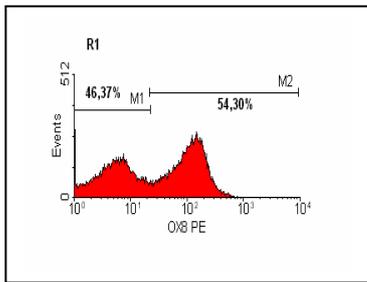
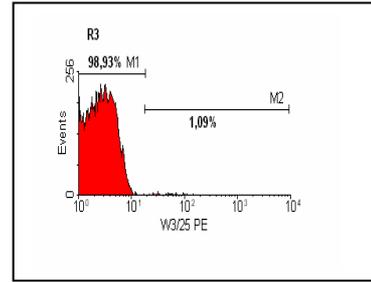
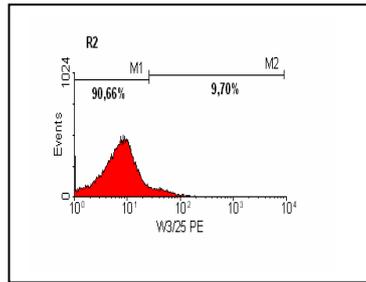
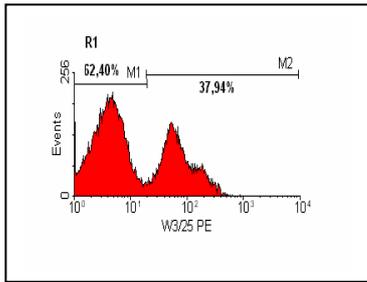
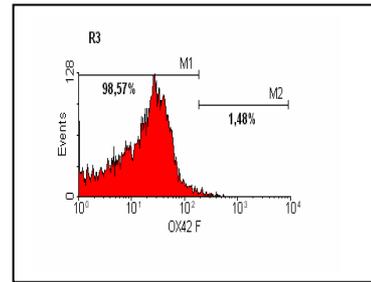
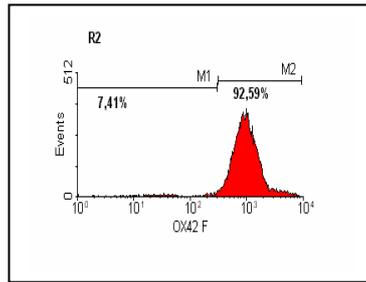
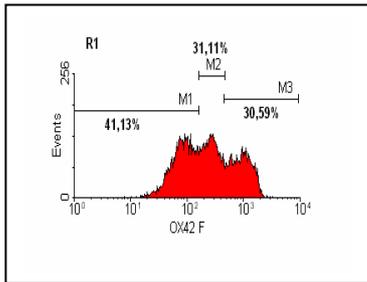
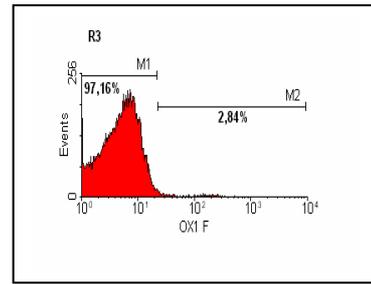
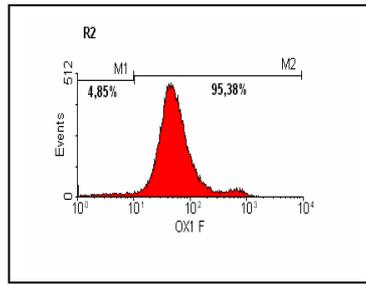
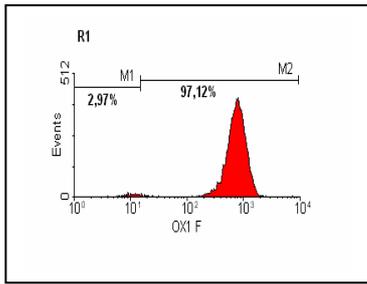


Abb.4.19: Darstellung der Zellpopulationen der Transplantatleber im Forward/Sideward-Scatter: Lymphozyten in R1, Granulozyten in R2, nicht-leukozytäre Zellen in R3.

### Region R1

### Region R2

### Region R3



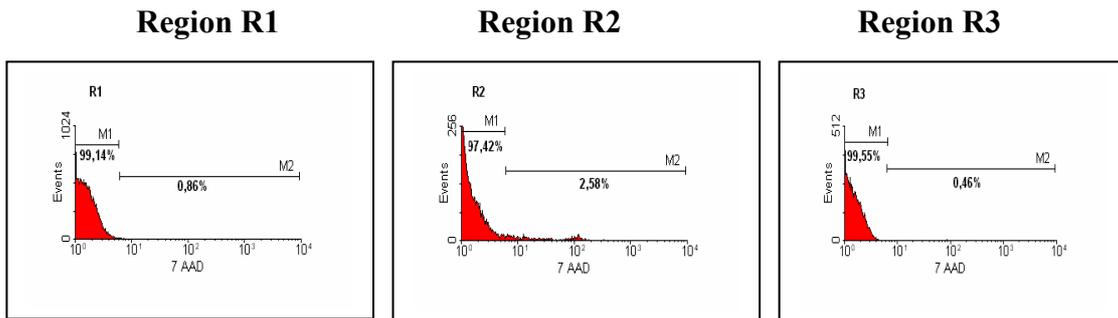


Abb. 4.20: Darstellung des Färbeverhaltens der Regionen R1, R2 und R3 in Histogrammform.

1. Zellen der Region R1 waren positiv für den Leukozytenmarker (Ox1) und ließen sich zusätzlich noch in CD4-positive (W3/25) und CD8-positive (Ox8) Zellen differenzieren. Diese Zellpopulation enthielt folglich die intrahepatischen Lymphozyten.
  
2. Region R2 war dadurch gekennzeichnet, daß sie apoptotische Zellen enthielt, die sowohl von dem Leukozyten- (Ox1-positiv) als auch von dem Granulozytenmarker (Ox42- positiv) erkannt wurden. Diese Population ließ sich aber nicht mit den Antikörpern Ox8 (CD8-positive Zellen) oder mit W3/25 (CD4-positive Zellen) markieren, so daß diese Population auf apoptotische Granulozyten deutete.
  
3. Zellen der Region R3 ließen sich mit keinem der genannten Marker färben. Wir deuteten diese Zellgruppe als nicht-leukozytäre Zellen, welche für unsere Untersuchungen ohne Bedeutung waren.

### *Apoptoserate der Lymphozyten in Region R1*

Die Zahl der apoptotischen Lymphozyten (Annexin+ und 7 AAD-) lag zu keinem der beiden Inkubationszeitpunkte über dem Wert der Standardtiere. Der Wert für apoptotische Zellen lag an Tag 28 p.op. bei 5,34% nach 0 Std. Inkubation und bei 10,89% nach 3 Std. Inkubation, was bei einem Wert von 6,3% mit 0 Std. und bei 14,02% nach 3 Std. jeweils immer unter den Standardwerten lag. Auch die Apoptoseraten der Tag 150 Tiere lagen mit 6,03% nach 0 Std. und mit 6,37% nach 3 Std. im Normbereich (Abb. 4.21). Auch die Differenzierung der apoptotischen Zellen in CD4-positive und CD8- positive Lymphozyten an Tag 28 p.op. brachte, verglichen mit den Standardtieren, keine signifikanten Unterschiede. So lagen die Werte für apoptotische CD4 positive Zellen an Tag 28 p.op. bei 2,23% (0 Std. Inkubation) und 1,72% (3 Std. Inkubation), im Vergleich zu 1,37% (0 Std. Inkubation) und 3,71% (3 Std. Inkubation) der apoptotischen CD4- positiven Zellen der Standardtiere (Abb. 4.23). Die Werte der apoptotischen CD8- positiven Lymphozyten an Tag 28 p.op. waren mit 2,02% (0 Std. Inkubation) und mit 3,64% (3 Std. Inkubation) nicht signifikant höher als die Werte der Standardtiere, welche bei 2,09% (0 Std. Inkubation) und 3,54% (3 Std. Inkubation) lagen (Abb. 4.22).

