

Thema: Akute Abstoßung in der Tunica muscularis bei der
allogenen Dünndarmtransplantation im Rattenmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Martin Wolfgang von Websky
aus Bonn

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Andreas Türler
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Walther Kuhn

Tag der Mündlichen Prüfung: 15. April 2008

Aus Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Bonn
Direktor Prof. Dr. med. Andreas Hirner

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meiner Schwester und meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit.

1. Einleitung	7
1.1 Das Kurzdarmsyndrom	7
1.2 Die Dünndarmtransplantation	9
1.2.1 State of the art – Studienlage	10
1.2.2 Ausblick und klinische Aspekte der Dünndarmtransplantation	11
1.3 Bedeutung der Tunica muscularis für die Dünndarmtransplantation	12
1.4 Transplantimmunologie	13
1.4.1 Akute Abstoßung	14
1.5 Hypothesen und Einordnung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Tiere	18
2.2 Gruppen und immunologisches Modell.....	18
2.3 Operation	19
2.3.1 Entnahmeoperation.....	19
2.3.2 Empfängeroperation	20
2.4 Probenentnahme	21
2.5 RNA Extraktion und Reverse Transkription	21
2.6 SYBR-Green-Real-Time RT-PCR.....	21
2.6.1 Verwendete Primer	22
2.6.2 PCR Bedingungen	22
2.7 Histopathologie	23
2.7.1 Gewebeaufbereitung für Histologie, Tunel Test, Immunhistochemie.....	23
2.7.2 Histopathologische Bewertung	23
2.8 Histochemie und Immunhistochemie	24
2.8.1 Histochemie	24
2.8.2 Immunhistochemie.....	24
2.9 Apoptose (TUNEL).	25

2.10	Statistik	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Phase der postoperativen Entzündung.....	27
3.1.1	Auf molekularer Ebene	27
3.1.2	Auf zellulärer Ebene.....	30
3.2	Phase der akuten Abstoßung	34
3.2.1	Infiltration der Tunica muscularis mit CD8+ Zellen	34
3.2.2	Expressionsprofil der Mediatoren (SYBR Green RT PCR).....	35
3.3	Grading der Abstoßungsreaktion in der transplantierten Muskularis	39
3.4	Ausmaß und zeitliches Auftreten von Apoptose	47
3.5	Kontraktile Aktivität der Dünndarm-Grafts und iNOS Expression	49
3.5.1.	Kontraktile Aktivität bei pharmakologischer iNOS-Blockade.....	53
4.	Diskussion.....	54
5.	Zusammenfassung	62
6.	Literaturverzeichnis.....	64
7.	Danksagung	73

1. Einleitung

1.1 Das Kurzdarmsyndrom

Bei einem Kurzdarmsyndrom kann sich ein Patient nicht mehr ausreichend über eine orale Nahrungszufuhr ernähren. Ursachen hierfür sind chirurgische Eingriffe mit ausgedehnten Darmresektionen oder verschiedene Erkrankungen, die bei Kindern oder bei Erwachsenen zu einem Verlust von Dünndarmabschnitten und damit von Resorptionsfläche führen. Die häufigsten Ursachen nach Fishbein et al. (2003) sollen kurz erwähnt werden: Abdominelle Traumata können langstreckige Resektionen notwendig machen, weitaus häufiger sind bei Erwachsenen jedoch Erkrankungen ischämischer Genese, zum Beispiel Thrombosen oder Embolien der Mesenterialgefäße. Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn können chirurgische Interventionen notwendig machen, nach denen manchmal zu wenig intestinale Restlänge verbleibt. Bei Kindern führen Störungen der Embryonalentwicklung zu Krankheitsbildern wie jejunoilealen Atresien, Omphalozelen, Gastroschisis und Malrotationsvolvulus – auch hier hat der Kinderchirurg oft nur die Möglichkeit längere Dünndarmanteile zu resezieren. In diesem Zusammenhang ist auch die nekrotisierende Enterokolitis bei Säuglingen zu nennen, eine Entzündung der Darmwand unklarer Genese, welche besonders häufig bei Frühgeborenen auftritt. Es wird zwar empfohlen, beim Auftreten einer Durchwanderungsperitonitis oder einer Perforation, im Rahmen des entzündlichen Geschehens zunächst ein, dem betroffenen Darmabschnitt vorgeschaltetes, Stoma anzulegen, oft kann aber nicht auf ausgedehnte Darmresektion verzichtet werden.

Wenn als Folge der hier aufgezählten Krankheitsbilder nicht genügend Resorptionsfläche zur oralen Nährstoffaufnahme erhalten bleibt, wird von einem Kurzdarmsyndrom gesprochen. Malassimilation, Malnutrition, chologene Diarrhoe sowie Flüssigkeitsverluste und Störungen des Elektolythaushaltes kennzeichnen diesen Zustand (Renz-Polster et al. 2003). Körpereigene Adaptationsmechanismen, die bis zu einem Jahr dauern können, erlauben oft einen Ausgleich auch vergleichsweise langstreckiger Darmverluste. Unter einer Restlänge von circa 100 cm Dünndarm jedoch kann die Malassimilation meist nicht mehr durch körpereigene Adaptationsmechanismen kompensiert werden. Es ist möglich diese Adaptationsmechanismen durch klinische Maßnahmen wie die Gabe hochkalorischer Nahrung und elementarer Nährlösung oral oder über eine perkutane endoskopische Gastrotomie Sonde (PEG Sonde) zu unterstützen. Die PEG Sonde hat den Vorteil, dass die hierbei mögliche pumpengesteuerte Nahrungszufuhr von den Patienten am besten toleriert wird, auch eine zusätzlich zur oralen Nahrungsaufnahme zyklische Gabe über Nacht ist so möglich. Als medikamentöse Therapie kann Loperamid, ein lokal lähmend auf den Darm wirkendes Opioid, gegeben werden um die intestinale Transitzeit zu

verlängern. Cholestyramin, ein Gallensalze bindendes Harz, vermindert die Nettosekretion von Wasser und Ionen in das Darmlumen und mildert so die chologene Diarrhoe. Chirurgische Möglichkeiten die Resorptionsfläche zu erhöhen, z.B. die Bianchi Methode, bei der dilatierte Darmabschnitte der Länge nach geteilt, zwei Lumina geformt und wieder anastomosiert werden (Bianchi 1997), oder die STEP Methode, bei der durch serielles transversales Staplen mit dem Gastrointestinalen Anastomosierungsgerät (GIA) eine Darmverlängerung erreicht wird (Kim et al. 2003), sind erst seit kurzem systematisch untersucht worden und können bei Patienten mit dilatierten Darmabschnitten indiziert sein (Thompson 2004). Reichen diese Maßnahmen nicht aus um eine ausreichende Resorption zu erzielen, so muss zusätzlich auf parenterale Ernährung zurückgegriffen werden. Oft können die Patienten lange Zeit mit zusätzlichen parenteralen Gaben von Nährstoffen, Vitaminen und Flüssigkeits- sowie Elektrolytsubstitution ausreichend therapiert werden. Die langfristige parenterale Ernährung (TPN) ist nicht nur durch einen erheblichen Verlust an Lebensqualität gekennzeichnet, sondern auch mit hohen Kosten und Komplikationen wie Kathetersepsis, Mangel an venösen Zugängen durch rezidivierende Thrombosen bis hin zur Leberzirrhose verbunden (Quigley et al. 1993, Sax et al. 1993). Die TPN-induzierte Leberzirrhose tritt besonders häufig bei pädiatrischen Patienten auf. Ursächlich werden der Verlust der enteralen Stimulation der Gallensekretion sowie Kohlenhydrat- und Kalorienüberschuss mit Steatosis Hepatis und Cholelithiasis diskutiert. Der Endzustand dieser Patienten, die „failure of parenteral nutrition“ ist dann limitierend. In den USA ist man deshalb dazu übergegangen, Kriterien die das Versagen der parenteralen Ernährung beinhalten oder ankündigen, als Indikation für eine Listung zur Dünndarmtransplantation festzulegen (**Tabelle 1**). Von den in **Tabelle 1** aufgeführten Kriterien reicht jeweils eines aus, um in den USA als Transplantkandidat gelistet zu werden.

Tabelle 1

Kriterien für das Versagen parenteraler Ernährung (US Medicare)
▪Bevorstehendes (eingetretenes) Leberversagen aufgrund TPN-induzierter Leberschäden
▪Thrombose von 2 oder mehr zentralen Venen
▪Auftreten von 2 oder mehr Sepsis-Episoden im Zuge einer Katheterinfektion pro Jahr
▪Auftreten von katheterassoziierter Fungämie, septischem Schock oder ARDS
▪Häufige Episoden schwerer Dehydratation trotz i.v. Volumentherapie zusätzlich zur TPN

1.2 Die Dünndarmtransplantation

Die Dünndarmtransplantation ist erst seit etwa 15 Jahren eine denkbare Therapieoption für Patienten mit „intestinal failure“, da sich vor der Einführung des Calcineurin Inhibitors Tacrolimus[®] (Todo et al. 1990) die akute und chronische Abstoßung des Transplantates kaum kontrollieren ließ. Inzwischen ist die zunächst experimentelle Rolle der Dünndarmtransplantation überwunden und sie stellt mit bis heute über 1000 Transplantationen weltweit eine echte therapeutische Alternative zur Langzeit-Parenteralernährung dar. In Deutschland wurde die erste von bis heute 24 Transplantationen 1988 in Kiel durchgeführt, die aktuellsten im Dezember 2004 hier am Universitätsklinikum Bonn und im Januar 2006 am Universitätsklinikum Tübingen. Im Eurotransplant Raum wurden im Zeitraum zwischen 2001 und 2004 über 30 Patienten transplantiert, davon zwei Drittel in Deutschland. Seit 1990 schreitet die Verbesserung der Dünndarmtransplantation stetig voran. Sie kann die Lebensqualität der Patienten bei optimalem Ausgang stark verbessern (DiMartini et al. 1998) und ist in den USA nach Ablauf von zwei Jahren post transplantationem als kosteneffektiver gegenüber der langfristigen parenteralen Ernährung beschrieben worden (Abu-Elmagd et al. 1999). Neben der Einführung moderner Immunsuppressiva wie Tacrolimus[®], haben weitere Faktoren, wie die potentiell begleitende Immunmodulation durch simultane Knochenmarkstransplantation, die Induktion von Toleranz (Cosimi et al. 2004, Nakao et al. 2003b), die verbesserte pharmakologische Behandlung von Begleitinfektionen (zum Beispiel mit Ganciclovir[®] bei CMV Infektion) und operativ technische Innovationen mit einem verbessertem perioperativen Management (Fishbein et al. 2003) dazu geführt, dass die Anzahl durchgeführter Dünndarmtransplantationen an spezialisierten Zentren in den letzten 10 Jahren stetig zugenommen hat. Trotz dieser Fortschritte liegen die Erfolgsraten bei der Dünndarmtransplantation noch deutlich unter denen anderer solider Organe. Das 5-Jahres Organüberleben liegt bei 55 %, die 5-Jahres Überlebensrate der Patienten liegt bei 63 % (Abu-Elmagd K et al. 2001). Im Vergleich hierzu ergeben sich bei der Lebertransplantation 5-Jahres Überlebensraten von mehr als 80 %.

Die Schwierigkeiten der Dünndarmtransplantation sind in der besonderen immunologischen Rolle des Dünndarmes begründet. Der Darm beherbergt ein intrinsisches Immunsystem mit einer großen Menge an „gut associated lymphoid tissue“. Durch die bidirektionale Wanderung immunkompetenter, alloreaktiver Zellen zwischen Transplantat und Empfänger (Lear et al. 1989) kommt es sowohl zu starken akuten und chronischen Abstoßungen als auch zur „graft-versus-host disease“ (GvHD). Unter Graft versus Host Disease (GvHD) versteht man eine Reaktion der Spenderleukozyten, die besonders im Dünndarmtransplantat in großer Zahl vorhanden sind, gegen den Empfängerorganismus. Diese immunologischen Reaktionen können sich an der Haut als Erythem oder an anderen Geweben manifestieren. Interessanterweise spielt die GvHD bei

der Dünndarmtransplantation im klinischen Setting eine eher untergeordnete Rolle, viel gefürchteter sind die akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen des Empfängers gegen sein neues Organ. Mehr als 80% der Patienten haben mindestens eine Abstoßungsepisode im ersten Jahr (Fishbein et al. 2003). Desweiteren reagiert der Darm, wenn er durch das Operationstrauma geschädigt wird, mit Motilitätsstörungen und dem Verlust seiner Barrierefunktion gegenüber Mikroorganismen. Unsere Arbeitsgruppe hat sich insbesondere dem Thema der postoperativen Motilitätsstörungen intensiv gewidmet (Kalff et al. 1998a, Kalff et al. 2003, Türler et al. 2002c). Es kann zu bakterieller Überwucherung und Translokation mit Darmatonie, Peritonitis und Sepsis kommen. Chirurgische Komplikationen umfassen Blutungen durch die großen Gefäßrekonstruktionen, schlechte Anastomosenheilung und Verletzungen der Lymphgefäße mit Ausbildung von chylogem Aszites (Cicalese et al. 2000). Sogenannte „opportunistische“ Infektionen z.B. mit dem Cytomegalievirus oder Adenoviren spielen durch die oft großzügig eingesetzten Immunsuppressiva während des ersten Jahres eine große Rolle und sind für das Outcome nicht günstig (Bueno et al. 1997, Burroughs et al. 2002, Kaufman et al. 2002, Parizhskaya et al. 2001). Eppstein-Barr Virus assoziierte Lymphproliferationen werden in bis zu 50% der Patienten berichtet (Finn et al. 1998, Grant 1999).

1.2.1 *State of the art – Studienlage*

Die klinischen Studien zur Dünndarmtransplantation beschäftigen sich größtenteils mit dem Vergleich verschiedener immunsuppressiver und immunmodulatorischer Therapieregime. Zur Zeit wird von führenden Programmen wie zum Beispiel den Gruppen aus Pittsburgh und Miami eine Induktionstherapie mit deletierenden Antikörpern wie Campath® in Kombination mit Tacrolimus® evaluiert (Bond et al. 2005, Flynn et al. 2005, Tzakis et al. 2003). Desweiteren werden technische Aspekte der Dünndarmtransplantation und ihrer Kombinationen im Rahmen von Leber plus Dünndarm oder multiviszeraler Transplantationen untersucht (Abu-Elmagd K et al. 2001, Tzakis et al. 2005). Die Prävention des Ischämie/ Reperfusionsschadens wurde mehrfach thematisiert, ein Review neueren Datums findet sich bei Mallick et al., 2004. Mallick erwähnt insbesondere die Technik des ischämischen Präkonditionierens (IPC) als experimentell gut belegt. Bei dieser wird durch kurzzeitiges Klemmen der A.mesenterica superior vor der eigentlichen Ischämie offenbar eine Induktion der Ischämietoleranz des Gewebes erreicht, auch andere Ansätze wie Antioxidantien, Antikomplementäre- und Antileukozytäre Therapien werden erwähnt (Mallick et al. 2004). Die Indikationsstellung zur Transplantation ist komplex, da wegen der mäßigen Langzeitergebnisse zuerst alle anderen Optionen (parenterale Ernährung, chirurgische Behandlung) ausgeschöpft werden sollten. In diesem Kontext ist die Evaluation von

klinischen Richtlinien zur Behandlung von Patienten mit Kurzdarmsyndrom wie bei Sudan et al. (2005) für eine gute Patientenselektion essentiell.

Im Tiermodell stehen Studien zu Abstoßungsmechanismen und innovative immunsuppressive und –modulatorische Behandlungsansätze im Zentrum des Interesses (Alessiani et al. 2003, Nakao et al. 2003b, Tanabe et al. 1994). Vor allem die beiden neuen immunsuppressiven Medikamente FK 778 und FTY 720 werden auf ihre Wirksamkeit bei der Dünndarmtransplantation geprüft (Alessiani et al. 2005, Yan et al. 2005). Die Bedeutung der T-Lymphozyten bei der Abstoßung ist eine zentrale, es ist aber noch nicht abschließend geklärt ob CD4+, CD8+ oder NK-Zellen die tragende Rolle spielen (Krams et al. 1998, Newell et al. 1997, Young 2004). Meist konzentrieren sich diese Arbeiten auf die Bedeutung der Darmmukosa bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von transplantationsbedingten immunologischen Komplikationen. Die intestinale Muskularis wurde bisher überwiegend hinsichtlich ihrer langfristigen motorischen Funktion im Rahmen eines chronischen Abstoßungsmodelles untersucht (Heeckt et al. 1993). Die einzige Publikation die speziell die Muskularis bei Dünndarmtransplantation untersucht, findet sich bei Ikoma et al. 1994.

1.2.2 Ausblick und klinische Aspekte der Dünndarmtransplantation

Die Dünndarmtransplantation ist auf dem Weg von einer experimentellen Therapiemethode zu einer akzeptierten Behandlungsoption bei Kurzdarmsyndrom (Intestinal Transplant registry (2005, Fryer 2005, Grant et al. 2005). Durch ein verbessertes immunsuppressives Management der Patienten, bessere Techniken und engmaschiges Monitoring ist es gelungen, die Kurzzeitergebnisse dramatisch zu verbessern. Ob die Langzeitergebnisse diesen Trend bestätigen bleibt natürlich abzuwarten. Viele Autoren empfehlen inzwischen die frühzeitige Überweisung eines TPN Patienten mit sich abzeichnenden Komplikationen in ein spezialisiertes Zentrum um rechtzeitig eine Evaluation zur Transplantation durchführen zu können und irreversible TPN bedingte Leberschäden zu vermeiden (Middleton et al. 2005). Zwar befinden sich die meisten und erfahrensten Zentren in den USA (University of Pittsburgh und University of Miami), jedoch zeichnet sich auch in Europa die Bildung einer auf diesem Gebiet erfahrenen Chirurgengemeinde ab. Nach wie vor ist die Dünndarmtransplantation eine sehr anspruchsvolle Therapie und die Patienten profitieren eindeutig davon an ein erfahrenes Zentrum mit ausreichender Fallzahl überwiesen zu werden. Mindestens sollte jedoch Kontakt zu einem erfahrenen Zentrum bestehen. Insbesondere ist nicht nur die Chirurgie für das Outcome des Patienten wichtig, genauso von Bedeutung ist die postoperative Betreuung durch erfahrene Endoskopiker und Pathologen (Sudan et al. 2005). Eine beginnende Abstoßung muss sicher

erfasst und die infektiösen Komplikationen früh erkannt werden, um erfolgversprechend therapieren zu können. Es handelt sich also um „hochkomplexe“ Patienten, die eine sehr gute interdisziplinäre Zusammenarbeit erfordern, am besten im Rahmen eines Expertenteams mit Erfahrung in der Dünndarm- und Lebertransplantation. Sind diese Voraussetzungen gegeben, so kann die Dünndarmtransplantation für die Patienten ein großer Zugewinn an Lebensqualität sein, bei vergleichbaren oder geringeren Kosten im Vergleich mit TPN. Natürlich bleibt die Dünndarmtransplantation auch eine Therapieoption der „letzten Chance“, nämlich bei Patienten die durch Panthrombosen, rezidivierende Kathetersepsis und End-Stage-Liver Disease durch TPN limitiert sind. Verständlicherweise sind die Ergebnisse umso schlechter je länger mit der Indikationsstellung in solchen Fällen gewartet wird. Soll die Dünndarmtransplantation also den Weg in eine multimodale Therapie des Kurzdarmsyndroms finden, so ist auch weiterhin Forschung nötig um die immunologischen, inflammatorischen und funktionellen Vorgänge dieses delikaten Organs während der Transplantation zu verstehen.

1.3 Bedeutung der Tunica muscularis für die Dünndarmtransplantation

Die Tunica muscularis weist ein dichtes Netzwerk residenter Makrophagen auf und reagiert mit lokalen Entzündungsvorgängen auf unterschiedliche Traumata (Kalff et al. 1998a, Mikkelsen 1995). Hierbei stellt sich die Frage, inwieweit dieses Netzwerk an immunologischen Prozessen in dieser Wandschicht im Rahmen der Dünndarmtransplantation und möglicherweise sogar der akuten Transplantatabstoßung beteiligt ist. Bekannt ist, dass unterschiedliche Darmalterationen zu einer Aktivierung dieser residenten Makrophagen führen, was zu einer ausgeprägten molekularen und zellulären Entzündungsreaktion führt (Eskandari et al. 1998, Hierholzer et al. 1999, Kalff et al. 1998b, Kalff et al. 1999a). Die lokale Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in der Tunica muscularis führt zu einer zielgerichteten Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn (Kalff et al. 1999b, Türler et al. 2002a). Arbeiten von Türler et al. 2002 und weitere Untersuchungen von Moore et al. 2002 sowie Schwarz et al. 2002 haben darüberhinaus gezeigt, dass speziell bei der Dünndarmtransplantation durch die Kombination der operativen Manipulation bereits während der Organentnahme und der anschließenden Ischämie/Reperfusion eine multifaktorielle Schädigung des Transplantates vorliegt (Moore et al. 2002, Schwarz et al. 2002, Türler et al. 2002b, Türler et al. 2002a). Dies äußert sich ebenfalls als starke Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis. Ob das Auftreten dieser zunächst unspezifischen Entzündung mit ihrer starken Leukozytenrekrutierung eine Auswirkung auf das Auftreten oder den Verlauf einer akuten Abstoßung hat ist bisher nicht bekannt.

Mehrere Quellen belegen die potentielle Bedeutung der Tunica muscularis für das Outcome der Dünndarmtransplantation: die Dünndarmtransplantation geht über die Ausbildung der

Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis mit einer Störung des kontraktiven Systems des Darmes einher (Türler et al. 2002b). Durch die resultierenden Motilitätsstörungen wird die bakterielle Überwucherung vorangetrieben und in Kombination mit der transplantationsbedingten Störung der Mukosabarriere die bakterielle Translokation gefördert (Nakada et al. 1995). Dies wiederum begünstigt die bei der Dünndarmtransplantation gefürchteten infektiösen Komplikationen (Cicalese et al. 2001, Lee et al. 1995).

1.4 Transplantimmunologie

Auch wenn nicht alle diskutierten Mechanismen der Transplantationsimmunologie an dieser Stelle Platz finden, so soll doch auf einen bemerkenswerten Paradigmenwechsel neuerer Zeit hingewiesen werden, der vermutlich das peri- und postoperative Management der Transplantationspatienten insgesamt ändern wird. Seit bekannt wurde, dass die Abstoßung eines Organs eine Immunreaktion vergleichbar mit einer Reaktion auf Infektionen ist (Medawar, 1944) wurde angenommen, dass die Organabstoßung auf einer unidirektionalen Host-versus-Graft Reaktion (HvGD) beruht. Dieses Modell konnte zwar die Abstoßung hinreichend erklären, die Mechanismen, die zu einer langfristigen Transplantattoleranz führen, blieben jedoch weitgehend ungeklärt. Die Folge waren enorme Anstrengungen in der Weiterentwicklung und klinischen Nutzung verschiedenster Immunsuppressiva, angefangen von Azathioprin über die Calcineurin Inhibitoren Cyclosporin® und Tacrolimus® bis hin zu neuen Präparaten wie Sirolimus® und monoklonalen Antikörpern. Dieses Armamentarium an Medikamenten wird heute meist in prophylaktisch hohen Dosen genutzt, was enorme Nebenwirkungen für die Patienten mit sich bringen kann. Trotzdem ist die Langzeittoleranz, wie sie schon 1963 von Starzl et al. beschrieben wurde, heute eher ein Ausnahmefall und die chronische Abstoßung bleibt trotz hoher Dosen von Immunsuppressiva vor allem bei der Nierentransplantation ein Problem. Nach Auffassung von Starzl et al. (Starzl et al. 2004) ist statt dem unidirektionalen Modell eher davon auszugehen dass HvGD und GvHD bei der Organtransplantation gleichermaßen auftreten und sich gegenseitig auslöschen können. Man hat die Vorstellung, dass „Passenger Leukozyten“ des Transplantats und alloreaktive Klone des Empfängers wechselseitig zu einer klonalen Erschöpfung führen (Schwartz und Dameschek, 1959; Starzl und Silverstein, 1967) was letztendlich zu einer Toleranz des fremden Organs führen kann. Eine mögliche Erklärung gab eine 1992 gemachte Untersuchung, bei der Patienten der frühen Transplantationsära untersucht wurden und bei allen ein minimaler Spender-Lymphozyten-Chimerismus in ihren Organen festgestellt wurde (Starzl et al. 1993). Dennoch wird diese Hypothese kontrovers diskutiert, da dies implizieren würde, dass eine gewisse Abstoßungsreaktion, d.h. ein Auseinandersetzen des Körpers mit dem Transplantat durchaus ein Schritt in Richtung der erwünschten Toleranz ist. Das würde ganz andere

Behandlungsansätze bei der Immunsuppression und eine gute Überwachung der Patienten erforderlich machen, da das Immunsystem sowenig wie möglich supprimiert werden soll und gleichzeitig die akute Transplantatzerstörung frühzeitig erkannt und behandelt werden muss. Das Ziel dieses Behandlungsansatzes ist eine initiale Schwächung des Empfängerimmunsystems (beispielsweise mit Antithymozyten Globulin; ATG[®] oder deletierenden Antikörpern, Campath[®]), so dass es in einen Bereich kommt, in dem die „Passenger Lymphozyten“ eine klonale Auslöschung bewirken können sowie nachfolgend eine möglichst geringe Basisimmunsuppression (bspw. Tacrolimus[®]) die langsam bis auf eine möglichst geringe Dosis ausgeschlichen wird. Eine erste Studie über diese Versuche, bzw. die induzierbare Transplantattoleranz, wurde 2003 in „Lancet“ publiziert (Starzl et al. 2003). Aufgrund dieses neuen Trends bei der immunsuppressiven Behandlung organtransplantierte Patienten ist es wichtiger denn je, auftretende akute Abstoßungen frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können.

1.4.1 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung ist definiert als eine sich über Tage bis Wochen entwickelnde Abstoßung des Transplantates mit überwiegend zellulärer Immunreaktion (T-Lymphozyten) und eventuell humoraler Komponente (antikörpervermittelte Immunreaktion, B-Lymphozyten) (Pfitzmann et al. 2001).