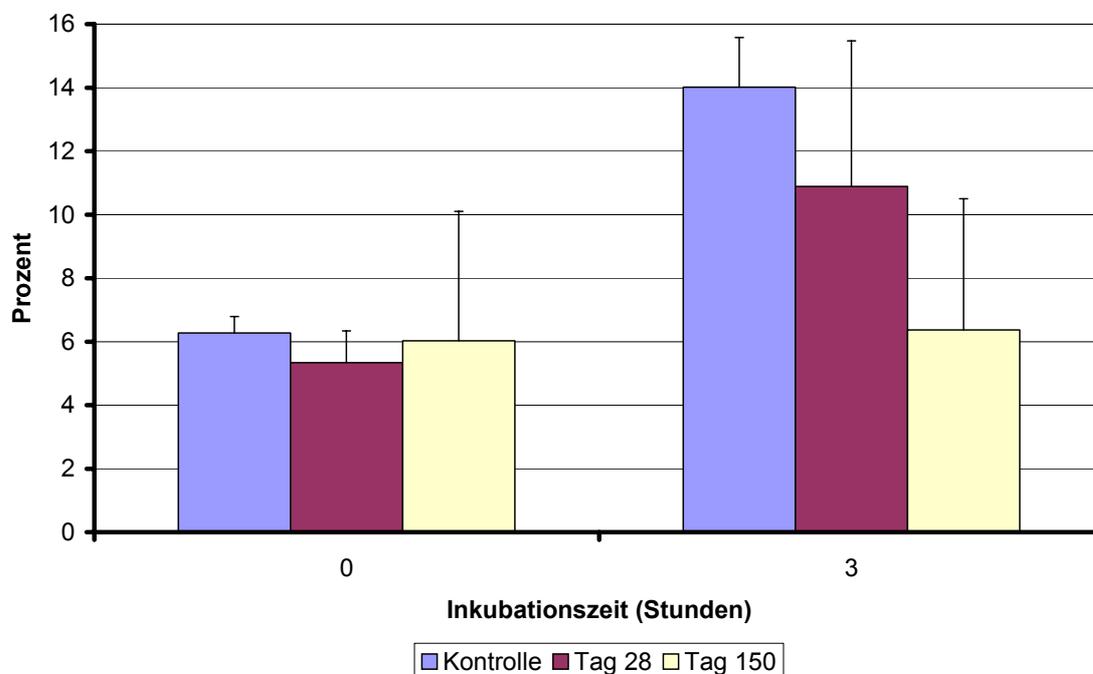


Abb. 4.21: Apoptoseraten der Leukozyten in Lebern der LEW-Tiere, Tiere T 28 und Tag 150 nach allogener Leber/Dünndarmtransplantation (BN→LEW).

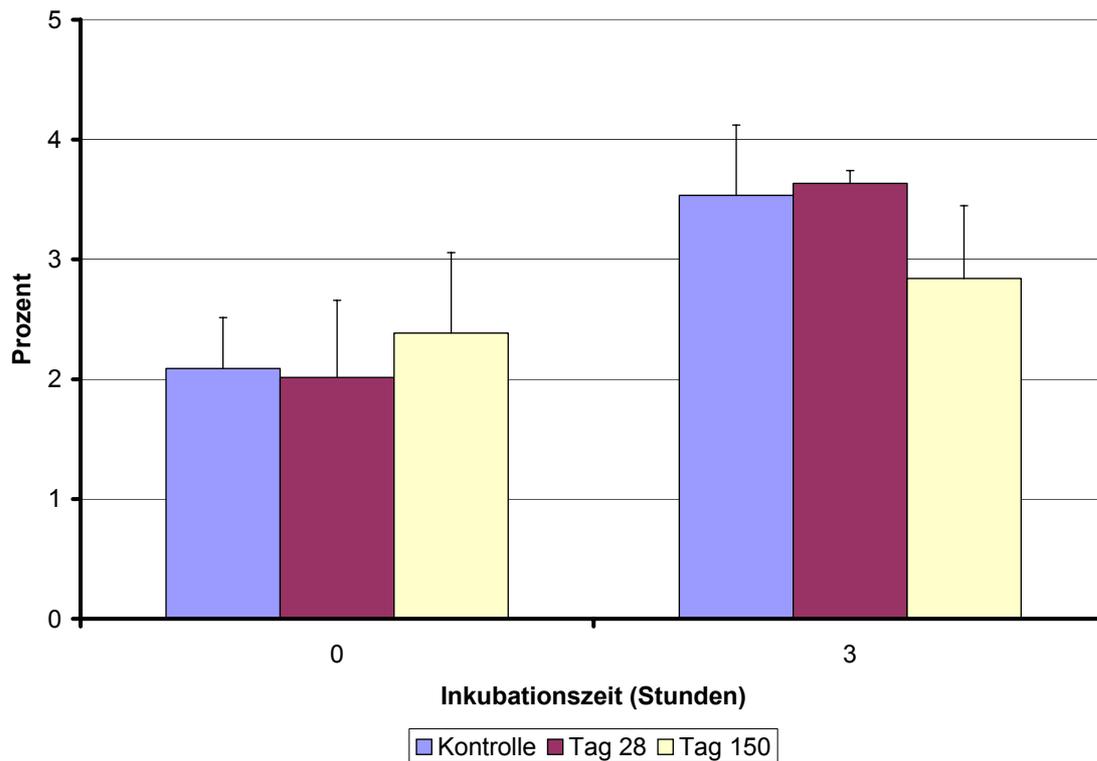


Abb. 4.22: Apoptoseraten CD8-positiver Zellen in Lebern der LEW-Tiere, Tiere T 28 und Tag 150 nach allogener Leber/Dünndarmtransplantation (BN→LEW).

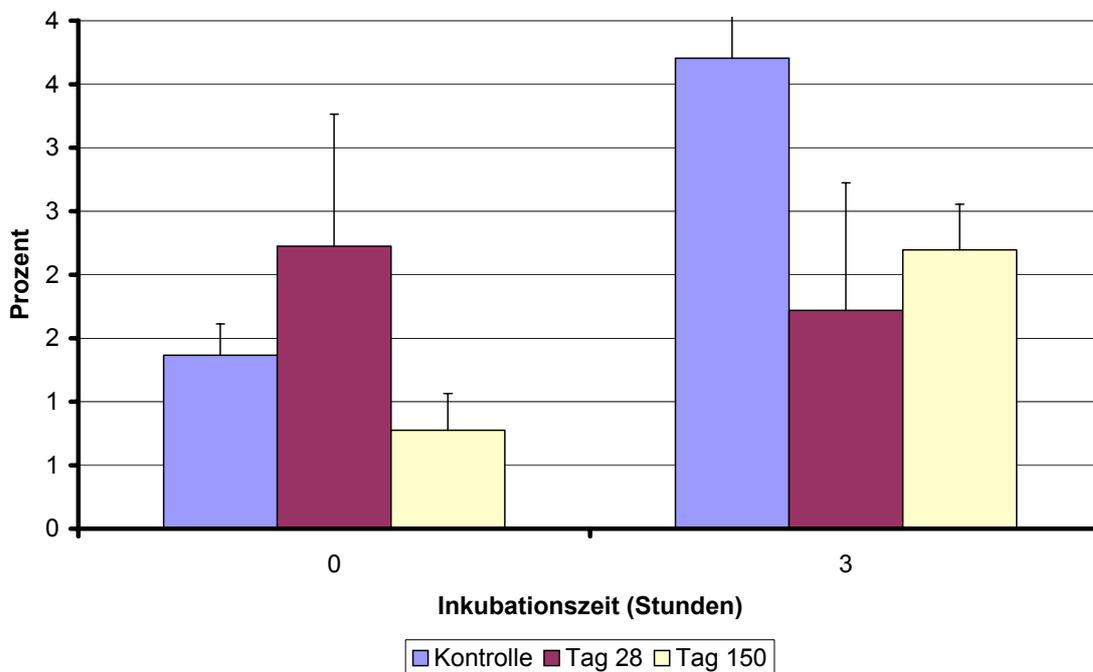


Abb. 4.23: Apoptoseraten CD4-positiver Zellen in Lebern der LEW-Tiere, Tiere T 28 und Tag 150 nach allogener Leber/Dünndarmtransplantation (BN→LEW).

### *Apoptoserate der Granulozyten in Region R2*

Die Apoptoseraten dieser Zellen waren in den Transplantatlebern, verglichen mit den Standardtieren, sowohl an Tag 28 p.op., als auch in den langfristig überlebenden Tieren, signifikant erhöht (p-Wert < 0,05). Die Apoptoseraten lagen in Region R2 an Tag 28 p.op. bei 80,30% (0 Std. Inkubation) und 92,94% (3 Std. Inkubation) im Vergleich zu 46,69% (0 Std. Inkubation) und 50,05% (3 Std. Inkubation) der Standardtiere. Auch die Werte der langfristig überlebenden Tiere waren mit 84,01% (0 Std. Inkubation) und 83,38% (3 Std. Inkubation) ähnlich hoch wie die Apoptoserate der Tiere an Tag 28 p.op. (Abb. 4.24).