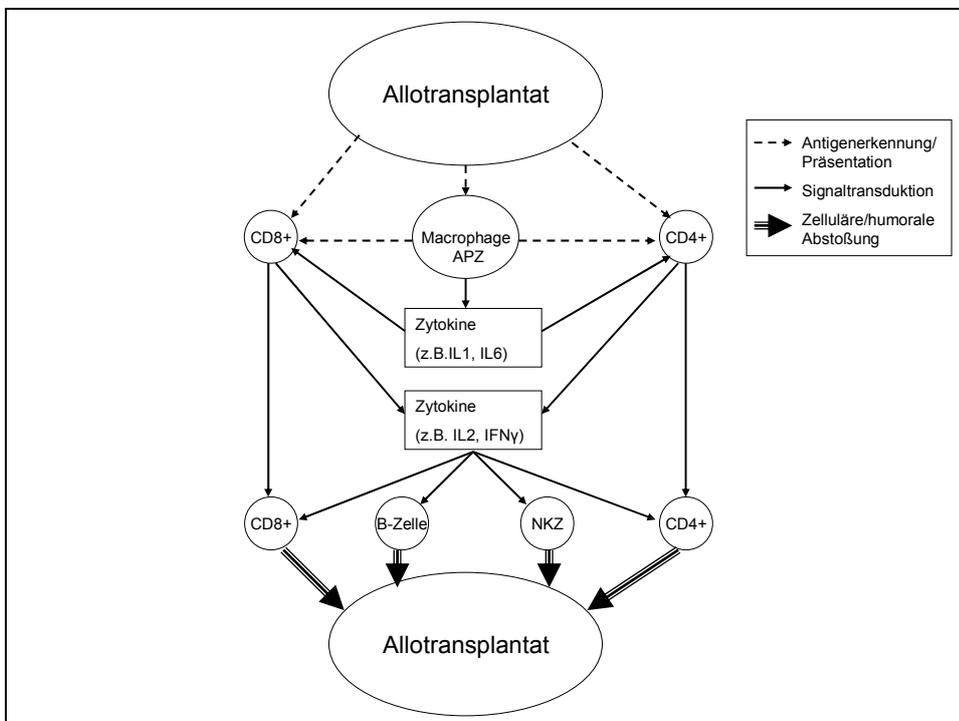


Abbildung 1. Vorgänge bei der akuten Abstoßung. Die Antigenpräsentierende Zelle (APZ) prozessiert das Fremdantigen und präsentiert es den Lymphozytenpopulationen, einige Lymphozyten erkennen die Fremdantigene eventuell direkt. Über Zytokinausschüttung und Kostimulation differenzieren und proliferieren entsprechende Klone von B- und T-Zellen, welche das Graft schädigen.

In **Abbildung 1** findet sich eine schematische Darstellung der bei der akuten Abstoßung ablaufenden Vorgänge so wie sie von Suthanthiran und Strom für Nierentransplantate vorgeschlagen wurde (Suthanthiran et al. 1994). Die antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des Empfängers präsentieren das prozessierte Fremdantigen über die MHC Komplexe I und II den CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Gleichzeitig erfolgt eine Kostimulation der T-Lymphozyten durch Sekretion von Interleukin 1-6. Wahrscheinlich erkennen einige T-Lymphozyten direkt das Fremdantigen ohne den Umweg über die APZ (hier dargestellt durch die direkten Pfeile von Allotransplantat zu Lymphozyt). Die aktivierten CD4⁺ Helferzellen und einige CD8⁺ Zellen sezernieren nun IL-2 wodurch es zur Proliferation und Differenzierung von T-Effektorzellen, B-Zellen und NK-Zellen kommt. Im Ganzen gesehen kommt es durch die Zytokinproduktion und die Bereitstellung aktivierungs-induzierter Membranrezeptoren letztendlich zu einer klonalen Expansion von infiltrativen, antigenspezifischen Zellen, welche das Transplantat zerstören. Die von den aktivierten Makrophagen und Lymphozyten freigesetzten Moleküle TNF α und INF γ verstärken die ICAM-1 Expression am Transplantatendothel, erleichtern somit das Einwandern der alloreaktiven Lymphozyten und erhalten die Entzündungsreaktion aufrecht. Komplementaktivierung und Anti-HLA Antikörper können ebenso beteiligt sein. Es entwickelt sich eine Mikrozirkulationsstörung mit Mikrothrombenbildung und Arteriitis der Mesenterialgefäße welche in Transplantatdysfunktion mündet.

Die wichtigste Phase bei der Organtransplantation im Allgemeinen und der Dünndarmtransplantation im Besonderen ist die Phase kurz nach der Operation bis zu 60 Tagen postoperativ. Hier entscheidet sich, inwieweit eine klonale Erschöpfung mit nachfolgender Toleranz zustande kommt (Starzl 2004). Ist das Immunsystem des Empfängers zu stark und überwiegt die Host-versus-Graft-Disease, so kommt es zu einer T-Zell vermittelten Reaktion gegen die Zellen des Spenders im Rahmen einer akuten Abstoßung. Die akute Abstoßung des Transplantates korreliert ihrerseits direkt mit der motorischen Funktion des Transplantates (Alessiani et al. 2003). Die akute Abstoßung führt in der Mukosa des Transplantates zu einer deutlichen Aufregulation der Apoptose (Fishbein et al. 2004). Wenn diese Aufregulation der Apoptose auch in der Tunica muscularis in den geplanten Experimenten festgestellt werden könnte, wäre dies ein weiterer Hinweis für die prognostische Bedeutung der immunologischen Vorgänge in der Muskularis.

1.5 Hypothesen und Einordnung der Arbeit

Aufgrund des vorher Gesagten nehmen wir erstens an, dass es Überschneidungen zwischen der unspezifischen Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis und der akuten Transplantatabstoßung gibt. Wir vermuten, dass die sich während der Transplantation entwickelnde Entzündung in der Tunica muscularis über eine Aktivierung der residenten Makrophagen und die lokale Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zu einer schnellen Einwanderung alloreaktiver Leukozyten in das Transplantat führt. Die Beeinflussung dieser initialen Entzündung könnte somit einen günstigen Einfluss auf das Auftreten beziehungsweise die Ausprägung einer akuten Abstoßung haben.

Zweitens stellen wir die Hypothese auf, dass die Tunica muscularis ein immunologisch aktives Kompartiment darstellt, in welchem Abstoßungsvorgänge ablaufen und aufrechterhalten werden, nachdem die Mucosa durch den Ischämie- und Reperfusionsschaden bereits schwerwiegend geschädigt und partiell denudiert worden ist.

Darüberhinaus postulieren wir eine Dyskontraktilität des Grafts während der akuten Abstoßung, hervorgerufen durch die Überexpression des kinetisch aktiven Mediators iNOS mit sukzessiver NO Freisetzung und die abstoßungsinduzierte Apoptose in der Tunica muscularis.

Um diese Hypothesen untersuchen zu können, bedurfte es eines Tiermodells, in dem reproduzierbar eine akute Abstoßung beobachtet werden kann. Die akute Abstoßung sollte dann auf mehreren Ebenen charakterisiert und in ihrem Verlauf beurteilt werden um später günstige Modifikationen nachweisen zu können. Insbesondere sollte die postoperative Entzündung in ihrem zellulären und molekularen Ablauf erfasst werden und dann der Beginn, Verlauf sowie die Ausprägung der akuten Abstoßung in der Tunica muscularis untersucht werden.

Dieses Abstoßungsmodell und seine Charakterisierung unter besonderer Berücksichtigung der Tunica muscularis ist Hauptbestandteil der vorliegenden Dissertation, es dient im weiteren Verlauf als Pilotstudie für weitere Untersuchungen der DFG geförderten klinischen Forschungsgruppe (KFO 115 / Teilprojekt 3). Die Charakterisierung umfasste folgende Parameter: Auswertung der motorischen Funktion der Transplantate mit in-vitro Kontraktilitätsmessungen, histochemische und immunhistochemische Untersuchungen der Transplantate, histologische Untersuchung mit Grading der akuten Abstoßung, Untersuchung der Apoptoseraten in der Muskularis und Mukosa mittels TUNEL-Test, Real-Time RT PCR der mRNA von Entzündungsmediatoren, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und apoptose- sowie abstoßungsassoziierter Mediatoren. Die Quantifizierung der motorischen Funktion der Transplantate ist insofern von Bedeutung, da, wie eingangs erwähnt, eine schlechte Motilität über verschiedene Mechanismen das Transplantatversagen begünstigen kann. Insbesondere

sollte an dieser Stelle der Einsatz von iNOS-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit bezüglich einer Motilitätsverbesserung überprüft werden. Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen der Transplantate sollten semiquantitativ Aufschluss über Qualität und Quantität der im Rahmen der Entzündung und Abstoßung stattfindenden Zellinfiltration in die Darmwand geben. Im zeitlich frühen Fenster nach Operation sollte die Einwanderung von MPO+ Zellen (vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten) gezeigt werden. Die Monozyten- (ED1) und Makrophageninfiltration (ED2) sollte separat nachgewiesen werden, da in Voruntersuchungen die zentrale Rolle der Muskularis-Makrophagen bereits gezeigt werden konnte. Im Rahmen der Charakterisierung immunologischer Vorgänge sollte die Infiltration mit CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in die Muskularis ebenfalls aufgezeigt werden. Ein histologisches Grading war notwendig um das Auftreten von akuter Abstoßung sicher zu erfassen und in seiner Ausprägung zu bestimmen. Von besonderem Interesse war, die Apoptoserate innerhalb der Muskularis und der Mukosa mittels TUNEL-Test zu quantifizieren. Die Apoptose der Mukosakrypten ist beim Grading der Abstoßung ein bekanntes Phänomen und ein zentrales Kriterium. Wir wollten hierbei untersuchen, ob die Apoptoserate in der Muskularis in ähnlicher Weise bei der Abstoßung erhöht ist. Als viertes Element der Abstoßungscharakterisierung sollten in der Real-Time RT PCR Veränderungen im mRNA Expressionsmuster in der Muskularis untersucht werden. Analog zur in-vitro Kontraktilitätsmessung wurde die Expression der induzierbaren NO-Synthetase iNOS in der Muskularis untersucht. Desweiteren erfolgte eine Messung des Expressionslevels des Entzündungsmediators IL-6 um den Grad der ablaufenden Inflammation abschätzen zu können. Das, für das Haften der Leukozyten am Endothel im Rahmen von entzündlichen Prozessen wichtige Adhäsionsmolekül ICAM 1 und das, für die Chemotaxis von Monozyten eine Rolle spielende Chemokin MCP 1 wurden untersucht, um nähere Hinweise zu der stattfindenden Zellinfiltration zu erhalten. Auch als Basis für in Zukunft geplante, weitere immunologische Fragestellungen wurden IL-2 und IL-10, IFN γ , TNF α bezüglich mRNA Expression untersucht. Interleukin 2 mRNA Expression wurde gemessen, da IL-2 Hauptangriffspunkt der Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus ist, T-Zell Proliferation induziert und der NF κ B Signaltransduktionsweg zur Zeit eine viel diskutierte Rolle in der Abstoßungsforschung spielt. IL-10 wurde als gegenregulatorisches Element zu Interferon γ im Rahmen der Makrophagenaktivierung und Abstoßung untersucht und TNF α schließlich als einer der möglichen Induktoren einer verstärkten Apoptose. Die genaue Rolle der erwähnten Moleküle ist nur teilweise bekannt und offenbar vielschichtig, weshalb an dieser Stelle ein allgemeiner Hinweis auf die zugrunde liegenden Überlegungen genügen muss.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Die Versuche wurden an Lewis und Brown Norway Ratten (Charles River Laboratories, Inc.) durchgeführt. Die Tierversuche wurden mit der örtlichen Ethikkommission abgestimmt und eine Genehmigung lag bei der Bezirksregierung Köln vor (50.203.2-BN 21, 20/02). Die Tiere wurden vorschriftsmäßig gehalten, mit einem 12h Tag/Nacht Rhythmus, Standard-Tierfutter und Wasser ad libitum.

2.2 Gruppen und immunologisches Modell

Das verwendete Modell, nämlich Darm aus Brown Norway Ratten implantiert in Lewis Ratten, wird als allogenes „high responder model“ beschrieben. Die Stärke der Abstoßung ist etwas geringer als in der Kombination Lewis → Brown Norway. Graft versus Host Disease (GvHD) kommt in dem von uns untersuchten Zeitrahmen so gut wie nicht vor (Murase et al. 1993). Es wurden keine Immunsuppressiva eingesetzt mit dem Ziel den Zeitpunkt des Auftretens und die Stärke der akuten Abstoßung insbesondere in der Tunica muscularis eindeutig untersuchen zu können. Für die allogenen transplantierten Gruppen von je 5 Tieren (n=5) fungierten Brown-Norway Ratten als Spender und die Lewis Ratten als Empfängertiere (BN→Lew). 24h, 96h und 168h post transplantationem wurden die Tiere geopfert um die Transplantate funktionell, histologisch, mittels SYBR Green RT-PCR, histochemisch und immunhistochemisch zu untersuchen. Als Kontrollgruppen dienten sowohl eine Gruppe von Brown-Norway Ratten (N=6) deren Darm nativ, d.h. ohne Trauma, entnommen wurde, als auch zwei isogen transplantierte Gruppen (2X BN→BN, n=5) die auch 24h bzw. 168h beobachtet wurden.

2.3 Operation

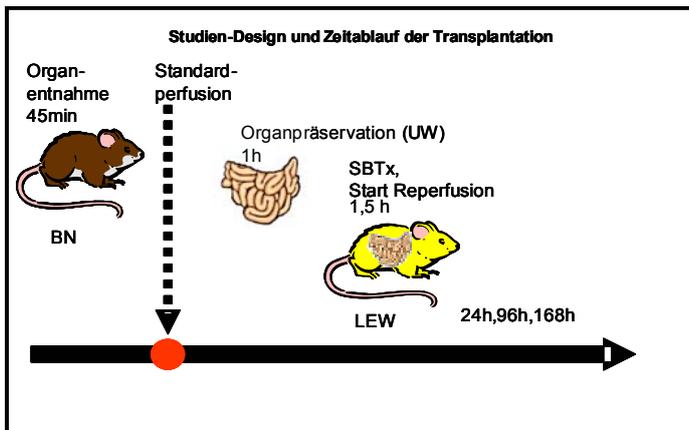


Abbildung 2. Die Spenderorgane wurden aus Brown Norway Ratten entnommen, mit Ringer Lactat Lösung perfundiert und ca. 1h auf Eis in University of Wisconsin (UW) Lösung aufbewahrt bis sie in die Lewis Empfänger (allogene Gruppen) implantiert wurden. Die Nachbeobachtungszeit betrug einen, vier und sieben Tage.

2.3.1 Entnahmeoperation

Die Transplantationen wurden von Dr. med. Nico Schaefer und Kazunori Tahara, MD PhD durchgeführt. In Isofluran Narkose erfolgte die transversale Laparotomie. Das Dünndarmkonvolut wurde in mit NaCl befeuchtete Tupper geüllt und auf die rechte Seite ausgelagert. Das Bindegewebe zwischen Pankreas und Kolon wurde stumpf mittels eines Wattestäbchens abpräpariert und das Pankreas in Richtung Duodenum verlagert. Die A. und V. colica dextra wurden dargestellt und nach Ligation mit 6-0 (Seide) durchtrennt. Das Dünndarmkonvolut, geüllt in feuchte Tupper, wurde nun auf die linke Seite ausgelagert. Die A. und V. colica media wurden mittels stumpfer Präparation dargestellt und nach Ligation mit 6-0 (Seide) durchtrennt. Das Dünndarmkonvolut wurde wieder nach rechts gelagert, die A. und V. ileocolica aufgesucht und nach Ligation mit 4-0 (Seide) durchtrennt. Das anale Ende des terminalen Ileums wurde kurz proximal des Cäcums durchtrennt und das gesamte Kolon entfernt. Ein langes Segment der Aorta abdominalis mit Abgang der A. mesenterica superior wurde durch Ligieren und Durchtrennen der A. renalis dextra mobilisiert. Ggf. war auch eine Durchtrennung der A. renalis sinistra erforderlich, immer jedoch eine Unterbindung mit 7-0 (Seide) und Durchtrennung der Lumbalarterien dieses Segmentes, um Blutungen zu minimieren. Die V. portae wurde vom Pankreas getrennt. Alle kleinen Gefäße zwischen Pankreas, Aorta, V. portae und V. splenica wurden sorgfältigst mit 7-0 (Seide) ligiert und durchtrennt. Das orale Ende des Duodenums wurde kurz distal zum ersten Abgang der A. und V. jejunalis durchtrennt. Die Cisterna chyli und

das sie umgebende Gewebe zwischen A. mesenterica superior und Truncus coeliacus wurde mit 6-0 (Seide) ligiert und reseziert. 1 ml NaCl mit 200 Einheiten Heparin wurde vor der Entnahme des Spenderorgans in die Penisvene injiziert. Die Aorta wurde zwischen Abgang der A. mesenterica superior und Truncus coeliacus mit 4-0 (Seide) ligiert und distal durchtrennt. Die V. portae wurde ebenfalls durchtrennt. Der Spenderdünndarm und seine versorgenden Gefäße wurden en bloc entnommen. Ein geringes Volumen von 5-7 ml kaltem Ringer Lactat wurde vom Aortencuff in das Graft injiziert und 20 ml Neomycinsulfat (0,5 %) wurden zur Spülung des Darmlumens verwendet, wobei Überdehnung des Dünndarms vermieden wurde. Das Graft wurde sofort in University of Wisconsin Lösung bei 4°C gelagert.

2.3.2 Empfängeroperation

In Isofluran Narkose erfolgte die mediane Laparotomie und der Dünndarm des Empfängertieres wurde in mit NaCl befeuchtete Tupfer gehüllt und ausgelagert. Das gesamte Jejunum und Ileum des Empfängers wurden bis auf 2-3 cm reseziert. Die verbleibenden Darmanteile wurden in feuchte Tupfer gehüllt und kranialwärts verlagert. Der Retroperitonealraum wurde eröffnet und Aorta und V. cava inferior wurden aufgesucht und von Ihren Abgängen und umgebendem Gewebe distal des Abgangs der A. renalis sinistra befreit. Sowohl Aorta als auch V. cava inferior wurden proximal und distal mit zwei gekurvten Bulldog Klemmen abgeklemmt. Die Aorta wurde mit dem Mikroskalpell eröffnet und die Öffnung durch eine longitudinale Arteriotomie mit der Mikroschere erweitert. Das Graft wurde aus der kalten UW-Lösung genommen, in mit 4°C NaCl getränkte Tupfer gehüllt und auf der Flanke des Empfängers plaziert. Die End-zu-Seit Anastomose zwischen der A. mesenterica superior des Spenders und der Aorta des Empfängers wurde mit fortlaufender 10-0 Nylon Naht durchgeführt. Zuerst wurde die Vorderwand vernäht, dann der Darm auf die linke Seite verlegt und die Naht der Rückwand vollendet. Eine longitudinale Venotomie der V. cava inferior wurde mit der Mikroschere vorgenommen. Die V. portae des Spenders wurde End-zu-Seit mit der V. cava inferior des Empfängertieres anastomosiert. Wiederum wurde fortlaufende 10-0 Nylon Naht verwendet, zunächst die Rückwand von innen vernäht, folgend die Naht der Vorderwand von aussen. Die distale Bulldogklemme wurde zuerst entfernt, als zweites die proximale Klemme. Nun wurden die in situ verbleibenden Darmanteile des Empfängers in die Bauchhöhle rückverlagert. Die End-zu-End Darmanastomosen wurden mit einer Lage Vollschicht Naht in der Stärke 6-0, absorbierbar, durchgeführt. Nun wurde das Graft in der Bauchhöhle plaziert wobei auf ungehinderten Blutzufluss und gute venöse Drainage durch die Gefäße geachtet wurde. Abdominalschichten und Haut wurden mit 3-0 Seide verschlossen.

2.4 Probenentnahme

In Isofluran Narkose wurde die mediane Laparotomie wiedereröffnet und das Transplantat entnommen. Desweiteren wurden eine Serumblutprobe, die Milz, mesenteriale Lymphknoten, Teile der Lunge und Leber und des verbliebenen Empfängerdünn darmes entnommen und nach Schockgefrieren in Flüssig-Stickstoff (-195°C) im Tiefkühlschrank bei -80°C asserviert. Das Transplantat und der Restabschnitt des Empfängerdünn darmes wurden in ca. 5 cm lange Segmente geteilt und während der Weiterverarbeitung auf Eis in KRBS/Ringer Lösung aufbewahrt. Um das Mesenterium zu entfernen wurden die Segmente in einer mit Sylgard® gefüllten Glasschale aufgespannt. Das Material für die RT-PCR wurde wie folgt gewonnen: Nach dem Aufziehen der Segmente auf eine Stricknadel erfolgte eine Inzision mit dem Skalpell an der mesenterialen Grenze. Mit Watteträgern wurde die Muskularis von der darunterliegenden Mukosa abgeschert. Muskularis und Mukosa wurden getrennt in Eppendorf Gefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert.

Muskularis Präparate (Whole Mounts) für die Histochemie wurden hergestellt, indem Dünndarmsegmente entlang der mesenterialen Grenze inzidiert, in Sylgard® Schalen aufgespannt und nun unter dem Mikroskop die Mukosa abpräpariert wurde (Kalff et al., 1998). Die so gewonnenen Whole Mounts wurden entweder für 10min in 100% EtOH fixiert und direkt mit einer Myeloperoxidase Färbung nach (Hanker et al. 1977) gefärbt, oder für spätere immunhistochemische Färbungen in BSA/Penicillin/Streptomycin KRBS Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.5 RNA Extraktion und Reverse Transkription

Aus den bei -80°C gelagerten Muskularis Proben wurde mittels eines Kits (Rneasy Mini Extraction, Cat. No. 74106, Fa. Qiagen) nach Protokoll des Herstellers RNA extrahiert. Ein DNase-Verdau entfernte mögliche Reste genomischer DNA (DNA-free, Cat. No. 1906, Fa. Ambion). Es folgte die photospektrometrische Messung der eluierten RNA bei 260 und 280 nm und eine Verdünnung auf 40ng/µl. Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurden nun Aliquots à 5µl (200ng RNA) eingesetzt (Omniscript RT, Fa. Qiagen).

2.6 SYBR-Green-Real-Time RT-PCR

Die Real Time RT-PCR mit SYBR-Green erfolgte auf einem AbiPrism 7700 Sequence Detection System (Schmittgen et al. 2000). Gewählt wurde eine relative Quantifizierungsstrategie, welche die in der Probe vorhandene RNA Menge eines Zielgens als Vielfaches eines Houskeeping Genes (GAPDH) darstellt (Türler et al. 2002c, Türler et al. 2002b, Türler et al. 2002a). Alle verwendeten Primer wurden vom Autor einem Effizienztest unterzogen oder die Effizienz war aus

Vorversuchen bekannt (Türler et al. 2002c, Türler et al. 2002b, Türler et al. 2002a). Die mathematische Kalkulation der Expressionslevel erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode (User Bulletin Nr.2 Abi Prism 7700 Detection System).

2.6.1 Verwendete Primer

Die Primer in **Tabelle 2** wurden Publikationen entnommen (Kita et al. 1992, Kosuga et al. 1994, Northemann et al. 1989, Yoshimura et al. 1991) oder mit den Programmen „Primer 3“ und „Primer Express“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aus den entsprechenden Gensequenzen (aus Pubmed Nucleotide von <http://www.pubmed.com/nucleotide>) designt und mit der Amplifikation einer Verdünnungsreihe auf ihre Effizienz getestet.

Zielgen	Primer-Sequenzen (5' nach 3')	
	Antisense	Sense
IL 6	TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA
IL 2	ATTTTCCAGGCACTGAAGATGTTT	CCCCATGATGCTCACGTTTA
IL 10	TCTTGGAGCTTATTAATAATCATTCTTC	CGACGCTGTCATCGATTCTC
IFN γ	CTGGCTCTCAAGTATTTTCGTGTTAC	AGTCTGAAGAACTATTTTAACTCAAGT AGC
TNF α	CACGCTGGCTCAGCCACTC	GGTATCGGTCCCAACAAGGA
INOS	CCATGCATAATTTGGACTTGCA	GGAGAGATTTTTCACGACACCC
ICAM1	TTAGGGCCTCCTCCTGAGC	CGTGGCGTCCATTTACACCT
COX2	AAGGATTTGCTGCATGGCTG	CTCTGCGATGCTCTTCCGAG
MCP1	AGCCGACTCATTGGGATCAT	CAGCCAGATGCAGTTAATGCC
FasL	TTGGAATGGGGTTAGGAAT	AGGCTGTGGTTGGTGAAC
GapDH	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	ACGGCACAGTCAAGGCTGAGA

Tabelle 2. Sequenzen der in der SYBR Green Real-Time RT-PCR verwendeten Primerpaare

2.6.2 PCR Bedingungen

Jede Proben-Analyse wurde im selben Reaktionsansatz doppelt durchgeführt. Das PCR Reaktionsgemisch wurde unter Verwendung der „SYBR Green PCR Core Reagents“ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hergestellt. Die PCR-Konditionen wurden entsprechend der Empfehlungen des Herstellers gewählt. Zunächst erfolgte eine Inkubation bei 50°C für 2 Minuten

zur Aktivierung der Uracil N'-Glykosylase und dann für 10 min bei 95°C, um die Amplitaq Gold Polymerase zu aktivieren. Dann folgten 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec and 60°C für 1 min. Nach Einführung der ABI „Sequence Detection System“ Software 1.7 für den ABI PRISM 7700 wurde am Ende der PCR ein Dissoziationskurvenprotokoll angewendet. Es zeigten sich bei allen verwendeten Primern spezifische und einzelne Schmelzkurvengipfel. Die Real-Time Daten wurden als Fluoreszenz-Signal (ΔR_n) versus Zyklus Nummer dargestellt. Der Schwellenwert wurde in die Mitte des linearen Anteils der Amplifikationskurven gelegt (Zyklus versus $\log \Delta R_n$) (Schmittgen et al. 2000). Der Schwellenwert-Zyklus (CT) entspricht dem Zykluswert, an dem die Amplifikationskurve den festgelegten Schwellenwert kreuzt. Die relative Quantifikation wurde dann unter Verwendung der vergleichenden $\Delta\Delta CT$ -Methode durchgeführt (Schmittgen et al. 2000) (siehe auch User Bulletin #2, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die PCR wurde mit einem Probenvolumen von 10 μ l durchgeführt.

2.7 Histopathologie

2.7.1 Gewebeaufbereitung für Histologie, Tunel Test und Immunhistochemie

Die Transplantate wurden entsprechend der Gruppeneinteilung nach 24h, 96h und 168h entfernt. Als Kontrollen dienten nativ entnommener Dünndarm von Brown Norway Ratten sowie isogen transplantierte Brown Norway Ratten mit Entnahme nach 24h und 168h. Mehrere 3mm lange Stücke des Transplantates bzw. des nativen Dünndarms wurden in 4 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dabei wurden die Stücke aufgestellt, sodass der Darm im Querschnitt histologisch beurteilt werden konnte.

2.7.2 Histopathologische Bewertung

Von den Paraffinblöcken wurden Schnitte angefertigt und für das histologische Grading der Abstoßung Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Präparate wurden vom Autor und einem unabhängigen Pathologen (Prof. Dr.med Axel Wellmann, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Aachen) hinsichtlich des Auftretens einer akuten Abstoßungsreaktion beurteilt. Zugrundegelegt wurde hierbei ein Gradingsschema welches auf Untersuchungen von Rosemurgy und Schraut (1986) basiert und für das Monitoring humaner Transplantate in der Klinik eingesetzt wird (Rosemurgy et al. 1986, Wu et al. 2003). Dieses Schema sieht eine Einteilung der akuten Abstoßung in vier Schweregrade vor. Es folgen die Definitionen: Bei Grad 1 liegen unbestimmte Veränderungen vor (Indeterminate for ACR), es kann keine akute Abstoßung morphologisch festgestellt werden. Minimales entzündliches Infiltrat kann vorhanden sein, an den Krypten können minimale Schädigungen vorliegen, apoptotische Körperchen im Kryptenepithel können in erhöhter Zahl vorhanden sein (in der Regel mit <6

apoptotischen Körperchen / 10 Krypten). Gestörte Kryptenarchitektur liegt in der Regel nicht vor, es findet sich keine Ulzerierung der Mukosa. Bei Grad 2 wird eine milde akute Abstoßung diagnostiziert (Mild ACR). Hier liegt ein mildes, lokal begrenztes, Infiltrat mit aktivierten Lymphozyten vor. Es finden sich leichte Verletzungen des Kryptenepithels mit einer erhöhten Apoptoserate des Kryptenepithels (in der Regel mit >6 apoptotischen Körperchen / 10 Krypten). Die Kryptenarchitektur kann etwas gestört sein, es finden sich aber keine Ulzerationen. Bei Grad 3 (Moderate ACR) ist der Schaden am Transplantat deutlich erkennbar. Ein weit verstreutes inflammatorisches Infiltrat in der Lamina propria, diffuse Schädigung des Kryptenepithels, eine massiv erhöhte epitheliale Apoptoserate mit konfluierenden Apoptosezonen sowie eine deutliche Störung der Kryptenarchitektur sind erkennbar. Eine intimale Arteriitis der Gefäße ist in Einzelfällen sichtbar, Ulzerationen finden sich nicht. Bei der schweren akuten Abstoßung des Grad 4 (Severe ACR) sind alle Befunde des Grad 3 vorhanden, hinzu kommen Ulzerationen der Mukosa sowie das morphologische Korrelat einer schweren intimalen oder transmuralen Arteriitis mit Mikrothromben. Diese ist am besten in den Gefäßen des Mesenteriums zu erkennen. Anhand einer Checkliste wurden die Befunde für jedes Präparat festgehalten und separat evaluiert.

2.8 *Histochemie und Immunhistochemie*

2.8.1 *Histochemie*

Die Infiltration der Muskularis mit Neutrophilen und Monozyten wurde mit einer Myeloperoxidase-Färbung unter Verwendung der Hanker-Yates-Reaktion nachgewiesen (Fishbein et al. 2003). Hierzu wurden Whole Mounts in einer Mischung von 30mg Hanker-Yates Reagenz (Polysciences, Inc.), 30ml KRBS und 300µl einer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 Minuten inkubiert, mit Ethanol fixiert und mit KRBS gewaschen. Die so angefärbten WM-Präparate wurden zur Auswertung unter dem Mikroskop auf einen Objektträger aufgezogen, mit Aquatex eingedeckelt und mit 200X Vergrößerung fotografiert. Ausgezählt wurden 5 randomisierte Quadrate von 100x100µm und es erfolgte eine Angabe von MPO+ Zellen/100 µm².

2.8.2 *Immunhistochemie*

Zur Quantifizierung der Infiltration der Muskularis mit Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Oberflächenantigene ED1, ED2 sowie CD4 und CD8 mit Antikörpern durchgeführt (Serotec). Diese Antikörper gegen ED1 und ED2 sowie CD4 und CD8 entstammten der Maus und waren gegen rattenspezifische Antigene gerichtet (Maus versus Ratte). Als sekundäre Antikörper wurden CY3 markierte Antikörper (Jackson Immuno Research, Esel versus Maus) und Alexa 488 (Kaninchen versus Maus) verwendet (Türler et al. 2002a). Die in BSA/Penicillin/Streptomycin Lösung bei 4°C konservierten

Whole Mounts wurden über Nacht in einer 1/100 verdünnten Lösung des 1. Antikörpers suspendiert. Am nächsten Tag erfolgten 3 jeweils 5 minütige Waschgänge in PBS Puffer und danach eine 4 stündige Inkubation mit dem 2. Antikörper. Nach 3 nochmaligen Waschschrritten wurden die Präparate auf Objektträger gebracht, eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Als zweite Technik wurden immunhistochemische Färbungen an den Paraffin fixierten Schnitten durchgeführt, verwendet wurde das LSAB 2 HRP Kit (Dako). Die Schnitte wurden nach Standardprotokoll entparaffiniert und 30 min in Citrat oder EDTA Puffer gekocht um die Antigene zu demaskieren. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Serotec), Verdünnung 1:100 (Dako Diluent) in der feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde in PBS-T (PBS Puffer mit Tween 1%) 10 min gewaschen und die endogene Peroxidase Aktivität mit H₂O₂ (3 %) geblockt. Nach erneutem Waschen wurde der biotinylierte Zweitantikörper aufgetragen und eine Stunde in feuchter Kammer inkubiert. Auf den nächsten Waschschrtritt folgte die 30 minütige Inkubation mit Streptavidin. Nach einem weiteren Bad in PBS-T wurde das chromogene AEC Substrat (Dako) aufpipetiert und unter mikroskopischer Kontrolle zwischen 3 und 5 min gefärbt. Als letzter Schritt wurde in Aqua dest. gespült und mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte analog zum Tunel Test wie unter Abschnitt 2.9 beschrieben.

2.9 Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling-Assay (TUNEL) zur lichtmikroskopischen Feststellung und Quantifizierung von Apoptose in der Tunica muscularis.

Verwendet wurde das „In situ cell death detection kit, AP“ der Firma Roche Biochemicals. Es basiert auf dem durch Transferase vermittelten Markieren freier 3' OH Enden genomischer DNA durch fluoreszenzmarkierte dUTP Moleküle, welche mit einem alkalische Phosphatase tragenden Antikörper enzymatisch visualisiert werden. In einer apoptotischen Zelle liegt die DNA zu einem Großteil in durch Endonukleasen fragmentierter Form vor und wird von dem System detektiert (Arends et al. 1990). Für den Tunel Test wurden 3-5µm dicke Schnitte angefertigt, die durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert wurden. Zur Anwendung kamen drei Xylol Bäder von sieben Minuten, 2 Bäder in EtOH 100% von fünf Minuten, ein Bad in EtOH 90%, ein Bad in EtOH 70% und zwei Waschgänge in Aqua dest. für gleichfalls 5 Minuten. Die Schnitte wurden nun auf dem Objektträger mit Diamantstift umkreist um eine gute Benetzung mit den Reagenzien zu gewährleisten. Alle folgenden Reaktionen wurden durch Aufpipettieren der Reagenzien gestartet und liefen in der Regel 30 Minuten in einer feuchten Kammer ab, darauf folgten immer zwei Waschgänge mit PBS Puffer für fünf Minuten. Als erster Schritt erfolgte eine Andauung der Schnitte mit „Proteinase K“ (Firma Roche Biochem.) in einer Verdünnung von 1:1000 in der

feuchten Kammer bei 37°C für 30 Minuten. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS Puffer (Firma Biochrom KG). Das als Positivkontrolle vorgesehene Präparat erhielt eine Behandlung mit DNase1 (Firma Ambion, 3 U/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschschriff. Unspezifische Reaktionen wurden mit fetalem Kälber Serum (Firma Biochrom, Verdünnung 1:25) blockiert, hierauf folgte kein Waschschriff sondern das fetale Kälberserum wurde durch Abklopfen entfernt. Das aufgetaute Tunel Reagenz wurde erst jetzt gemäß Anleitung gemischt. Nach Aufbringen des Gemisches katalysiert die im Reagenz enthaltene Terminale Transferase den Anbau fluoreszeimarkierter d-UTP an freie 3' OH Enden der genomischen DNA. Diese Reaktion erforderte 10 Minuten bei 37°C. Es folgten zwei Waschschriffe. Der anti-Fluoreszeim Antikörper wurde in einer mit Magermilchpulver gepufferten Lösung aufgetragen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschriffen erfolgte die Inkubation mit „Fast Red“ (Firma Biozol) als Substrat der alkalischen Phosphatase. Die Schnitte wurden abschließend 6 Minuten in Aqua dest. gewässert und mit Hämalan nach Mayer gegengefärbt. Nach dem Eindeckeln mit Aquatex (Firma Merck) stellen sich die Apoptosesignale rot und normale Zellkerne bläulich gefärbt dar. Die Auswertung erfolgte durch Fotografieren der Präparate bei 100facher Vergrößerung und Auszählung von fünf randomisierten 100µm*100µm großen Muskularisabschnitten. Abschließend wurde der Mittelwert gebildet und die Apoptoserate in der Muskularis als Signaldichte pro µm² angegeben.

2.10 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die üblichen Methoden zur Berechnung von Mittelwert (MW) Standardabweichung und „standard error of the mean“ (SEM) benutzt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer unter Microsoft Windows XP® und der Tabellenkalkulation Excel für Microsoft Windows XP® (Microsoft, Redmont, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows, Version 12.0 der Firma Lead Tools. Die stochastische Signifikanz oder Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels Student T-Test und Varianzanalyse (ANOVA) überprüft. Unterschiede bei einem p-Wert <0,05 wurden als signifikant angesehen, Unterschiede bei einem p-Wert von < 0,01 wurden als hoch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Phase der postoperativen Entzündung

3.1.1 Auf molekularer Ebene (SYBR Green RT PCR)

Am Anfang der pathophysiologischen Vorgänge, die sich innerhalb des Grafts abspielen, steht die akute Reaktion auf die Manipulation des Darmes und die Ischämie sowie Reperfusion. Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in einem isogenen Transplantationsmodell (LEW→LEW) (Schaefer et al. 2006a) ist bereits die Aktivierung der in der Transplantatmuskularis vorhandenen Makrophagen und die Rekrutierung von Entzündungszellen in die Tunica muscularis bekannt. Diese Vorgänge werden durch eine Aufregulation verschiedener Entzündungsmediatoren und Chemokine begleitet und eingeleitet. Im allogenen Modell der vorliegenden Promotionsarbeit (BN→LEW) finden diese Vorgänge zu Beginn der postoperativen Phase in ähnlicher Form statt. Im folgenden Abschnitt werden deshalb zunächst einige Ergebnisse der SYBR Green RT PCR für die Aufregulation dieser Mediatoren und Chemokine vorgestellt um die molekulare Ausprägung der Entzündung kurz nach der Transplantation in der Tunica muscularis aufzuzeigen. Sowohl bei dieser Untersuchung wie auch bei den Folgenden werden die Ergebnisse der allogenen transplantierten Gruppen (BN Spender-LEW Empfänger) mit den isogen transplantierten Gruppen (BN Spender-BN Empfänger) und der nicht transplantierten Kontrollgruppe (CTL) verglichen. Bei den isogenen Gruppen handelt es sich um eigens für diese Arbeit neu operierte Tiere, da in den Vorversuchen nur Lewis Ratten verwendet worden waren, alle hier untersuchten Grafts stammen somit aus BN Ratten. In **Abbildung 3** ist der für die Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten bedeutsame chemotaktische Faktor MCP1 in seiner mRNA Expression in der Tunica muscularis dargestellt. Es finden sich im Vergleich der allogenen gegen die isogen transplantierten Tiere zwei Maxima der MCP1 Expression: Sowohl nach 24h als auch nach 168h postoperativ zeigt sich bei den allogenen transplantierten Tieren ein Expressionsmaximum, welches sich signifikant von den isogenen Gruppen der gleichen Zeitpunkte unterscheidet. (AT-24: $27,45 \pm 4,02$ vs. IT-24: $12,1 \pm 1,3$, $p < 0,05$ und AT-168: $27,26 \pm 5,02$ vs. IT-168: $3,2 \pm 1,19$, $p < 0,05$). Die isogen transplantierten Tiere zeigen nach 24h ebenfalls eine signifikante Aufregulation der MCP1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. 168h postoperativ ist dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. (IT-24: $12,1 \pm 1,3$ vs. CTL: $1,12 \pm 0,61$, $p < 0,05$ und IT-168: $3,2 \pm 1,19$ vs. CTL: $1,12 \pm 0,61$, $p > 0,05$). Es zeigt sich also eine signifikante MCP1 Aufregulation nach 24h als ein Ausdruck der unspezifischen Entzündung in den isogenen und den allogenen Grafts der transplantierten Ratten. Bei den isogen transplantierten Tieren ohne Abstoßung ist nach 7 Tagen keine MCP1

Erhöhung mehr nachweisbar; bei der allogenen Gruppe hingegen erreicht MCP1 nach 7 Tagen mit Einsetzen der akuten Abstoßung ein zweites Maximum.

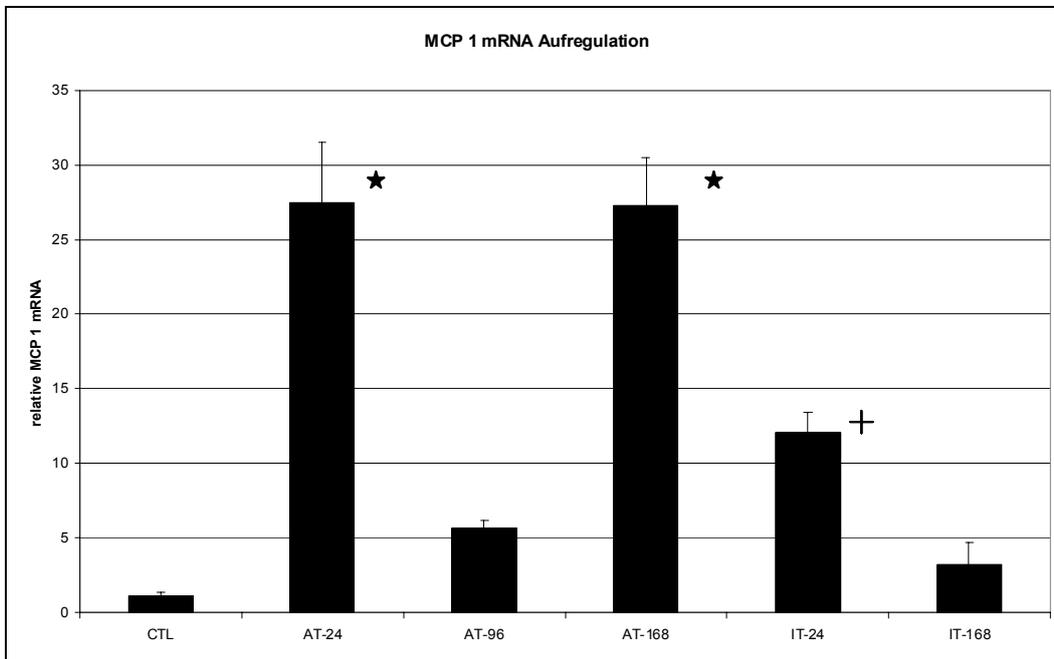


Abbildung 3: SYBR-Green RT-PCR für MCP 1 mRNA. Dargestellt ist die mRNA Expression in der Tunica muscularis der Kontrollgruppe (CTL) gegen die allogenen 24h, 96h und 168h Gruppen (AT-24, AT-96, AT-168; BN→LEW) sowie die isogenen Gruppen (IT-24, IT 168BN→BN). Nach 24h und nach 168h postoperativ zeigt sich bei den allogenen transplantierten Tieren ein Expressionsmaximum welches sich signifikant von den isogenen Gruppen der gleichen Zeitpunkte unterscheidet. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ AT vs. IT; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Die mRNA-Expression des für die leukozytäre Adhäsion wichtigen Faktors ICAM-1 in der Tunica muscularis ist in der **Abbildung 4** dargestellt. Auch hier zeigt sich eine signifikante Aufregulation in der Muskularis der operierten Tiere nach 24h gegenüber der Kontrollgruppe, vermutlich als Ausdruck der unspezifischen Entzündung in beiden Gruppen. Zwischen den allogenen und isogen transplantierten Tieren selbst ergibt sich 24h nach der Transplantation zunächst kein signifikanter Unterschied (AT-24: $2,32 \pm 0,25$ vs. IT-24: $2,6 \pm 0,31$, $p > 0,05$). Die ICAM-1 Expression in der Tunica muscularis erreicht wie die MCP1 Expression mit dem Einsetzen der Abstoßung nach 7 Tagen in der allogenen transplantierten Gruppe ihr Maximum. Dieses ist signifikant höher als bei den anderen Gruppen zu jedem Zeitpunkt. (AT-168: $5,57 \pm 0,68$ vs. IT-168: $1,89 \pm 0,21$, $p < 0,05$). Die allogenen Gruppen steigen also im zeitlichen Verlauf in der ICAM-1 Expression an während

in den isogenen Gruppen die ICAM-1 Expression im Verlauf nach 7 Tagen fast auf Normwerte sinkt.

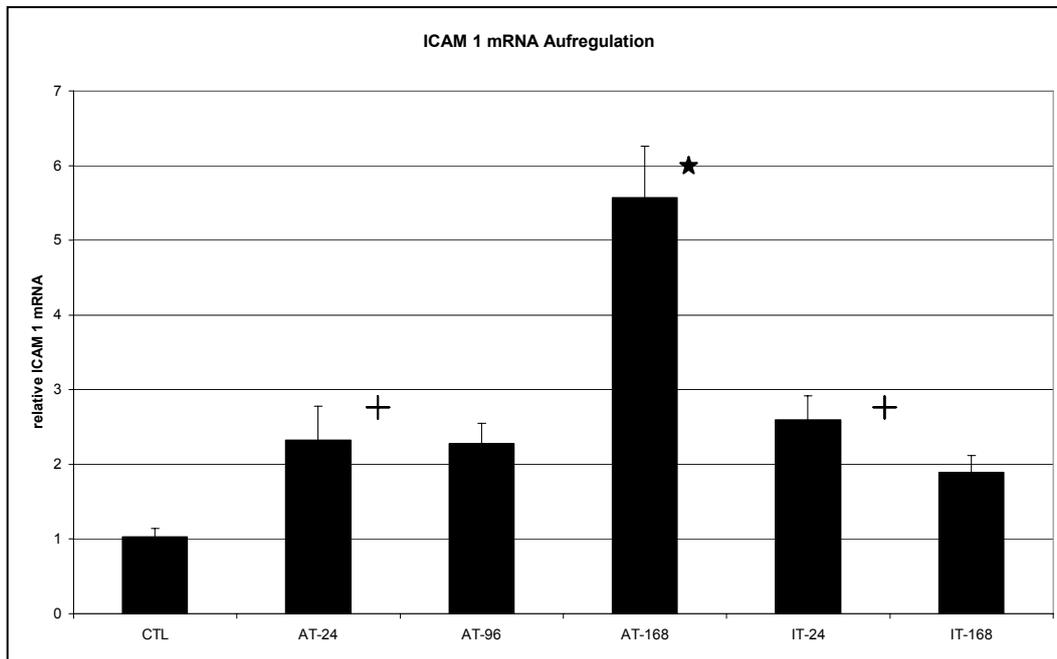


Abbildung 4. SYBR-Green RT-PCR für ICAM 1 mRNA. Dargestellt ist die mRNA Expression in der Tunica muscularis der Kontrollgruppe (CTL) gegen die allogenen 24h, 96h und 168h Gruppen (AT-24, AT-96, AT-168; BN→LEW) sowie die isogenen Gruppen (IT-24, IT 168BN→BN). In beiden 24h Gruppen zeigt sich in den transplantierten Tieren eine Aufregulation der ICAM 1 Expression welche sich signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet. Im Verlauf steigt die ICAM 1 Expression in der allogenen 7 Tagesgruppe auf ein Maximum an, während sie in der isogenen Gruppe fällt. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * p<0,05 AT vs. IT; + p<0,05 vs. Kontrolle).

Der Entzündungsmarker IL 6, in **Abbildung 5** in seiner mRNA-Expression dargestellt, zeigt einen ähnlichen Verlauf. Bei den allogenen transplantierten Tieren zwei signifikante Maxima gegenüber der Kontrolle, nach 24h und 168h. (AT-24: $255,18 \pm 86,37$ und AT-168: $223,0 \pm 57,12$ vs. CTL: $1,16 \pm 0,36$, jeweils p<0,05). Die AT-96h Gruppe zeigte keine signifikante Erhöhung der IL 6 Expression. Die isogene Gruppe zeigte nach 24h ebenso eine signifikante IL 6 Aufregulation, die im weiteren Verlauf nach sieben Tagen nicht mehr nachweisbar war. (IT-24: $108,37 \pm 24,26$ vs. CTL: $1,16 \pm 0,36$, p < 0,05 signifikant; IT-168: $10,24 \pm 5,42$ vs. CTL: $1,16 \pm 0,36$, p > 0,05 nicht signifikant).

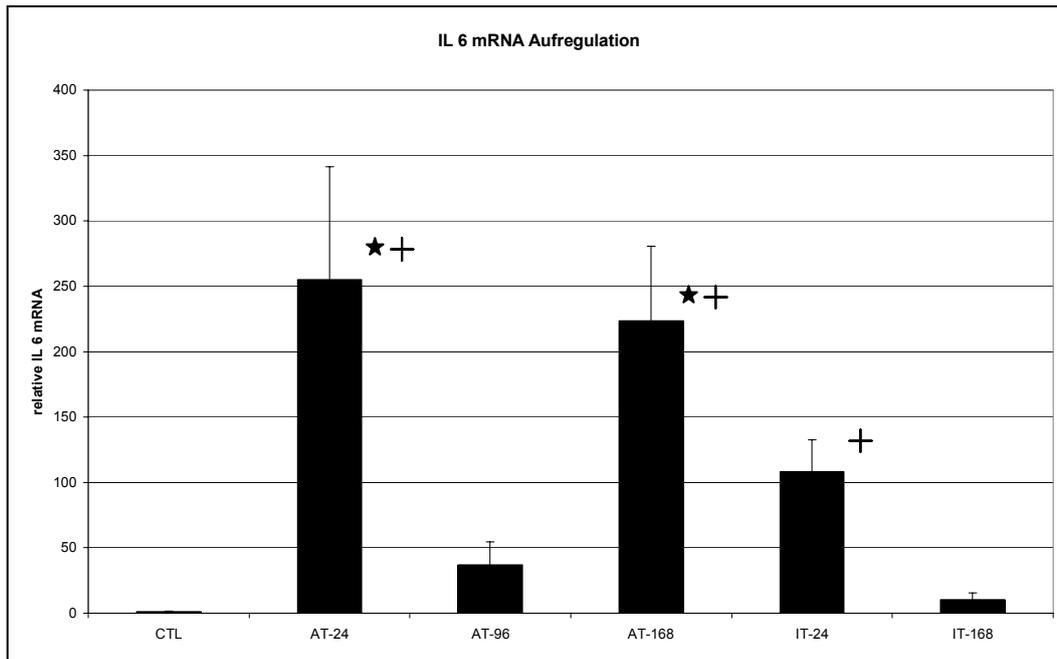


Abbildung 5. SYBR-Green RT-PCR für IL 6 mRNA. Wieder zeigt sich in beiden 24h Gruppen eine Aufregulation der IL 6 Expression welche sich signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet. Im Verlauf wird die IL 6 Expression in der allogenen 7 Tagesgruppe auf ein zweites Maximum aufreguliert, während sie in der isogenen 7 Tagesgruppe nicht aufreguliert wird. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ AT vs. IT; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.2 Auf zellulärer Ebene (Immunhistochemische und Immunfluoreszenz Färbungen)

Diese in der SYBR Green RT PCR erhobenen Befunde für die Mediatoren und Chemokine finden ihr Korrelat in der Infiltration der Muskularis mit Entzündungszellen. Für neutrophile Granulozyten und Monozyten, die insbesondere durch die Expression von MCP1 in ihrer Einwanderung in die Muskularis stimuliert werden, wurden jeweils eigene immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Türler et al. 2002c). Dargestellt in **Abbildung 6** ist die Infiltration der Muskularis mit MPO+ Zellen (insbesondere neutrophile Granulozyten), eingeteilt in allogene Gruppen (AT-24, AT-96, AT-168) und isogene Tiere (IT-24, IT-168) zu den verschiedenen Zeitpunkten, aufgetragen gegen die Kontrollgruppe. Nach 24h postoperativ ist eine signifikante Zunahme des Infiltrates zu erkennen (AT-24: $11,5 \pm 2,2$ Zellen/Feld vs. CTL: $3,8 \pm 1,2$ Zellen/Feld, $p < 0,05$). Die isogene 24h Gruppe zeigt ebenfalls eine vermehrte Infiltration. Diese ist statistisch jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. (IT-24: $8,6 \pm 2,8$ Zellen/Feld vs. CTL: $3,8 \pm 1,2$ Zellen/Feld, $p > 0,05$). Die allogene 24h Gruppe und die isogene 24h Gruppe unterscheiden sich untereinander in der Anzahl der MPO+ Zellen nicht signifikant. Ein

Infiltrationsmaximum mit MPO+ Zellen wird nach 96h allogener Transplantation gezählt. (AT-96: $18,6 \pm 1,7$ Zellen/Feld). Das MPO+ Infiltrat nimmt danach bei 7 Tagen postoperativ wieder signifikant ab (AT-168: $9,1 \pm 1,6$ Zellen/Feld vs. IT-168: $6,9 \pm 1,3$, $p < 0,05$). Dieser Befund korreliert gut mit der histologisch gemachten Beobachtung, dass es im Rahmen der initialen Entzündung und des Ischämie/Reperfusionsschadens zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten kommt, welche dann mit Beginn der akuten Abstoßung zunehmend durch lymphozytäre Zellen ersetzt werden.