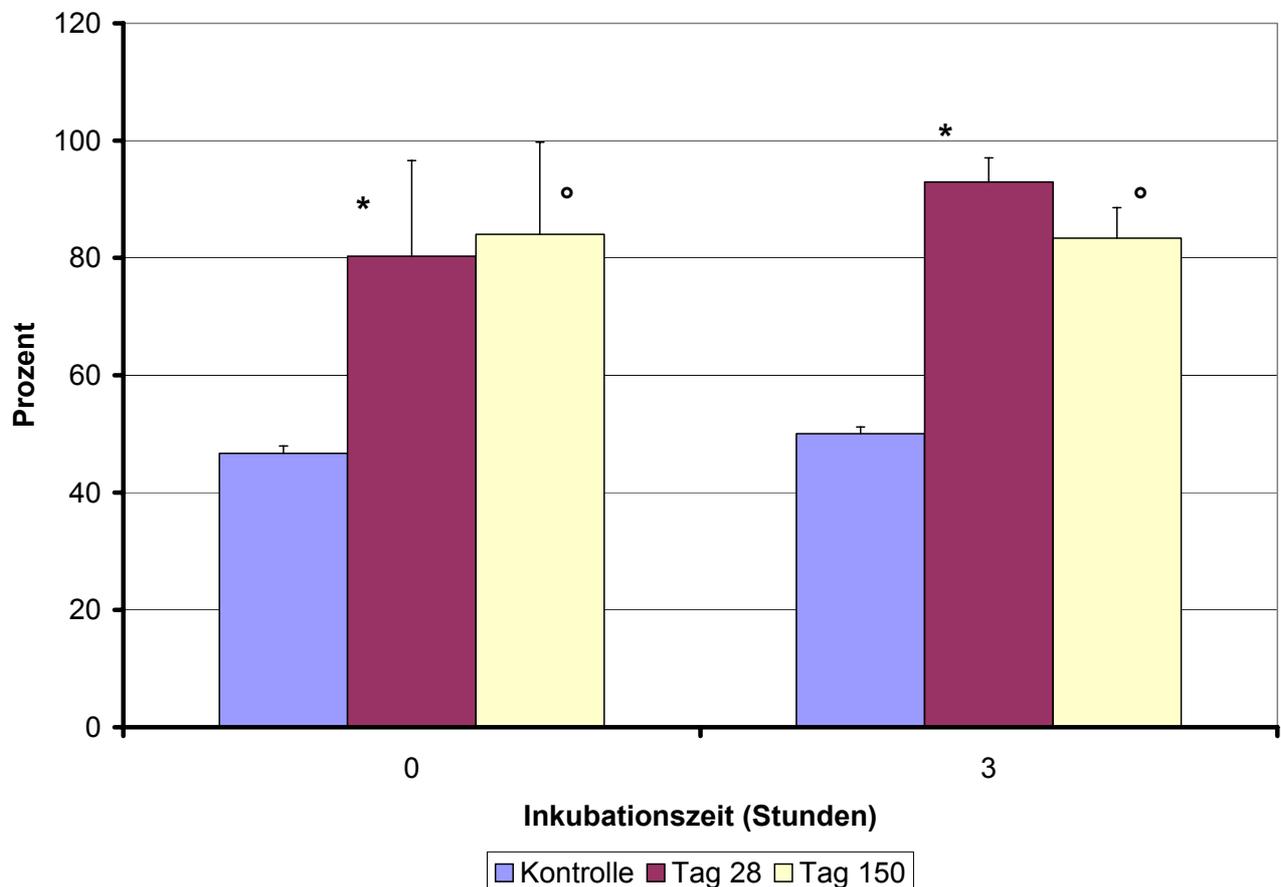


Abb. 4.24: Apoptoseraten der Granulozyten in der Region R2 zu den Inkubationszeitpunkten 0 Std. und 3 Std., \*p<0,05; °p<0,05 vs. Kontrolle.

## Zusammenfassung

1. Wir konnten mit unseren Versuchen eine Methode etablieren, mit der Apoptosen von Leukozyten durchflußzytometrisch erfaßt werden können. Dabei sind mittels Dreifachfärbungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen möglich.
2. Mit der Durchflußzytometrie ließen sich innerhalb der isolierten Leberzellen drei Zellpopulationen (Lymphozyten in R1, Granulozyten in R2, Leberparenchymzellen in R3) differenzieren.
3. Die Apoptoseraten der Lymphozyten (Region R1) waren zu keinem der Meßzeitpunkte signifikant erhöht. Das von Meyer et al. mit immunhistologischen Färbungen gezeigte Maximum der Apoptoseraten nicht parenchymatöser Zellen (v.a. CD8-positive Lymphozyten) an Tag 28 p.op. (Meyer, 1998c), konnte mit der Durchflußzytometrie, zumindest in der *Lymphozytenpopulation*, nicht gezeigt werden.
4. Signifikant erhöhte Apoptoseraten fanden sich in der *Granulozytenpopulation* (Region R2), sowohl an Tag 28 p.op. als auch an Tag 150 p.op..

## 5. Beantwortung der Fragen

1. Wird nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation ein Langzeitüberleben der allogenen transplantierten Tiere erreicht, welches auf der Induktion spenderspezifischer Toleranz basiert ?

Die Versuchstiere überlebten nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation in der Stammkombination BN→LEW im Langzeitverlauf mehr als 150 Tage. Mit der heterotopen Herztransplantation an Tag 70 p.op. und der Hauttransplantation an Tag 100 p.op. konnten wir zeigen, daß nach kombinierter orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation eine spenderspezifische Toleranz entsteht: ein LEW-Empfängertier stößt weder das "fremde" BN-Leber/Dünndarmtransplantat, noch das in einem zweiten Schritt übertragene „fremde“ BN-Herz bzw. BN-Hauttransplantat, ab. Dieser Effekt beruht dabei nachweislich nicht auf der medikamentösen Immunsuppression mit FK506, und schließt damit die reine Akzeptanz der transplantierten Organe aus. Die Transplantate eines genetisch unterschiedlichen DA-Stamms werden jedoch abgestoßen. Mit dieser Versuchsanordnung konnten wir die entstandene spenderspezifische Toleranz nachweisen.

2. Kann mit durchflußzytometrischen Methoden der zeitliche Verlauf einzelner Zellpopulationen in Leber, MLKs und Milz quantitativ erfaßt werden, und wie verhalten sich die zellulären Abläufe in den untersuchten Organen?

Mit der Durchflußzytometrie konnten wir den zeitlichen Verlauf der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen nachweisen. Ein Maximum für CD4-positive Zellen (Tag 14 p.op.) und für CD8-positive Zellen (Tag 28 p.op.) lag aber nur in Transplantatleber und Transplantat-MLKs an den gleichen Untersuchungszeitpunkten, welche sich korrespondierend auch in der Immunhistologie zeigten (Meyer, 1998c). Ein solches Maximum konnte in der Empfängermilz für keine der beiden Lymphozytenpopulationen zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden.

3. Lassen sich in den Organen Leber, MLKs und Milz mit der Durchflußzytometrie spendereigene Leukozytenpopulationen (sog. Chimärismus) nachweisen, welche mit der Toleranzentwicklung in Zusammenhang stehen?

Wir konnten in allen untersuchten Organen (Transplantatleber, Transplantat-MLKs und Empfängermilz) einen Chimärismus nachweisen, der als ein möglicher Mechanismus im Rahmen der spenderspezifischen Toleranzinduktion diskutiert wird (Starzl, 1993; Qian, 1994;). Dabei war der Verlauf spendereigener Leukozyten in Transplantatleber, Transplantat-MLKs und Empfängermilz bis zum Tag 14 p.op. konstant. Am Tag 28 p.op. fiel der Verlauf signifikant ab und erreichte am Tag 150 p.op. ein Minimum. Die Differenzierung der spendereigenen Leukozyten der Transplantatleber zeigte einen initialen Abfall der CD4-positiven Zellen bis Tag 7 p.op. (passenger leukocytes). Dagegen kam es zu einem Anstieg der empfangereigenen CD4-positiven Zellen in der Transplantatleber an Tag 14 p.op. i.S. einer Immunantwort des Empfängers. Dabei scheinen diese Helfer-Zellen für den nachfolgenden Anstieg der empfangereigenen CD8-positiven Zellen an Tag 28 p.op. verantwortlich zu sein.

4. Läßt sich mit der kombinierten Annexin V und 7-AAD Färbung eine Methode etablieren, mit der Apoptosen von Leukozyten durchflußzytometrisch erfaßt werden können?

Durch Vorversuchen wurde eine Methode etabliert, mit der die Apoptoserate von Leukozyten durchflußzytometrisch erfaßt werden konnte. Dabei sind mit Hilfe einer geeigneten Dreifachfärbung für die Durchflußzytometrie sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen bezüglich der apoptotisch gewordenen Leukozyten möglich.

5. Kann mit der o.g. Färbemethode auch die Apoptoserate von Lymphozyten der Transplantatleber quantitativ erfaßt werden und zeigen sich dabei Unterschiede in der Früh- und Spätphase nach Transplantation ? Welche

Leukozytenpopulation im Lebertransplantat weist dabei durchflußzytometrisch die höchste Apoptoserate auf?