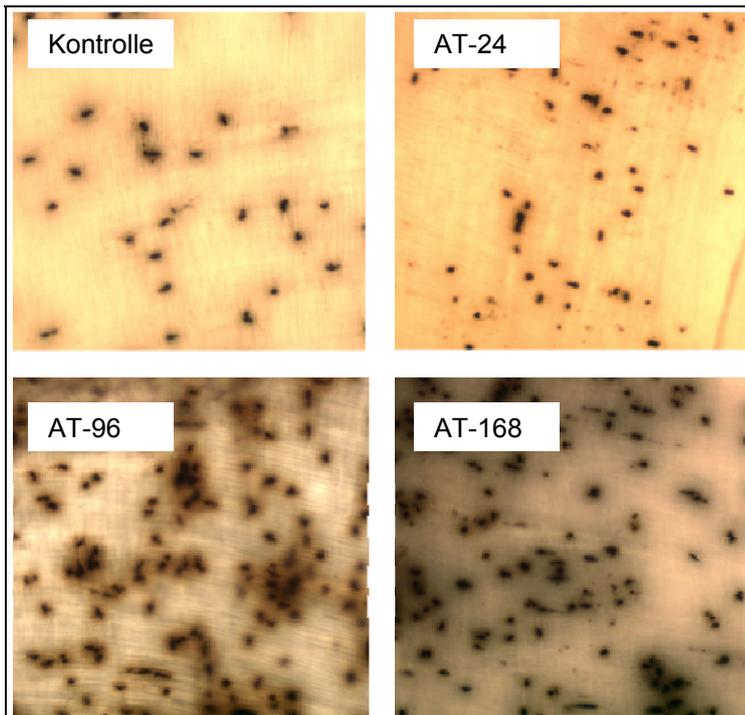
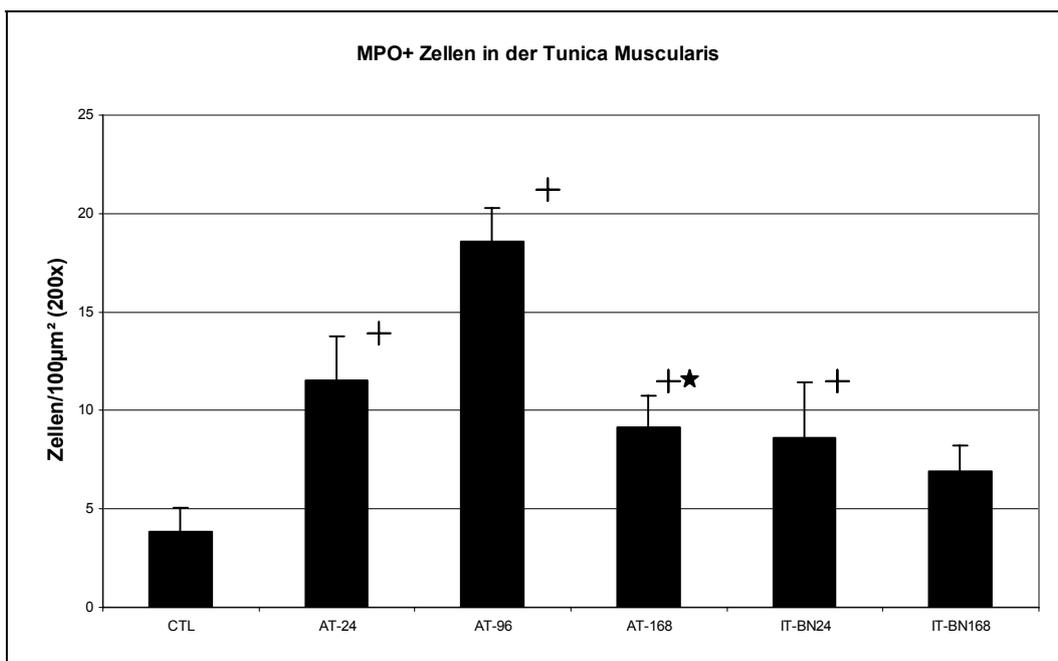
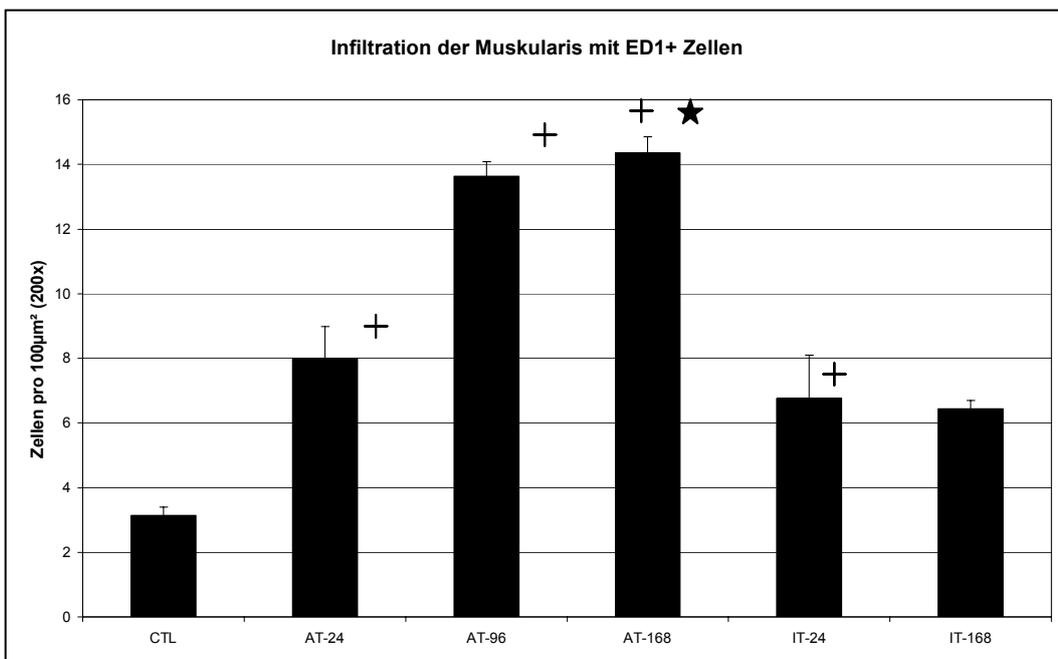
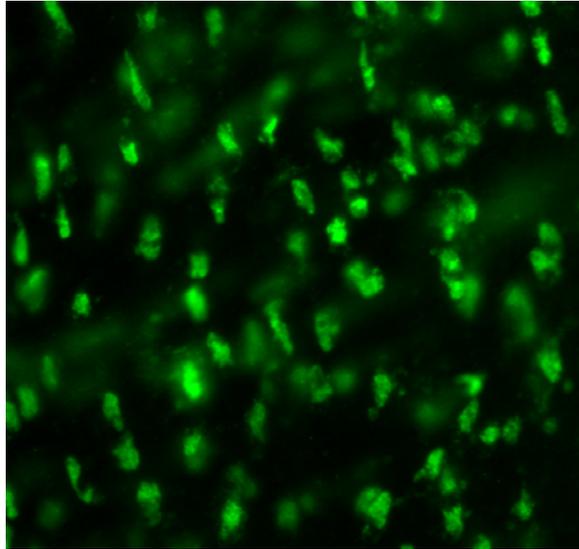


Abbildung 6. Myeloperoxidase Färbung nach Hancer-Yates. Dargestellt sind repräsentative Fotografien von Whole Mounts mit Zellinfiltration der Tunica Muscularis durch MPO+ Zellen (Neutrophile und Monozyten) sowie deren Auszählung in den Präparaten. Das Balkendiagramm gibt die Anzahl der Zellen auf $100\mu\text{m}^2$ ($200\times$ Vergrößerung) an, mit einem Fehlerbalken von \pm des SEM, * $p < 0,05$ AT vs. IT; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle.



Die Infiltration von Monozyten während der akuten postoperativen Entzündung und während des Abstoßungsvorganges wurde ebenso untersucht. In **Abbildung 7** ist die Infiltration der Muskularis mit ED1+ Zellen, einer Antikörper Färbung, die vor allem Monozyten und unreife Makrophagen anfärbt dargestellt.

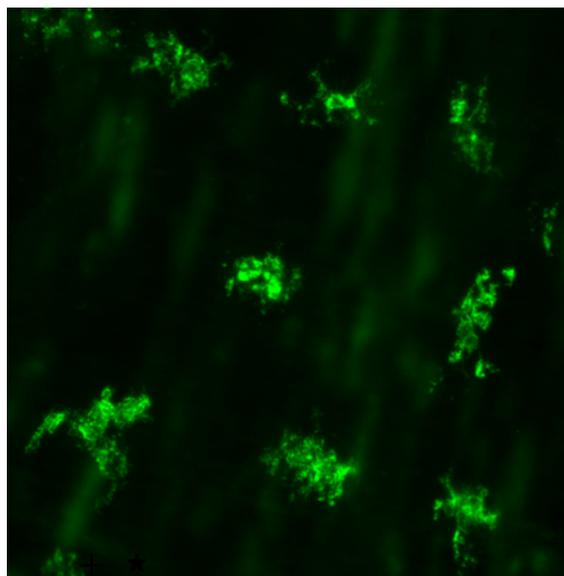
Abbildung 7: Deutliche Zellinfiltration der Tunica muscularis mit ED1+ Zellen (v.a. Monozyten), hier exemplarisch in einem Tier 24h nach allogener SBTX. Erkennbar ist die charakteristische rundliche Form der Monozyten, visualisiert durch den grün fluoreszierenden Antikörper. Teilweise weisen die Zellen bereits Pseudopodien, Ausziehungen des Zytoplasma auf, wie auch Makrophagen sie besitzen. Ausgezählt wurden die Zellen in analog gefärbten Whole Mounts. (jeweils 5 zufällig gewählte Felder (Vergr. 200x pro Präparat), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ AT vs. IT; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

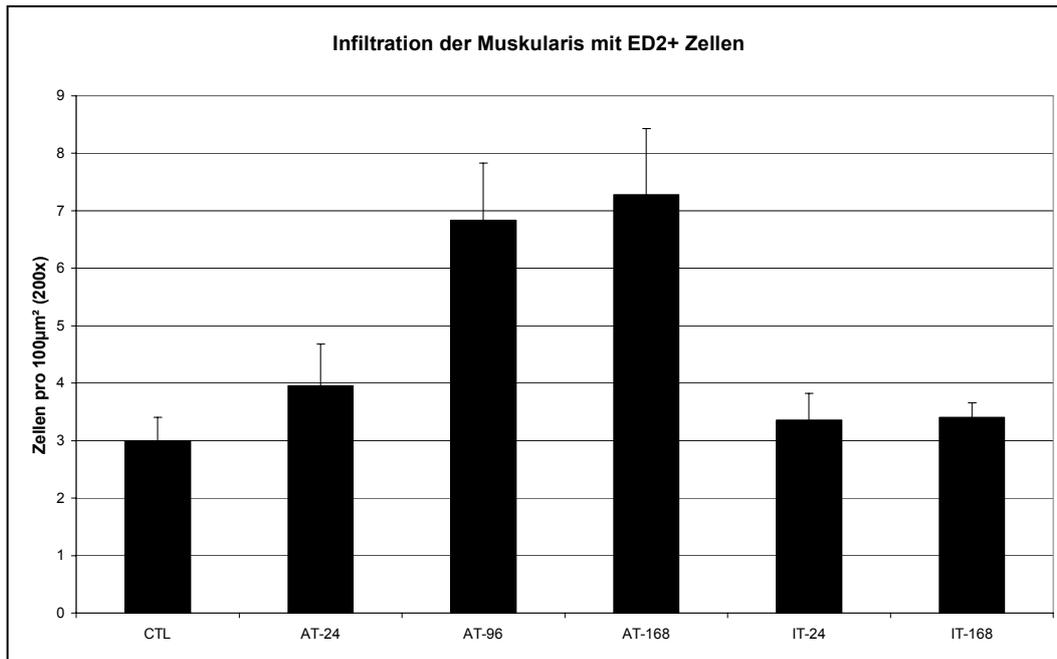


Wie aus dem Diagramm zu **Abbildung 7** zu ersehen, zeigen sich in den Muskularis-Whole Mounts 24h nach der Transplantation sowohl bei den isogen als auch bei den allogenen transplantierten Tieren eine signifikante Infiltration mit ED1+ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (AT-24: $8,0 \pm 1$ Zellen/Feld; IT-24: $7,4 \pm 1,3$ Zellen/Feld vs. CTL: $3,1 \pm 0,3$ Zellen/Feld, $p < 0,05$). Während 168h postoperativ in den isogenen Grafts die Anzahl der ED1+ Zellen leicht abnimmt, zeigt sich eine Verstärkung der Infiltrate in den allogenen Grafts, sowohl 96 h postoperativ (AT-96: $13,6 \pm 0,5$ Zellen/Feld) als auch 168h postoperativ (AT-168: $14,4 \pm 0,5$ Zellen/Feld vs. IT-168: $6,5 \pm 0,3$ Zellen/Feld, $p < 0,05$), korrelierend mit der Manifestation und Progression der akuten Abstoßung.

In **Abbildung 8** sind analog ED2+ Zellen angefärbt, bei denen es sich überwiegend um residente und ausgereifte Makrophagen in der Muskularis handelt. Hier zeigt sich im Gegensatz zu den ED1+ Zellen (**Abb.7**) noch keine signifikante Erhöhung 24h postoperativ (AT-24: $3,9 \pm 0,7$ Zellen/Feld vs. IT-24: $3,4 \pm 0,5$ Zellen/Feld, $p > 0,05$), auch nicht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (CTL: $3,0 \pm 0,4$ Zellen/Feld). Allerdings verdoppelt sich die Anzahl der ED2+ Zellen nahezu 96h und 168h postoperativ (AT-96 $6,9 \pm 1$ Zellen/Feld) im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den isogen transplantierten Tieren (AT-168: $7,3 \pm 1,1$ Zellen/Feld vs. IT-168: $3,4 \pm 0,2$ Zellen/Feld, $p < 0,05$). Es ist davon auszugehen dass ein Teil der einwandernden Monozyten, die bereits nach 24h nachweisbar sind, sich im weiteren Verlauf zu Makrophagen ausdifferenzieren. Darüber hinaus nehmen wir an, dass zirkulierende Makrophagen in das geschädigte Transplantat einwandern.

Abbildung 8: Zellinfiltration der Tunica Muskularis mit ED2+ Zellen (v.a. Makrophagen). Hier ebenfalls repräsentativ für ein allogenes Transplantat nach 24 h dargestellt. Die sternartige Form der Makrophagen ist in der 400x Vergrößerung deutlich erkennbar. Ausgezählt wurden die Zellen in analog gefärbten Whole Mounts. (jeweils 5 zufällig gewählte Felder (Vergr. 200x pro Präparat), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ AT vs. IT; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle.





3.2 Phase der akuten Abstoßung

3.2.1 Infiltration der Tunica muscularis mit CD8+ Zellen

Offenbar wandelt sich die nach 24h nachweisbare akute unspezifische Entzündung im weiteren Verlauf in den allogenen Grafts in das Bild der akuten Abstoßung um. Wie bereits beschrieben nimmt die Zahl der in die Muskularis eingewanderten neutrophilen Granulozyten in der allogenen transplantierten 7 Tagesgruppe ab (vergleiche **Abbildung 5**) während die Zahl der einwandernden Lymphozyten (hier CD8+ Zellen) signifikant ansteigt (**Abbildung 9**). **Abbildung 9** zeigt das Resultat der Auszählung von Lymphozyten in Muskularis Whole Mounts, die für das Oberflächenantigen CD8 positiv mittels Antikörpern angefärbt wurden (vornehmlich T-Killerzellen, vergleiche auch histologisches Grading). Die Infiltration der Dünndarmmuskularis mit CD8+ T-Lymphozyten ergab nach Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (CTL: $1 \pm 0,3$ Zellen/Feld), den isogen transplantierten 24h und 168h Tieren (IT-24: $2 \pm 0,5$ Zellen/Feld; IT-168: $0,2 \pm 0,1$ Zellen/Feld) sowie den allogenen 24h und 96h Gruppen (AT-24: $1,8 \pm 0,5$ Zellen/Feld; AT-96: $2,9 \pm 0,4$ Zellen/Feld). 7 Tage postoperativ zeigte sich in der allogenen Gruppe korrelierend mit dem Auftreten der moderaten bis schweren Abstoßung eine hochsignifikante

Infiltration mit CD8+ T-Lymphozyten (AT-168: 23 ± 3 Zellen/Feld vs. IT-168: $0,2 \pm 0,1$ Zellen/Feld, $p < 0,01$).

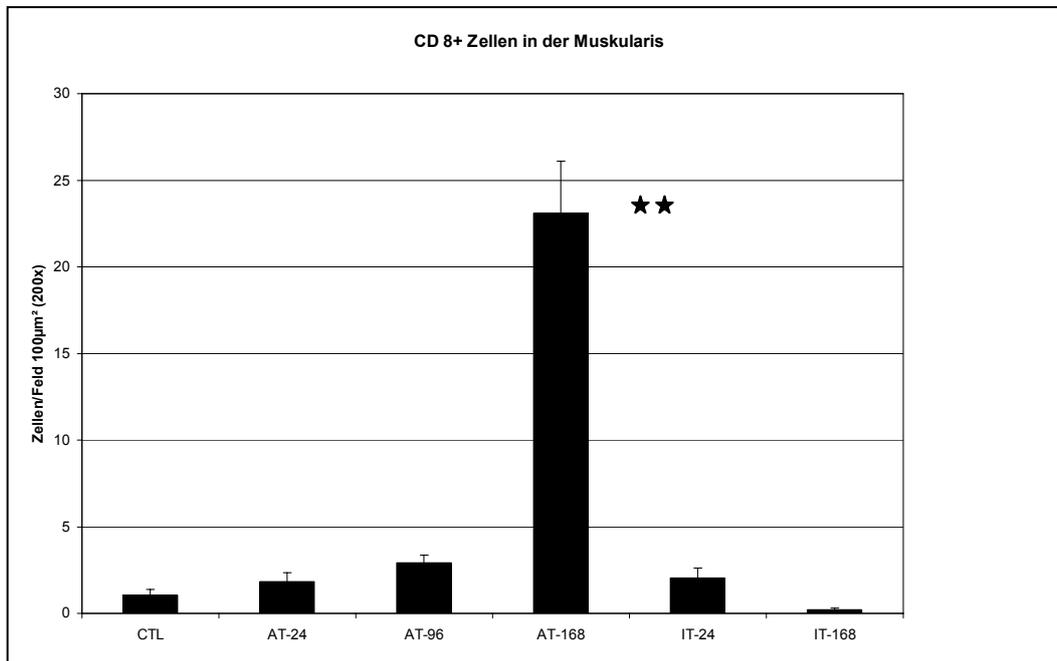


Abbildung 9. Dargestellt ist das Ergebnis der Auszählung von in die Muskularis infiltrierenden CD 8+ T-Lymphozyten. Es zeigt sich ein hochsignifikanter Anstieg der T-Lymphozyten in den allogenen Grafts 7 Tage nach Transplantation als Ausdruck der akuten Abstoßung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ** $p < 0,01$ AT vs IT.

3.2.2 Expressionsprofil der Mediatoren (SYBR Green RT PCR)

Auf molekularer Ebene zeigte sich das Einsetzen der akuten Abstoßung mit der Aufregulation anderer Mediatoren, als denen, die während der akuten postoperativen Entzündung aufreguliert worden waren (siehe oben). Gleichzeitig mit dem Auftreten des T-zellulären Infiltrates (vergleiche **Abbildung 9** und histologisches Grading) kam es zur Aufregulation der abstoßungsassoziierten Marker IL10, TNF α und INF γ . Die Aufregulation der entsprechenden mRNA, wiederum bestimmt mittels SYBR Green RT PCR ist in **Abbildung 10**, **Abbildung 11** und **Abbildung 12** dargestellt. **Abbildung 10** beschreibt den Verlauf der Interleukin 10 Expression in Proben der bekannten Gruppen. Alle transplantierten Tiere, sowohl allogene als auch isogene transplantierte, zeigen signifikante IL 10 Erhöhungen gegenüber den Kontrolltieren. Bei den beiden isogenen Gruppen IT-24h und IT-168h bleibt der relative mRNA Wert relativ konstant. (IT-24: $15,84 \pm 2,96$ und IT-168: $14,74 \pm 4,54$). Bei den allogenen transplantierten Tieren zeigt sich dagegen eine deutliche

Zunahme der IL 10 Expression im zeitlichen Verlauf (AT-24: $28,3 \pm 3,04$, AT-96: $52,69 \pm 8,53$, AT-168: $122,84 \pm 15,45$).

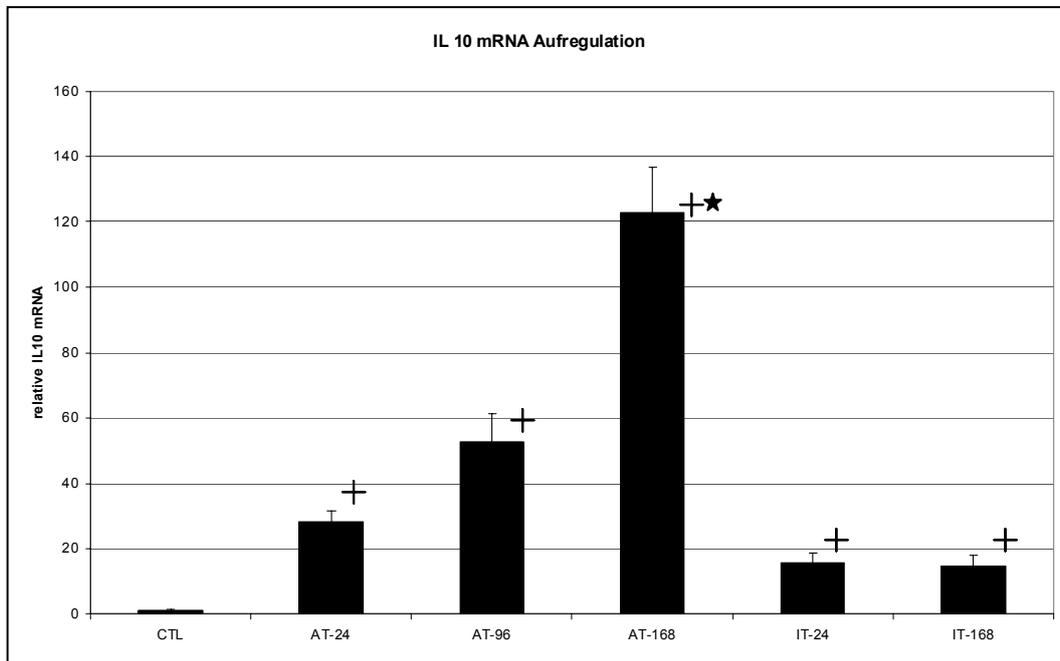


Abbildung 10. SYBR-Green RT-PCR für IL 10 mRNA. Die allogenen Grafts zeigen eine mit der Zeit nach Transplantation kontinuierlich ansteigende IL 10 Expression in der T. muscularis. Die isogenen Grafts unterscheiden sich zwar signifikant von der Kontrollgruppe, bleiben im Verlauf aber auf einem konstant niedrigen Expressionslevel für IL 10. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * p<0,05 AT vs. IT; + p<0,05 vs. Kontrolle).

In **Abbildung 11** ist für TNF α ein fast analoger mRNA-Expressionsverlauf zu beobachten wie bereits für IL 10 gezeigt. Wiederum unterscheiden sich alle allogenen transplantierten Gruppen signifikant von der Kontrollgruppe. Die isogenen Gruppen zeigen jedoch nur eine schwach signifikante Erhöhung und sind untereinander nicht signifikant verschieden (IT-24: $1,59 \pm 0,16$ und IT-168: $1,62 \pm 0,44$ vs. CTL: $1,03 \pm 0,13$). Die allogenen transplantierten Tiere zeigen währenddessen eine deutliche Aufregulation von TNF α , die im zeitlichen Verlauf stark zunimmt und nach 7 Tagen postoperativ maximal war. (AT-24: $4,52 \pm 0,52$ vs. IT-24: $1,59 \pm 0,16$, p < 0,05 signifikant und AT-168: $17,72 \pm 3,12$ vs. IT-168: $1,62 \pm 0,44$, p < 0,05 signifikant).

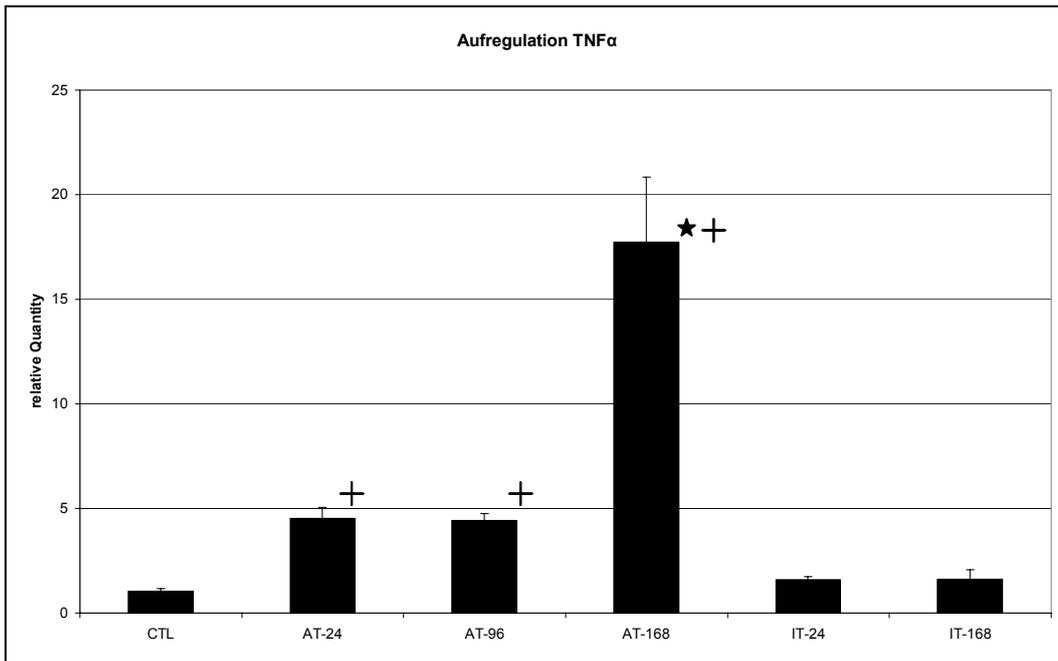


Abbildung 11. SYBR-Green RT-PCR für TNF α m-RNA. Die PCR für TNF α ergibt eine signifikante Zunahme der Expression in der T.muscularis der allogenen Grafts nach 24h im Vergleich zur Kontrollgruppe und ein generelles Maximum in den allogenen Grafts nach 7 Tagen. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * p<0,05 AT vs. IT; + p<0,05 vs. Kontrolle).

Die mRNA Expression von Interferon γ in der Tunica muscularis (**Abbildung 12**) zeigt wiederum den typischen Verlauf mit signifikantem Interferon γ -mRNA Anstieg im Verlauf der Abstoßung. Die isogene 168h Gruppe, sowie die allogenen transplantierte 24h Gruppe zeigten keine erhöhte IFN γ Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. (IT-168: $32,40 \pm 19,63$ vs. CTL: $1,13 \pm 0,28$, $p > 0,05$ nicht signifikant und AT-24: $2,86 \pm 1,23$ vs. CTL: $1,13 \pm 0,28$, $p > 0,05$ nicht signifikant). Erst nach 96h postoperativ war bei der allogenen Gruppe eine signifikante IFN γ -mRNA Erhöhung messbar (AT-96: $36,37 \pm 3,93$). Am deutlichsten abgrenzbar war das IFN γ -mRNA Maximum bei den allogenen Tieren 7 Tage nach der Transplantation (AT-168: $401,14 \pm 46,76$ vs IT-168: $32,40 \pm 19,63$, $p < 0,01$ hochsignifikant).

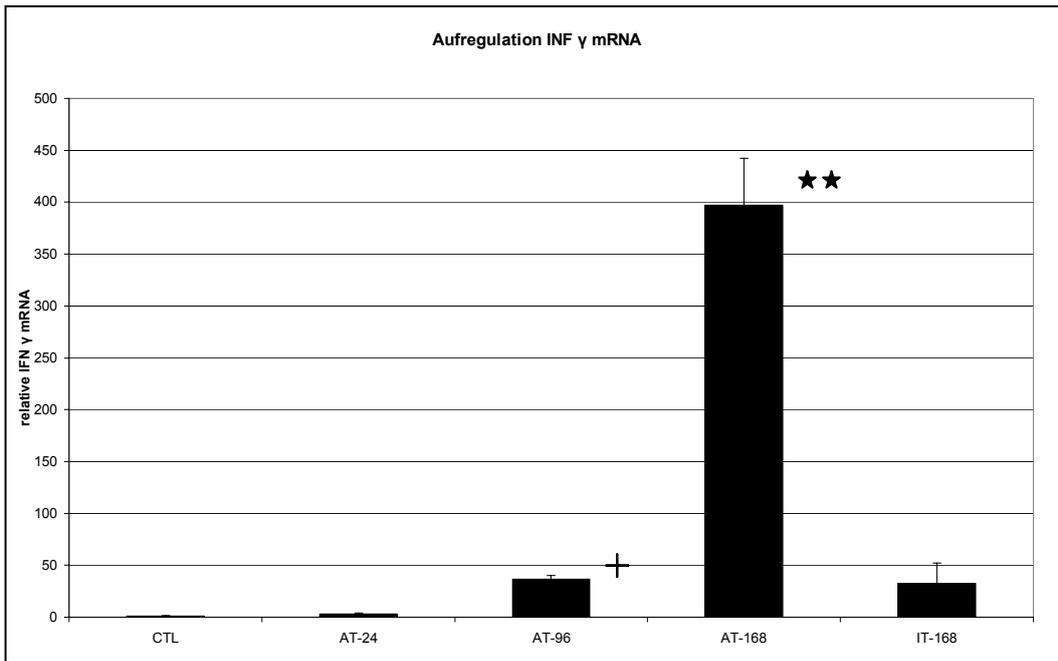


Abbildung 12. SYBR-Green RT-PCR für IFN γ m-RNA. Die PCR für IFN γ ergibt erst nach 96h eine signifikante Zunahme der Expression in der T.muscularis der allogenen Grafts im Vergleich zur Kontrollgruppe und ein generelles Maximum in den allogenen Grafts nach 7 Tagen. Für die isogenen Grafts 24h nach Transplantation konnte kein eindeutiger Wert festgelegt werden, 7 Tage post transplantationem ist die IFN γ Expression in den isogenen Grafts aber wiederum nur ca 10% verglichen mit der allogenen Gruppe. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, ** p<0,05 AT vs. IT; + p<0,05 vs. Kontrolle).