Mit Annexin V und 7-AAD war es mit der Durchflußzytometrie möglich apoptotische Lymphozyten in der Transplantatleber nachzuweisen. Allerdings waren die Apoptoseraten der Lymphozyten an keinem der Meßzeitpunkte (Tag 28 p.op. und Tag 150 p.op.) signifikant erhöht. Das von Meyer et al. mit immunhistologischen Färbungen gezeigte Maximum der Apoptoseraten von Leukozyten an Tag 28 post transplantationem (Meyer, 1998c), konnte mit der Durchflußzytometrie, zumindest in der *Lymphozytenpopulation*, nicht gezeigt werden. Signifikant erhöhte Apoptoseraten im Lebertransplantat fanden sich in der *Granulozytenpopulation*, sowohl an Tag 28 p.op. als auch an Tag 150 p.op..

## **6. Diskussion**

### **6.1 Kombinierte orthotope Leber/Dünndarmtransplantation**

#### **6.1.1 Modellentwicklung**

Die Transplantation des hoch immunogenen Dünndarms führt beim Menschen und im Tiermodell zu Abstoßungsreaktionen, die bisher nur durch die Gabe hoher Dosen von Immunsuppressiva therapiert werden können (Goulet, 1992; Timmermann, 2000). Die Beobachtungen von Rasmussen und Wang, daß die Leber einen protektiven Effekt auf mittransplantierte Organe desselben Spenders hat, und deren Akzeptanz im Empfänger verbessert (Rasmussen, 1995; Wang, 1998), läßt sich ebenfalls auf den Dünndarm übertragen. Erste Versuche zur kombinierten Leber/Dünndarmtransplantation am Rattenmodell (Zhong, 1993) ermöglichten allerdings, aufgrund von Abstoßungsreaktionen, kein Langzeitüberleben der Versuchstiere. Erstmals konnte Meyer mit seinem Modell ein Langzeitüberleben erreichen (Meyer, 1998b), und somit die immunologischen Vorgänge nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation im Langzeitverlauf untersuchen. Besondere Bedeutung hat dieses Modell deshalb, da es sich bezüglich der Nahrungspassage sowie der arteriellen und venösen Blutversorgung vollständig am physiologischen Normalzustand orientiert (Kap.3.3.1). Damit hat dieses Modell einen nahen Bezug zur klinischen Anwendung. Denn bei entsprechenden Krankheitsbildern (v.a. Kurzdarmsyndrom in Kombination mit Leberzirrhose) stellt heute die kombinierte orthotope Leber/Dünndarmtransplantation auch beim Menschen eine mögliche Therapieoption dar (De Ville de Goyet, 2000).

#### **6.1.2 Klinischer Verlauf, Transplantatüberleben, Immunsuppression**

Den postoperativen klinischen Verlauf der Tiere und die physiologische Funktion der Transplantate, beurteilten wir anhand von objektiven Meßgrößen wie Gewicht, Bilirubin im Serum, Ikterus und Diarrhoe. Dabei waren alle Meßgrößen im Langzeitverlauf völlig unauffällig und ließen auf vitale und funktionstüchtige Transplantate schließen. In diesem von uns verwendeten Tiermodell, konnten wir mit

einer Immunsuppression von 0,5 mg/kgKG/d FK506 an den Tagen 0-5 p.op. ein 80 prozentiges Langzeitüberleben erreichen. Die Immunsuppression war im Vergleich mit der von Timmermann benötigten Medikation von 2,0 mg/kgKG/d für die Tage 0-9 p.op. (Timmermann, 2000), wesentlich geringer. Die Reduzierung der Immunsuppression bei Verwendung der gleichen Versuchsbedingungen bezüglich der orthotopen Dünndarmtransplantation, wies dabei erneut auf den protektiven Effekt des Lebertransplantates hin. Dabei konnten wir zeigen, daß nicht die Unterdrückung des gesamten Immunsystems mit Immunsuppressiva im Empfängertier zur Protektion führte: Messungen im Plasma ergaben, daß bereits ab dem Tag 14 p.op. kein therapeutisch wirksamer Spiegel von FK506 mehr vorlag.

### **6.1.3 Nachweis der spenderspezifischen Toleranz**

Die Ergebnisse von Kamada unterstützen unsere Vorstellung, daß der gezeigte protektive Effekt der Leber vielmehr auf die Induktion spenderspezifischer Toleranz zurückzuführen ist (Kamada, 1985). Dabei stellt die Toleranz einen grundlegenden Unterschied gegenüber der reinen Akzeptanz eines Transplantates dar. Toleranz ist definiert als das Fehlen einer Immunantwort gegenüber spenderspezifischen Antigenen bei normaler Immunantwort anderen Antigenen gegenüber. Die Toleranz entsteht nach Qian durch einen aktiven Prozeß, welcher auf der Konfrontation des Immunsystems im Empfänger mit dem Transplantat basiert (Qian, 1997). Demgegenüber ist die Akzeptanz gekennzeichnet durch eine generelle Unterdrückung aller Immunantworten gegenüber allen Antigenen, z.B. durch Immunsuppressiva (s.o.). Wir zeigten nun mit der heterotopen Herztransplantation an Tag 70 p.op. und Hauttransplantation an Tag 100 p.op., daß im Rahmen der kombinierten Leber/Dünndarmtransplantation eine *spenderspezifische Toleranz* entsteht: ein LEW-Empfängertier stößt weder das "fremde" BN-Leber/Dünndarmtransplantat noch das in einem zweiten Schritt übertragene „fremde“ BN-Herz- bzw. BN-Hauttransplantat ab. Wurde hingegen ein vom BN-Leber/Dünndarmtransplantat genetisch differentes DA-Herz- bzw. DA-Hauttransplantat übertragen, so wurden diese Transplantate innerhalb kürzester Zeit abgestoßen. Für die isolierte Lebertransplantation ist die spenderspezifische Toleranzentwicklung in dieser Stammkombination (BN→LEW) bekannt (Engemann, 1982). Erstmalig konnten wir aber nun auch die spenderspezifische Toleranzentwicklung für die

Transplantatkombination Leber + Dünndarm nachweisen. Damit hatten wir ein ideales Modell geschaffen, um die immunologischen Mechanismen im Rahmen der spenderspezifischen Toleranzinduktion mit der Durchflußzytometrie zu untersuchen.

## **6.2 Mechanismen der spenderspezifischen Toleranzinduktion**

### **6.2.1 Chimärismus**

Mehrere immunologische Mechanismen werden für die spenderspezifische Toleranzinduktion nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation diskutiert. Als ein wesentlicher Mechanismus wird die Persistenz spenderspezifischer Zellen im Empfänger angesehen, die dauerhaft ihre Alloantigene ( d.h. zellspezifische Oberflächenantigene) präsentieren (Starzl et al, 1993). Dieser Chimärismus, d.h. das parallele Vorkommen von Spender- und Empfängerzellen nach Organtransplantation im Empfängerorganismus, läßt zwei unterschiedliche Zeitphasen erkennen. Der Makrochimärismus bezeichnet das Vorkommen hauptsächlich von Spenderleukozyten im Blut des Empfängers für ca. 3 Wochen nach Organtransplantation. Die mit dem Transplantat übertragenen Leukozyten werden wahrscheinlich nach Ablauf dieser Zeitspanne durch alloreaktive T-Lymphozyten aus dem Blut entfernt. Dieses Phänomen betreffend, werden diese Zellen auch als „passenger leukocytes“ bezeichnet. Die zweite Phase bildet der Mikrochimärismus: noch Jahre nach Organtransplantation lassen sich in peripheren Empfängerorganen (z.B. Milz und Lymphknoten) spendereigene Zellen nachweisen. Dabei stammen diese wahrscheinlich von hämatopoetischen Stammzellen ab, welche mit dem Transplantat übertragen wurden (Sakamoto et al., 1997). Zusätzliche Bedeutung zu den beiden genannten Formen des Chimärismus, hat der sogenannte Transplantatchimärismus. Dabei kommt es zu einer Koexistenz von Spender- und Empfängerzellen im Transplantat selbst (Egawa, 1995; Oliver, 1998; Meyer, 1998c).

Mit unseren Versuchen wollten wir besonders den Mikro- und Transplantatchimärismus untersuchen. Uns gelang es mit Hilfe der Durchflußzytometrie in dem Lebertransplantat, den Spender-MLKs als auch in der Empfängermilz an allen

Untersuchungszeitpunkten spendereigene Zellen bzw. einen Chimärismus nachzuweisen. Dabei zeigten die Messungen in den Spenderorganen Leber und MLKs sowie in der Empfängermilz einen parallelen Verlauf über die Zeit: das Vorkommen der gesamten spendereigenen Leukozyten war bis zum Tag 14 p.op. konstant und fiel bis zum Tag 28 p.op. signifikant ab. Ein geringer Anteil spendereigener Leukozyten war jedoch weiterhin an Tag 150 p.op. in allen untersuchten Organen nachweisbar. Damit konnten wir zeigen, daß trotz unterschiedlicher Herkunft der Organe Leber (BN), MLKs (BN) und Milz (LEW) sich die Kinetik spendereigener Zellen in allen untersuchten Organen annähernd gleich verhält. Die Auswanderung der spendereigenen Leukozyten aus der Leber bis zum Tag 28 p.op. bestätigt dabei die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Schlitt, 1996; Tashiro, 1996). Der signifikante Abfall bzw. Austausch der „passenger leucocytes“ innerhalb der ersten 3-4 Wochen nach Transplantation als Charakteristikum des Makrochimärismus, konnte wir mit Hilfe der Durchflußzytometrie ebenfalls zeigen. Meyer konnte im weiteren Verlauf immunhistologisch nachweisen, daß der Austausch von spendereigenen Zellen in der Transplantatleber, sogenannter nicht-parenchymatöser Zellen (NPC), gegen empfangereigene Zellen allerdings unvollständig ist: Dendritische Zellen, Kupffer'sche Sternzellen und T-Lymphozyten des Spenders persistieren besonders im Leberparenchym des tolerierten Transplantates und weisen damit auf den Mikro- bzw. Transplantatchimärismus hin (Meyer, 1998c). Um diese Zellpopulationen könnte es sich damit bei den von uns mit der Durchflußzytometrie ermittelten spendereigenen Zellen in der Leber handeln (siehe auch 6.2.3). Allerdings konnten wir zum Tag 150 p.op. keinen erneuten Anstieg der spendereigenen T-Lymphozyten in der Leber (zusätzlich weder in MLKs noch Milz) aufzeigen, wie es von Klein nach alleiniger orthotoper Lebertransplantation beschrieben wurde (Klein, 2000). Das deutet darauf hin, daß die immunologischen Abläufe nach Lebertransplantation im Empfänger vermutlich vom mittransplantierten Dünndarm wesentlich beeinflußt werden. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, daß spendereigener Zellen nicht nur in der Transplantatleber und den Transplantat-MLKs dauerhaft nachweisbar sind, sondern auch in der Empfängermilz. Zusätzlich scheint sich der Verlauf spendereigener Leukozyten in Spender- und Empfängerorganen vermutlich nicht wesentlich zu unterscheiden.

Die Persistenz spendereigener Zellen im Empfänger scheint damit nicht nur auf die Transplantatleber und Transplantat-MLKs reduziert zu sein, sondern ist durchflußzytometrisch auch in dem peripheren lymphatischen Empfängerorgan Milz nachweisbar. Dies sehen wir als erneuten Hinweis darauf, daß die Analyse der spenderspezifischen Toleranzinduktion in der Leber nicht nur auf Vorgänge im Transplantat selbst beschränkt werden darf. Inwieweit allerdings der beschriebene Verlauf spendereigener Zellen in Leber, MLKs und Milz eine Reaktion auf den veränderten Immunstatus im Empfänger ist oder diesen aktiv beeinflußt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht endgültig entschieden werden.

### **6.2.2 Rolle der T-Zellen in Leber, Milz und MLKs**

Die Induktion spenderspezifischer Toleranz wird von Qian als ein aktiver „Lernprozeß“ beschrieben. Dabei spielt sich vor der Toleranzentwicklung, durch die Konfrontation des Empfänger-Immunsystems mit dem Transplantat, eine passagere Abstoßungsreaktion ab, die einen wesentlichen Zusammenhang mit der Toleranzinduktion zu haben scheint (Qian, 1997). Meyer et al. konnten auch in ihrem Modell der kombinierten Leber/Dünndarmtransplantation zeigen, daß diese passagere Abstoßung zu beobachten ist. Allerdings findet sie wesentlich weniger heftig und im postoperativen Verlauf später statt, als nach alleiniger Lebertransplantation oder heterotoper Leber/Dünndarmtransplantation ohne Immunsuppression (Meyer, 1998c). Speziell den T-Lymphozyten fällt im Rahmen der Abstoßung eine zentrale Bedeutung zu. Han et al. konnte mit T-Zell-defizienten Knock-out Mäusen zeigen, daß ohne T-Zellpopulationen keine Abstoßungsreaktionen nach Allotransplantation statt finden (Han, 2000). Die von uns durchgeführten Analysen der T-Zell-Subpopulationen in Leber, Milz und MLKs zeigten, daß das Maximum CD4-positiver Zellen an Tag 14 p.op., für CD8-positive Zellen an Tag 28 p.op., allerdings nur in Leber und MLKs, lag. Ein solches Maximum konnte in der Milz für keine der beiden Lymphozytenpopulationen und zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden. Darin spiegelt sich erneut die unterschiedliche Herkunft der Milz (LEW) gegenüber den transplantierten Organen Leber und MLKs (BN) wieder: die Transplantatleber des BN-Tieres wird passager vom Empfängertier (LEW) abgestoßen. Diese passageren Abstoßungsreaktionen konnten wir mit der Durchflußzytometrie aber erwartungsgemäß

nicht im Empfängerorgan Milz (LEW) nachweisen. Die weitere durchflußzytometrische Differenzierung der Maxima an Tag 14 p.op. für CD4-positve Zellen und an Tag 28 p.op. für CD8-positve Zellen in der Leber ergab, daß es sich fast ausschließlich um empfängerspezifische Lymphozyten handelt. Damit bestätigt die Durchflußzytometrie die Ergebnisse der Immunhistologie, welche im Rahmen der passageren Abstoßung in der Frühphase nach kombinierter Leber/Dünndarmtransplantation eine deutliche Leukozyteninfiltration in der Leber nachweisen konnte (Meyer, 1998c). Bei diesem Infiltrat handelt es sich demzufolge zum größten Teil um empfängerspezifische T-Lymphozyten, wobei das Infiltrat zunächst an Tag 14 p.op. vordringlich von CD4-positiven Zellen, an Tag 28 p.op. von CD8-positiven Zellen, geprägt ist. Diese Beobachtungen entsprechen dem bekannten Regelkreis, daß im Rahmen einer Abstoßung zunächst „antigenpräsentierende Zellen“ (APC) die Alloantigene des Spenders erkennen und diese in die T-Zellregion der regionären Lymphknoten transportieren. Durch den Kontakt mit dem Alloantigen (und weiterer hier nicht genannter Costimulatoren) werden zunächst die CD4-positiven Helferzellen aktiviert. In einem zweiten Schritt führen diese wiederum u.a. über eine Sekretion von Interleukin 2 zur Aktivierung und Vermehrung des spezifischen CD8-positiven Zellklons (Abbas, 1997). Zusätzlich korreliert nach McCaughan et al. der Verlauf der CD8-positiven Zellen mit dem Grad der Abstoßung im Lebertransplantat (McCaughan et al., 1990). Am Verhältnis der CD4- zu CD8- positiven Lymphozyten läßt sich danach der Verlauf einer Abstoßung ablesen. Qian und Meyer beschreiben mit Blick auf die Toleranzentwicklung eine rückläufige Aktivität von CD8-positiven Lymphozyten im Lebertransplantat (Qian et al., 1997; Meyer, 1998c). Diese beiden Aussagen bestätigen unsere Beobachtungen: der Abfall der CD8-positiven Lymphozyten nach dem Tag 28 p.op. in Leber und MLKs beendet die passagere Abstoßung - weist damit vermutlich auf die „erlernte“ spenderspezifische Toleranz hin.

### **6.2.3 Bedeutung der Leukozyten in der Leber**

Der immunhistologische Nachweis einer aktiven Auseinandersetzung des Empfängers mit dem Transplantat nach orthotoper Leber/Dünndarmtransplantation, ergab in der Leber das für Abstoßungsreaktionen typische morphologische Bild: ein Leukozyteninfiltrat (hpts. T-Lymphozyten), sowie eine erhöhte Apoptoserate

parenchymaler Zellen, wobei beide Parameter an Tag 28 p.op. ihr Maximum hatten (Thorwarth, 2001). Wir konnten mit Hilfe der Durchflußzytometrie ebenfalls Hinweise für diese beschriebenen Phänomene in der Leber finden: die quantitative Analyse des Leukozyteninfiltrats der Leber zeigte ein Maximum an Tag 7 und 28 p.op.. Dabei bestand der überwiegende Anteil dieser Zellen zu beiden Zeitpunkten aus empfangerspezifischen Leukozyten (6.2.2). Die spenderspezifischen CD4- und CD8-positiven Lymphozyten der Leber fielen bereits zum Tag 3 p.op. signifikant ab und zeigten am Tag 14 p.op. nur einen minimalen Anstieg bevor sie am Tag 28 p.op. erneut auswanderten. Sie blieben jedoch weiterhin auf geringem Niveau bis Tag 150 p.op. i.S. des Transplantatchimärismus nachweisbar.