In **Abbildung 13** zeigt Interleukin 2 in seiner Expression ein signifikantes Maximum, sieben Tage nach allogener Transplantation (AT-168: $4,67 \pm 0,59$ vs. CTL: $1,04 \pm 0,19$, p<0,05). Für alle anderen Gruppen bzw. Zeitpunkte konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IL 2 Expression in der RT-PCR nachgewiesen werden.

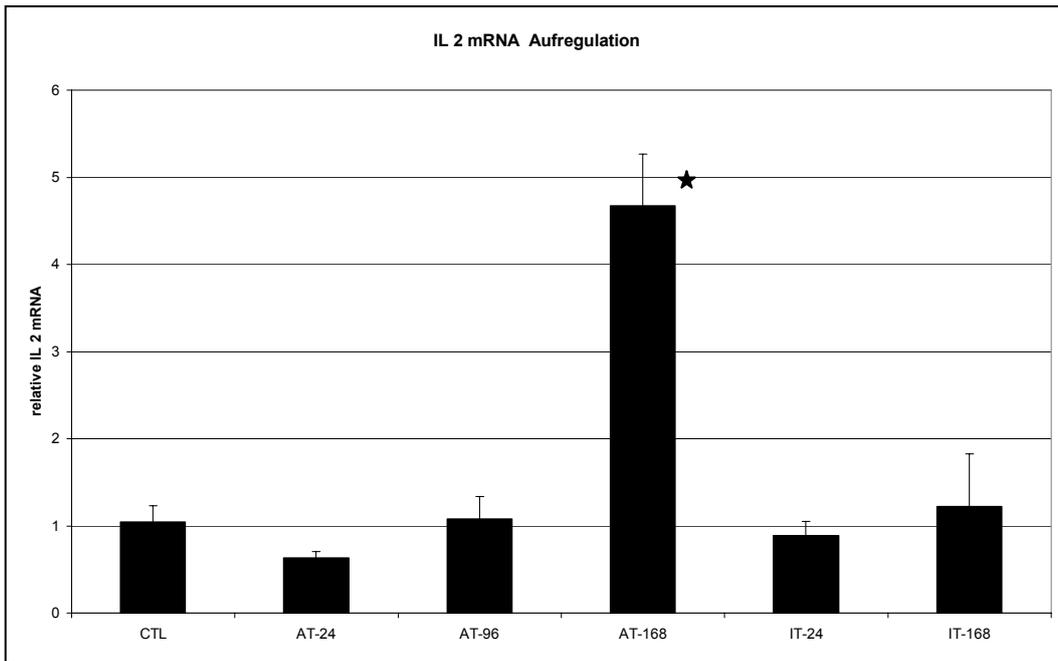


Abbildung 13. SYBR-Green RT-PCR für IL 2 m-RNA. Die PCR für IL 2 zeigt nur ein signifikantes Maximum, in der allogenen transplantierten Gruppe 7 Tage postoperativ. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * p<0,05 AT vs. IT).

3.3 Grading der Abstoßungsreaktion in der transplantierten Muskularis

Das Auftreten der akuten Abstoßung wurde histopathologisch validiert, alle Grafts wurden zur Untersuchung in Vollschichten fixiert, querschnitten, Hämatoxylin/Eosin gefärbt und von zwei Untersuchern mikroskopisch beurteilt. Das histologische Grading der so behandelten Transplantate ergab in der Übersicht die in **Abbildung 14** dargestellten Diagnosen. Die genauen Gradingkriterien sind im Teil „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben.

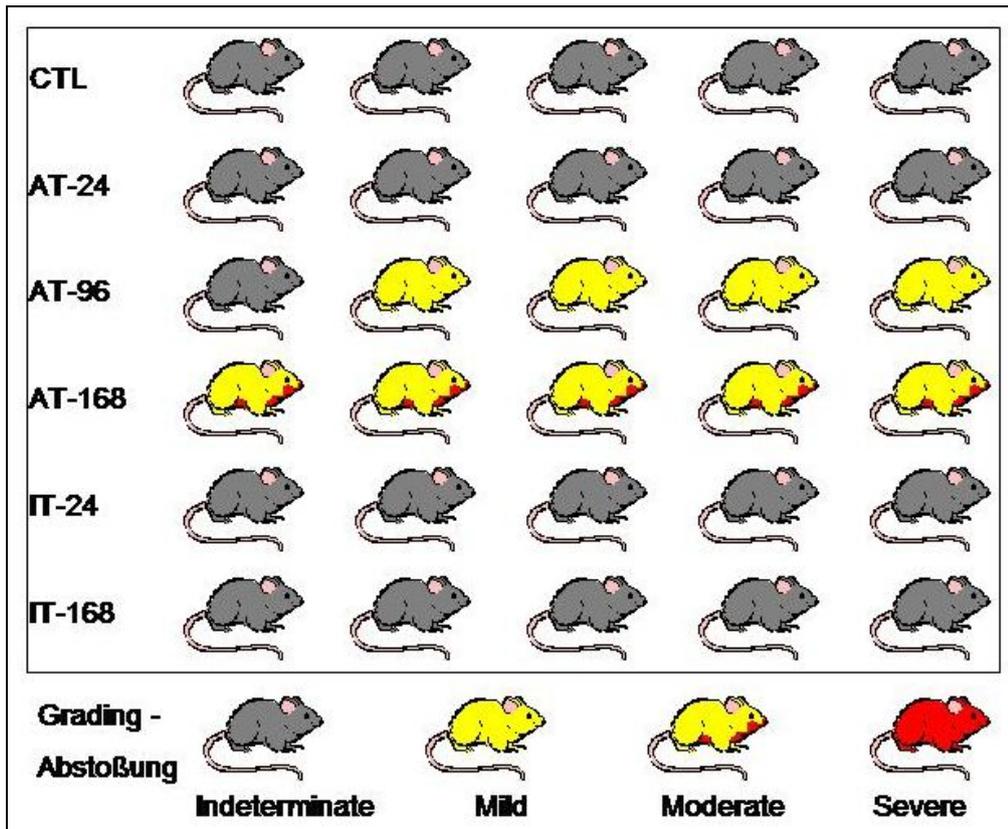


Abbildung 14. Gezeigt sind die Resultate des histopathologischen Gradings der Hämatoxylin/Eosin gefärbten Vollschnitt Präparate durchgeführt von zwei unabhängigen Untersuchern. Die Präparate wurden kodiert und nach Beurteilung wurde eine Diagnose vergeben (indeterminate for acute rejection, mild acute rejection, moderate acute rejection and severe acute rejection). Alle Tiere der 24h Gruppen erhielten „indeterminate“ weil sie nur unspezifische Entzündungszeichen präsentierten. In den allogenen Grafts 96h postoperativ zeigten 4 von 5 Tieren bereits milde Abstoßung. Nach 7 Tagen zeigten alle allogenen Grafts Zeichen moderater Abstoßung. Die Kriterien für schwere Abstoßung kamen in diesem Zeitrahmen nicht vor. Die isogenen Grafts nach 7 Tagen zeigten unauffällige Befunde und wurden ebenfalls als „indeterminate for acute rejection“ gegradet.

In **Abbildungen 15** und **16** sind zunächst „normale“, das heißt nicht entzündete und nicht transplantierte Darmpräparate aus Kontrolltieren in Hämatoxylin/Eosin Färbung abgedruckt. Im histologischen Grading waren 24h postoperativ (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**) noch keine für eine akute Abstoßung pathognomonischen Zeichen erkennbar, dafür zeigte sich eine unspezifische Entzündungsreaktion in den Präparaten. Alle Tiere der Gruppen AT-24h und IT-24h wurden als „indeterminate for ACR“ eingestuft. Wegweisend war eine milde Infiltration des Mesenteriums vor allem mit neutrophilen Granulozyten. Die Zählung der apoptotischen Körperchen in der Mukosa ergab meist weniger als 6 Apoptosen pro 10 Krypten. Bei den

allogenen Gruppen finden sich von 96h bis 168h post-transplantationem zunehmend, wie in **Abbildungen 19** und **20**, exemplarisch dargestellt, Zeichen der akuten Abstoßung. Die allogenen transplantierten Tiere 96h nach der Transplantation fielen durch eine gestörte Kryptenarchitektur und durch ein vermehrtes Infiltrat der Propria auf. Darüber hinaus zeigten sie ausgeprägte Zottenödeme und eine vereinzelt beginnende Arteritis und Mikrothrombosierung der Mesenterialgefäße. Die entsprechenden Proben wurden bis auf einen Fall als milde Abstoßung charakterisiert. Die Zahl der apoptotischen Körperchen in 10 konsekutiven Krypten betrug bei allen Tieren der allogenen transplantierten Gruppe AT-96h mehr als 6.

168h nach allogener Transplantation war histologisch nach dem Gradingsschema in allen Transplantaten (AT 168h) eine moderate Abstoßung zu sehen. **Abbildung 21** zeigt exemplarisch die Adhäsion von Lymphozyten und Granulozyten am Endothel eines Mesenterialgefäßes bei ihrer Einwanderung in das Dünndarm Graft. Morphologisch imponierte zudem eine massiv gestörte Kryptenarchitektur mit starkem lymphozytären Infiltrat und einer Muskularisatdünnung (**Abbildungen 23** und **24**). Die Serosa zeigte peritonitische Veränderungen, die Zählung der apoptotischen Körperchen (**Abbildung 22**) pro zehn Krypten in der Mukosa ergab durchweg Werte größer 6 (im Schnitt 17). Ulzerationen, die der Einordnung in die Klassifikation „schwere Abstoßung“ entsprechen, traten nach 7 Tagen noch nicht auf. Die isogene 168h-Gruppe zeigte allenfalls geringe entzündliche Veränderungen und keine auf eine Abstoßung hinweisenden histologischen Veränderungen. In der Kontrollgruppe fand sich normaler Dünndarm.

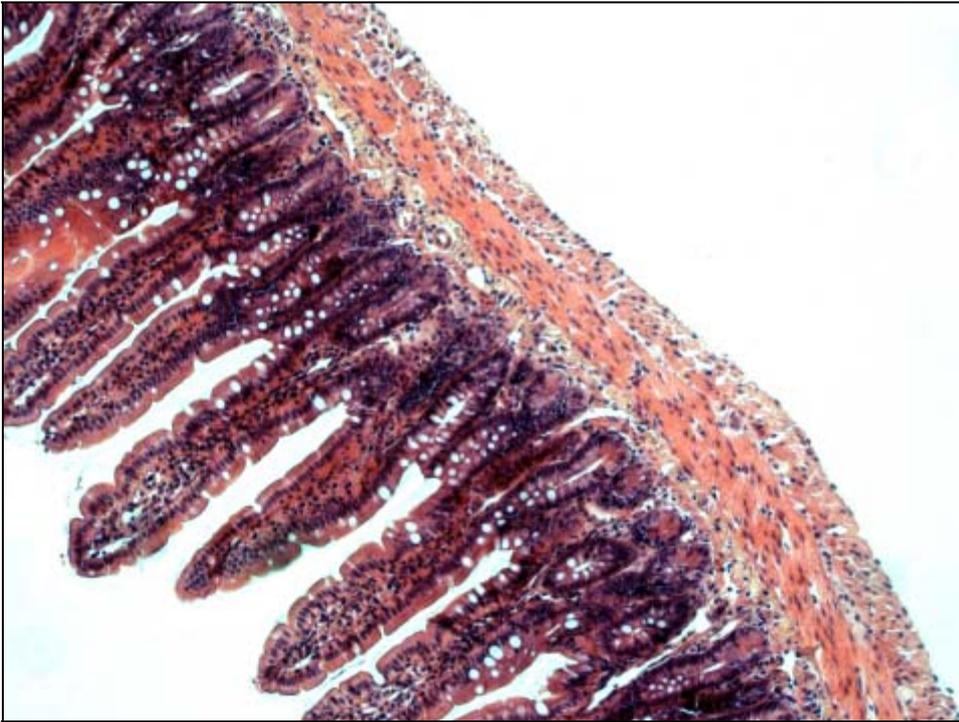


Abbildung 15. Kontrollgruppe CTL , (HE, 100x, Querschnitt). Erkennbar ist normale Kryptenarchitektur, es sind kaum Apoptosen und kein signifikantes Infiltrat in der Mucosa oder Submucosa vorhanden.

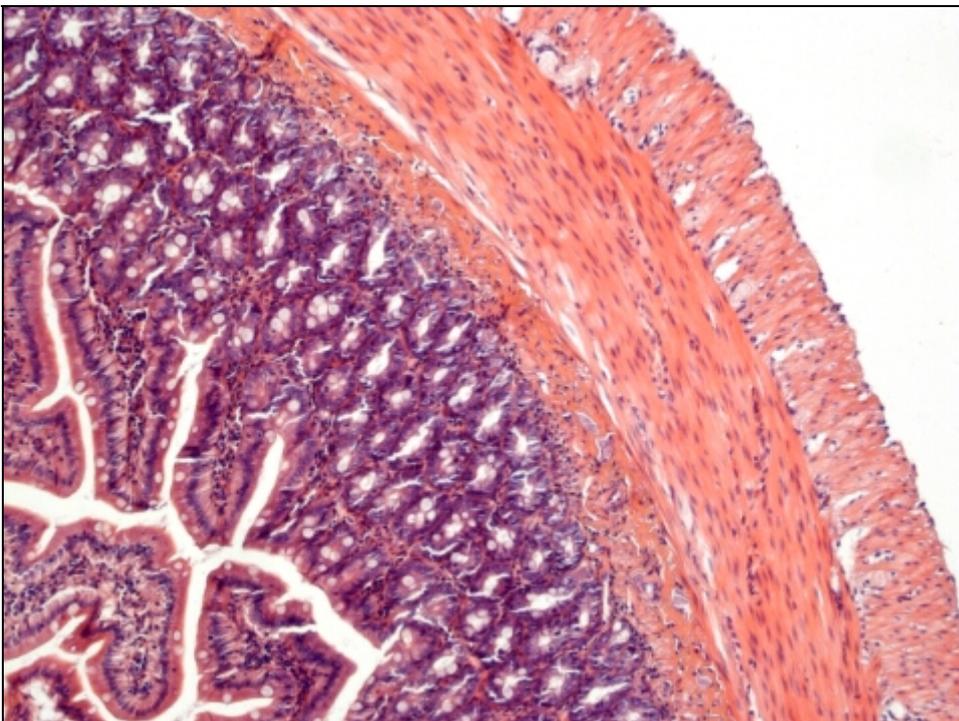


Abbildung 16. Kontrollgruppe CTL; (HE, 100x, Querschnitt). Normalbefund

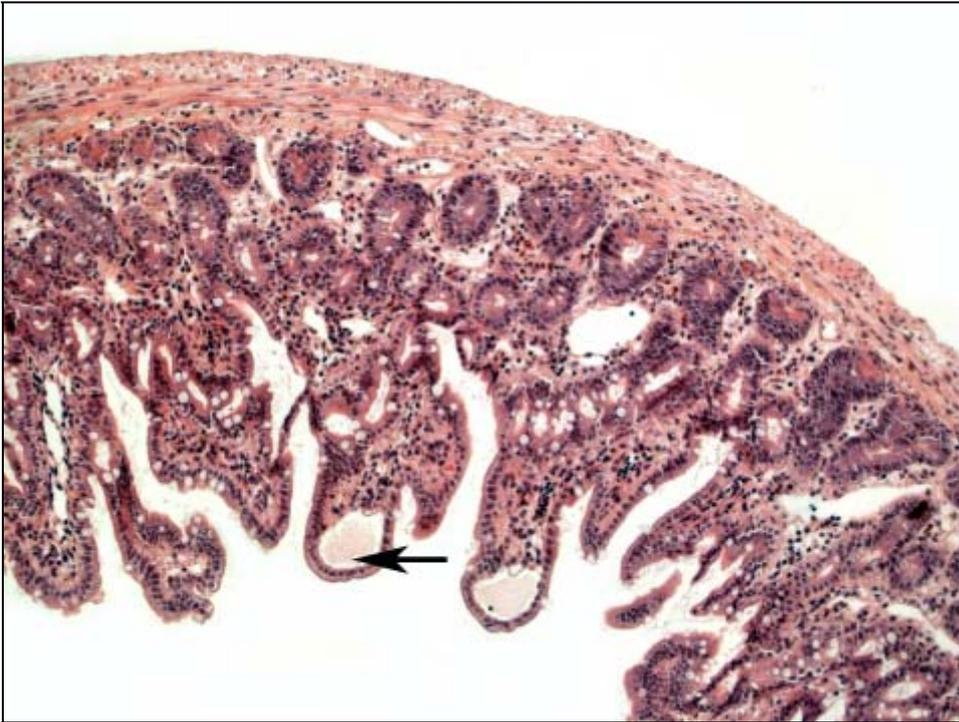


Abbildung 17. Allogene Gruppe AT-24, (HE, 100x, Querschnitt). Deutliches Infiltrat der Muskularis und Mukosa mit neutrophilen Granulozyten. Zottenspitzenödem (Pfeil, aufgr. Durchtrennung der Lymphgefäße). A.e. durch Ischämie/Reperfusion gestörte Kryptenarchitektur.

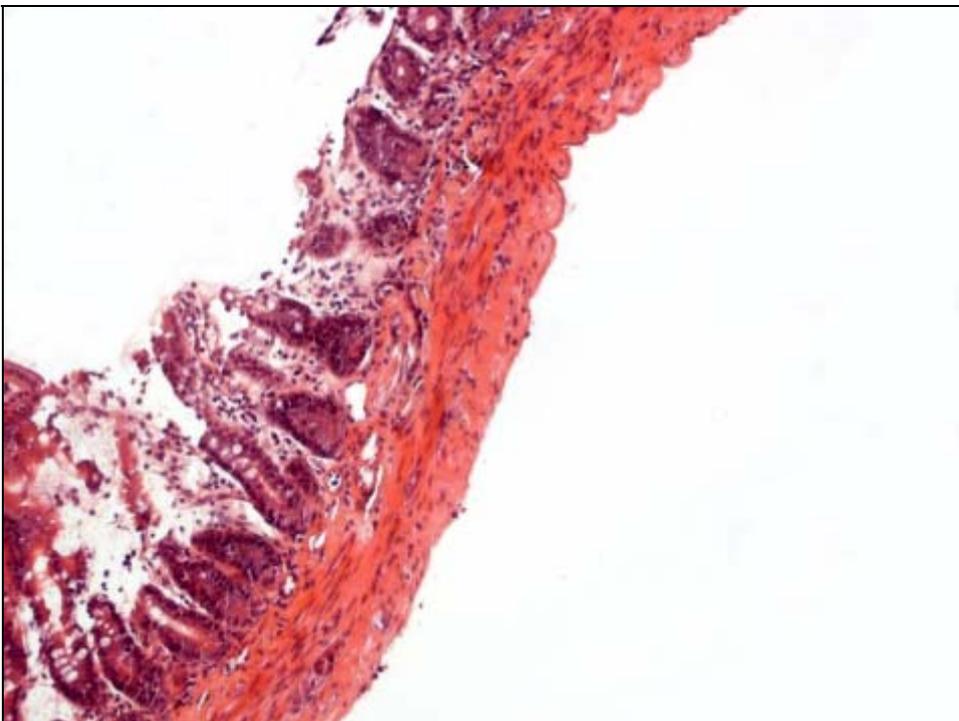


Abbildung 18. Allogene Gruppe AT-24, (HE, 100x, Querschnitt). Epithelablösung („sloughing of mucosa“) am ehesten bedingt durch Ischämie-Reperfusionsschaden.

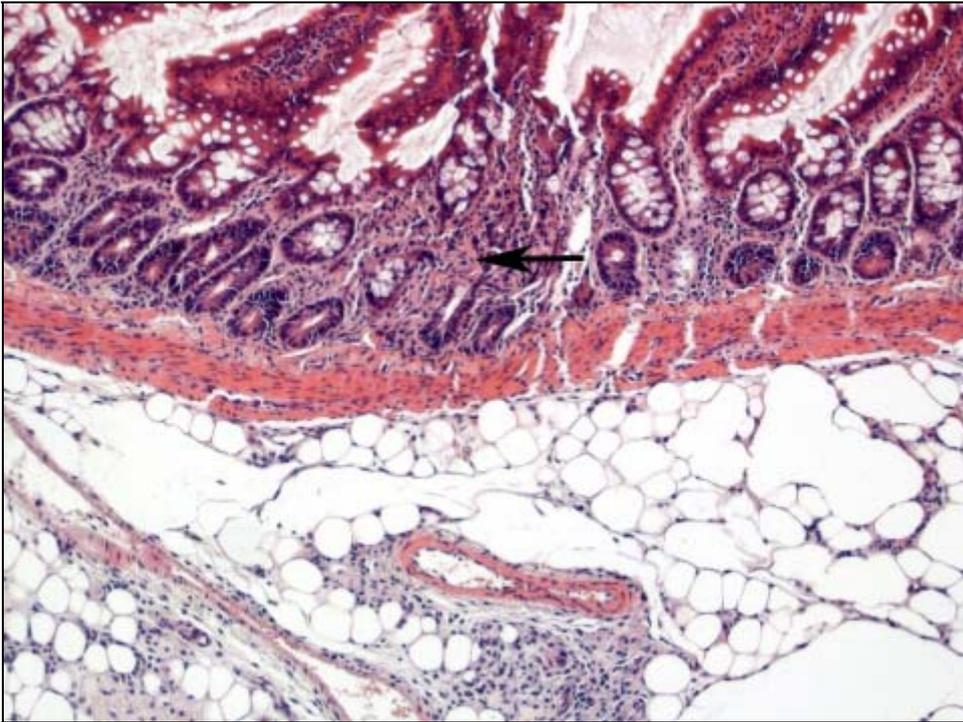


Abbildung 19. Allogene Gruppe AT-96, (HE, 100x, Querschnitt). Mesothelinfiltrat, Propriafibrose und Kryptenuntergang (Pfeil).

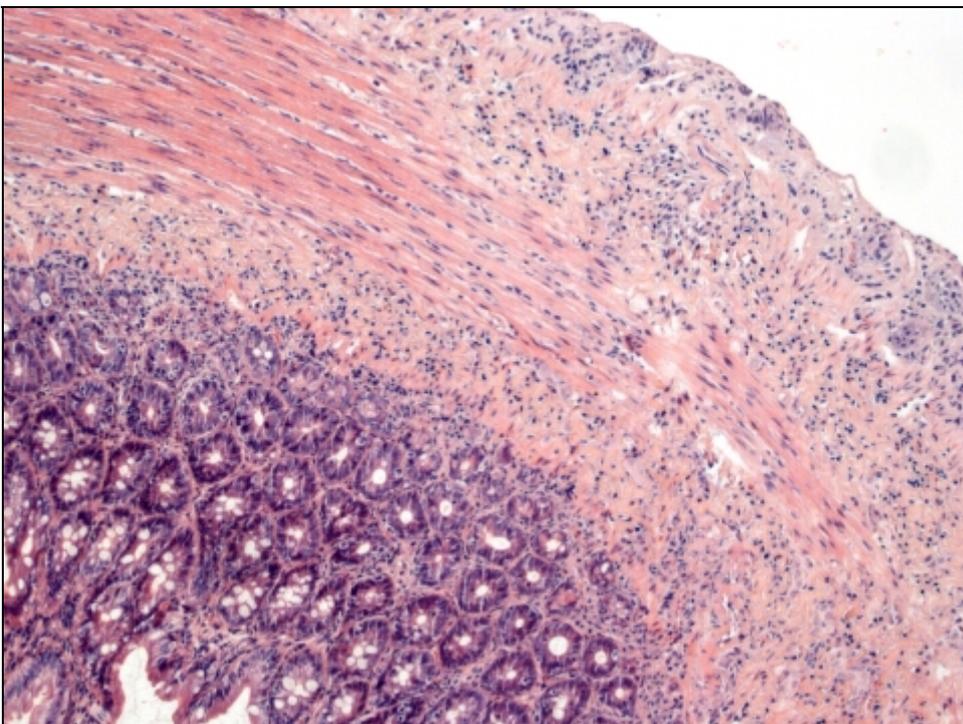


Abbildung 20. Allogene Gruppe AT-96, (HE, 100x, Querschnitt). Deutliches Muskularisinfiltrat.

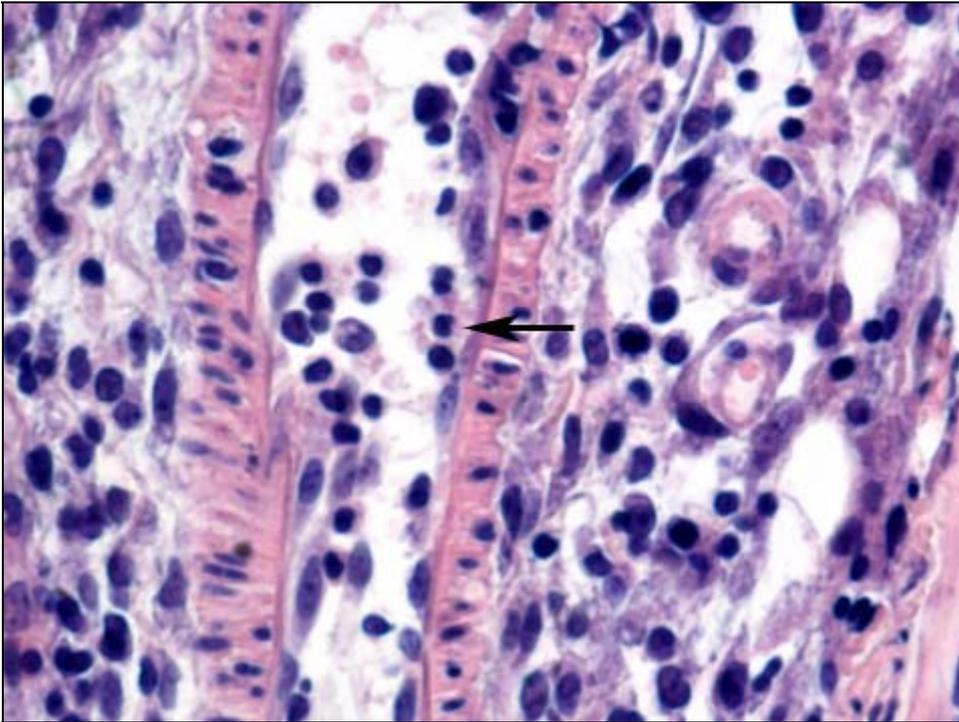


Abbildung 21. Allogene Gruppe AT-168, (HE, 400x, Querschnitt). Adhäsion neutrophiler Granulozyten u. Lymphozyten am Endothel eines Mesenterialgefäßes.

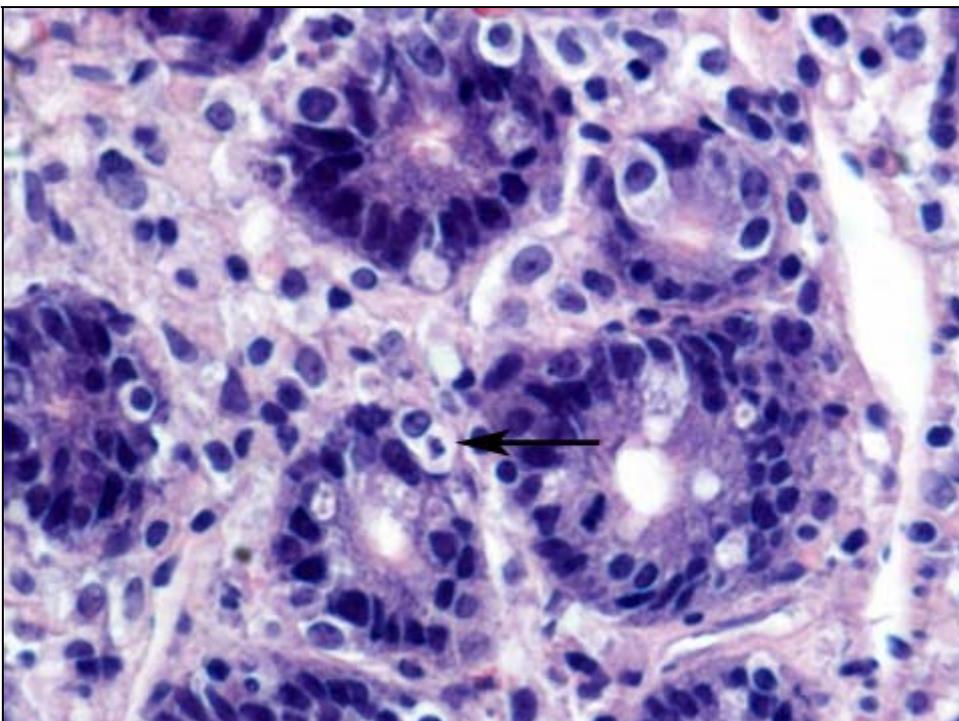


Abbildung 22. Allogene Gruppe AT-168, (HE, 400x, Querschnitt). Apoptotische Körperchen in Mukosakrypten (Pfeil).

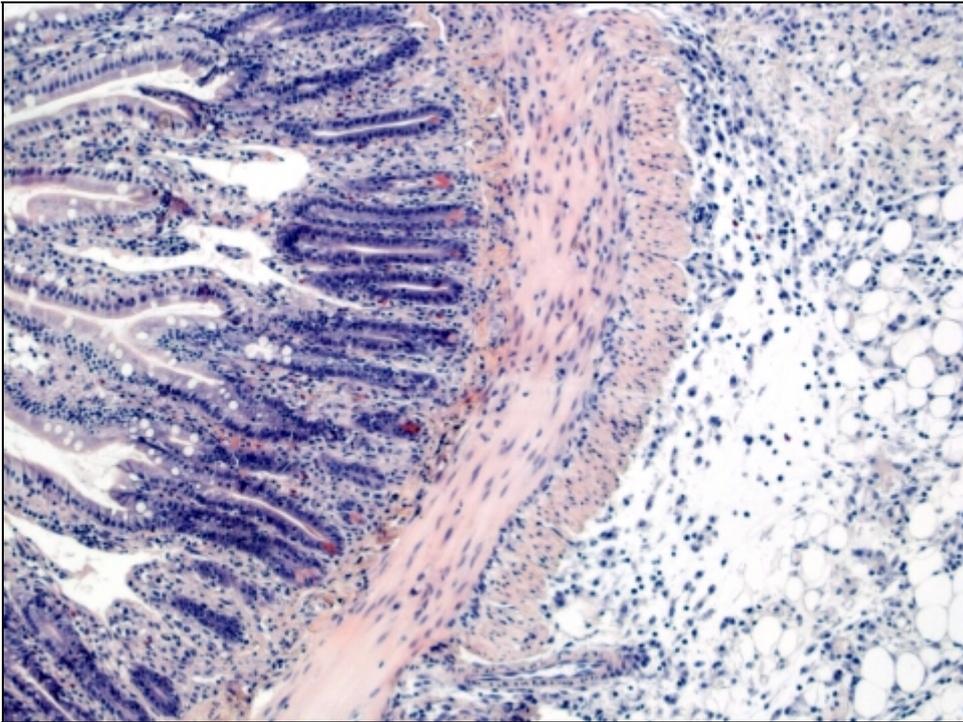


Abbildung 23. Allogene Gruppe AT-168, (HE, 100x, Querschnitt). Stärkstes Mesoinfiltrat, stark gestörte Kryptenarchitektur und -Untergang, Propriafibrose

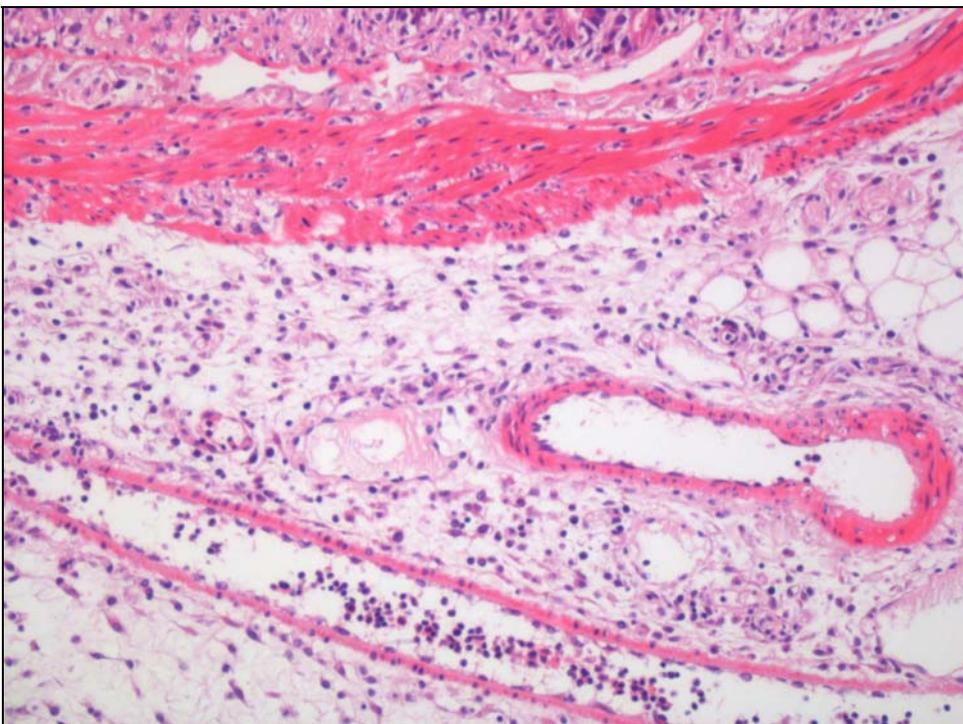


Abbildung 24. Allogene Gruppe AT-168, (HE, 100x, Querschnitt). Starkes Mesoinfiltrat, Arteritis der Mesenterialgefäße, Ausdünnung der Tunica muscularis

3.4 Ausmaß und zeitliches Auftreten von Apoptose

In der Klinik wird das systematische Durchmustern der biopsierten Schleimhaut der Transplantate mit Auszählung der apoptotischen Körperchen in den Krypten als Mittel der Wahl angesehen, um eine akute Abstoßung anhand der erhöhten Apoptoserate in der Mukosa zu diagnostizieren. Im Rahmen dieses Abstoßungsmodells fand sich, dass die Muskularis deutlich am Abstoßungsgeschehen partizipiert und im Rahmen der Abstoßung ebenfalls erhöhte Raten von Apoptose aufweist. In der Mukosa ist dieses Phänomen wie erwähnt bereits bekannt und wird im histologischen Grading mit herangezogen. Tatsächlich konnte in unserem Modell nun mittels TUNEL-Test eine Häufung von apoptotischen Zellen in der Tunica muscularis nachgewiesen werden. **Abbildung 25** zeigt eine Auswertung von mit TUNEL gefärbten Paraffinschnitten der transplantierten Muskularis. Die Quantifizierung der Apoptosen in der Tunica muscularis mittels TUNEL-Test ergab eine signifikante Zunahme der Apoptosen über den gesamten Beobachtungszeitraum in den allogenen Gruppen mit einem Maximum nach 168h (AT-24: $6,8 \pm 2,7$ Zellen/Feld; AT-96: 10 ± 2 Zellen/Feld; AT-168: $15 \pm 3,5$ Zellen/Feld). Im Gegensatz hierzu ergab sich in den isogen transplantierten Gruppen keine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (IT-24: $1,7 \pm 0,9$ Zellen/Feld; IT-168: $4,7 \pm 2,2$ Zellen/Feld vs. CTL: $2 \pm 0,8$ Zellen/Feld). Zählt man nun auch die Apoptosesignale in der Mukosa der gleichen Areale aus, so erhält man die in **Abbildung 25** dargestellten Raten. Tendenziell sind im TUNEL-Test leicht erhöhte Apoptoseraten in der Tunica muscularis gegenüber der Mukosa erkennbar, signifikant wird dieser Unterschied jedoch erst bei den allogenen 168h Tieren (AT-168 Muskularis: $15,1 \pm 3,54$ vs. AT-168h Mukosa $5,95 \pm 1,7$ Signale/100 μm^2 bei 200facher Vergrößerung). Interessanterweise folgt der Verlauf der Signalhäufung in der Mukosa dem Verlauf in der Muskularis, wenn man die Auswertung in den gleichen Präparaten (jeweils mit Augenmerk auf Muskularis oder Mukosa) durchführt.

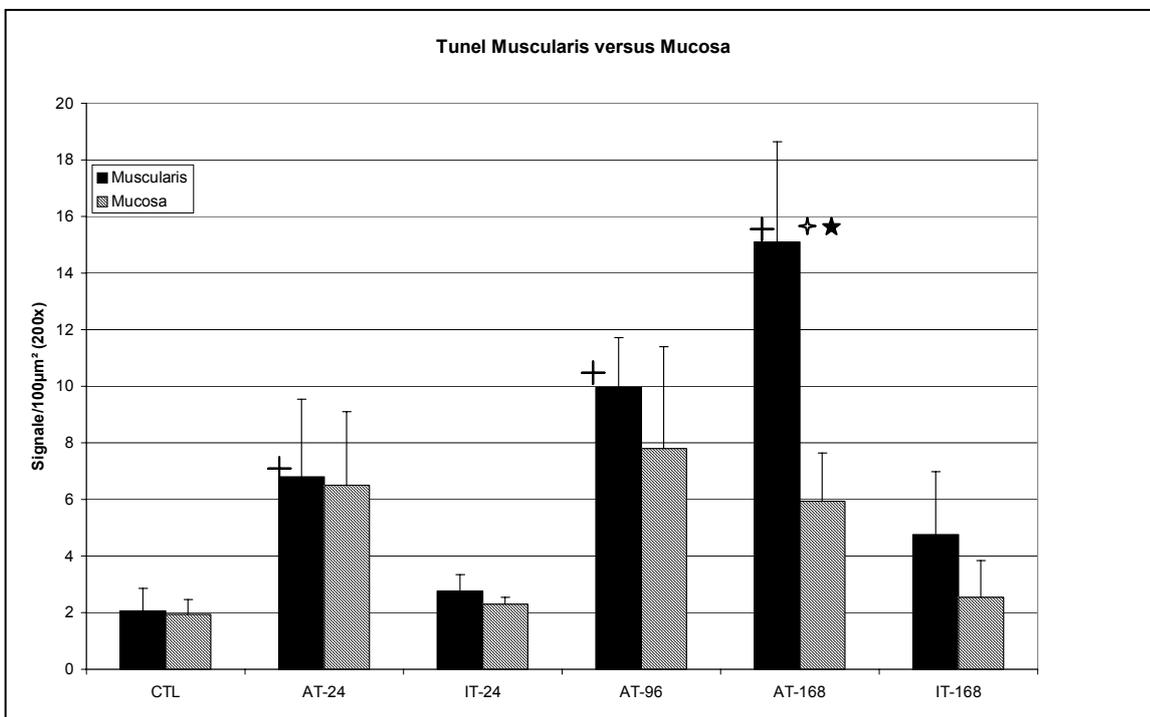
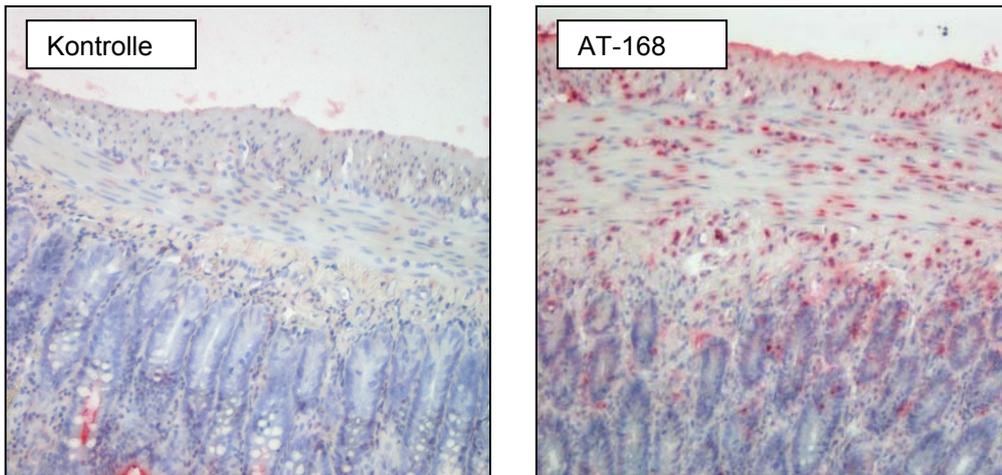


Abbildung 25. Dargestellt sind Apoptoseraten in der Tunica muscularis, untersucht mittels TUNEL-Test. Aufgetragen wurden sowohl die Gruppen gegeneinander, als auch Apoptose in der Muskularis verglichen mit Raten in der Mukosa. Es ergibt sich eine signifikante Zunahme der Apoptoseraten in den allogenen Grafts über die untersuchten Zeiträume verglichen mit der Kontrollgruppe sowie den isogenen Grafts. Tendenziell waren die Apoptoseraten in der Muskularis etwas höher als in der Mukosa, signifikant war dies jedoch nicht. Ausgezählt wurde in unmittelbar aneinander angrenzenden Abschnitten von TUNEL-gefärbten Paraffin Querschnitten wie oben abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ AT vs. IT, ✦ $p < 0,05$ Muskularis vs. Mukosa (168h).

Angestoßen von den im TUNEL-Test gemachten Beobachtungen führten wir eine SYBR Green RT PCR durch um die mRNA-Expression des Apoptose-induzierenden Fas-Liganden zu untersuchen. In **Abbildung 26** ist der mRNA-Expressionsverlauf dargestellt. Das Expressionsprofil für Fas-L lässt eine signifikante Zunahme um den Faktor 8, verglichen mit der entsprechenden isogenen IT-168h Gruppe, im zeitlichen Verlauf erkennen (AT-168: $18,6 \pm 2$ vs. IT-168: $2,4 \pm 0,51$). Es könnte möglich sein, dass der Fas-Ligand Signaltransduktionsweg bei der Induktion von Apoptose in der Tunica muscularis des Dünndarmgrafts während der akuten Abstoßung eine Rolle spielt.

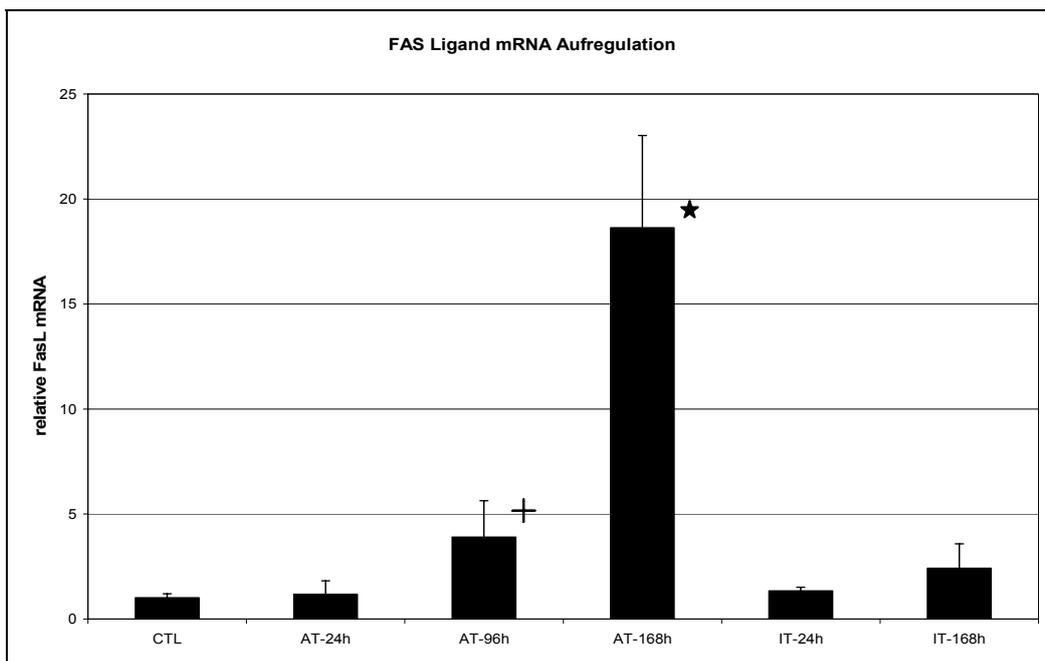


Abbildung 26. SYBR-Green RT-PCR für Fas-Ligand mRNA. In den allogenen Grafts zeigte sich eine signifikante Aufregulation des Fas-Liganden ab 96h post transplantationem. Das absolute Maximum wurde in den allogenen Grafts nach 7 Tagen gemessen. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, + p<0,05 vs. Kontrolle, * p<0,05 AT vs. IT).

3.5 Kontraktile Aktivität der Dünndarm-Grafts und iNOS Expression

Wie Eingangs beschrieben spielt die Darmmotilität insbesondere bei der Dünndarmtransplantation eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des Transplantats. Dysmotilität im Rahmen der Abstoßung kann eine ganze Kettenreaktion von Ereignissen, unter anderem bakterielle Überwucherung und Translokation nach sich ziehen (vergleiche Einleitung) die das Outcome der Dünndarmtransplantation beeinflussen können. Deshalb haben wir die

Kontraktilität von Muskularispräparaten aus den Grafts in vitro untersucht um indirekt einen Hinweis auf ihre motorische Funktion zu erhalten. In **Abbildung 27** sind Dosis-Antwort Kurven der Muskelaktivität der glatten Dünndarmmuskulatur, unter Stimulation mit dem muskarinergen Agonisten Bethanechol dargestellt. Wie hier zu sehen zeigt sowohl die Muskularis der isogenen Grafts (BN→BN) als auch die Muskularis der allogenen transplantierten Tiere (BN→Lew) eine signifikante Reduktion ihrer Kontraktilität nach 24h Reperfusion (AT-24: 32% Verminderung – $3,01 \pm 0,35$ g/mm²/s; IT-24: 18% Verminderung – $3,66 \pm 0,44$ g/mm²/s) verglichen mit der Kontrollgruppe (CTL: $4,43 \pm 0,51$ g/mm²/s) unter einer Stimulationsdosis von 100µmol/l Bethanechol.

96h postoperativ, korrelierend mit dem Auftreten milder Abstoßungszeichen, zeigte sich eine signifikante Minderung der kontraktilen Aktivität der Transplantat-Muskularis um 35% (AT-96 $2,93 \pm 0,21$ g/mm²/s) unter einer Stimulationsdosis von 100µmol/l Bethanechol. 168h nach Transplantation erholte sich die Kontraktilität der Transplantatmuskularis der isogen transplantierten Tiere mit Einheilung der Grafts fast bis auf die Normalwerte der Kontrollgruppe (8% Reduktion, IT-168: $4,06 \pm 0,57$ g/mm²/s gegen Kontrollgruppe, CTL: $4,43 \pm 0,51$ g/mm²/s) unter einer Stimulationsdosis von 100µmol/l Bethanechol. Im Gegensatz hierzu verschlechterte sich die kontraktile Aktivität der Transplantatmuskularis in der allogenen Gruppe um 78%, im Vergleich mit der Kontrollgruppe (AT-168: $0,97 \pm 0,21$ g/mm²/s gegen CTL: $4,43 \pm 0,51$ g/mm²/s) unter einer Stimulationsdosis von 100µmol/l Bethanechol, korrelierend mit dem histopathologisch nachgewiesenen Auftreten von moderater bis schwerer Abstoßung (vergleiche Grading in **Abbildung 14**).

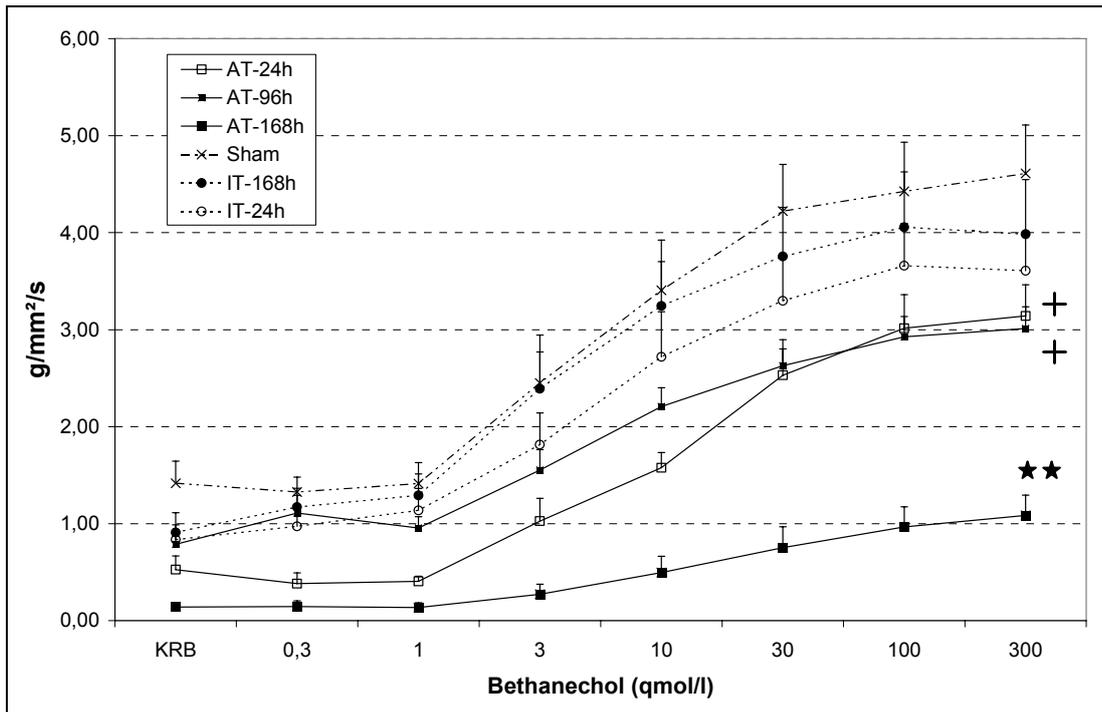


Abbildung 27: Messung der in-vitro Kontraktilität der Dünndarm-Grafts, aufgetragen als Dosis-Antwortkurve von präparierten Muskelstrips unter Bethanechol Stimulation. Die oberste Kurve stellt die Kontraktilität der Kontrolltiere dar, knapp darunter liegt die Kontraktilität der isogenen Grafts 7 Tage postoperativ. Die nächst schlechtere Kurve ist die der isogenen Grafts 24h nach Transplantation. Die drei unteren Kurven sind die der allogenen Grafts, die schlechteste Kontraktilität zeigten die allogenen Grafts nach 7 Tagen mit moderater Abstoßung im Grading. (Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurden jeweils die Kontraktilitätswerte unter Stimulation mit 100qmol/l Bethanechol verwendet, + $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$ AT 168 vs. IT 168).

Als eine Ursache der schlechten Kontraktilität der Grafts (siehe **Abbildung 27**) wurde basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Schaefer N et al. 2005) die Hypothese aufgestellt, dass iNOS Induktion in der Tunica muscularis im Rahmen der Abstoßung mitverantwortlich sein könnte. **Abbildung 28** zeigt die SYBR Green RT PCR für die iNOS mRNA Expression in der Tunica muscularis. In der Tat ist die Expression der induzierbaren NO-Synthetase iNOS (**Abbildung 28**) bereits 24h postoperativ sowohl bei der isogenen- als auch bei der allogenen Gruppe gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht, (AT-24: $20,05 \pm 5,41$ sowie IT-24: $6,5 \pm 1,56$ vs. CTL: $1,05 \pm 0,37$, $p < 0,05$), untereinander unterscheiden sich die 24h-Tiere jedoch nicht signifikant. Die isogen transplantierte 7 Tagesgruppe (IT-168) war nicht von den Kontrolltieren (CTL) abzugrenzen was die INOS Expression betrifft. Das Maximum der INOS-Expression wird nach 7 Tagen bei der allogenen Gruppe erreicht (AT-168: $460,6 \pm 95,55$ vs. IT-168h: $6,25 \pm 4,17$, $p < 0,05$), die auch die schlechteste Kontraktilität aufwies. Somit könnte die immer schlechter werdende Kontraktilität der Muskularis der allogenen Grafts durchaus unter anderem auf die

Aufregulation von iNOS und nachfolgende NO Freisetzung zurückzuführen sein. Die Erholung der Kontraktilität in der isogenen 7 Tagesgruppe (IT-168) unter Abwesenheit von iNOS Induktion passt zu dieser Annahme.