#### **6.2.4 Apoptose**

Die Apoptose, oft synonym verwendet mit dem Begriff „programmierter Zelltod“, spielt in vielen physiologischen Situationen zur Aufrechterhaltung einer Homöostase eine wichtige Rolle. Beispielhaft seien an dieser Stelle die Elimination von Zellen während der Embryogenese, die Involution von hormonsensitiven Zellen nach Hormonentzug und der spezifische Untergang unreifer Lymphozyten während der Entwicklung der Selbsttoleranz des Immunsystems genannt. Im Gegensatz zur Nekrose, als Beispiel eines weiteren Zelluntergangmechanismus, ist die Apoptose nicht von einer Entzündungsreaktion begleitet. Dabei gibt es mehrere Modelle, die den Apoptosemechanismus erklären. Im Rahmen der Transplantationsimmunologie hat dabei das Modell der FAS/FAS-Ligand vermittelten Apoptose eine besondere Stellung. Bei FAS/FAS-Ligand (CD95/CD95L) handelt es sich um einen Protein-Rezeptor-Komplex aus der Tumor-Nekrose-Faktor Genfamilie. Bindet ein FAS-Ligand an einen auf der Zelloberfläche exprimierten FAS-Rezeptor, so wird in der Zelle eine Enzymkaskade aktiviert, die letztendlich zur Degradation von Nukleoproteinen im Zellkern führt – und damit zum Zelltod (Abbas, 1997).

Die Apoptose wird darüber hinaus als ein weiterer Mechanismus im Rahmen der spenderspezifischen Toleranzinduktion in der Leber diskutiert (Kamada, 1985; Qian, 1997; Oliver 1998). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, daß besonders die Apoptose von CD8-positiven Zellen in der Leber eine entscheidende Rolle spielen

könnte (Huang, 1994; Crispe, 1996; Meyer, 1998a; Crispe, 2000). Wir konnten zunächst mit Vorversuchen eine Methode etablieren, mit der Apoptosen von Leukozyten mit Hilfe einer Dreifachfärbung durchflußzytometrisch erfaßt werden können. Da der Apoptosevorgang als dynamischer Ablauf zu sehen ist, ermöglicht unsere Methode zusätzlich eine Betrachtung der Apoptoseraten in einem gewissen „Zeitfenster“: beginnend bei frühapoptotischen Zellen, über apoptotische Zellen und schließlich endend bei spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen können alle Apoptosestadien erfaßt werden. Damit ist die Aussagekraft der Durchflußzytometrie um wesentliche Punkte erweitert - verglichen mit dem rein „statischen Blick“, den die Immunhistologie (TUNEL-Technik) nur gewährt. Da die Immunhistologie die Dynamik des Apoptoseablaufes nicht erfassen kann, lassen sich Aussagen beider Methoden allerdings nur schwer vergleichen. Der Vorteil der Immunhistologie ist auf der anderen Seite die Analyse des Apoptoseprozesses im Zellverband. Damit gelingt eine lokale Zuordnung der zu untersuchenden Zellabläufe zur umgebenden anatomischen Organstruktur. Diese „räumliche“ Orientierung trägt zum Verständnis der komplexen Mechanismen entscheidend bei. Da in der Durchflußzytometrie eine Zellsuspension analysiert wird, sind mit diesem Verfahren diesbezüglich keinerlei Aussagen möglich. Für die Fluoreszenzdetektion des FACS-Geräts ist dabei eine Mindestanzahl an fluoreszierenden Signalen (d.h. antikörpermarkierte Zellen) nötig. Unter diesem Schwellenwert (in unserem Versuchsaufbau  $10^5$  Zellen/ $\mu$ l) sind Aussagen bezüglich der untersuchten Zellpopulationen nur eingeschränkt möglich. Die Immunhistologie scheint dabei das sensitivere Verfahren zu sein. Beide Untersuchungsmethoden eröffnen somit die Möglichkeit sich gegenseitig zu ergänzen.

Mit der Durchflußzytometrie ließen sich innerhalb der isolierten Zellen des Lebertransplantates drei Zellpopulationen differenzieren. Innerhalb der Lymphozytenpopulation lagen die Apoptoseraten der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten zu keinem der Meßzeitpunkte signifikant über dem Standardniveau. Das von Meyer et al. mit der TUNEL-Technik gezeigte Maximum der Apoptoseraten nicht-parenchymatöser Zellen (besonders der CD8-positiven Lymphozyten) an Tag 28 p.op. (Meyer, 1998c), konnte mit der Durchflußzytometrie, zumindest in der *Lymphozytenpopulation*, nicht gezeigt werden. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Durchflußzytometrie und der Immunhistologie, kann auf die bereits

o.g. unterschiedlichen Analyseverfahren zurückgeführt werden. Es scheint wahrscheinlich, daß wir mit der Durchflußzytometrie nicht das korrelierende „Zeitfenster“ zur Detektion der apoptotischen CD4- und CD8-positiven Lymphozyten erfaßt haben. Eine weitere Möglichkeit ist die zu geringe Anzahl an apoptotischen Lymphozyten, welche von dem verwendeten FACS-Gerät nicht detektiert werden konnten. Allerdings zeigten unsere durchflußzytometrischen Untersuchungen signifikant erhöhte Apoptoseraten in der *Granulozytenpopulation*, sowohl an Tag 28 p.op. als auch an Tag 150 p.op.. Die Rolle der Granulozyten im Rahmen der Lebertransplantation ist bisher nur wenig verstanden. Eine verstärkte transhepatische Aktivierung neutrophiler Granulozyten nach Lebertransplantation beschreibt Pesonen et al. und sieht dies in einem zeitlichen Zusammenhang mit dem auftretenden Reperfusionsschaden des Lebertransplantates (Pesonen et. al, 2000). Dabei reduziert die Apoptoseinduktion neutrophiler Granulozyten ex vivo den systemischen Effekt eines Ischämieschadens nach Reperfusion des Lebertransplantates (Chen et al, 2001). In welchem Zusammenhang allerdings die von uns mit Hilfe der Durchflußzytometrie ermittelten Apoptoseraten der Granulozyten mit der Toleranzinduktion stehen bleibt zunächst weiterhin unklar.

## 7. Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgestellte Tiermodell der kombinierten orthotopen Leber/Dünndarmtransplantation konnte den protektiven Effekt der Leber für cotransplantierte Organe in eindrucksvoller Weise aufzeigen. Langfristiges Ziel muß die Übertragung der in diesem physiologisch getreuen Tiermodell gewonnenen Erfahrungen auf den Menschen sein, um damit zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Anwendbarkeit der Organtransplantation, speziell der Dünndarmtransplantation, beizutragen. Bisher sind dieser protektive Effekt bzw. die toleranzinduzierenden Mechanismen allerdings nur unvollständig geklärt. Derzeit ist noch jede Organtransplantation, insbesondere die Dünndarmtransplantation, zunächst von einer immunsuppressiven Therapie begleitet. Allerdings zeigt diese nur bei der Prävention und Therapie akuter Abstoßungsreaktionen einen deutlichen Nutzen. Die chronische Abstoßung eines Transplantates ist hingegen auch mit neuesten immunsuppressiven Therapiestrategien nur unzureichend behandelbar. Ziel muß es deshalb sein, die immunmodulierenden Zellabläufe im Empfängerorganismus weiter experimentell zu klären und zu reproduzieren. Dabei ergänzen sich die Immunhistologie und die Durchflußzytometrie in idealer Weise. Da beide Methoden qualitative und quantitative Analysen der zu untersuchenden Zellpopulationen ermöglichen, sich jedoch im Analyseverfahren selbst grundsätzlich unterscheiden (visuelle Auswertung gegenüber maschineller Fluoreszenzdetektion), ermöglichen sie in Kombination die vollständige Untersuchung komplexer zellulärer Abläufe. Ein großer Gewinn wäre die Aufdeckung der Mechanismen des beschriebenen protektiven Effektes der Leber, um diesen in einem weiteren Schritt auch ohne begleitende Lebertransplantation anwenden zu können. Somit wäre eine wesentliche Ausweitung dieses protektiven Effektes auf sämtliche Organtransplantationen möglich. Die damit ebenfalls verbundene Einsparung an teilweise dauerhaft benötigten Immunsuppressiva nach Allotransplantation würde einen großen Nutzen für die Patienten darstellen, da neben eingeschränkter Wirksamkeit (s.o.) auch Nebenwirkungen ( Osteoporose, Diabetes mellitus, neu auftretende Malignome) und das strenge Einnahmeregime der bisher verwendeten Immunsuppressiva die Lebensqualität oft deutlich reduzieren.