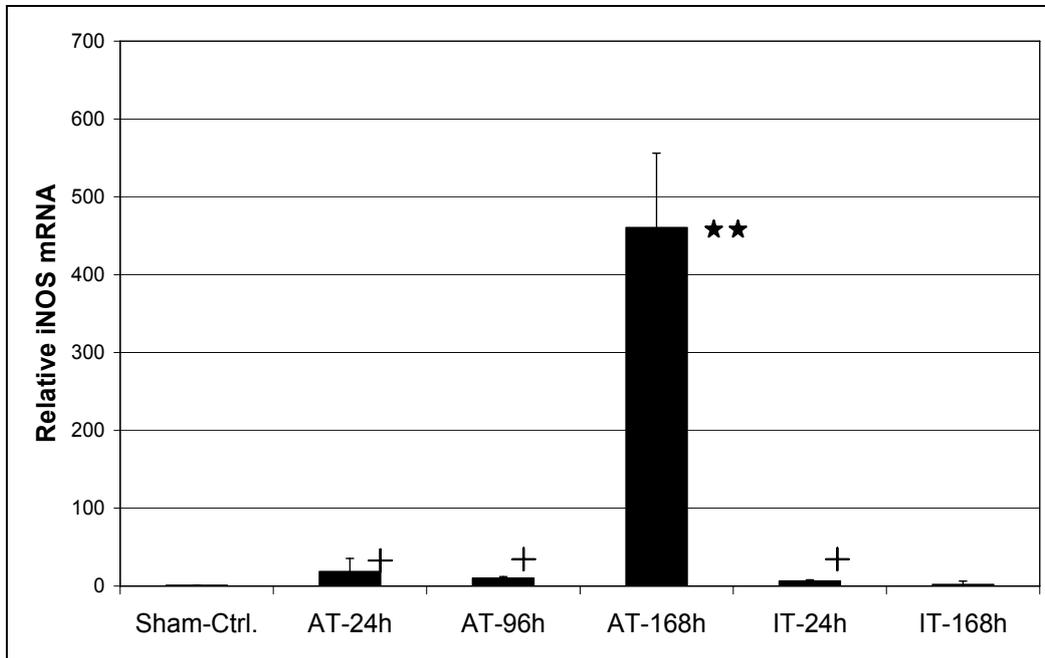


Abbildung 28: SYBR-Green RT-PCR für iNOS mRNA. iNOS m-RNA Aufregulation wurde in beiden 24h Gruppen (isogen und allogene) als gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht gemessen. Das absolute Maximum der iNOS m-RNA Expression fand sich in der Muskularis der allogenen Grafts 7 Tage post transplantationem. Die isogenen Grafts zeigten 7 Tage nach der Transplantation keine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe mehr. Die Quantifikation erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ unter Verwendung von GAPDH als endogene Referenz. (n=5 pro Gruppe, Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt, + p<0,05 vs. Kontrolle, ** p<0,01 AT vs. IT).

3.5.1. Kontraktile Aktivität der Dünndarm-Grafts nach pharmakologischer iNOS-Blockade

Dennoch wollten wir einen Schritt weitergehen um diese Hypothese zu untermauern und die Rolle von iNOS in den Dünndarmgrafts während der Abstoßung genauer untersuchen. Deshalb testeten wir, ob der Einsatz des selektiven iNOS-Inhibitors L-Nil eine Verbesserung der Kontraktilität erbringt (**Abbildung 29**). In der Tat zeigte die Muskularis der allogenen transplantierten Tiere nach 7 Tagen unter L-Nil Gabe eine ca. fünffache Kontraktilitätsverbesserung (AT-168h/Pufferlösung: $0,12 \pm 0,04$ g/mm²/s vs. AT-168h/L-NIL: $0,53 \pm 0,17$ g/mm²/s, $p < 0,05$). Die nicht transplantierten Kontrolltiere zeigten keine Verbesserung der Kontraktilität (CTL/Pufferlösung: $1,33 \pm 0,15$ g/mm²/s vs. CTL/L-NIL: $1,39 \pm 0,17$ g/mm²/s, $p > 0,05$).

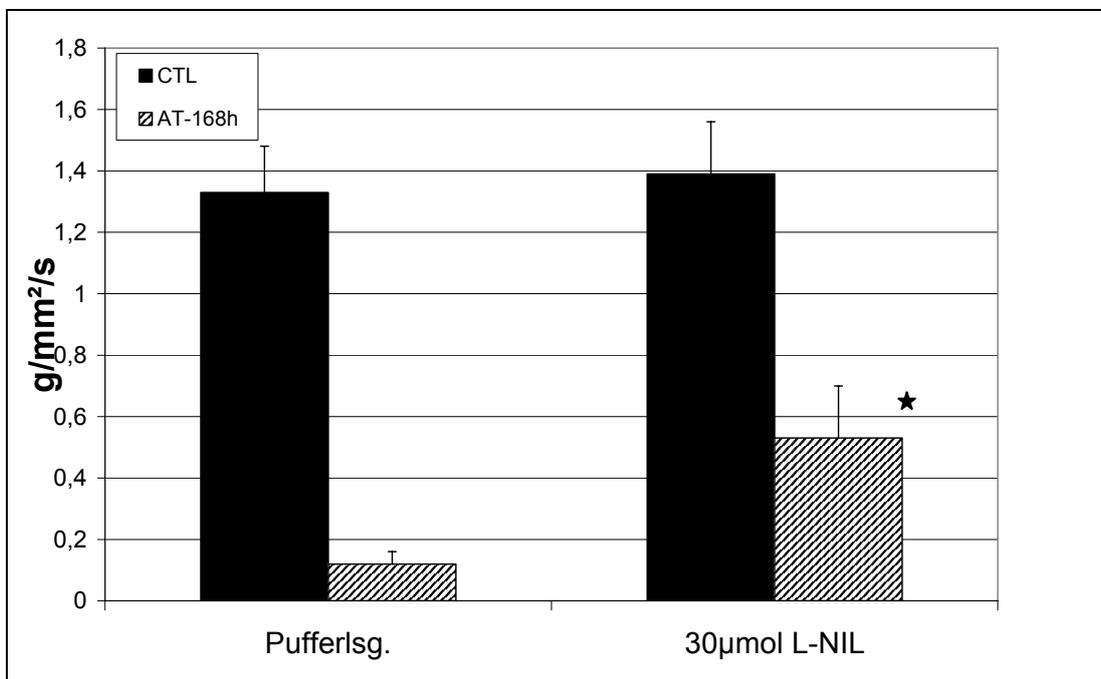


Abbildung 29. Spontane Darmkontraktilität im Organbad, gemessen vor und nach Gabe des selektiven iNOS-Inhibitors L-NIL. Die schwarzen Balken stellen Kontraktilitätswerte der Muskelstrips aus Kontrolltieren dar, d.h. die Muskelstrips waren keiner Transplantation unterzogen und reagieren nicht auf die Gabe des iNOS Inhibitors L-NIL. Die gestreiften Balken repräsentieren die Kontraktilität von allogenen Grafts 7 Tage nach Transplantation, ihre schlechte Kontraktilität wird unter Behandlung mit iNOS Inhibitor L-NIL um circa das fünffache besser. * $p < 0,05$ AT mit Puffer vs. AT mit L-NIL.

4. Diskussion

Die klinische Dünndarmtransplantation, anders als die Transplantation anderer solider Organe, wird heutzutage noch immer häufig durch Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen kompliziert. Offenbar spielen bei der Transplantation des Dünndarmes, dessen einzelne Kompartimente und Wandschichten in einem aussergewöhnlich hohen Mass mit immunologisch aktiven Zellsystemen durchsetzt sind, komplexe Vorgänge eine Rolle, welche zu einer starken Stimulation des Empfängerimmunsystems führen. In welchen Kompartimenten des Dünndarmes sich diese akuten Abstoßungsgeschehen manifestieren und welche molekularen und zellulären Mechanismen beteiligt sind, sowie über ihre zeitliche und kausale Abfolge gibt es bisher relativ wenige gesicherte Daten. Ziel dieser Arbeit war es daher, diese Vorgänge, insbesondere in der Tunica muscularis der Darmwand, näher zu beleuchten. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass die Tunica muscularis mit ihren ansässigen Immunzellen an der Ausbildung der molekularen und zellulären Entzündungsreaktion im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach Transplantation unmittelbar beteiligt ist. Unsere Resultate zeigen nun zum ersten Mal, dass die intestinale Muskularis ein Ort immunologischer und inflammatorischer Vorgänge bei der akuten Transplantatabstoßung ist und dass diese Vorgänge mit einer massiven Dyskontraktilität *in vitro* assoziiert sind.

Die von uns aufgestellten Hypothesen über die Rolle der Tunica muscularis bei der Dünndarmtransplantation sollen hier kurz gefasst den Einstieg zur Diskussion unserer Ergebnisse erleichtern.

Als erste Hypothese postulierten wir, dass die, zunächst unspezifischen, inflammatorischen Veränderungen mit Aktivierung der residenten Makrophagen in der Tunica muscularis die Abstoßungsreaktion in der Tunica muscularis eines allogenen Dünndarmtransplantationsmodells beeinflussen und gegebenenfalls aggravieren können. Beschrieben ist die verstärkende Rolle von früh aktivierten Makrophagen bei der Abstoßung von „small for size“ Leber Allotransplantaten, ebenfalls im Rattenmodell (Yang et al. 2004). Auch für die Nierentransplantation wird ein Einfluss der transplantationsbedingten Schädigung auf eine akute Abstoßung diskutiert (Lu et al. 1999). Bei der Dünndarmtransplantation ist die Rolle der Tunica muscularis bis dato noch nicht im Setting der akuten Transplantatabstoßung untersucht worden. Wir konnten nun zeigen, dass bei der intestinalen Transplantation allogene Wechselwirkungen zwischen Transplantat und Empfänger durch die Aktivität der residenten Immunzellen der Tunica muscularis beeinflusst werden (Schaefer et al. 2006b).

Als zweite Hypothese untersuchten wir die immunologische Aktivität der Tunica muscularis während der akuten Abstoßung. Welche charakteristischen molekularen, zellulären und

immunologischen Veränderungen in der Tunica muscularis führen zur akuten Abstoßung? Die vorliegenden Befunde zur Histologie, Mediatoraufregulation, Zellinfiltration, Apoptose und die inflammatorischen Veränderungen in der Tunica muscularis während der akuten Abstoßung, welche ohne Einsatz von Immunsuppressiva nicht reversibel sind, sollen im Folgenden kritisch beurteilt werden.

Die dritte Hypothese postuliert eine Dysmotilität der allogenen Grafts, ausgelöst durch die wandständige Entzündung und iNOS Expression und andere, abstoßungsassoziierte Vorgänge (Apoptose). Wir vermuteten, dass die immunologischen Vorgänge in der allogenen transplantierten Tunica muscularis im Rahmen der akuten Abstoßung unter anderem ebenfalls durch Expression kinetisch aktiver Mediatoren (iNOS) zu einer motorischen Dysfunktion des Transplantates führen würden und diese Dysfunktion stärker ausgeprägt sein müsste als bei isogenen Grafts. Auch zu diesem Punkt soll im Folgenden Bezug genommen werden.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt im zeitlichen Ablauf der Geschehnisse in der Darmwand, beginnt also mit der initialen postoperativen Entzündung. In beiden Settings, isogene und allogene Dünndarmtransplantation, findet sich zunächst eine vermutlich durch Ischämie/Reperfusion und Manipulation ausgelöste Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis zum Zeitpunkt 24h postoperativ. Diese zeichnet sich durch eine massive Infiltration der Darmwand mit neutrophilen Granulozyten (**Abb.6**) und Monozyten (**Abb.7**), sowie Aktivierung von darmwandständigen Makrophagen, Mediatoraufregulation und Dysmotilität der entnommenen Muskelstrips *in vitro* (**Abb.27**) aus. Diese frühe Reaktion ist in der Literatur und in Vorarbeiten mehrfach beschrieben worden (Kalff et al. 1998a, Kalff et al. 1998b, Schaefer et al. 2006a, Türler et al. 2002b). Histologisch zeigt sich vor allem, neben der neutrophilen Infiltration, eine Architekturstörung und Denudierung der Mucosa (**Abb.23**). Unter den aufregulierten Mediatoren sind in dieser ersten Phase insbesondere IL6, MCP1, iNOS und TNF α unter Anderen zu nennen (**Abb.3, 4, 28, 11**). MCP1 wurde als chemotaktischer Faktor für Leukozyten untersucht, beschrieben im Zusammenhang mit Leukozytenrekrutierung und Abstoßungsvorgängen im Rahmen der Transplantation von verschiedenen Organen (Farivar et al. 2005, Türler et al. 2002), es zeigt hier eine frühe signifikante Aufregulation. IL6 wurde als typischer Entzündungsmarker auch im Rahmen von Abstoßungsvorgängen untersucht (McDiarmid et al. 1994, Romano et al. 1997, Wehner et al. 2005). IL6 zeigt sich in diesem Versuch im Rahmen der postoperativen Inflammationsreaktion nach 24h in beiden Gruppen signifikant aufreguliert. iNOS wurde vor allem in Bezug auf Hypothese 3 untersucht, als ein bei Nagern bereits für intestinale Dysmotilität verantwortlich identifiziertes Enzym (via NO Synthese und somit Funktionsunterdrückung der glatten Muskulatur) (Eskandari et al. 1999, Kalff et al. 2000, Türler et al. 2006). Auch iNOS ist am ersten Beobachtungszeitpunkt aufreguliert, zeitgleich

mit der ersten von uns beobachteten Dyskontraktilität in beiden Gruppen. TNF α , ein abstoßungs- und apoptoseinduzierender Faktor ist interessanterweise ebenso früh im zeitlichen Ablauf aufreguliert. Diese Aufregulation zeigt sich während der akuten Entzündung 24h postoperativ nur bei den allogenen transplantierten Tieren. Eventuell macht sich bereits zu diesem Zeitpunkt eine Antigenität als verstärkendes Element bemerkbar. Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung von ersten Apoptosemaxima in der Tunica muscularis bei den allogenen transplantierten Tieren, welche vermutlich durch die hohe TNF α Aufregulation mitverursacht werden. TNF α zeigt sein absolutes Induktionsmaximum jedoch mit vollem Einsetzen der akuten Abstoßung nach 7 Tagen, wie die meisten der abstoßungsassoziierten Mediatoren (siehe unten).

Während sich bei den isogenen Tieren die Werte im Verlauf normalisieren, die Infiltration mit Entzündungszellen zurückgeht und die Dyskontraktilität der Muskelstrips *in vitro* gebessert wird, zeigen die allogenen Tiere ohne Immunsuppression einen komplett anderen, charakteristischen Verlauf in ihrer Tunica muscularis, der mit akuter Abstoßung assoziiert ist. Nach einer vorübergehenden Latenzphase, die bis zu 96h andauert, kommt es zu einer abstoßungsbedingten, immunologischen Reaktion in der Tunica muscularis. Dieser immunologisch bedingte „second hit“ ist zunächst durch ein Auftreten anderer zellulärer Infiltrate in der Tunica muscularis gekennzeichnet. Statt neutrophilen Granulozyten finden sich nun vermehrt lymphozytäre Zellen, die immunhistochemisch zu einem Großteil als CD8 $^{+}$ identifiziert wurden (**Abb.9**). Histologisch zeichnet sich die beginnende Abstoßung durch eine Zunahme der Apoptotischen Körperchen in der Mucosa, Propriafibrose mit Kryptenuntergang sowie einer zunehmenden Architekturstörung und Muskularisverdünnung des Darmes aus (**Abb.23**) (Wu et al. 2003, Wu et al. 2006). Das Expressionsprofil der untersuchten Mediatoren ändert sich, die anfänglich erwähnten Marker (IL6, MCP1, iNOS, TNF α) steigen weiter, oder zeigen einen distinkt zweigipfligen Verlauf (IL6, MCP1, TNF α), analog mit den Phasen der postoperativen Entzündung und dem späteren Einsetzen der akuten Abstoßung. Desweiteren zeigen andere Marker nun erstmalig signifikante Aufregulationen: ICAM 1 ist ebenfalls als ein Schlüsselement der Leukozytenrekrutierung beschrieben worden (Kalff et al. 1999c, Kato et al. 1995, Zhang et al. 2003). Es wird in diesem Experiment zum Zeitpunkt 168h postoperativ als mindestens fünffach erhöht gemessen (**Abb. 5**), 24h postoperativ war ebenfalls eine geringe Erhöhung nachweisbar, jedoch in unserer Messung nicht signifikant. Zusätzlich findet sich eine Aufregulation von IFN γ , IL10, IL2 und FasL (**Abb.12, 10, 13, 26**) die in der Literatur als immunregulatorisch und für T Zell Proliferation verantwortlich bekannt sind und deren Expression vor allem im Rahmen von Abstoßungsmechanismen reguliert wird (Li et al. 2001, Obara et al. 2005, Porter et al. 2000, van den Boogaardt et al. 2006, Waldmann et al. 1992). IL 10 kann in diesem Zusammenhang

gesondert erwähnt werden, da es als antiinflammatorisches Zytokin gegensätzliche Wirkungen hat und als Gegenregulation des Organismus zu den inflammatorischen Abstoßungsvorgängen gesehen werden kann (Izcue et al. 2006, Zhu et al. 2004).

Der Vergleich der in vitro gemessenen Muskelkontraktilitäten erbrachte, dass die Dysmotilität der allogenen transplantierten Muskelstrips signifikant ausgeprägter wird, je länger diese dem immunologischen Prozess der Abstoßung ausgesetzt sind. Am Tag 7 nach Operation zeigt die allogene Muskularis kaum mehr vorhandene Kontraktionen im Organbad, während die isogene sich fast bis auf Kontrollniveau erholte (**Abb.27**). Assoziiert ist dieser Kontraktilitätsverlust mit einem absoluten Maximum an iNOS Expression in der Tunica muscularis (**Abb.28**). iNOS ist in der Literatur als einer der Mediatoren bekannt, die über NO Synthese gastrointestinale Motilität beeinträchtigen (siehe oben). NO selbst, freigesetzt sowohl während des Ischämie/Reperfusionsschadens als auch während der akuten Abstoßung, verstärkt diese und setzt somit einen circulus vitiosus von NO Freisetzung, Dysmotilität und Abstoßung in Gang. (Nakao et al. 2003a, Toogood et al. 1996). Als Quelle der iNOS Freisetzung kommen Leukozyten, glatte Muskulatur, Endothelzellen und Ganglienzellen der neuronalen Plexus in Frage. In Vorarbeiten unserer Gruppe wurden vor allem Monozyten, Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile als iNOS Quellen identifiziert (Kalff et al. 2000, Turler et al. 2006), ein Befund der sich mit den hier vorliegenden Befunden deckt. Darüber hinaus konnte in der allogenen Tunica muscularis während der akuten Abstoßung 7 Tage posttransplant ein Maximum an Apoptosesignalen mittels TUNEL Test gemessen werden (**Abb.25**). Kausal könnte hier die bereits erwähnte TNF α Aufregulation, erhöhte LPS Konzentrationen, Fas Ligand Freisetzung (**Abb.26**) und sogar NO selbst als apoptoseinduzierend angenommen werden. Es stehen also mehrfache Wege zur Diskussion, die vermutlich kofaktoriell, die verstärkte Apoptose bewirken. Eine Behandlung dieser Muskelstrips mit dem selektiven iNOS Antagonisten L-NIL erbringt eine Kontraktilitätsverbesserung um das fünffache, allerdings wird das Kontrollniveau isogen transplantierte Muskularis nicht erreicht (**Abb.29**). Dies lässt vermuten, dass neben den inhibitorischen Mediatoren (NO) auch zelldestruktive Prozesse im Rahmen der akuten Abstoßung die Kontraktilität beeinflussen.

Die Beobachtung, dass das Ausmaß der Transplantatabstoßung mit einer Einschränkung der motorischen Funktion des Transplantates direkt korreliert, unterstützt die Hypothese, dass die Entzündungsvorgänge in der Tunica muscularis in direktem Zusammenhang mit der Abstoßung stehen (Alessiani et al. 2003).

Es lässt sich also schließen: Das Auftreten akuter Abstoßung geht mit spezifischen Zellinfiltrationen in die Tunica muscularis von Dünndarmgrafts einher, welche von einer

Mediatoraufregulation und Beeinträchtigung der Muskelfunktion in vitro begleitet werden. Die unspezifische postoperative Entzündung in der Tunica muscularis tritt in allogenen transplantierten Grafts genauso auf, wird aber danach durch spezifische immunologische Vorgänge (Antigenität) im Rahmen der Abstoßung aggraviert und mündet schließlich im Vollbild der „acute Rejection“. Die dabei auftretende Dyskontraktilität der Muskelstrips in vitro ist auch mit einer iNOS Aufregulation assoziiert und kann durch L-NIL Gabe in vitro gemildert werden. Offenbar spielen aber auch andere Vorgänge, wie zum Beispiel abstoßungsassoziierte Apoptose, in der Muskelschicht des Darmes eine kofaktorielle Rolle. Somit ist die Tunica muscularis nicht nur ein reines Aktivitätsorgan, sondern auch ein immunologisch aktiv partizipierendes Kompartiment bei der akuten Abstoßung von Dünndarm Grafts. Dies erscheint der Arbeitsgruppe eine wesentliche Erkenntnis aus mehreren Gründen:

Bislang erfolgt das Transplantatmonitoring im klinischen Setting aus technischen Gründen zumeist anhand von Schleimhautbiopsien. Wir haben erste Anhaltspunkte dafür, dass eine beginnende Abstoßung möglicherweise mit Vorgängen in der Tunica muscularis assoziiert sein kann (Apoptosesignale in der Muskularis bei noch relativ intakter Schleimhaut derselben Darmabschnitte **Abb.25**), welche mit der Schleimhautbiopsie nicht fassbar sind und somit zwangsläufig übersehen werden. Kurz nach der Ischämie/Reperfusion und ebenso bei einer fortgeschrittenen Abstoßung wird die Tunica mucosa weitgehend abgestoßen (mucosal sloughing) und die Tunica muscularis bleibt als immunologisch aktives Kompartiment erhalten. Eine sich dort manifestierende Entzündungsreaktion mit Makrophagenaktivierung, lokaler Expression chemotaktischer Substanzen und Adhäsionsmolekülen, und einer dort stattfindenden Antigenpräsentation könnte möglicherweise sogar zeitlich vor Manifestation der Abstoßung in der Mucosa in der Muskularis initiiert und unterhalten werden. Weitere Untersuchungen der Gruppe zum Vergleich der sich in der Schleimhaut manifestierenden Abstoßung und der Manifestation in der Tunica Muskularis sind geplant.

Zweitens ist die Tunica muscularis mechanistisch gesehen ein Schlüsselement der motorischen Transplantatfunktion. Ist sie durch Organentnahme, Organpräservierung, Ischämie und Reperfusion und schließlich Abstoßung geschädigt (Bauer 1996, Cicalese et al. 1996, Cicalese et al. 1997, Heeckt et al. 1993, Schwarz et al. 2002, Türler et al. 2002a), so kommt es zu Muskularisdyskontraktilität und dementsprechend schlechter Darmmotilität. Diese intestinale Paralyse kann schließlich zu einer bakteriellen Überwucherung und Translokation mit nachfolgender Sepsis führen und damit zur hohen Morbidität und Mortalität bei der Dünndarmtransplantation beitragen (Cicalese et al. 2001, Garrido et al. 2001, Nishida et al. 2002).

Im Ausblick legt diese Erkenntnis nahe, dass ein suffizientes Transplantatmonitoring nach Dünndarmtransplantation auch die Tunica muscularis mit einbeziehen sollte. Dies würde jedoch der Entwicklung von Techniken zur Vollwandbiopsie oder der Identifikation von spezifischen Muskelmarkersubstanzen im Serum, wie sie für Schädigungen der Mucosa (Citrullin) bereits beschrieben sind, (Pappas et al. 2001) bedürfen.

Diskussionsbedürftig ist die Rolle der residenten Makrophagen in der Tunica muscularis während der akuten Abstoßung. Bekannt und durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt worden, ist ihre Aktivierung im Rahmen der postoperativen Entzündung der Darmwand (Kalff et al. 1998a, Kalff et al. 1998b). Hier im Setting der Transplantation ist eine Aktivierung der muskularisständigen Makrophagen im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens beobachtet worden (Schaefer et al. 2006b, Schaefer et al. 2006a, Türler et al. 2002b). Die Frage, ob diese Aktivierung sich jedoch auf die Schwere und Schnelligkeit der einsetzenden akuten Abstoßung auswirkt, ist in diesem Modell kaum beantwortbar. Denkbar wäre, dass eine frühe Makrophagenaktivierung (der residenten Spendermakrophagen) über die Freisetzung von Mediatoren, Zyto- und Chemokinen, eine schnelle Rekrutierung von Leukozyten des Empfängers in das Transplantat bedingt und somit eine maximale massive Immunantwort des Empfängers provoziert. Experimentell möglich und bereits in Bearbeitung durch unsere Arbeitsgruppe ist eine Depletion der Spendermakrophagen in der Tunica muscularis durch Behandlung mit Chlodronatliposomen und Gadoliniumchlorid. Erste Ergebnisse zeigen eine reduzierte Abstoßung in der Histologie und eine deutlich verbesserte Kontraktilität der Muskelstrips *in vitro*, was eine Beteiligung der Spendermakrophagen nahelegt. Allerdings wandern in grosser Zahl Monozyten und „passenger“ Makrophagen in das Transplantat ein, die ebenfalls wesentlich an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Zudem ist eine akute Abstoßung auch ohne eine Antigenpräsentation durch Phagozyten möglich (T-Zellen sind offenbar in der Lage, auch ohne Interaktion mit Makrophagen, auf die Antigenität des Allografts mit Aktivierung und Expansion zu reagieren (Game et al. 2002). So sollte die Rolle der residenten Transplantatmakrophagen kritisch beurteilt werden, ihre Depletion und ihre Inaktivierung bremst und verzögert aber vermutlich den Verlauf der akuten Abstoßung.

Das Vorhandensein und das Auftreten von T-Zellen in der Tunica muscularis im Rahmen von unspezifischen mechanischen Alterationen konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden (Kalff et al. 1998c, Kalff et al. 1998b). Bisher ist in mehreren Studien sowohl im Rattenmodell als auch im Knock-out Mausmodell die Abhängigkeit von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und deren Einfluß auf die Transplantatabstoßung bei der Dünndarmtransplantation zwar mehrmals nachgewiesen worden, jedoch wurde eine mögliche Assoziation der Abstoßungsvorgänge mit einer Aktivierung dieser Zellen über lokale Entzündungsmechanismen

in der Darmwand, und hier insbesondere in der Tunica muscularis, bisher nicht gezeigt (Briscoe et al. 2002, Krams et al. 1998, Navarro-Zorraquino et al. 2002, Newell et al. 1997). Ob die durch CD4+ oder CD8+ T-Zellen gesteuerten akuten Abstoßungsvorgänge bei der Dünndarmtransplantation direkt durch die unspezifische lokale posttraumatische Entzündungsreaktion getriggert werden oder indirekt über die zelluläre antigenspezifische Immunantwort hervorgerufen werden, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Anfärbung und Beurteilung der CD4+ Lymphozyten in den Dünndarmgrafts während der akuten Abstoßung gestaltete sich als technisch schwierig, sodass ihre Rolle nicht abschließend geklärt werden konnte. Unsere Versuche legen nahe, dass CD8+ Zellen in hohem Maße an der Ausprägung der akuten Abstoßung beteiligt sind. In der Literatur finden sich jedoch durchaus widersprüchliche Hinweise auf die Rolle von CD8+ Zellen bei der akuten Abstoßung. Eine Arbeit konnte Abstoßung ohne CD8+ Zellen zeigen, die Mehrzahl der Autoren jedoch betonen die wichtige Rolle der CD8+ Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (Krams et al. 1998, Navarro-Zorraquino et al. 2002). Weitere Untersuchungen der Gruppe, auch mittels FACS Analysen des peripheren Blutes der Tiere während der akuten Abstoßung sollen die Art der peripher zirkulierenden Lymphozyten bestimmen und werden weitere Anhaltspunkte liefern. In einem zweiten Schritt wäre dann eine selektive Depletion mittels OX 4 und OX 8 Antikörpern denkbar, womit die Effekte der Ausschaltung der einen oder anderen Zellpopulation gezeigt werden könnten.

Als Ausblick für weiterführende Arbeiten in der Grundlagenforschung zu den Mechanismen der akuten Abstoßung am Darm könnten Ansätze und Mechanismen untersucht werden, die bislang nicht zur Sprache gekommen sind, die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit wichtige Faktoren und Induktionsmechanismen der akuten Abstoßung darstellen. Zum Beispiel könnten die Rollen der unspezifischen akuten Immunantwort, beispielsweise Cytolyse vermittelt durch Granzyme B und Perforin (Corti et al. 2005, McDiarmid et al. 1995) oder die Komplementaktivierung sowie die Antikörper vermittelte Immunantwort (Kato et al. 2006, Ruiz et al. 2003) untersucht werden. Mit dem gleichen Modell wäre es ebenso möglich, die Effekte, sowohl von gängigen als auch neuen Immunsuppressiva, auf die akute Abstoßung in der Tunica muscularis zu untersuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern unserer Meinung nach die bestehenden Erkenntnisse über die Rolle der Tunica muscularis bei der intestinalen Transplantation, insbesondere über ihre immunologische Bedeutung wesentlich (Alessiani et al. 2003, Cicalese et al. 1996, Ikoma et al. 1994, Nakada et al. 1995, Sugitani et al. 1997), lassen aber auch noch viele Fragen unbeantwortet. Im vollen Bewusstsein, dass der Wert einer wissenschaftlichen Arbeit auch in der Etablierung von Basisbefunden für weiterführende Untersuchungen liegt und weiterführende Fragen aufwirft, soll angemerkt werden: Das vorliegende Modell eignet sich gut

für die Bearbeitung der Vorgänge in der Tunica muscularis bei der Dünndarmtransplantation, da es trotz des hohen technischen Aufwands gut reproduzierbare Ergebnisse generiert. Interessant ist dieses noch relativ neue Feld der Transplantationsmedizin vor allem auch deshalb, da bei der intestinalen Transplantation die Vorgänge Inflammation und akute Abstoßung so eng miteinander verbunden sind wie dies sonst eigentlich nur von Lungentransplantaten bekannt ist (Ng et al. 2006, Nicod 2006).

5. Zusammenfassung

Das Patienten- und Organüberleben bei der klinischen Dünndarmtransplantation wird deutlich durch das Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion beeinflusst. Dies liegt im Wesentlichen in den, in hohem Ausmass in den Gewebekompartimenten des Dünndarmes vorhandenen, immunologisch aktiven Zellen begründet. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Rolle der Tunica muscularis und der dort ablaufenden Inflammationsvorgänge während der akuten Abstoßung nach Dünndarmtransplantation untersucht. Syngene Dünndarmtransplantation (LEW → LEW Ratten) verursacht durch den Ischämie/Reperfusionsschaden und die Darmmanipulation eine lokale Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis welche mit Dyskontraktilität der Muskelstrips in vitro verbunden ist. Diese unspezifische Entzündungsreaktion ist reversibel. Allogene Dünndarmtransplantation in einem high-responder Modell (BN → LEW) führt zunächst zu ähnlichen inflammatorischen Vorgängen in der Tunica muscularis. Mit Einsetzen der akuten Abstoßung jedoch kommt es zu einer immunologisch bedingten weiteren Schädigung der Tunica muscularis des Transplantats, die sich unter anderem durch eine massive inflammatorische Reaktion, spezifische Zellinfiltrate und eine noch stärkere Dyskontraktilität auszeichnet und im Verlauf (168h) zum Transplantatversagen führt.

Während der unspezifischen Entzündungsphase fand sich in der Tunica muscularis eine starke Infiltration mit Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen. Die Expressionslevel von IL6, ICAM1, MCP1, iNOS und TNF α wurden als erhöht in der SYBR Green RT PCR gemessen. Es zeigte sich eine Dyskontraktilität der Muskelstrips in vitro. Die Histologie zeigte unspezifische entzündliche Veränderungen. Bei der akuten Abstoßung, die ab 96h post transplantationem nachweisbar war, zeigte sich ein spezifisches Infiltrat aus lymphozytären Zellen in der Tunica muscularis (zumeist CD8+) sowie phagozytären Zellen. Die genannten Mediatoren zeigten ein zweites, absolutes Induktionsmaximum in der PCR. Zusätzlich wurden die abstoßungsassoziierten Mediatoren IFN γ , IL10, IL2, TNF α und FasL als erhöht detektiert. Die Dyskontraktilität (verursacht durch iNOS vermittelte NO Synthese und zelldestruktive Vorgänge in der Tunica muscularis) war stärker ausgeprägt als bei der syngenen Gruppe und verschlechterte sich im Verlauf der Abstoßung. Der selektive iNOS Antagonist L-NIL konnte die Dyskontraktilität in vitro um den Faktor 5 bessern, jedoch nicht auf Niveau der syngenen Grafts. Mittels TUNEL Test wurden erhöhte Apoptoseraten in der Tunica muscularis der allogenen Grafts festgestellt, gleichzeitig mit Induktionsmaxima für TNF α und Fas Ligand als apoptoseinduzierende Mediatoren. Die Histologie ergab Zeichen der milden (96h) bis moderaten (168h) akuten Abstoßung.

Wir schlussfolgern, dass die sich während des Transplantationsvorganges manifestierende Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis, möglicherweise schon zeitlich vor der Tunica mucosa, über die lokale Expression von chemotaktischen Substanzen und Adhäsionsmolekülen, zu einer schnellen Rekrutierung alloreaktiver Leukozyten in das Transplantat führt. Abstoßungsmechanismen werden hierdurch verstärkt, bzw. möglicherweise erst in Gang gesetzt. Die unspezifische posttraumatische Entzündung und die spezifische Abstoßungsreaktion bewirken dann kofaktoriell und wechselseitig den Funktionsverlust bis zum Untergang des Transplantates. Dementsprechend sollten die Vorgänge in der Tunica muscularis sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie, zur Prävention und Behandlung der akuten Abstoßung nach intestinaler Transplantation mitberücksichtigt werden. Aus dem Gesagten folgern wir außerdem, dass durch eine gezielte und frühzeitige Blockade der Entzündungskaskade, möglicherweise schon während der Transplantation, das Outcome der Dünndarmtransplantation verbessert werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Literaturangaben

1. Intestinal transplant registry.
2. Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, Mazariegos G, Wu T, Murase N, Sindhi R, Martin D, Colangelo J, Zak M, Janson D, Ezzelarab M, Dvorchik I, Parizhskaya M, Deutsch M, Demetris A, Fung J, Starzl TE. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001; 234: 401-416.
3. Abu-Elmagd KM, Reyes J, Fung JJ, Mazariegos G, Bueno J, Janov C, Colangelo J, Rao A, Demetris A, Starzl TE. Evolution of clinical intestinal transplantation: improved outcome and cost effectiveness. *Transplant Proc* 1999; 31: 582-584.
4. Alessiani M, De Ponti F, Fayer F, Abbiati F, Zonta S, Zitelli E, Arbustini E, Morbini P, Poggi N, Klersy C, Blangetti I, Dionigi P, Zonta A. The influence of surgery, immunosuppressive drugs, and rejection, on graft function after small bowel transplantation: a large-animal study. *Transplant International* 2003; 16: 327-335.
5. Alessiani M, Zonta S, Abbiati F, Cobianchi L, Bardone M, Zitelli E, Doni M, Vigano J, Mazzilli M, Lovisetto F, Dominioni T, Dionigi B, Lusona B, Morbini P, Molinaro MD, Dionigi P. Efficacy of malononitramid FK778 in a preclinical model of small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 2719-2721.
6. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
7. Bauer AJ. Transplantation-induced injuries of the intestinal muscularis and its innervation: from preservation to chronic rejection. *Transplant Proc* 1996; 28: 2539-2541.
8. Bianchi A. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: results in 20 children. *J R Soc Med* 1997; 90: 429-432.
9. Bond GJ, Mazariegos GV, Sindhi R, Abu-Elmagd KM, Reyes J. Evolutionary experience with immunosuppression in pediatric intestinal transplantation. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 274-279.
10. Briscoe DMSayegh MH. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med* 2002; 8: 220-222.
11. Bueno J, Green M, Kocoshis S, Furukawa H, Abu-Elmagd K, Yunis E, Irish W, Todo S, Reyes J, Starzl TE. Cytomegalovirus infection after intestinal transplantation in children. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1078-1083.
12. Burroughs M, Sobanjo A, Florman S, Kaufman SS, Fishbein T. Cytomegalovirus matching does not predict symptomatic disease in intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 946-947.

13. Cicalese L, Billiar TR, Rao AS, Bauer AJ. Interaction between ischemia/reperfusion-induced leukocyte emigration and translocating bacterial enterotoxins on enteric muscle function. *Transplant Proc* 1997; 29: 1815.
14. Cicalese L, Halfter WM, Heeckt PF, Schraut WH, Bauer AJ. Immunocyte infiltration of the graft muscularis and its effect on muscle function during acute rejection of rat small intestinal allografts. *Transplant Proc* 1996; 28: 2459.
15. Cicalese L, Kuddus R, Yacoub W, Subbotin V, Fung JJ, Starzl TE. Ischemia/reperfusion injury induces chronic changes in the small bowel. *Transplant Proc* 2000; 32: 1315.
16. Cicalese L, Sileri P, Green M, Abu-Elmagd K, Kocoshis S, Reyes J. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1414-1417.
17. Corti B, Altimari A, Gabusi E, Pinna AD, Lauro A, Morselli-Labate AM, Gruppioni E, Pirini MG, Fiorentino M, Ridolfi L, Grigioni WF, D'Errico-Grigioni A. Potential of real-time PCR assessment of granzyme B and perforin up-regulation for rejection monitoring in intestinal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 4467-4471.
18. Cosimi ABSachs DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 2004; 77: 943-946.
19. DiMartini A, Rovera GM, Graham TO, Furukawa H, Todo S, Funovits M, Lu S, Abu-Elmagd K. Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22: 357-362.
20. Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KK, Bauer AJ. LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am J Physiol* 1999; 277: G478-G486.
21. Eskandari MK, Kalff JC, Lee KK, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates jejunal muscularis macrophages and suppresses circular muscularis activity. *Transplant Proc* 1998; 30: 2670.
22. Farivar AS, Mackinnon-Patterson BC, McCourtie AS, Ward PA, Mulligan MS. The role of CC and CXC chemokines in cardiac allograft rejection in rats. *Exp Mol Pathol* 2005; 78: 171-176.
23. Finn L, Reyes J, Bueno J, Yunis E. Epstein-Barr virus infections in children after transplantation of the small intestine. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 299-309.
24. Fishbein TM, Gondolesi GE, Kaufman SS. Intestinal transplantation for gut failure. *Gastroenterology* 2003; 124: 1615-1628.
25. Fishbein TM, Liu J, Wang L, Li Y, Boros P. Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant. *J Surg Res* 2004; 119: 51-55.
26. Flynn B, Park BK, Bond G, McGhee W, Mazariegos G, Sindhi R, Reyes J, Abu-Elmagd K. Immunosuppressant strategies for intestinal transplantation: a review of a tolerogenic regimen. *Prog Transplant* 2005; 15: 60-64.

27. Fryer JP. Intestinal transplantation: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 162-168.
28. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2002; 10: 101-108.
29. Garrido V, Bond GJ, Mazariegos G, Wu T, Martin D, Colangelo J, Ezzelarab M, Fung J, Reyes J, Abu-Elmagd K. Late severe rejection of intestinal allografts: risks and survival outcome. *Transplant Proc* 2001; 33: 1556-1557.
30. Grant D. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. *Intestinal Transplant Registry. Transplantation* 1999; 67: 1061-1064.
31. Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, Tzakis A, Langnas A, Fishbein T, Goulet O, Farmer D. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg* 2005; 241: 607-613.
32. Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A. A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem J* 1977; 9: 789-792.
33. Heeckt PF, Halfter WM, Schraut WH, Lee KK, Bauer AJ. Small bowel transplantation and chronic rejection alter rat intestinal smooth muscle structure and function. *Surgery* 1993; 114: 449-456.
34. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Twardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1999; 68: 1244-1254.
35. Ikoma A, Nakada K, Suzuki T, Nakamura K, Reynolds JC, Todo S, Starzl TE. Gastrointestinal motility in the immediate postoperative period after intestinal transplantation, with special reference to acute rejection. *Transplant Proc* 1994; 26: 1657-1658.
36. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006; 212: 256-271.
37. Kalff JC, Buchholz BM, Eskandari MK, Hierholzer C, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery* 1999a; 126: 498-509.
38. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999b; 117: 378-387.
39. Kalff JC, Cicalese L, Exner B, Schraut WH, Bauer AJ. Role of phagocytes in causing dysmotility after each stage of small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1998a; 30: 2568.
40. Kalff JC, Hierholzer C, Tsukada K, Billiar TR, Bauer AJ. Hemorrhagic shock results in intestinal muscularis intercellular adhesion molecule (ICAM-1) expression,

- neutrophil infiltration, and smooth muscle dysfunction. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999c; 119: 89-93.
41. Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 2000; 118: 316-327.
 42. Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998b; 228: 652-663.
 43. Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998c; 63: 683-691.
 44. Kalff JC, Türler A, Schwarz NT, Schraut WH, Lee KK, Tweardy DJ, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg* 2003; 237: 301-315.
 45. Kato T, Mizutani K, Terasaki P, Quintini C, Selvaggi G, Thompson J, Ruiz P, Tzakis A. Association of emergence of HLA antibody and acute rejection in intestinal transplant recipients: a possible evidence of acute humoral sensitization. *Transplant Proc* 2006; 38: 1735-1737.
 46. Kato Y, Yamataka A, Yagita H, Bashuda H, Okumura K, Miyano T. Prevention of fetal bowel allograft rejection by combined treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 antibodies. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1093-1097.
 47. Kaufman SS, Magid MS, Tschernia A, LeLeiko NS, Fishbein TM. Discrimination between acute rejection and adenoviral enteritis in intestinal transplant recipients. *Transplant Proc* 2002; 34: 943-945.
 48. Kim HB, Fauza D, Garza J, Oh JT, Nurko S, Jaksic T. Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 425-429.
 49. Kita Y, Takashi T, Iigo Y, Tamatani T, Miyasaka M, Horiuchi T. Sequence and expression of rat ICAM-1. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1131: 108-110.
 50. Kosuga K, Yui Y, Hattori R, Sase K, Eizawa H, Aoyama T, Inoue R, Sasayama S. Cloning of an inducible nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear cells. *Endothelium* 1994; 2: 217-221.
 51. Krams SM, Hayashi M, Fox CK, Villanueva JC, Whitmer KJ, Burns W, Esquivel CO, Martinez OM. CD8+ cells are not necessary for allograft rejection or the induction of apoptosis in an experimental model of small intestinal transplantation. *J Immunol* 1998; 160: 3673-3680.
 52. Lear PA, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RF. Lymphocyte migration patterns in small bowel transplants. *Transplant Proc* 1989; 21: 2881-2882.
 53. Lee TK, Heeckt P, Smith SD, Lee KK, Rowe MI, Schraut WH. Postoperative selective bowel decontamination prevents gram-negative bacterial translocation in small-bowel graft recipients. *J Surg Res* 1995; 58: 496-502.

54. Li Y, Li N, Li Y, Wu B, Li J. Up-regulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 1089-1094.
55. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int* 1999; 55: 2157-2168.
56. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1359-1377.
57. McDiarmid SV, Farmer DG, Kuniyoshi JS, Robert M, Khadavi A, Shaked A, Busuttil RW. The correlation of intragraft cytokine expression with rejection in rat small intestine transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 690-697.
58. McDiarmid SV, Farmer DG, Kuniyoshi JS, Robert M, Khadavi A, Shaked A, Busuttil RW. Perforin and granzyme B. Cytolytic proteins up-regulated during rejection of rat small intestine allografts. *Transplantation* 1995; 59: 762-766.
59. Middleton S, Jamieson NV. The current status of small bowel transplantation in the UK and internationally. *Gut* 2005; 54: 1650-1657.
60. Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol* 1995; 10: 719-736.
61. Moore BA, Nakao A, Otterbein LE, Choi AM, Bauer AJ, Murase N. Carbon monoxide protects against intestinal dysmotility associated with small bowel transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122 Suppl 1: A-38.
62. Murase N, Demetris AJ, Woo J, Tanabe M, Furuya T, Todo S, Starzl TE. Graft-versus-host disease after brown Norway-to-Lewis and Lewis-to-Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506. *Transplantation* 1993; 55: 1-7.
63. Nakada K, Ikoma A, Suzuki T, Reynolds JC, Campbell WL, Todo S, Starzl TE. Amelioration of intestinal dysmotility and stasis by octreotide early after small-bowel autotransplantation in dogs. *Am J Surg* 1995; 169: 294-299.
64. Nakao A, Moore BA, Murase N, Liu F, Zuckerbraun BS, Bach FH, Choi AM, Nalesnik MA, Otterbein LE, Bauer AJ. Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility. *Gut* 2003a; 52: 1278-1285.
65. Nakao A, Nalesnik MA, Ishikawa T, Azhipa O, Demetris AJ, Murase N. Chimerism and tolerance in rat recipients of intestinal allografts from ALS-treated donors with and without adjunct naive--donor-strain bone-marrow cells. *Transplantation* 2003b; 75: 1575-1581.
66. Navarro-Zorraquino M, Guemes A, Pastor C, Soria J, Sousa R, Salinas JC, Tejero E, Lozano R. Apoptosis and CD8 and CD54 cell expression in rat small bowel transplantation. *J Surg Res* 2002; 103: 37-40.
67. Newell KA, He G, Hart J, Thistlethwaite JR, Jr. Treatment with either anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies blocks alpha beta T cell-mediated rejection of intestinal allografts in mice. *Transplantation* 1997; 64: 959-965.

68. Ng CS, Wan S, Arifi AA, Yim AP. Inflammatory response to pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Surg Today* 2006; 36: 205-214.
69. Nicod LP. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 444-449.
70. Nishida S, Levi D, Kato T, Nery JR, Mittal N, Hadjis N, Madariaga J, Tzakis AG. Ninety-five cases of intestinal transplantation at the University of Miami. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 233-239.
71. Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 16072-16082.
72. Obara H, Nagasaki K, Hsieh CL, Ogura Y, Esquivel CO, Martinez OM, Krams SM. IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *Am J Transplant* 2005; 5: 2094-2103.
73. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marin O, Huijing F, Gelman B, Levi DM, Nery JR, Kato T, Mittal N, Nishida S, Thompson JF, Ruiz P. Serum citrulline and rejection in small bowel transplantation: a preliminary report. *Transplantation* 2001; 72: 1212-1216.
74. Parizhskaya M, Walpusk J, Mazariegos G, Jaffe R. Enteric adenovirus infection in pediatric small bowel transplant recipients. *Pediatr Dev Pathol* 2001; 4: 122-128.
75. Pfitzmann R, Neuhaus P, Hetzer R. Organtransplantation.
76. Porter CJ, Ronan JE, Cassidy MJ. fas-fas-ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 2000; 69: 1091-1094.
77. Quigley EM, Marsh MN, Shaffer JL, Markin RS. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1993; 104: 286-301.
78. Renz-Polster H, Krauzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin.
79. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van H, V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325.
80. Rosemurgy ASSchraut WH. Small bowel allografts. Sequence of histologic changes in acute and chronic rejection. *Am J Surg* 1986; 151: 470-475.
81. Ruiz P, Garcia M, Pappas P, Berney T, Esquenazi V, Kato T, Mittal N, Weppler D, Levi D, Nishida S, Nery J, Miller J, Tzakis A. Mucosal vascular alterations in isolated small-bowel allografts: relationship to humoral sensitization. *Am J Transplant* 2003; 3: 43-49.
82. Sax HC, Rombeau JL, Caldwell. Clinical nutrition, parenteral nutrition.

83. Schaefer N, Tahara K, von Websky M, Abu-Elmagd K, Kalff JC, Hirner A, Tuerler A. Inducible Nitric Oxide Expression in the intestinal muscularis mediates severe smooth muscle dysfunction during acute rejection in allogeneic rodent small bowel transplantation.
84. Schaefer N, Tahara K, Schmidt J, Zobel S, Kalff JC, Hirner A, Turler A. Mechanism and impact of organ harvesting and ischemia-reperfusion injury within the graft muscularis in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2006a; 38: 1821-1822.
85. Schaefer N, Tahara K, Websky M, Kalff JC, Hirner A, Turler A. Acute rejection in allogeneic rodent small bowel transplantation causes smooth muscle dysfunction via an inflammatory response within the intestinal muscularis. *Transplant Proc* 2006b; 38: 1792-1793.
86. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285: 194-204.
87. Schwarz NT, Beer-Stolz D, Simmons RL, Bauer AJ. Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann Surg* 2002; 235: 31-40.
88. Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 Suppl 2: 14607-14614.
89. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ, . Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1993; 17: 1127-1152.
90. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, Corry RJ, Jordan ML, Fontes P, Gayowski T, Bond G, Scantlebury VP, Potdar S, Randhawa P, Wu T, Zeevi A, Nalesnik MA, Woodward J, Marcos A, Trucco M, Demetris AJ, Fung JJ. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003; 361: 1502-1510.
91. Starzl TE, Murase N, Demetris AJ, Trucco M, Abu-Elmagd K, Gray EA, Eghtesad B, Shapiro R, Marcos A, Fung JJ. Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004; 77: 926-929.
92. Sudan D, DiBaise J, Torres C, Thompson J, Raynor S, Gilroy R, Horslen S, Grant W, Botha J, Langnas A. A multidisciplinary approach to the treatment of intestinal failure. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 165-176.
93. Sugitani A, Bauer AJ, Reynolds JC, Halfter WM, Nomoto M, Starzl TE, Todo S. The effect of small bowel transplantation on the morphology and physiology of intestinal muscle: a comparison of autografts versus allografts in dogs. *Transplantation* 1997; 63: 186-194.
94. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 365-376.

95. Tanabe M, Murase N, Demetris AJ, Hoffman RA, Nakamura K, Fujisaki S, Galvao FHF, Todo S, Starzl TE. Influence of Donor-Recipient Strain Combinations on Immunological Responses After Allogeneic Rat Small-Bowel Transplantation. *Transplantation Proceedings* 1994; 26: 1569-1570.
96. Thompson JS. Surgical rehabilitation of intestine in short bowel syndrome. *Surgery* 2004; 135: 465-470.
97. Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation: I. An unusual pattern of cytokine expression. *Transplantation* 1996; 62: 851-855.
98. Türler A, Abu-Elmagd KM, Kalff JC, Bond GJ, Brunagel G, Schraut WH, Moore BA, Bauer AJ. Molecular inflammatory events within the human intestinal muscularis during small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2002a; 34: 921.
99. Türler A, Kalff JC, Heeckt P, Abu-Elmagd KM, Schraut WH, Bond GJ, Moore BA, Brünagel G, Bauer AJ. Molecular and functional observations on the donor intestinal muscularis during human small bowel transplantation. *Gastroenterology* 2002b; 122: 1886-1897.
100. Turler A, Kalff JC, Moore BA, Hoffman RA, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Leukocyte-derived inducible nitric oxide synthase mediates murine postoperative ileus. *Ann Surg* 2006; 244: 220-229.
101. Türler A, Moore BA, Pezzone MA, Overhaus M, Kalff JC, Bauer AJ. Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg* 2002c; 236: 56-66.
102. Turler A, Schwarz NT, Turler E, Kalff JC, Bauer AJ. MCP-1 causes leukocyte recruitment and subsequently endotoxemic ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G145-G155.
103. Tzakis AG, Kato T, Levi DM, Defaria W, Selvaggi G, Weppler D, Nishida S, Moon J, Madariaga JR, David AI, Gaynor JJ, Thompson J, Hernandez E, Martinez E, Cantwell GP, Augenstein JS, Gyamfi A, Pretto EA, Dowdy L, Tryphonopoulos P, Ruiz P. 100 multivisceral transplants at a single center. *Ann Surg* 2005; 242: 480-490.
104. Tzakis AG, Kato T, Nishida S, Levi DM, Tryphonopoulos P, Madariaga JR, De Faria W, Nery JR, Regev A, Vianna R, Miller J, Esquenazi V, Weppler D, Ruiz P. Alemtuzumab (Campath-1H) combined with tacrolimus in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1512-1517.
105. van den Boogaardt DE, van Miert PP, de Vaal YJ, de Fijter JW, Claas FH, Roelen DL. The ratio of interferon-gamma and interleukin-10 producing donor-specific cells as an in vitro monitoring tool for renal transplant patients. *Transplantation* 2006; 82: 844-848.
106. Waldmann TA, Pastan IH, Gansow OA, Junghans RP. The multichain interleukin-2 receptor: a target for immunotherapy. *Ann Intern Med* 1992; 116: 148-160.

107. Wehner S, Schwarz NT, Hundsdoerfer R, Hierholzer C, Tweardy DJ, Billiar TR, Bauer AJ, Kalff JC. Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. *Surgery* 2005; 137: 436-446.
108. Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation* 2003; 75: 1241-1248.
109. Wu T, Bond G, Martin D, Nalesnik MA, Demetris AJ, Abu-Elmagd K. Histopathologic characteristics of human intestine allograft acute rejection in patients pretreated with thymoglobulin or alemtuzumab. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1617-1624.
110. Yan S, Rodriguez-Barbosa JI, Pabst O, Beckmann JH, Brinkmann V, Forster R, Hoffmann MW. Control of intestinal allograft rejection by FTY720 and costimulation blockade. *Transplant Proc* 2005; 37: 114-115.
111. Yang ZF, Ho DW, Chu AC, Wang YQ, Fan ST. Linking inflammation to acute rejection in small-for-size liver allografts: the potential role of early macrophage activation. *Am J Transplant* 2004; 4: 196-209.
112. Yoshimura T, Takeya M, Takahashi K. Molecular cloning of rat monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its expression in rat spleen cells and tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 504-509.
113. Young NT. Immunobiology of natural killer lymphocytes in transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1-6.
114. Zhang QW, Kish DD, Fairchild RL. Absence of allograft ICAM-1 attenuates alloantigen-specific T cell priming, but not primed T cell trafficking into the graft, to mediate acute rejection. *J Immunol* 2003; 170: 5530-5537.
115. Zhu M, Wei MF, Liu F, Shi HF, Wang G, Chen S. Allogeneic T-cell apoptosis induced by interleukin-10-modified dendritic cells: a mechanism of prolongation of intestine allograft survival? *Transplant Proc* 2004; 36: 2436-2437.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. med. N. Schäfer für die gute Betreuung und viel wertvolle Hilfe.

PD Dr. med. A. Türler für die freundliche Überlassung des Themas.

Prof. Dr. med. J.C. Kalff

Prof. Dr. med. U. Wulfhekel

Prof. Dr. med. W. Kuhn

Prof. Dr. med. A. Wellmann

Prof. Dr. med. U. Bode

Dr. med. J. Schmidt

Dr. med. B. Stoffels

Dr. rer. nat. S. Wehner

Dr. med. W. Schaupp

Dr. med. E. König

Julia Schaupp

Silke Zobel

Mariola Lysson

Kareem Abu Elmagd, MD PhD

Guilherme Costa, MD

Kazunori Tahara, MD PhD