## 8. Zusammenfassung

Trotz der Entwicklung neuer und selektiver Immunsuppressiva, darunter neben konventionellen Medikamenten auch monoklonale Antikörper, bleibt die Transplantation des Dünndarms auch weiterhin bei einer Fünfjahresüberlebensrate von 35% ein risikoreiches Verfahren, welches nur bei einem kleinen Patientenspektrum derzeit indiziert ist. Die Erkenntnis, daß eine cotransplantierte Leber (oder eine sogar erst in einem 2. Schritt nachträglich transplantierte Leber) die Überlebensrate nach Dünndarmtransplantation wesentlich verbessert, zeigt die immunologische Sonderstellung der Leber auf und verweist auf ihren protektiven Effekt, den sie auf sämtliche Organtransplantate des gleichen Spenders ausübt. Dies konnte sowohl tierexperimentell (Rasmussen, 1995; Meyer 2000) als auch im Rahmen der humanen Leber/Dünndarmtransplantation nachvollzogen werden (Intestinal Transplant Registry). Dabei sind diese toleranzinduzierenden Mechanismen der Leber selbst, aber auch im gesamten Immunsystem des Empfängers, bisher nur unvollständig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Zellmigration immunologisch kompetenter Zellen nach Leber/Dünndarmtransplantation zu analysieren, welche möglicherweise Grundlage für die spenderspezifische Toleranz sind. Insbesondere führten wir Analysen in der transplantierten Leber selbst, aber auch in mesenterialen Lymphknoten (MLKs) und Milz des Empfängers durch. Letztere wurde unter der Vorstellung analysiert, auch systemische immunologische Abläufe im Empfänger zu erfassen. Die Ergebnisse sollten mit gewonnenen Erkenntnisse aus der Immunhistologie korreliert werden. Dabei gelang es uns mit der kombinierten orthotopen Leber/Dünndarmtransplantation der Ratte in der Stammkombination BN→LEW ein geeignetes Tiermodell zu entwickeln. Erstmals war es damit möglich, sich vollständig an den physiologischen Verhältnissen zu orientieren und die immunologischen Mechanismen nach Transplantation im Langzeitverlauf zu untersuchen. Nach Ablauf der initialen Gabe geringer Dosen des Immunsuppressivums FK506, konnten wir - nach passagerer Abstoßung - die induzierte spenderspezifische Toleranz nachweisen und dabei eine bloße Akzeptanz der Transplantate ausschließen.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersuchten wir wesentliche Mechanismen der Toleranzinduktion: den Chimärismus und die Apoptose nicht-parenchymaler Zellen im Lebertransplantat.

Den Chimärismus, das Nebeneinander von Spender- und Empfängerzellen im Empfängerorganismus, konnten wir in seinen unterschiedlichen Manifestationsformen (Makro-, Mikro- und Transplantatchimärismus) zu jeder Zeit nach Transplantation nachweisen. Seine Bedeutung für die Induktion spenderspezifischer Toleranz bleibt aber weiterhin unklar. So kann eine Transplantatabstoßung trotz langfristig persistierender Spenderzellen im Empfänger auftreten (Schlitt, 1996; Schlitt 1997). Auf der anderen Seite wurde eine spenderspezifische Toleranzinduktion auch ohne die Persistenz von Spenderzellen im Transplantatempfänger im Rahmen einer Herztransplantation beobachtet (Bushell et al., 1995).

Zum Nachweis apoptotischer Zellen mit der Durchflußzytometrie, gelang es uns eine Methode zu etablieren, die den dynamischen Apoptoseprozeß erfaßt und damit die Unterscheidung zwischen frühapoptotischen, apoptotischen und spätapoptotischen / nekrotischen Zellen ermöglicht. Die Apoptoseanalyse unterschiedlicher Leukozytenpopulationen im Lebertransplantat selbst gelang uns dabei ebenfalls. Allerdings konnten wir kein Apoptosemaximum von CD8-positiven Lymphozyten an Tag 28 p.op. nachvollziehen, wie es in der Immunhistologie (Meyer, 1998c) beschrieben wurde. Uns gelang es aber ein signifikantes Maximum an Apoptoseraten in der Granulozytenpopulation der Transplantatleber an Tag 28 p.op. und Tag 150 p.op. aufzuzeigen. Für sich betrachtet ließen sich diese Ergebnisse allerdings nicht in Zusammenhang mit der nachgewiesenen Toleranzinduktion bringen.

Unsere eigenen Ergebnisse, sowie die Erkenntnisse aus der Literatur lassen den Schluß zu, daß spenderspezifische Toleranz in der Leber durch das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen induziert wird. Den Stellenwert, den hier Chimärismus und T-Zellapoptose für sich betrachtet einnehmen, konnte aber nicht endgültig geklärt werden. Gegenstand weiterer Untersuchungen muß es daher sein, die „Vernetzung“ der bekannten Phänomene zu identifizieren, die zur Toleranzinduktion beitragen.

## 9. Literatur

- Abbas A, Lichtman A, Pober J, 1997 Cellular and Molecular Immunology 3<sup>rd</sup>. Edition, W.B.Saunders Compny, ISBN 0-7216-4024-9
- Alican F, Hardy JD, Cayirli M, et al. Intestinal transplantation: laboratory experience and report of a clinical case. *Am J Surg.* 1971;121:150-159.
- Bushell A, Pearson T, Morris Pj, Wood Kj (1995) Donor-recipient microchimerism is not required for tolerance induction following recipient pretreatment with donor-specific transfusion and anti-CD4-antibody. *Transplantation* 59: 1367-1371
- Calne R: An opportunity in organ transplantation. *Nature Medicine* 1995; 1:20-22
- Chen MF, Chen JC, Chiu DF, Ng CJ, Shyr MH, Chen MH: Prostacyclin analogue (OP-2507) induces delayed ex vivo neutrophil apoptosis and attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement in rats. *Shock* 2001 Dec;16(6):473-8
- 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
- De Ville de Goyet J, Mitchell A, Mayer AD, et al. En bloc combined reduced-liver and small bowel transplants: from large donors to small children. *Transplantation.* 2000;69:555-559.
- Egawa H, Martinez O, Quinn M, Villanueva J, So S, Esquivel C, Krams S: Acute Liver allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1995; 59: 97-102
- 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
- Fortner JG, Sichuk G, Litwin SD, Beattie EJ. Immunological responses to an intestinal allograft with HLA-identical donor-recipient. *Transplantation.* 1972; 14:531-535.
- Gassel HJ, Otto C, Gassel AM, Meyer D, Steger U, Timm W, Ulrichs K, Thiede A: Tolerance of rat liver allografts induced by short term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies against CD25 and CD54 with subtherapeutic cyclosporine. *Transplantation* 2000; 69(6):1058-67.

- Goulet O, Revillon Y, Brousse N, et al. Successful small bowel transplantation in an infant. *Transplantation*. 1992;53:940-943.
- Goulet O, Michel JL, Jobert A, et al. Small bowel transplantation alone or with the liver in children: changes by using FK506. *Transplant Proc*. 1998;30:1569-1570.
- Grant D, Wall W, Mimeault R, et al. Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet*. 1990;335:181-184.
- Han WR; Zhan Y; Murray-Segal LJ; Brady JL; Lew AM; Mottram PL: Prolonged allograft survival in anti-CD4 antibody transgenic mice: lack of residual helper T cells compared with other CD4-deficient mice.  
*Transplantation* 2000 Jul 15;70(1):168-74 (ISSN: 0041-1337)
- Kamada N: The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 1985; 55: 369-383.
- Kamada N: Animal models of liver transplantation and their clinical relevance. In Neuberger J and Adams D (eds): *Immunology of liver transplantation*. Boston, Little Brown & Co 1993; 161-186.
- Klein I (2000) Zelluläre Immunreaktionen nach orthotoper Rattenlebertransplantation unter selektiver immunsuppressiver Therapie und Toleranzinduktion. Promotionsschrift zur Erlangung der Doktorwürde an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
- Lillehei RC, Idezuki Y, Feemster JA, et al. Transplantation of stomach, intestine and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery*. 1967;67:721-741.
- McCaughan 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
- Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gasser M, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A (1998a) Apoptosis as an instrument for immune regulation - study on a liver/small bowel tolerant rat model. *Transpl.Proc*. 30: 2362-2363
- Meyer D, Gassel HJ (1998b) Combined abdominal organ transplantation. In: Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A (eds) *Organtransplantation in rats and mice, microsurgical techniques and immunological principles*. Springer Verlag, Heidelberg, pp 141-147
- Meyer D (1998c) Mikrochirurgische Entwicklung der Leber - / Dünndarmtransplantation: Untersuchungen zu Mechanismen funktioneller Toleranz. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi and der Julius-Maximilian-Universität Würzburg

- Meyer D, Otto C, Rummel C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. "Tolerogenic effect" of the liver for a small bowel allograft. *Transpl Int* (2000) 13 Suppl 1: S 123-S126
- Mittal NK, Kato T, Thompson JF. Current indications for intestinal transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2000;5:279-283.
- Montani MS, Tuosto L, Giliberti R, Stefanini L, Cundari E, Piccolella E: Dexamethasone induces apoptosis in human T cell clones expressing low levels of Bcl-2. *Cell Death Differ*.1999; 6(1): 79-86; 1350-9047
- Oliver S, Goto S, Chiba S, Clouston A, Kelso A: Persistence of donor-reactive CD4+ T cells in liver and spleen of rats tolerant to a liver allograft. *Transplantation* 1998; 66: 132-134.
- Olivier CL, Rettori R, Olivier C, Baur O, Roux J. Homotransplantation orthotopique de l'intestin grele et des colon droit et transverse chez l'homme. *J Chir (France)*. 1969;98:323-330.
- Ono K, Lindsey ES (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57: 225-229
- Pesonen EJ, Hockerstedt K, Makisalo II, Vuorte J, Jansson SE, Orpana A, Karonen SL, Repo H: Transhepatic neutrophil and monocyte activation during clinical liver transplantation.. *Transplantation* 2000 Apr 15;69(7):1458-64
- Qian S, Demetris A, Murase N, Rao A, Fung J, Starzl T: Murine liver allograft transplantation: Tolerance and cell chimerism. *Hepatology* 1994; 916-923.
- 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
- Sakamoto T, Murase N, Ye Q, Starzl TE, Demetris Aj (1997) identification of donor hematopoietic progenitor cells after allogeneic liver transplantation. *Transplant.Proc.* 23: 3243-3245
- Schlitt HJ: Spender-Leukozyten und Chimärismus bei klinischer Leber-, Lungen- und Herztransplantation – Analyse und Ausblick. *Transplantationsmedizin* 1996; 8: 9-32
- Schlitt HJ (1979) is microchimerism needed for allograft tolerance? *Transplant.Proc.* 29: 82-84

Starzl T, Demetris A, Murase N, Thomson A, Trucco M, Ricordi C: Donor cell chimerism permitted by immunosuppressiv drugs: a new view of organ transplantation. *Immunology Today* 1993; 14(6): 326-332.

The Intestinal Transplant Registry. Available at: <http://www.lhsc.on.ca/itr/>

Tashiro H, Fukuda Y, Kimura A, Hoshino S, Ito H, Dohi K: Assessment of microchimerism in rat liver transplantation by polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996; 23(4):828-834

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

Thorwarth M (2001) Kombinierte Leber/Dünndarmtransplantation: Modellentwicklung und Analyse toleranzinduzierender Mechanismen. Promotionschrift zur Erlangung der Doktorwürde der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1):39-51

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

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(1): 381-385

## 10. Anhang

Tabelle 1.1: Färbeprotokoll bei Leber/Dünndarmtransplantation BN→LEW

Ansatznr.	1.Antikörper	Donkey	MS	2.Antikörper	Strept.Trico.	3.Antikörper
<b>MLK</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	
3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.						Ox27 F
9.	NDS 60	***	***	R73 bio	***	341 F
10.	NDS 60	***	***	R73 bio	***	W3/25 F
11.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
12.	NDS 60	***	***	341 bio	***	Ox39 F
13.	NDS 60	***	***	Ox33 bio	***	10/78 F
Ansatznr.	1.Antikörper	Donkey	MS	2.Antikörper	Strept.Trico.	3.Antikörper
<b>Milz</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	
3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.						Ox27 F
9.	Ox27	***	***	R73 bio	***	341 F
10.	Ox27	***	***	R73 bio	***	W3/25 F
11.	Ox27	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
12.	Ox27	***	***	341 bio	***	Ox39 F
13.	Ox27	***	***	Ox33 bio	***	10/78 F
Ansatznr.	1.Antikörper	Donkey	MS	2.Antikörper	Strept.Trico.	3.Antikörper
<b>Leber</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	
3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.						Ox27 F
9.	Ox27	***	***	Ox38 bio	***	ED2 F
10.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	ED2 F

11.	R73 PE			Ox38 bio	***	341 F
12.	Ox27	***	***	341 bio	***	Ox39 F
13.	NDS 60	***	***	341 bio	***	Ox39 F
14.	Ox27	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
15.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
16.	Ox27	***	***	10/78 bio	***	341 F
17.	NDS 60	***	***	10/78 bio	***	341 F
18.	R73 PE			10/78 bio	***	Ox39 F
19.	JJ319	***	***	Ox38 bio	***	341 F
20.				Ox33 bio	***	

Tabelle 1.2: Färbeprotokoll bei Leber/Dünndarmtransplantation DA→LEW

Ansatznr.	1.Antikörper	Donkey	MS	2.Antikörper	Strept.Trico.	3.Antikörper
<b>MLK</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	
3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.	NDS 60	***	***	R73 bio	***	341 F
9.	NDS 60	***	***	R73 bio	***	W3/25 F
10.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
11.	NDS 60	***	***	341 bio	***	Ox39 F
12.	NDS 60	***	***	Ox33 bio	***	10/78 F
<b>Milz</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	
3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.	MN4	***	***	R73 bio	***	341 F
9.	MN4	***	***	R73 bio	***	W3/25 F
10.	MN4	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
11.	MN4	***	***	341 bio	***	Ox39 F
12.	MN4	***	***	Ox33 bio	***	10/78 F
<b>Leber</b>						
1.	Zellen solo					
2.		***			***	

3.						Ox1 F
4.						Ox42 F
5.	W3/25 PE			Ox22 bio	Strept.FITC	
6.						W3/25 F
7.				R73 bio	***	
8.	MN4	***	***	Ox38 bio	***	ED2 F
9.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	ED2 F
10.	R73 PE			Ox38 bio	***	341 F
11.	MN4	***	***	341 bio	***	Ox39 F
12.	NDS 60	***	***	341 bio	***	Ox39 F
13.	MN4	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
14.	NDS 60	***	***	Ox38 bio	***	Ox39 F
15.	MN4	***	***	10/78 bio	***	341 F
16.	NDS 60	***	***	10/78 bio	***	341 F
17.	R73 PE			10/78 bio	***	Ox39 F
18.	JJ319	***	***	Ox38 bio	***	341 F

Tabelle 1.3: Färbeprotokoll (Apoptose) bei Leber/Dünndarmtransplantation BN→LEW

	1.Antikörper	Donkey	MS	2.Antikörper	Strept.Trico.	3.Antikörper
<b>Leber</b>						
1.	Zellen solo					
2.						Ox1 F
3.						Ox42 F
4.						Annexin V
5.				7-AAD		
6.	W3/25 PE					
7.				7-AAD		Annexin V
8.	W3/25 PE			7-AAD		Annexin V
9.	Ox8 PE			7-AAD		Annexin V
10.						ED2-F
11.						10/78 F

## **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 Dank gilt besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Meyer, Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, für die Überlassung meines Themas. Für seine geduldige Anleitung und Hilfe bei dieser Dissertation bedanke ich mich ganz herzlich.

Herrn Dr. rer. nat. C. Otto, Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie der Universität Würzburg, danke ich für die große Geduld und Hilfsbereitschaft bei den zahlreichen Diskussionen sowie bei der Fertigstellung 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.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau A. Gebert und Frau N. Martens für die große Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche. Besondere Anerkennung gebührt ihnen auch für die Schaffung des angenehmen Arbeitsklimas in der Abteilung für Experimentelle Transplantationsimmunologie (ETI).

Bei meinen Eltern, sowie bei meiner Großmutter, möchte ich mich für die großzügige und geduldige Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.

## Curriculum vitae

<b>Persönlich</b>	Name: Geburtsdatum: Geburtsort: Eltern:	Christoph Rummel 28. Juni 1974 Stuttgart Georg und Monika Rummel
<b>Schulausbildung</b>	1980 - 1984 1984 - 1993	Grundschule Stuttgart-Birkach Wilhelmsgymnasium Stuttgart-Degerloch
<b>Zivildienst</b>	Juni 1993 - September 1994	Abteilung für Orthopädie Olgahospital Pädiatisches Zentrum Stuttgart
<b>Studium</b>	November 1994  August 1996 August 1997 1997 - 2002  September 1999 März 2000 Mai 2001 November 2001	Beginn Studium der Humanmedizin Universität Würzburg Physikum 1. Staatsexamen Promotion Experimentelle Transplantationsimmunologie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg 1. Amerikanisches Staatsexamen: USMLE Step1 2. Staatsexamen 3. Staatsexamen 2. Amerikanisches Staatsexamen: USMLE Step2
<b>Praktisches Jahr</b>	Mai - Juni 2000  Juli - Oktober 2000  Oktober - November 2000  Dezember - Januar 2001  Februar - März 2001	Innere Medizin <i>Stephen J. Forman M.D.</i> Department of Hematology and BMT City of Hope National Medical Center, Duarte, USA  Allgemeine Chirurgie <i>Prof. Dr. A. Thiede</i> Universitätsklinik Würzburg  Innere Medizin <i>Prof. Dr. G. Ertl</i> Universitätsklinik Würzburg  Orthopädie <i>Prof. Dr. A. Gächter</i> Kantonsspital St. Gallen, Schweiz  Orthopädie <i>Prof. Dr. J. Eulert</i> Orthopädische Universitätsklinik König-Ludwig- Haus Würzburg
<b>Arzt im Praktikum</b>	Juni 2001 - November 2002	Orthopädie <i>Dr. L. Seebauer, Prof. Dr. W. Keyl</i> Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen