

Aus dem  
Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med A. Baethmann

**Intravitalmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen  
zur Wirkung poly- und monoklonaler anti-Lymphozytenantikörper  
am konkordanten, xenogenen Primatenmodell**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von Franz Edler von Koch

aus Regensburg

2004

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Rolf Linke

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2004

## **Inhaltsverzeichnis:**

### **A Einleitung**

1. Einführung
2. Mangel an Spenderorganen - Xenotransplantation als Ausweg
3. Polyklonale ATG

### **B Material und Methodik**

1. Tiere
2. Antikörper
3. Nierenperfusionsversuch
  - 3.1. Explantation und Präparation der Nieren
  - 3.2. Perfusion
  - 3.3. Immunhistologie
    - 3.3.1. Gefrierschnitte
    - 3.3.2. Nachweis-Antikörper
    - 3.3.3. Färbemethoden
    - 3.3.4. Auswertungsverfahren
  - 3.4. Lymphozyten in vitro Bindungstest
    - 3.4.1. Mononukleäres Konzentrat
    - 3.4.2. Untersuchtes Gewebematerial
    - 3.4.3. Auswertungsverfahren
4. Intravitalmikroskopische Versuche
  - 4.1. Definitionen
  - 4.2. Versuchsgruppen
  - 4.3. Präparation
  - 4.4. Perfusion

- 4.4.1. Perfusionssystem
- 4.4.2. Perfusat
  - 4.4.2.1. Spenderblut
  - 4.4.2.2. Vorbehandlung mit Antikörpern
  - 4.4.2.3. Fluoreszenzfärbung
- 4.5. Intravitalmikroskopie
  - 4.5.1. Mikroskop
  - 4.5.2. Auswertungsverfahren

## **C. Ergebnisse**

### **1. Immunhistologie**

- 1.1. Kontrollgruppen
- 1.2. Nachweis von ATG Fresenius
- 1.3. Nachweis von ATG Mérieux

### **2. Lymphozyten Bindungstest**

- 2.1. Kontrollgruppe
- 2.2. Bindung bei Vorbehandlung mit ATG Fresenius

### **3. Intravitalmikroskopie (IVM)**

- 3.1. Auswertung
  - 3.1.1. Perfusion mit unbehandeltem Spenderblut (keine Antikörpertherapie)
  - 3.1.2. Spenderblut vorbehandelt mit ATG Fresenius
  - 3.1.3. Spenderblut vorbehandelt mit ATG Mérieux
  - 3.1.4. Spenderblut vorbehandelt mit anti-IL-2 (CD25) Rezeptor Antikörpern
  - 3.1.5. Zugabe von ATG unter laufender Perfusion

## **D. Diskussion**

### **1. Einführung**

- 1.1. Grundlagen der Xenotransplantation
- 1.2. Xenogene Abstoßung
- 1.3. Einflüsse von Ischämie und Reperfusion

## **2. Wahl der Versuchstiere**

## **3. Nierenperfuisionsmodell**

### 3.1. Ex vivo Perfusion isolierter Organe

#### 3.1.1. Bindung von ATG an Strukturen von Primatennieren

#### 3.1.2. Bindung mononukleärer Zellen auf Nierenbiopsien

#### 3.1.3. Einflüsse von Ischämie und Reperfusion auf die Bindung von ATG an Primatennieren

## **4. Intravitalmikroskopie**

### 4.1. Methodik

### 4.2. Polyklonale ATG

#### 4.2.1. Spezifität und Wirkungsweise

#### 4.2.2. Nebenwirkungen von polyklonalem ATG

#### 4.2.3. Prophylaktische Therapie mit pATG

#### 4.2.4. Beeinflussung der Leukozytenadhäsion durch polyklonales ATG

### 4.3. Therapie mit Anti CD25 Antikörpern

#### 4.3.1. Entwicklung von Anti CD25 Antikörpern

#### 4.3.2. Angriffspunkte der Antikörper bei der Adhäsionsvermittlung

#### 4.3.4. Klinische Anwendung

## **E. Zusammenfassung**

## **F. Literaturverzeichnis**

## **G. Anhang**

### **1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

### **2. Lebenslauf**

### **3. Danksagung**



## **A. Einleitung**

### **1. Einführung**

Bereits im 3. Jahrhundert nach Christus gelang der Legende zu Folge den beiden heiligen Ärztepatronen Cosmas und Damian in Syrien die erfolgreiche Transplantation eines Organs. Wie auf sakralen Darstellungen gut zu erkennen verpflanzten sie das Bein eines toten Mauren an einen weißen Patienten, dem man das eigene Bein aufgrund einer Krebsgeschwulst entfernen musste. Die unerreichten chirurgischen Fähigkeiten des frühchristlichen Ärzteduos waren, wie auch heute noch, das Produkt aus perfekter Assistenz- im Bild zu sehen: 3 geflügelte Assistentinnen in Engelsgestalt - und göttlichem Beistand. Nach Ihrer religiös motivierten Hinrichtung durch den syrischen Stadthalter Lysias um 305 gingen der Menschheit diese überragenden ärztlichen Erkenntnisse auf Jahrtausende verloren. Aus der wissenschaftlichen Sicht des beginnenden 16. Jahrhunderts mag dem Betrachter der abgebildeten Darstellung die Transplantation eines Maurenorgans auf einen Kaukasier in etwa der heutigen konkordanten Xenotransplantation entsprochen haben. Über das Transplantatüberleben und eine wohl nötige immunsuppressive Therapie schweigt die Überlieferung jedoch.

Interessanterweise fanden die Reliquien der beiden frühchristlichen Transplantationsmediziner in der Reformationszeit Ihre letzte Ruhestätte in der Münchner Sankt Michaelskirche. So ist es nicht verwunderlich, dass heute die Transplantationsmedizin und insbesondere die Erforschung der xenogenen Tranplantation einen hohen Stellenwert an der Münchner Universität besitzt.

### **2. Mangel an Spenderorganen - Xenotransplation als Ausweg**

Der weltweite Mangel an geeigneten Spenderorganen zwingt Forscher in der ganzen Welt dazu nach geeigneten Alternativen zur Lösung dieses ernsten Problems zu suchen. Die Xenotransplantation und die damit verbundene Vorstellung von einer nahezu unbegrenzten Quelle gesunder Spenderorgane beflügelte bereits früh den

---

Abbildung Gegenseite:

Transplantation eines Beines durch die heiligen Cosmas und Damian  
Altarbild aus Schwaben um 1500, Württembergisches Landesmuseum Stuttgart

wissenschaftlichen Geist. In den letzten Jahrzehnten zeigte sich jedoch, dass neben den initial erkannten immunologischen Problemen auch anatomische, physiologische und infektiologische Aspekte eine entscheidende Rolle spielen. Den verlockenden Perspektiven einer erfolgreichen Xenotransplantation stehen bis heute unüberwindbare Hürden gegenüber.

### **3. Polyklonale ATG**

In dem hier erstmals entwickelten konkordanten xenogenen Mensch zu *Macaca fascicularis* Versuchsaufbau, sind die auf den Granulozyten exprimierten Adhäsionsmoleküle und die dazu passenden Rezeptoren und Liganden auf den Endothelzellen soweit intakt und auch kompatibel genug, um innerhalb der Spezies-spezifischen Adhäsionsmoleküle und der nah verwandten Liganden zu interagieren und in dieser Weise fähig die Artenbarriere zu überbrücken.

pATG werden seit Jahren zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungskrisen bei Organ und Gewebetransplantationen sowie zur Behandlung der „Spender gegen Wirt Reaktion“, der sog. graft vs. host reaction eingesetzt (Elias TJ et al.). Kommerziell erhältliche pATG, hergestellt im Kaninchenorganismus, unterscheiden sich signifikant bezüglich ihrer Ziel-Epitope. Selbst verschiedene Chargen zeigen eine gewisse Variabilität ihres biologisch wirksamen anti-Lymphozyten Antikörper Profils. Dies führt zu einer Vielzahl verschiedener Antikörper, die gegen die als immunisierendes Antigen verwendeten, auf der Zelloberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle gerichtet sind. Diese Variabilität wurde für Kaninchen pATG erstmals von Thomas et al berichtet (Rebellato LM) und später durch die Wissenschaftler der Firma Fresenius bestätigt (Zeitler R). Diese ATGs beinhalten Moleküle der Selectin-, Integrin- und IG-Familien (Tabelle 1, Bourdage JS et al.). Dementsprechend komplex und teilweise unerforscht sind die verschiedenen Wirkungsmechanismen von pATG. So führt pATG über eine Bindung an die Empfänger- T-Lymphozyten zu einer Depletion dieser Zellen. Der polyklonale Antikörper führt nach Bindung an T-Zellen in Verbindung mit dem Komplementsystem zu einer Zellyse.

<b>Tabelle 1</b>		
<b>Typ</b>	<b>%</b>	<b>Funktion</b>
CD1a	100	Ligand für $\gamma/\delta$ T-Zellen
CD2	100	Adhäsions Molekül (bindet LFA-3)
CD3	100	Signal Transduktion
CD4	35	Bindet an MHC-Klasse 1
CD5	100	Bindet an proliferierende B-Zellen
CD8	80	Bindet an MHC-Klasse 1
CD11a	60	Bindet an ICAM-1
CD28	100	Bindet an CTLA <sub>4</sub> , zweites Signal
CD45(RA)	60	T-Zelle
CD54	100	ICAM-1
CD56	100	LFA-2
CD71	100	Transferrin Rezeptor (Zellwachstum)
CD96	100	Apoptose Rezeptor
$\alpha/\beta$ TCR	100	T-Zell Rezeptor

## **B. Material und Methodik**

### **1. Tiere**

Als Versuchstiere dienten 15 Javaneraffen (*Macaca fascicularis*). Die Tiere stammten alle aus der Tierhaltung der Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung (GSF, München Oberschleißheim). Die Haltung dieser Primaten wurde an diesem Institut aufgelöst. Die Versuche liefen unter dem Aktenzeichen AZ: 211-2531.3-36/98, Titel: Ex vivo Perfusion des Musculus quadriceps von *Macaca fascicularis* zur Messung der Adhäsion von Leukozyten in kleinen Blutgefäßen und Kapillaren nach Vorbehandlung von menschlichem Blut mit monoklonalen anti-CD 25 Antikörpern „Simulect“ und „Zenapax“ und polyklonalen Anti-Human-T-Lymphozyten Antikörpern der Firmen Fresenius und Mérieux.

Die Versorgung und Pflege der Tiere erfolgte gemäß den Richtlinien des NIH für Versorgung und Verwendung von Versuchstieren (NIH publication No85-23, 1985).

Das Gewicht der Tiere beiderlei Geschlechts (5♂/10♀) betrug 3,1 bis 4,6 kg.

Die Tiere wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn in das Institut für chirurgische Forschung gebracht und erhielten Wasser ad libitum und Obst bis 12 Stunden vor Versuchsbeginn.

### **2. Antikörper**

Untersucht wurden vier verschiedene mono- und polyklonale Antikörper (mAb, pAb). Das Anti-Human-T-Lymphozyten-Globulin des Herstellers Fresenius (ATG Fresenius, Fresenius AG, Bad Homburg Deutschland) ist ein hochgereinigtes, polyklonales Immunglobulin vom Kaninchen. Die Zubereitung der Firma Mérieux (Thymoglobulin, Mérieux, Lyon, Frankreich) enthält ebenfalls hochgereinigtes, polyklonales anti-Human-T-Lymphozyten-Globulin vom Kaninchen.

Der monoklonale Antikörper Basiliximab (Simulect®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2 (IL-2) Rezeptors auf aktivierten T-Lymphozyten gerichtet ist (Onrust SV et al.). In gleicher Weise bindet auch der Antikörper Daclizumab (Zenapax®, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) an die  $\alpha$ -Untereinheit (CD25) des Interleukin-2 (IL-2) Rezeptors aktivierter T-Lymphozyten.

Beide Immunglobuline entfalten einen kompetitiven Antagonismus bei der Interleukin-2 induzierten T-Zell Proliferation (Wiseman LR et al.) und entfalten so ihre immunsuppressive Wirkung im Organismus.

### **3. Nierenperfusionsversuch**

#### **3.1. Explantation und Präparation der Nieren**

Der chirurgische Eingriff (Organentnahme) wurde unter Vollnarkose durchgeführt. Als Wirkstoffe wurden Ketamin (100mg/ml) und Xylazin (2%) 1:1, in einer Dosierung von 2ml/5kg Körpergewicht (KG) intramuskulär injiziert. Während des Eingriffs wurden die spontan atmenden Tiere über einen vor Mund und Nase liegenden Schlauch mit Sauerstoff versorgt. Nach Einleitung der Narkose und Fixierung des Tieres auf dem Operationstisch wurde vom Xiphoid bis auf Höhe der Spina iliaca superior anterior median laparotomiert. Danach wurden von der Aorta abdominalis kommend beide Arteriae und Venae renales sowie die Ureteren dargestellt. Anschließend wurden die Nieren unter Schonung von Gefäßen und Ureteren aus dem Peritoneum präpariert bis sie frei in der Bauchhöhle zu liegen kamen. Es wurde ein grössenadaptierter Standard-Katheter (Venflon®) in die Vena Cava inferior eingeführt und, das in tiefer Narkose befindliche Tier, nach Gabe von 5000 I.E. Heparin darüber entblutet. Die Nieren wurden entnommen und sofort über einen in die Arteria renalis eingeführten feinen Katheter (Venflon®) mit je 50 ml NaCl in Phosphatpuffer (Temperatur 4° C), versetzt mit 500 I.E. Heparin, blutleer gespült. Dazu wurde ein Perfusor in der Einstellung 9, das entspricht einem Fluss von 300 ml/h verwendet. Anschließend wurden die Nieren in gekühltem NaCl mit Phosphatpuffer unter Zusatz von Crush-Eis gelagert, bzw. sofort wie unter B.3.2. perfundiert.

#### **3.2. Perfusion**

Eine Niere wurde sofort wie nachfolgend beschrieben perfundiert, die zweite für 24 Stunden bei 4°C gelagert und erst am nächsten Tag in gleicher Weise behandelt.

Ein mit NaCl in Phosphatpuffer vorgefüllter Katheter wurde in die A. renalis eingeführt und fixiert. Unter Verwendung eines Perfusors wurde die in Phosphatpuffer aufbewahrte Niere mit einem Volumen von insgesamt 50 ml

physiologischer NaCl- Lösung und einem Fluss von 300 ml/h perfundiert. Nach Beendigung dieser ersten Perfusion wurde an einem Nierenpol mit einem Skalpell eine etwa 5 x 2 mm große Keilbiopsie entnommen und diese schockgefroren. Dazu wurde das Gewebe auf Korkplättchen in Tissue Tek eingebettet und in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Anschließend wurde die gleiche Niere mit den in 50 ml PBS gelösten ATG Zubereitungen der Firmen Fresenius bzw. Mérieux in empfohlener therapeutischer Dosis (ATG Mérieux: 2,5mg/kg KG, ATG Fresenius: 4,5mg/kg KG) mit einem Fluss von 300 ml/h perfundiert. Nach diesem Schritt wurden die Organe ohne die Flüssigkeit auszuspülen für 20 Minuten bei 4°C konserviert. Hierauf wurden die Nieren erneut mit 50 ml PBS in bekannter Weise frei gespült und sofort eine zweite Keilbiopsie entnommen, die wie oben zur weiteren Diagnostik eingefroren wurde. Die Nieren wurden mit frisch gewonnenem menschlichem Plasma gespült und erneut für 20 Minuten bei 4°C gelagert. Nach Ablauf dieser Frist wurde eine weitere Biopsie entnommen.

### **3.3. Immunhistologie**

Im nachfolgend beschriebenen Ansatz sollte immunhistologisch evaluiert werden, ob die gegen menschliche Leukozyten gerichteten Antikörper neben der therapeutisch gewünschten Bindung an das Zielantigen eine therapeutisch nicht erwartete, unspezifische Bindung mit Endothelzellen eingehen. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers auf den Endothelzellen erfolgte mit immunhistochemischen Nachweismethoden unter Einsatz spezifischer Anti-Kaninchen Immunglobulin Antikörper.

#### **3.3.1. Gefrierschnitte**

Die in Tissue-Tek eingefrorenen Gewebelöcke wurden von -78°C auf -18°C erwärmt, mit einem Gefriermikrotom (Leica Kryostat 1720, Leica, Bensheim, Deutschland) in 6 µm dicke Präparate geschnitten und auf Polyglycan beschichtete Objektträger (Superfrost, Menzel Gläser, Deutschland) aufgebracht. Nach 2 h Trocknung wurden die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur in 75 prozentigem Aceton fixiert. Die so vorbehandelten Schnitte konnten zur späteren Verarbeitung bei -75° C aufbewahrt werden.

### **3.3.2. Nachweis-Antikörper**

Für den immunhistologischen Nachweis der polyklonalen ATG vom Kaninchen wurde Anti-Kaninchen Immunglobulin (H+L) von der Ziege (Dianova Immunotech, Hamburg, Deutschland) in einer 500-fachen Verdünnung verwendet. Um die erforderliche Sensitivität zu erreichen, wurde die optimale Dosierung des zur Anwendung kommenden Antikörpers zuvor in mehreren Verdünnungsreihen evaluiert. Für den vorliegenden Versuchsaufbau konnte eine optimale Verdünnung von 1:500 ermittelt werden.

### **3.3.3. Färbemethoden**

Die im Kryostaten angefertigten Schnitte wurden vor der Weiterbehandlung 5 Minuten in ein Pufferbad eingelegt. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, mussten die Gewebeschnitte 20 Minuten in ein frisch angesetztes Wasserstoffperoxid - Methanolbad (60 ml Methanol, 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eingelegt werden. Hiermit konnte die im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase, die sonst mit der Substratlösung (AEC) reagieren würde, inaktiviert werden. Die Objektträger wurden erneut für 5 Minuten in ein Pufferbad eingelegt und anschließend die überschüssige Flüssigkeit in der Umgebung des Gewebes entfernt. Um Hintergrundüberfärbungen zu vermeiden, wurde jeder Gewebeschnitt 20 Minuten mit Normalserum inkubiert. Das Serum wurde abgeklopft und der Überstand abgetupft.

Danach wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in 500-facher Verdünnung benetzt und in einer vorbereiteten feuchten Kammer bei Zimmertemperatur für 40 Minuten inkubiert. Die zur Anwendung kommende Inkubationszeit richtet sich dabei nach der verwendeten Verdünnung und der Art des aufgetragenen Antikörpers.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Objektträger vorsichtig mit Pufferflüssigkeit aus der Waschflasche abgespült und für 10 Minuten in ein Pufferbad gelegt.

Der markierte Antikörper wurde im Weiteren mit einem geeigneten Peroxidasesubstrat sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Objektträger 15 Minuten in 3-Amino-9-Ethyl Carbazol (AEC, E. Merck, Darmstadt) eingelegt. Kurz zuvor wurden 20 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Durch Reaktion des Wasserstoffperoxids mit

der mit dem Antikörper konjugierten Peroxidase entsteht ein rotbrauner Farbstoff (Cordell JL et al.).

Die Schnitte wurden nun mit Puffer abgespült und durch drei Sekunden langes Tauchen in Hämalauin gegengefärbt. Zum Bläuen des Hämalauins wurden die Objektträger zum Schluss 5 Minuten in ein Leitungswasserbad gelegt, danach mit Kaisers Gelatine bedeckt und mit einem Deckglas gesichert.

Die so abgedeckten Objektträger bleiben über Jahre farbecht und können im Verlauf ausgewertet werden.

#### **3.3.4. Auswertungsverfahren**

Die zuvor wie unter 3.3.3. vorbehandelten und mit dem Anti-Kaninchen Immunglobulin inkubierten Gefrierschnitte wurden unter einem Mikroskop (Typ Zeiss Standard KF2) bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Hierzu wurden die sichtbaren Glomeruli, Tubuli und Nierengefäße einzeln und systematisch auf Zeichen einer Anlagerung des getesteten Antikörpers untersucht. Reaktionspositive, in der immunhistologischen Färbung charakteristisch rotbraun angefärbte Anteile zeigen eine Bindung von ATG im Gewebe.

Um die Bindung des Antikörpers an ATG und die Darstellung des Antikörpers durch den rotbraunen Farbton nachzuweisen, wurde als Positivkontrolle zusätzlich ein direkt mit ATG-Lösung inkubierter, ungewaschener Gefrierschnitt mit dem Anti-Kaninchen Immunglobulin behandelt.

#### **3.4. Lymphozyten in vitro Bindungstest**

Zur Evaluation der Lymphozytenadhäsion auf den wie unter 3.3.1. angefertigten Gefrierschnitten wurde ein modifizierter „Stamper-Woodruff in vitro binding assay“ durchgeführt (Butcher EC et al., Stamper HB Jr. et al., Woodruff JJ et al.).

Das wie in 3.4.1. hergestellte mononukleäre Konzentrat (Lymphozyten und Monozyten) wurde zu einem Prozent mit bovinem Serum Albumin (BSA, fraction V, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) versetzt. Die fertige Suspension wurde für 40 Minuten auf den Gewebeschnitten inkubiert. Bei einem Teil der Gefrierschnitte wurde die Lymphozytensuspension 30 Minuten vor der Inkubation auf den Gefrierschnitten mit ATG-Fresenius versetzt. Anschließend wurde die Flüssigkeit in

der Umgebung des Gewebes abgetupft und die Objektträger zur Fixation der Zellen für 15 Minuten in gekühlter (8°C) einprozentiger Glutaraldehyd (Baker grade, J.T. Baker, Phillipsburg, USA) -PBS Lösung gelagert. Zuletzt wurden die Objektträger mit PBS gespült und im Färbeautomaten nach Pappenheim gefärbt.

#### **3.4.1. Mononukleäres Konzentrat**

Heparinisiertes Vollblut (10 ml), wurde langsam über einen Ficoll-Gradienten (Ficoll-Isopaque Lösung 1,077 g/ml, Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München) der Dichte 1,077 in zwei Reagenzgläser geschichtet. Die so angefertigten Reagenzien wurden bei deaktivierter Bremse für 20 Minuten mit 2700 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Zentrifuge: Firma Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Nach abgeschlossener Zentrifugation erreicht man eine Auftrennung der korpuskulären Blutbestandteile. Der in der Interphase abzentrifugierte Ring, bestehend aus mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten), wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben, mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung in ein neues Reagenzglas gefüllt und mittels Zentrifugation bei 1300 Umdrehungen pro Minute über 10 Minuten von den Ficollresten getrennt. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen am Boden des Reagenzglases ein zweites Mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die nun konzentrierte und von Verunreinigungen weitgehend freie Zellsuspension wurde in 2 ml 0,9 prozentige NaCl-Lösung aufgenommen (Ertel W et al., Schutz A et al.).

#### **3.4.2. Untersuchtes Gewebematerial**

Als Untersuchungsmaterial für den „Binding Assay“ dienten die beim Perfusionsversuch vor Behandlung mit ATG entnommenen nativen Gewebeproben. Von diesen wurden wie unter 3.3.1. beschrieben Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte dürfen bei Beginn des Tests nicht älter als zwei Stunden sein, da ein längeres Aufbewahren zu erhöhter unspezifischer Hintergrundfärbung führt. Von jeder entnommenen Biopsie wurden mehrere Gefrierschnitte angefertigt und mit der Lymphozytensuspension inkubiert.

### 3.4.3. Auswertungsverfahren

Die zuvor wie unter 3.4. vorbehandelten und inkubierten Gefrierschnitte wurden unter einem Mikroskop (Mycrosop: Typ Zeiss Standard KF 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 400- facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden die vorliegenden Schnittpräparate systematisch auf adhärenente Zellen untersucht.

## 4. Intravitalmikroskopische Versuche

Die Betrachtung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie ermöglicht eine direkte und in besonderem Maße anschauliche Bewertung der Organperfusion. Die immunologischen und physikalischen Abläufe nach Organtransplantation spiegeln sich in den intravitalmikroskopisch sichtbaren Interaktionen zwischen Gefäßendothel und zirkulierenden Zellen wieder.

### 4.1. Definitionen

**Sticking:** (permanente Adhäsion) Alle in der Beobachtung eines Gefäßquerschnitts erkennbaren Leukozyten, die sich während einer Beobachtungszeit von 30 Sekunden nicht fortbewegen und dabei als am Gefäßendothel haftend zu identifizieren sind.

**Rolling:** (vorübergehende Adhäsion) Alle in der Beobachtung eines Gefäßquerschnitts erkennbaren Leukozyten, die sich sichtbar über eine Länge von mindestens 100 µm am Gefäßendothel rollend bzw. in direktem Kontakt hierzu fortbewegen und weniger als 30 Sekunden adhärenent sind, werden als Roller (Rolling) bezeichnet.

**Flowing:** (freier Fluss ohne permanente oder vorübergehende Zelladhäsion) Alle in der Beobachtung eines Gefäßquerschnitts erkennbaren Leukozyten, die sich ohne festen Kontakt mit der Gefäßwand (siehe Rolling, Sticking), in freiem Fluss durch die im Gesichtsfeld einsehbare Gefäßdistanz bewegen.

Vergleiche auch <sup>1</sup>Hammer C.

## 4.2. Versuchsgruppen

Für die Perfusionsversuche wurden die Tiere in fünf Gruppen unterteilt. In der ersten Versuchsgruppe wurde das Spenderblut 30 Minuten vor Beginn der Perfusion mit polyklonalen Antikörpern des Typs ATG Fresenius (ATG Fresenius, Fresenius AG, Bad Homburg Deutschland) in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KG vorbehandelt.

In der zweiten Gruppe wurde das Spenderblut 30 Minuten vor Beginn der Perfusion mit ATG der Firma Mériex (ATG Mériex, Mériex, Lyon, Frankreich) in der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 2,5 mg/Kg KG vorbehandelt.

In der dritten Gruppe wurden die Perfusionen zusammengefasst, bei denen die polyklonalen Antikörper (ATG) beider Hersteller (Merieux, Fresenius) 30 Minuten nach begonnener Perfusion in den Perfusionskreislauf zugegeben wurden.

In der vierten Versuchsgruppe wurden dem Spenderblut 30 Minuten vor Beginn der Perfusion monoklonale anti-CD25 Antikörper (Basiliximab) der Firma Novartis (Simulect®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) in einer Dosierung von 0,3 mg/Kg KG, zugeführt. Die vom Hersteller empfohlene Absolutdosis von 20 mg wurde auf ein durchschnittliches Körpergewicht von 70 Kg entsprechend den Dosierungen der anderen Substanzen auf eine pro Kg Körpergewicht ausgelegte Dosisangabe extrapoliert.

In der fünften und letzten Gruppe wurden Perfusionen zusammengefasst, deren Spenderblut mit dem monoklonalen anti-CD25 Antikörper (Daclizumab) der Firma Hoffmann-La Roche (Zenapax®, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) in der vom Hersteller empfohlenen Dosierung von 1mg/Kg KG Körpergewicht vorbehandelt worden war (siehe Tabelle 2).

## 4.3. Präparation

Die Präparation wurde unter Vollnarkose durchgeführt. Als Narkosemedikation wurden Ketamin (100mg/ml, Pharmacia-Upjohn, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (2 %, Bayer, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär injiziert (siehe auch 3.1.).

Anschließend wurde die Haut der Regio subinguinalis über einen Längsschnitt auf einer Distanz von etwa zwei Zentimetern eröffnet und nach Spaltung der Fascia cribrosa die Arteria und Vena femoralis aufgesucht. Nach sorgfältiger Präparation wurden beide Gefäße im proximalen Abschnitt ligiert, distal der Ligatur eröffnet und

mittels zweier Venenverweilkanülen katheterisiert. Das Tier wird nun durch eine Überdosis Phenobarbital (Luminal®, Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland) euthanasiert. Nach Zugabe von 5000 I.E. Heparin über den arteriellen Schenkel wurde die untere Extremität unter Infusion isotoner NaCl Lösung in die Arteria femoralis über die Vena femoralis selektiv entblutet. Die Lagerung auf einem Heizkissen und eine in den Perfusionsaufbau integrierte Wärmeschleife gewährleisteten dabei eine konstante Körpertemperatur von 37° C

Zur Visualisierung der Perfusion mittels eines Intravitalmikroskops wird die Muskulatur der unteren Extremität nach Eröffnung von Cutis und Subcutis sorgfältig dargestellt um das Objektiv in geeigneter Weise aufsetzen zu können. Hierzu wurde am medialen Unterschenkel des Tieres die Fascia cruris über eine Hautinzision freigelegt. Um die im weiteren Verlauf durchgeführte mikroskopische Betrachtung nicht durch ausströmendes Blut zu behindern, wurde besonderes Augenmerk auf Schonung der Gefäße sowie die sorgfältige Blutstillung mittels bipolarer Elektrokoagulation gelegt.

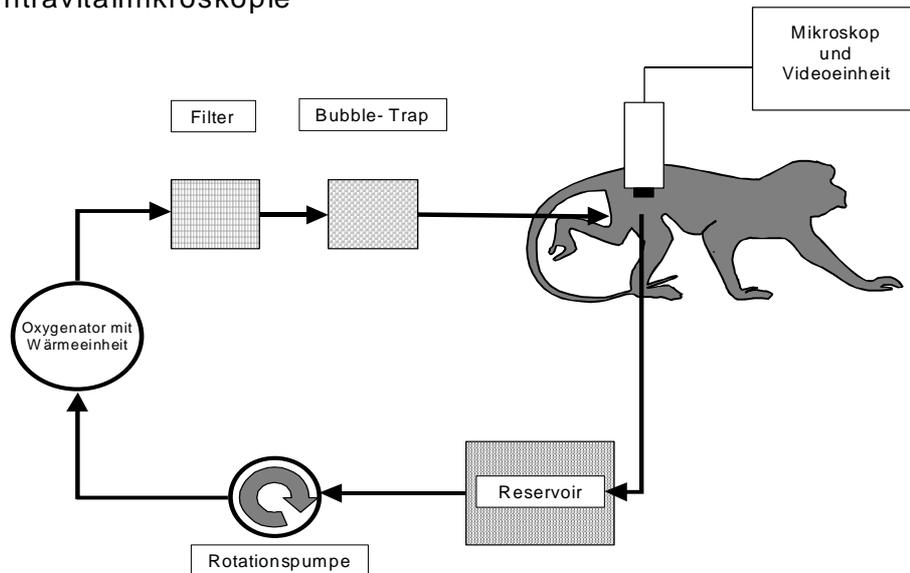
#### **4.4. Perfusion**

##### **4.4.1. Perfusionssystem**

Das vorbehandelte Blut wurde über ein hierzu aufgebautes Perfusionssystem, bestehend aus einem temperierten Reservoir, einem temperierten Oxigenator, einem Hämofilter und einer Vorrichtung zur Elimination von Luftblasen (Bubble- Trap) mit konstanter Geschwindigkeit und ohne Beeinflussung des Leukozytensystems in den Extremitätenkreislauf des Versuchstieres infundiert (siehe Abbildung 1). Aus einem Reservoir gelangte das oxigenierte Blut über die Arteria femoralis in den Kreislauf des Versuchstieres und wurde nach Passage der Extremität aus der Vena femoralis wieder in das Reservoir des Perfusionskreislaufs eingeschleust und rezirkuliert. Der Perfusionsdruck wurde über eine Rotationspumpe den physiologischen Parametern angepasst. Um das Risiko einer Luftembolie zu minimieren wurde eine entsprechende Vorrichtung (Bubble- Trap) in das Perfusionssystem eingebaut. Zusätzlich wurde ein Membranfilter eingesetzt. Für sämtliche Versuche wurden, um unspezifische Einflüsse zu minimieren bzw. konstant zu halten, fixe Schlauchlängen und standardisierte Versuchsaufbauten verwendet.

### Abbildung 1

Schematische Darstellung des Perfusionssystems für die Intravitalmikroskopie



## 4.4.2. Perfusat

### 4.4.2.1. Spenderblut

Das für die Perfusion verwendete Spenderblut wurde kurz vor Beginn des Versuchs von gesunden männlichen Spendern in mit 500 I.E. Heparin gespülte Perfusorspritzen aufgezogen. Die Lymphozytenzahlen im Blut, die mit einem elektronischen Zählapparat des Typs Coulter Counter ermittelt wurden, lagen zwischen 1000 und 4500/ $\mu\text{l}$ . Das Vollblut wurde mit physiologischer NaCl Lösung auf einen Hämatokrit von 30 % verdünnt. Aufgrund des nur wenige Minuten betragenden Intervalls bis zur weiteren Behandlung mit Antikörpern und Farbstoffen konnte auf eine Konservierung des Blutes verzichtet werden und dieses solange bei Zimmertemperatur in einem sterilen, geschlossenen Reservoir aufbewahrt werden.

#### 4.4.2.2. Vorbehandlung mit Antikörpern

Das zuvor frisch gewonnene heparinisierte und verdünnte Spenderblut wurde 30 Minuten vor Beginn der Perfusion mit dem zu untersuchenden Antikörper in entsprechender therapeutischer Dosis versetzt und bei Zimmertemperatur und konstanter Bewegung des geschlossenen Reservoirs inkubiert. Die zugesetzte Menge an Antikörperzubereitung variiert mit dem verwendeten Produkt. Die verwendete therapeutische Dosis der entsprechenden ATG ist in Tabelle 2 nochmals zusammengefasst dargestellt.

Um den Einfluss von ATG auf die Mikrozirkulation nach vorausgegangener Perfusion mit unbehandeltem Blut zu beobachten, wurde bei 3 Tieren, nach Eintritt einer vollständigen Adhäsion der Leukozyten (Sticking), die ATG Suspension direkt in den Perfusionskreislauf gegeben (siehe C 3.1.5.).

**Tabelle 2** Verwendete Antikörper und therapeutische Dosierungen

Präparat	ATG Merieux	ATG Fresenius	Daclizumab	Basiliximab
Dosis	2,5 mg/Kg KG	2,5 mg/Kg KG	1 mg/Kg KG	0,3 mg/Kg KG

#### 4.4.2.3. Fluoreszenzfärbung

Jeweils 300 ml heparinisiertes, verdünntes, humanes Spenderblut wurden zur weiteren Verwendung portioniert. Für die später durchgeführte Intravitalmikroskopie war es nötig den Fluss des Blutplasmas mit Na-Fluorescein (20mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sichtbar zu machen. Die Leukozyten konnten mit Rhodamin 6G (150mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) markiert werden. Der hydrophobe Farbstoff reichert sich in den Mitochondrien derselben an und führt so zu einer nahezu kompletten Färbung der zirkulierenden Leukozyten (Batz H. et al). Hierzu wurden beide Farbstoffe etwa 10 Minuten vor Beginn des Versuchs vorsichtig mit dem verdünnten Blut vermischt. Bei nachlassender Kontrastierung der Leukozyten im laufenden Versuch konnte Rhodamin 6G direkt in das Perfusionssystem nachgegeben werden. So war es möglich, über den gesamten Versuchszeitraum von bis zu 60 Minuten einen weitgehend gleichmässigen Kontrast zu erhalten.

## **4.5. Intravitalmikroskopie**

### **4.5.1. Mikroskop**

Es wurde ein Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberlampe und einem Ploemopak Illuminatorsystem für Auflichtbeleuchtung, verwendet. Je nach benutzter Fluoreszenzfarbe wurden ein I2/3-Blaufilter (450-490 nm) und N2 Grünfilterblock (530-560 nm) (Filter: Leitz, Wetzlar, Deutschland) zwischengeschaltet. Mit einer am Mikroskop installierten CCD Video Kamera (Pieper FK, 6990 Mellingen, Schweiz) wurden die Bilder an einen Monitor (Sony Trinitron PVM 2043, Japan) übermittelt, mit Hilfe eines Videorecorders (Panasonic 7350, Japan) aufgezeichnet und auf S-VHS Videobändern (Fuji Super VHS Pro, Japan) festgehalten. Zwischen Kamera und Videorecorder wurde eine Zeitlaufuhr (FOR A Company, Tokyo, Japan) geschaltet. Die untere Extremität des Versuchstieres wurde mit Hilfe von Haltemagneten und Mullbändern in waagrechter Position auf dem Objektisch fixiert. Das Objektiv wird mit Beginn der Perfusion möglichst druckfrei auf das dafür präparierte Hautfenster gesetzt, zwischen Objektiv und Präparat wurde mit isotoner NaCl Lösung ein Flüssigkeitsfilm gelegt. Um den durch Licht-, Wärme- und Kompressionseinfluss entstehenden Gewebeschaden sowie ihren Einfluss auf die Perfusionsmessungen zu minimieren, wurden jeweils aufeinanderfolgende kurze Sequenzen aufgezeichnet. Unter Verwendung dieses Systems konnten nun die zuvor markierten Zellen während ihrer Zirkulation durch die Gefäße beobachtet, die Sequenzen aufgezeichnet und anschließend ausgewertet werden werden.

### **4.5.2. Auswertungsverfahren**

Die Aufzeichnung der Intravitalmikroskopie wurde an zufällig ausgewählten Gewebssausschnitten vorgenommen. Die während der 60-minütigen Perfusion aufgenommenen Videobänder konnten mit einem Videorecorder (Panasonic 7350, Japan) und einem Monitor (Sony Trinitron PVM 2043, Japan) aufgezeichnet und anschließend ausgewertet werden. Dabei wurden in der Aufzeichnung gut sichtbare Gefäßstrecken (Vergrößerung auf dem Monitor 800-fach) ausgewählt. Der

Durchfluss an markierten frei fließenden Leukozyten, Rollern und Stickern (siehe B.4.1.) konnte am Gefäßendothel für jeweils 30 Sekunden, in Bild zu Bild Analyse ausgezählt werden. Die geringe Versuchsanzahl erlaubt keine statistische Auswertung der vorliegenden Experimente (<sup>1</sup>Hammer C.).

## **C. Ergebnisse**

### **1. Immunhistologie**

Ziel der immunhistologischen Untersuchungen war es festzustellen, ob es neben der gewünschten, therapeutischen Bindung der Antikörper an die entsprechenden Antigene der zirkulierenden Lymphozyten auch zu einer Bindung der Antikörper an Strukturen des Nierengewebes wie Gefäßen, Tubuli und Glomeruli kommt. Die Untersuchung des Nierengewebes auf Adhäsion von ATG wurde direkt nach Perfusion mit ATG, sowie nach einer 2. Perfusion mit menschlichem Blutplasma durchgeführt. Hierzu wurden die von den nach Perfusion mit den ATG-Lösungen entnommenen Nieren-Keilbiopsien angefertigten Gefrierschnitte wie unter B.3.3.ff beschrieben mit den diagnostischen Antikörpern inkubiert, angefärbt und anschließend ausgewertet. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 2 aufgeführt. Insgesamt wurden die Nieren von 6 Tieren explantiert und perfundiert, wobei in einem Fall eine einseitige Nierenagenesie angetroffen wurde (Tier II).

**Tabelle 3:**

Immunhistologie der Operationsbiopsate nach Inkubation mit Anti-Kaninchen Immunglobulin (H+L) von der Ziege. Die Schnitte wurden mit einer Antikörperverdünnung von 1:500 für 60 Minuten inkubiert.

Tier	Perfusionszeitpunkt	Antikörper	Gefäße	Tubuli	Glomeruli
I	sofort nach Explantation	kein Antikörper	-	-	-
II	sofort nach Explantation	kein Antikörper	-	-	-
I	sofort nach Explantation	Fresenius	-	-	-
II	sofort nach Explantation	Fresenius	-	-	+
IV	sofort nach Explantation	Fresenius	-	-	++
III	sofort nach Explantation	Mérieux	-	-	+
V	sofort nach Explantation	Mérieux	-	-	-
VI	sofort nach Explantation	Mérieux	-	-	-
I	24 Std. nach Explantation	kein Antikörper	-	-	-
I	24 Std. nach Explantation	Fresenius	-	-	-
II	kein Organ				
IV	24 Std. nach Explantation	Fresenius	-	-	-
III	24 Std. nach Explantation	Mérieux	-	-	-
V	24 Std. nach Explantation	Mérieux	-	-	-
VI	24 Std. nach Explantation	Mérieux	-	-	-
	Positiv Kontrolle	Fresenius	+++	+++	+++
	Positiv Kontrolle	Mérieux	+++	+++	+++

Legende:

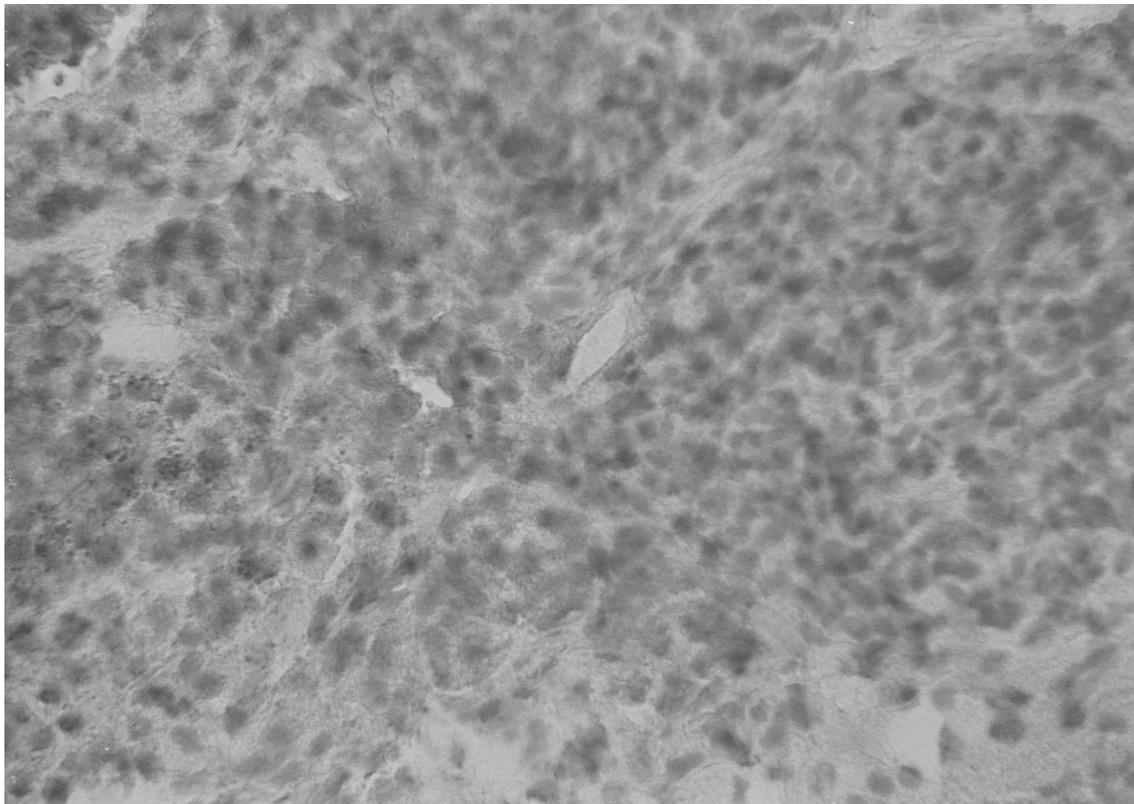
Keine Färbung	-
Schwache Färbung	+
Mässige Färbung	++
Deutliche Färbung	+++

## 1.1. Kontrollgruppen

Bei allen Nieren wurde sofort nach Blutleere eine Biopsie entnommen. Die vor der Perfusion mit den ATG-Präparationen gewonnenen Gewebeschnitte wurden wie unter 3.3.3. beschrieben mit dem anti-Kaninchen Antikörper zum Nachweis von Kaninchen-ATG inkubiert. In keinem der Präparate trat eine deutliche für den Nachweis von ATG spezifische rot- braune Färbung des Präparats auf. Glomeruli, Tubuli und Gefäße des Nierenparenchyms zeigten sich ATG negativ (Abbildung3). Die unmittelbar nach der Explantation entnommenen Präparate unterschieden sich dabei nicht von den nach einer Hypoxiezeit von 24 Stunden entnommenen Biopsien. Auf allen Präparaten, die direkt mit ATG inkubiert und anschließend mit der selben Methode gefärbt wurden, konnte das zuvor aufgebrauchte ATG in Form der rot-braunen Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 2). Der stark positive Nachweistest dieser Kontrolle korrelierte mit der Anwesenheit von ATG im Gewebe.

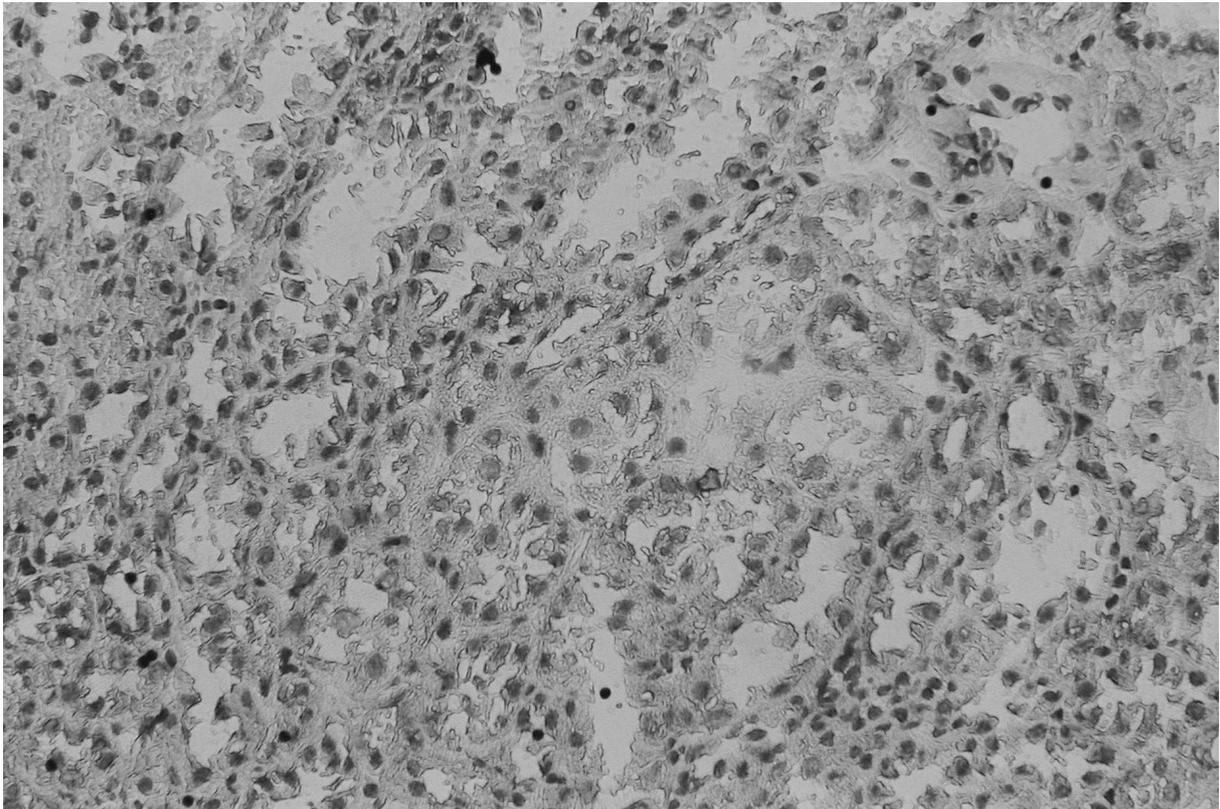
### Abbildung 2

Immunhistologie nach Inkubation mit ATG (Positivprobe)



### **Abbildung 3**

Fehlender Nachweis von ATG im vor Perfusion gewonnenen Gefrierschnitt



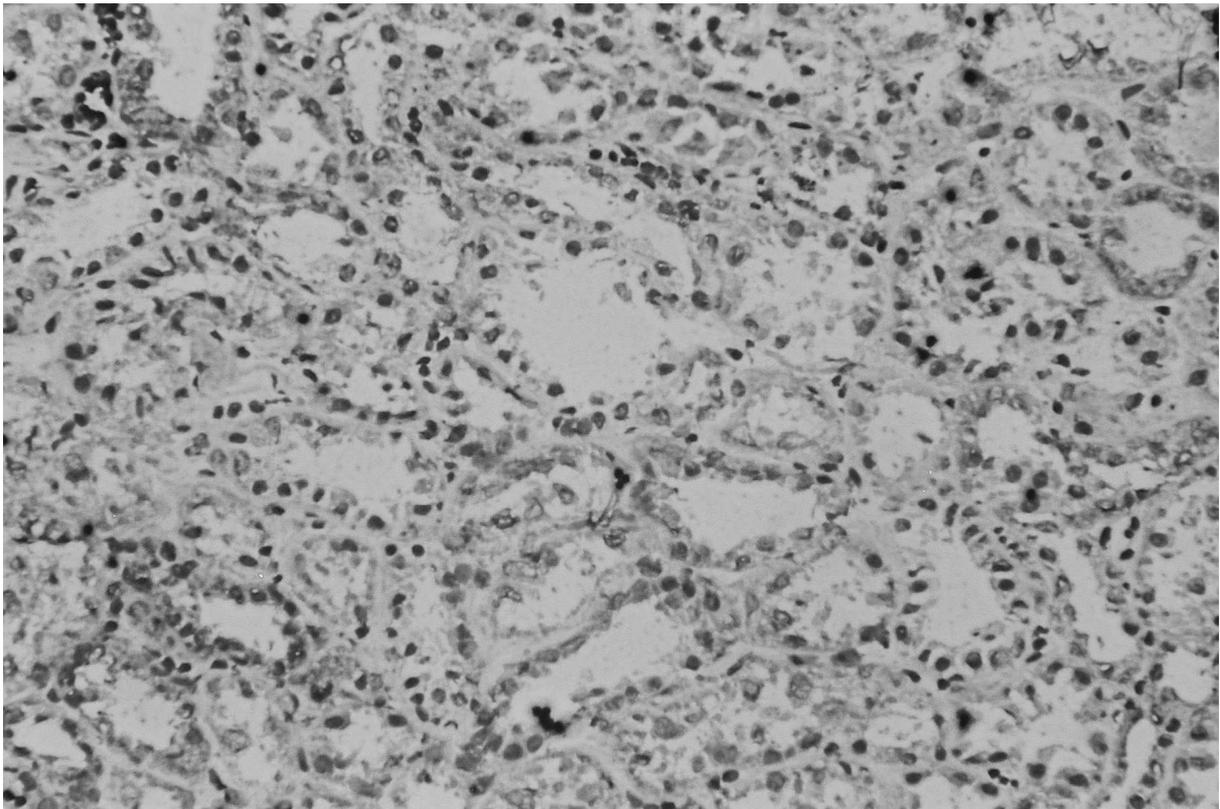
#### **1.2. Nachweis von ATG Fresenius**

Drei Nieren wurden sofort am Tag der Entnahme behandelt, zwei weitere 24 Stunden später. Die Zahl von nur zwei Nieren in der 24 Stunden Gruppe ist durch ein Tier mit einer einseitigen Nierenagenesie bedingt. In den Biopsien dieser fünf Cynomolgus-Nieren konnte nach Perfusion mit ATG Fresenius (siehe B.3.2.), Spülung mit 50 ml PBS und anschließender Färbung wie unter B.3.3.3. beschrieben, kein eindeutig positiver, deutlicher Nachweis von gebundenem ATG erbracht werden. Die am Tag der Explantation gewonnenen Biopsien unterschieden sich im immunhistologischen Ergebnis nicht von den nach 24 Stunden gewonnenen Gewebeschnitten. Bei einem Präparat wurde nach Perfusion sofort nach Explantation in den Glomeruli ein schwach positives Ergebnis gefunden. In einem weiteren Präparat konnte ein mäßiger Färbenachweis im Zustand nach sofortiger Perfusion gefunden werden. ATG-Fresenius konnte folglich nach vorheriger Perfusion nicht als wesentlich im Nierengewebe und speziell an den Endothelzellen adhärenter Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4). Eine klinisch relevante Bindung an Strukturen

der Niere nach vorheriger Perfusion liegt folglich nicht vor. Die Ergebnisse vor und nach einer 2. Perfusion mit menschlichem Blutplasma unterscheiden sich bezüglich des Nachweises einer Antikörperbindung nicht. Auch nach der Plasmaperfusion konnte kein positiver Nachweis mittels Immunhistologie erbracht werden.

#### **Abbildung 4**

Immunhistologisch gefärbter Gefrierschnitt ohne Nachweis von ATG-Fresenius nach Perfusion mit ATG-Fresenius

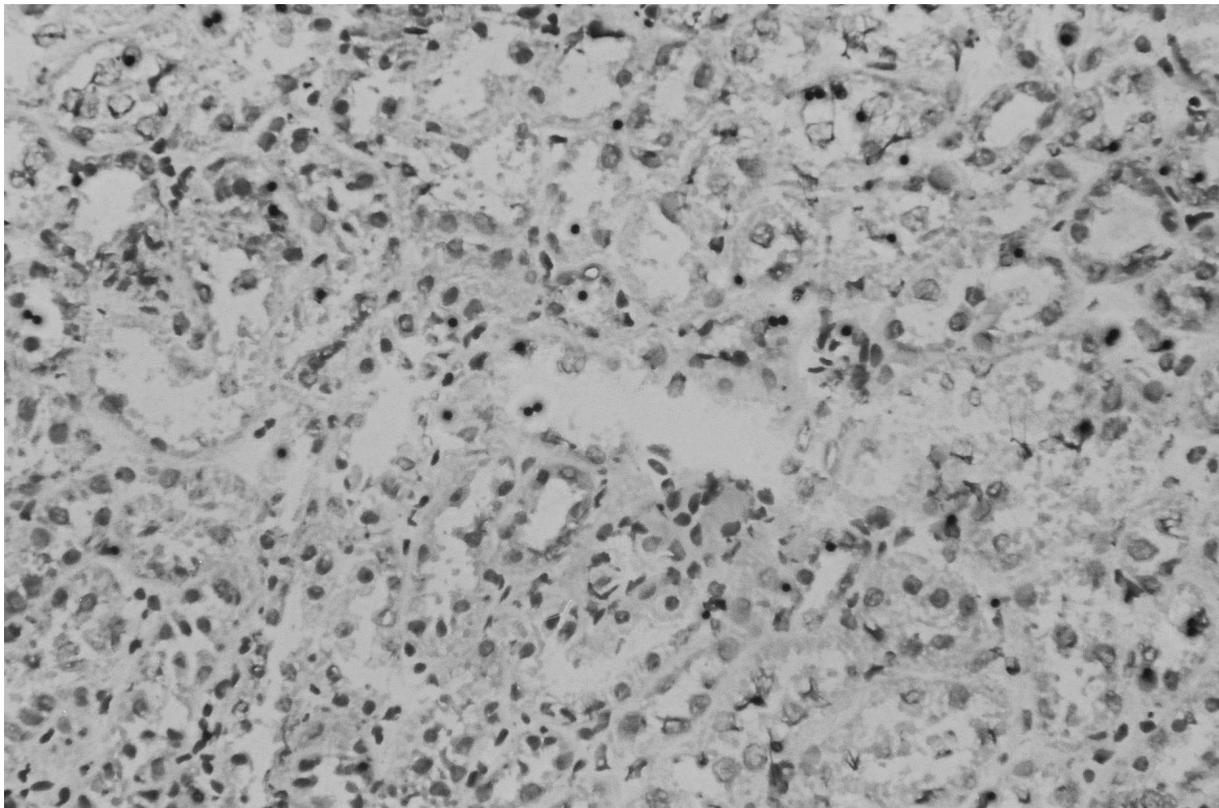


### 1.3. Nachweis von ATG Meriéux

Sechs Nieren von Cynomolgus Affen wurden mit ATG der Firma Meriéux perfundiert. Drei dieser Organe wurden sofort nach Entnahme, drei 24 Stunden später der Perfusion wie unter 3.2. beschrieben unterzogen. Die anschließende immunhistochemische Färbung (siehe B.3.3.3.) erbrachte für die sofort nach Explantation entnommenen Gewebeblöcke keinen eindeutigen Nachweis von gebundenem ATG. In einem Gewebeschnitt lagen schwach positive Glomeruli vor. Ebenso konnte in keiner der jeweils 24 Stunden später perfundierten und biopsierten Nieren ATG nachgewiesen werden. ATG Mériéux findet sich somit nicht im Gewebe von zuvor hiermit perfundierten Nieren wieder, eine wesentliche unspezifische Bindung liegt nicht vor (Abbildung 5).

#### Abbildung 5

Immunhistologisch gefärbter Gefrierschnitt ohne Nachweis von ATG-Mériéux nach Perfusion mit ATG-Mériéux



## 2. Lymphozyten Bindungstest

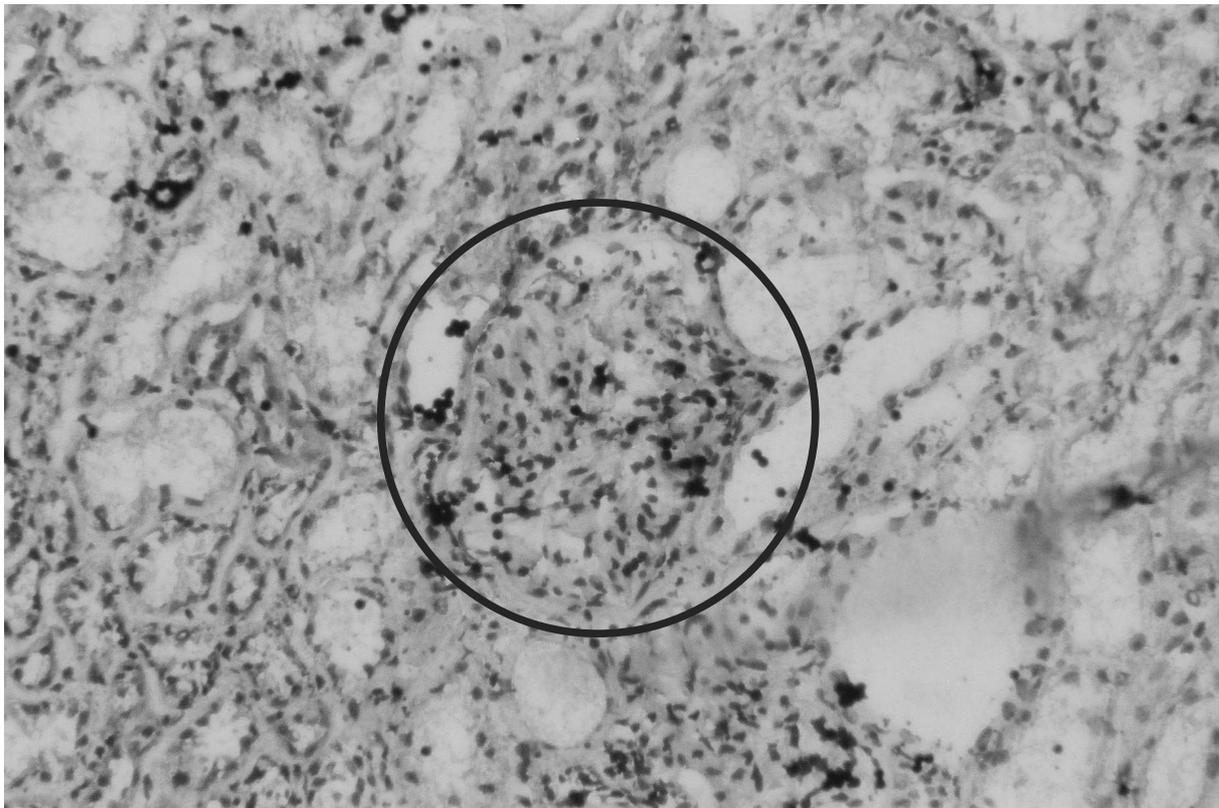
Die wie unter 3.4 ff behandelten Gefrierschnitte wurden unter dem Mikroskop ausgewertet (siehe B.3.4.3.).

### 2.1. Kontrollgruppe

Eine Bindung von humanen mononukleären Zellen an nicht mit Antikörpern vorbehandelten Gefrierschnitten wurde an mehreren nativen Schnitten untersucht. Es zeigte sich keine wesentliche Bindung der verwendeten Zellen an das untersuchte Nierengewebe. Lediglich in den glomerulären Abschnitten konnten einzelne Zellen als adhären identifiziert werden.

#### Abbildung 6

Adhäsion mononukleärer Zellen auf Gefrierschnitten der Niere ohne Vorbehandlung mit ATG

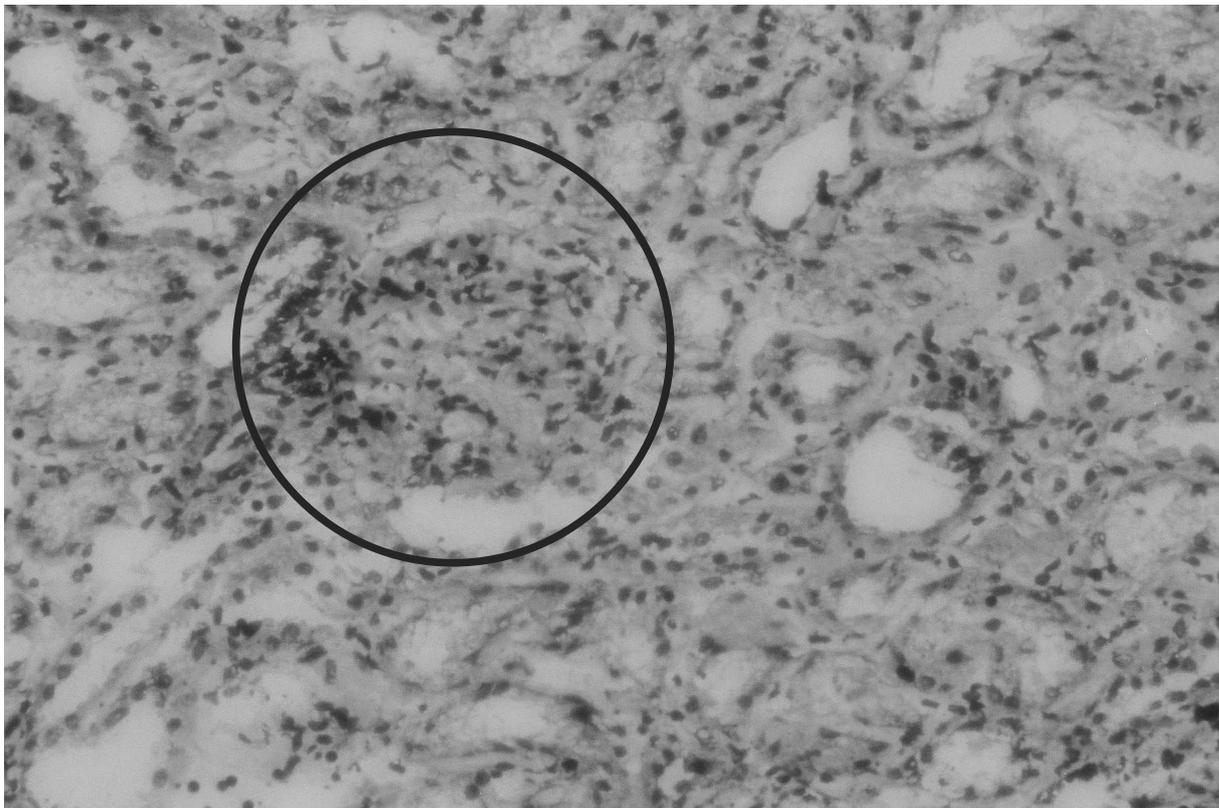


## 2.2. Bindung bei Vorbehandlung mit ATG Fresenius

Nach Vorbehandlung der Zellsuspension mit ATG Fresenius, wie unter B.3.4.ff beschrieben, wurde die Adhärenz der humanen mononukleären Zellen auf den Gefrierschnitten an mehreren Präparaten untersucht. Es zeigte sich keine relevante Bindung der verwendeten Zellen an das untersuchte Nierengewebe. Lediglich in den Glomeruli konnten einzelne Zellen als adhärenz identifiziert werden (Abbildung 7). Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zu den analogen Untersuchungen ohne ATG Vorbehandlung der Zellen festgestellt werden.

### Abbildung 7

Adhäsion mononukleärer Zellen auf Gefrierschnitten der Niere nach Vorbehandlung mit ATG Fresenius



### **3. Intravitalmikroskopie (IVM)**

#### **3.1. Auswertung**

Aufgrund der geringen Fallzahl der IVM Versuche in den einzelnen Untersuchungsgruppen verbietet sich hier eine statistische Auswertung der Ergebnisse (<sup>1</sup>Hammer C). Um trotz der geringen Versuchsanzahl verwertbare Ergebnisse vorlegen zu können wurden die erhobenen Daten im Folgenden (B.3.1.1. bis B.3.1.5.) einzeln ausgewertet und interpretiert. Es wurden jeweils drei Perfusionen mit ATG Fresenius, drei Perfusionen mit ATG der Firma Meriéux und drei Kontrollen ohne Zugabe eines Antikörpers durchgeführt. In dieser Kontrollgruppe wurde bei Erreichen eines sistierenden Blutstromes ATG in das Perfusionssystem eingebracht und der Verlauf weiter mit Intravitalmikroskop und Videoeinheit dokumentiert.

Zusätzlich wurden je zwei Perfusionsversuche nach Vorbehandlung des Blutes mit monoklonalen Antikörpern gegen den Interleukin-2 Rezeptor durchgeführt.

##### **3.1.1. Perfusion mit unbehandeltem Spenderblut (keine Antikörpertherapie)**

Als Vergleichsgruppe gegenüber den Perfusionsversuchen, in denen das Blut mit entsprechenden Antikörpern vorbehandelt wurde, wurden drei Perfusionen mit unbehandeltem Blut durchgeführt. Es erfolgte zuvor lediglich eine Verdünnung (Hk 30%) und Heparinisierung des Perfusats. Die Beobachtung der Perfusion konnte nach 15 Minuten begonnen werden, um zuvor eine sorgfältige Präparation des Fensters, die Fokussierung des Gefäßquerschnitts und gleichzeitig eine ausreichende Verteilung des Perfusats im Tierpräparat zu gewährleisten.

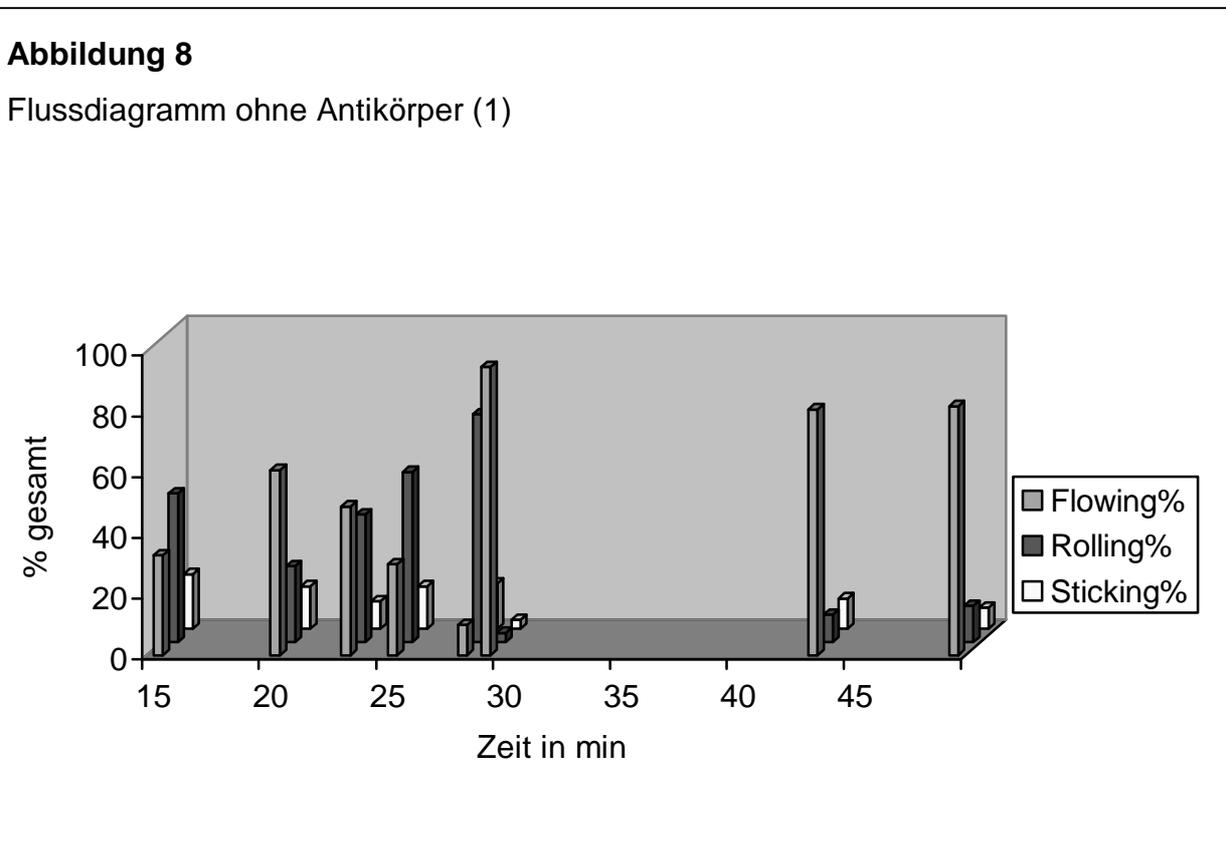
**Tabelle 4**

Fluss ohne Antikörper (1)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	13	19	7	39	33,3	48,7	17,9
20	48	20	11	79	60,8	25,3	13,9
23	38	33	7	78	48,7	42,3	9,0
25	20	37	9	66	30,3	56,1	13,6
28	2	15	3	20	10,0	75,0	15,0
29	37	1	1	39	94,9	2,6	2,6
43	57	6	7	70	81,4	8,6	10,0
49	85	12	7	104	81,7	11,5	6,7

**Abbildung 8**

Flussdiagramm ohne Antikörper (1)



15 Minuten nach Beginn der Perfusion fanden sich 33% der Zellen im freien Fluss durch die Gefäße, 49% bewegten sich an der Gefäßwand rollend fort und etwa 18% waren an fest adhären. Bis zur 28. Minute kommt es zu einem weitgehenden Erliegen des Flusses, der sich hier mit nur 10% frei fließenden, 75% rollenden und 15% während der Beobachtung adhären Leukozyten darstellt. Bis zur 49. Minute steigt der freie Fluss wieder an um nach 29 Minuten ein Maximum von 95% zu

erreichen. In der 49. Minute befanden sich noch 80% der Zellen im freien Fluss (siehe Tabelle 4, Abbildung 8).

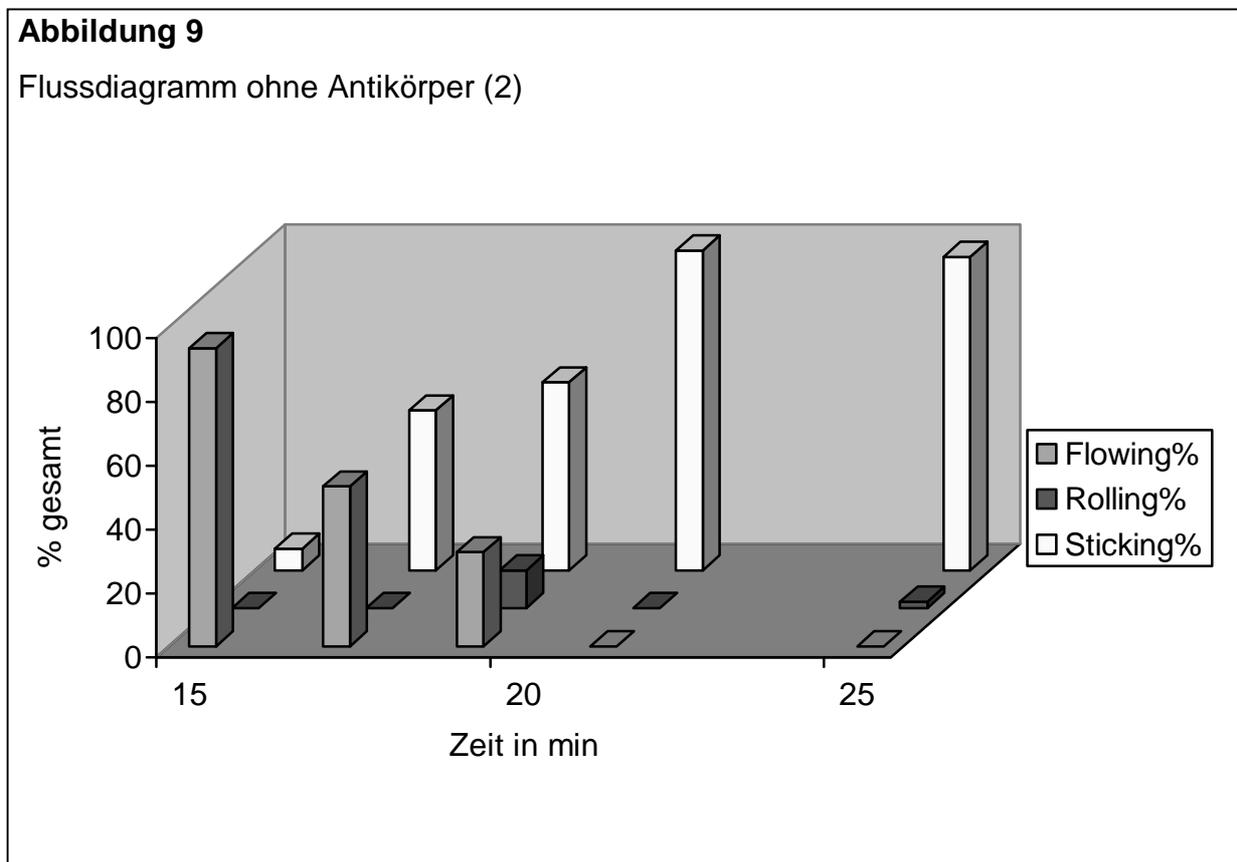
**Tabelle 5**

Fluss ohne Antikörper (2)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	41	0	3	44	93,2	0,0	6,8
17	13	0	13	26	50,0	0,0	50,0
19	5	2	10	17	29,4	11,8	58,8
21	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
25	0	2	100	102	0,0	2,0	98,0

**Abbildung 9**

Flussdiagramm ohne Antikörper (2)



Zu Beginn der Beobachtung nach 15 Minuten Perfusionszeit befanden sich 93% der Zellen in freiem Fluss durch die Gefäße, und etwa 7% waren fest an der Gefäßwand adhären. Bis zur 21. Minute kommt es zu einem völligen Erliegen des freien Flusses durch die Gefäße. In der 21. und 25. Minute liegt der Anteil der fest an der Gefäßwand adhären Zellen jeweils bei 100%. Abgesehen von einem Peak in der

19. Minute findet sich kein Leukozyten-Rolling in den Gefäßen (siehe Tabelle 5, Abbildung 9)

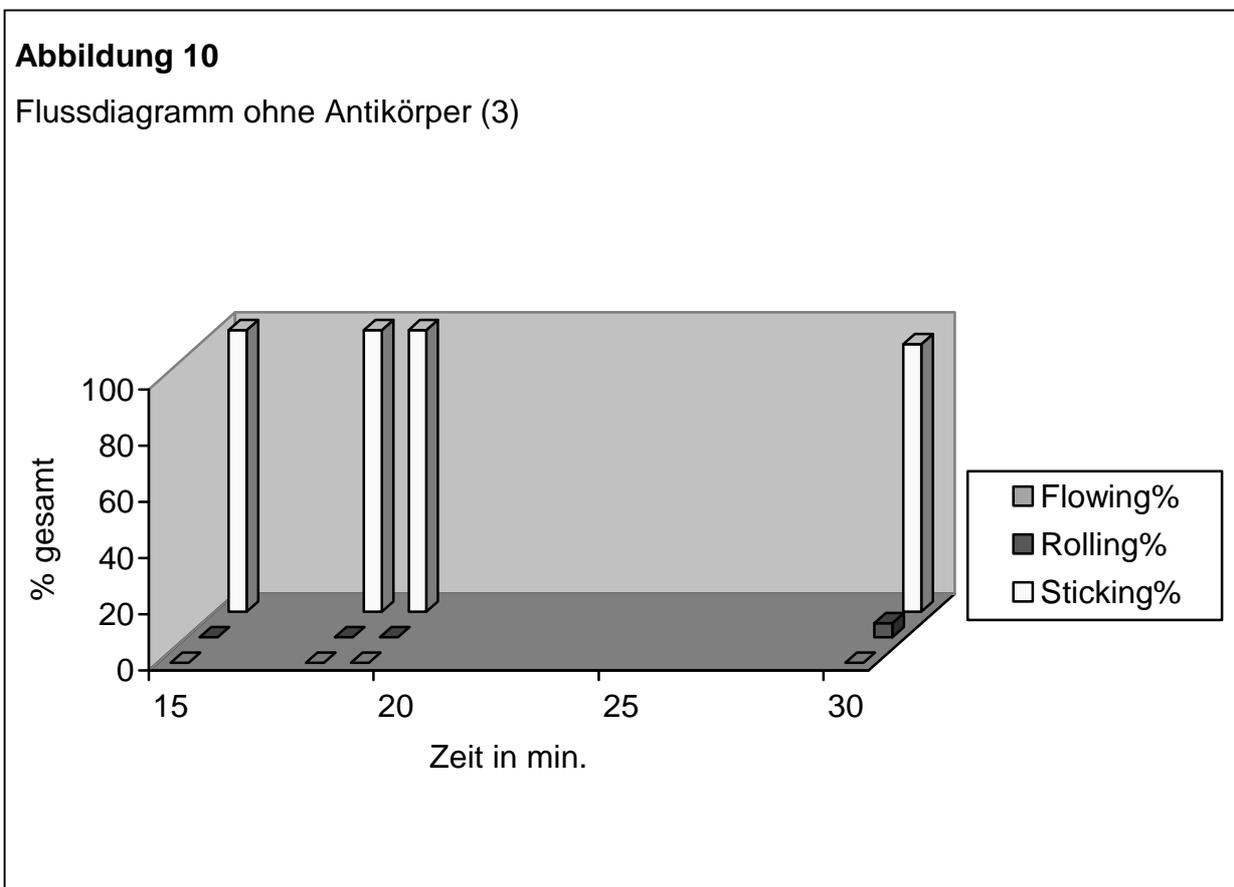
**Tabelle 6**

Fluss ohne Antikörper (3)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
18	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
19	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
30	0	5	100	105	0,0	4,8	95,2

**Abbildung 10**

Flussdiagramm ohne Antikörper (3)



Bereits zu Beginn der Beobachtung lassen sich keine rollenden oder frei fließenden Leukozyten nachweisen. In der 30. Minute können einzelne rollende Zellen gesehen werden. Während der gesamten Beobachtungszeit von 30 Minuten werden keine frei fließenden Leukozyten registriert (siehe Tabelle 6, Abbildung 10).

### 3.1.2. Spenderblut vorbehandelt mit ATG Fresenius

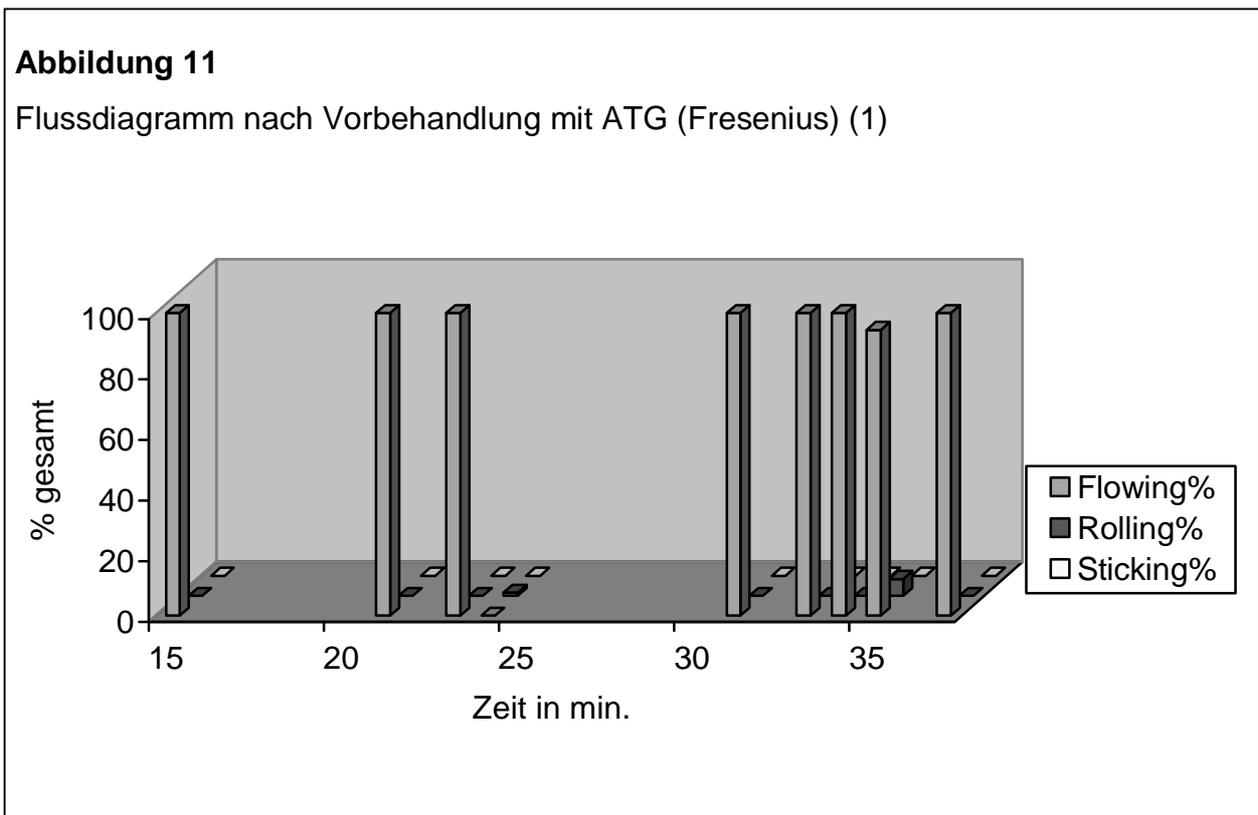
**Tabelle 7**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (1)

Zeit in min	Fowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	60	0	0	60	100,0	0,0	0,0
21	14	0	0	14	100,0	0,0	0,0
23	22	0	0	22	100,0	0,0	0,0
24	0	1	0	1	0,0	100,0	0,0
31	30	0	0	30	100,0	0,0	0,0
33	221	0	0	221	100,0	0,0	0,0
34	25	0	0	25	100,0	0,0	0,0
35	17	1	0	18	94,4	5,6	0,0
37	125	0	0	125	100,0	0,0	0,0

**Abbildung 11**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (1)



Während der gesamten Beobachtungszeit befinden sich, abgesehen von der 24. und der 35. Minute, in welcher der im betrachteten Gefäß jeweils eine einzelne rollende Zelle erfasst werden konnte, 100% der Leukozyten im freien Fluss durch die Gefäße.

Während der Beobachtungszeit von 37 Minuten konnte kein Sticking festgestellt werden (siehe Tabelle 7, Abbildung 11).

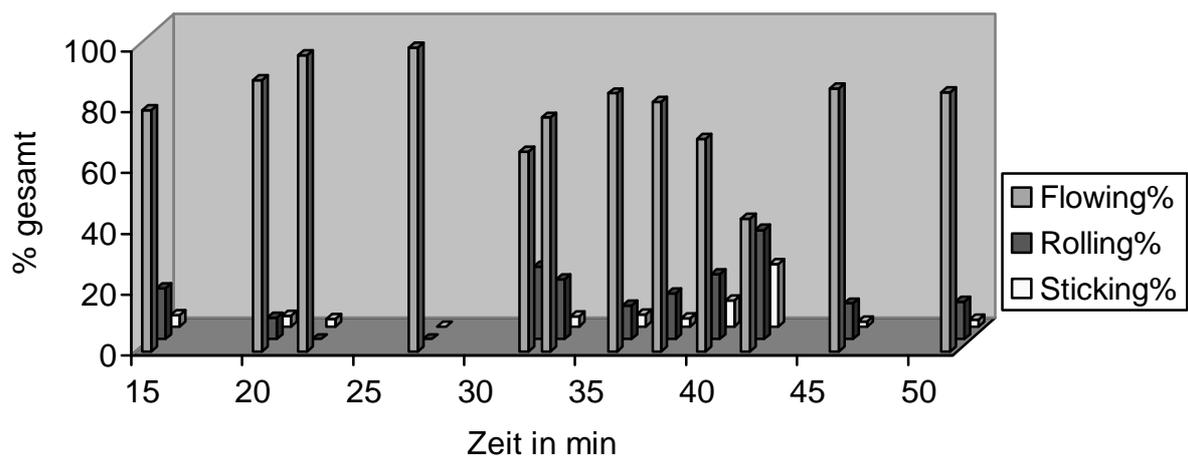
**Tabelle 8**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (2)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	62	13	3	78	79,5	16,7	3,8
20	50	4	2	56	89,3	7,1	3,6
22	41	0	1	42	97,6	0,0	2,4
27	70	0	0	70	100,0	0,0	0,0
32	44	16	7	67	65,7	23,9	10,4
33	47	12	2	61	77,0	19,7	3,3
36	85	11	4	100	85,0	11,0	4,0
38	60	11	2	73	82,2	15,1	2,7
40	49	15	6	70	70,0	21,4	8,6
42	17	14	8	39	43,6	35,9	20,5
46	110	15	2	127	86,6	11,8	1,6
51	76	11	2	89	85,4	12,4	2,2

**Abbildung 12**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (2)



Während der Beobachtungszeit von insgesamt 51 Minuten findet sich kaum Sticking in den beobachteten Gefäßen. In der 42. Minute wird mit etwa 21% der beobachteten Leukozyten ein Maximalwert der adhärennten Zellen erreicht. Die frei fließenden Leukozyten stellen während der gesamten Untersuchung, mit meist über 80% die größte Fraktion (siehe Tabelle 8, Abbildung 12).

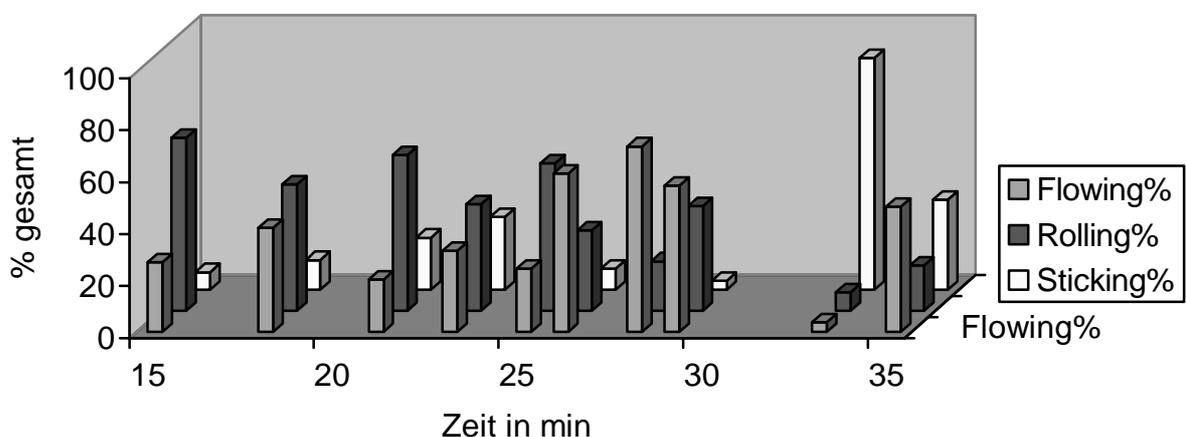
**Tabelle 9**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (3)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	4	10	1	15	26,7	66,7	6,7
18	14	17	4	35	40,0	48,6	11,4
21	6	18	6	30	20,0	60,0	20,0
23	19	25	17	61	31,1	41,0	27,9
25	23	54	18	95	24,2	56,8	18,9
26	53	27	7	87	60,9	31,0	8,0
28	45	12	6	63	71,4	19,0	9,5
29	49	35	3	87	56,3	40,2	3,4
33	1	2	25	28	3,6	7,1	89,3
35	25	9	18	52	48,1	17,3	34,6

**Abbildung 13**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Fresenius) (3)



15 Minuten nach Beginn der Perfusion befinden sich 27% der Zellen im freien Fluss durch die Gefäße, etwa 67% bewegten sich an der Gefäßwand rollend fort und 7% waren fest adhärent. Bis zur 28. Minute steigerte sich der Anteil der frei fließenden Leukozyten auf etwa 71%. In der 33. Minute konnten einmalig nur 4% der Zellen als frei fließend gegenüber 89% fest adhären und 7% rollenden Zellen identifiziert werden. In der 35. Minute befinden sich wieder 48% der beobachteten Leukozyten im freien Fluss (siehe Tabelle 9, Abbildung 13).

### 3.1.3. Spenderblut vorbehandelt mit ATG Mérieux

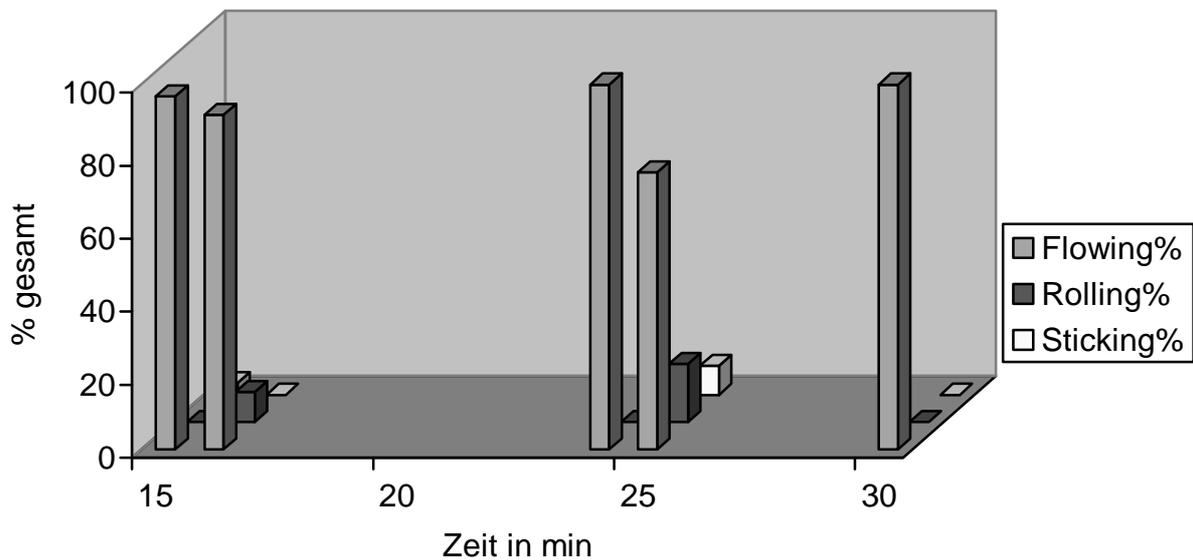
**Tabelle 10**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (1)

Zeit in min	Fluss	Rolling	Sticking	Summe	%Fluss	%Rolling	%Sticking
15	29	0	1	30	96,7	0,0	3,3
16	55	5	0	60	91,7	8,3	0,0
24	35	0	0	35	100,0	0,0	0,0
25	19	4	2	25	76,0	16,0	8,0
30	62	0	0	62	100,0	0,0	0,0

**Abbildung 14**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (1)



Zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen nach 15 Minuten dauernder Perfusion befinden sich 97% der Leukozyten im freien Fluss durch die Gefäße, 3% sind adhärent. Während der gesamten Beobachtungszeit von 30 Minuten finden sich nur vereinzelt rollende oder stickende Zellen. Nach 30 Minuten ist der Anteil der frei fließenden Zellen bei 100% (siehe Tabelle 10, Abbildung 14).

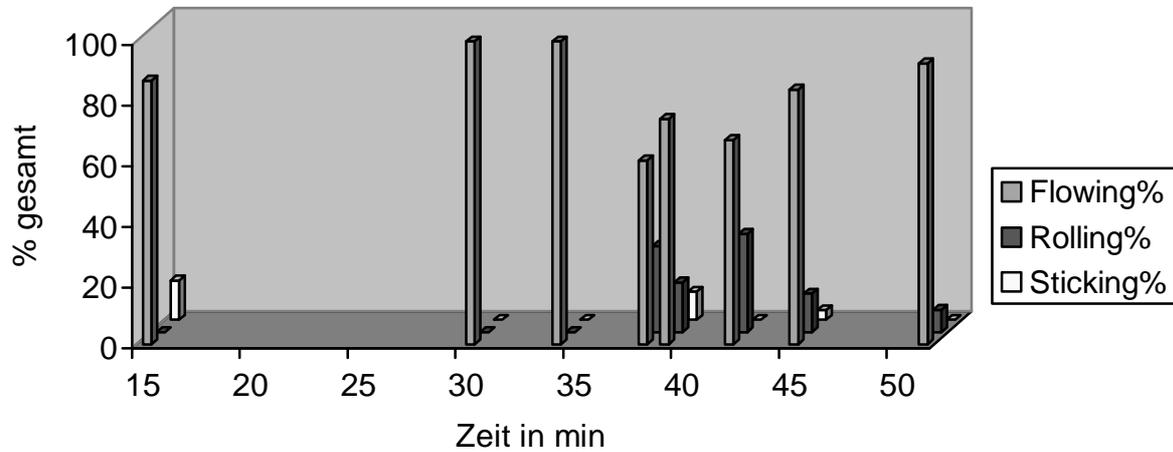
**Tabelle 11**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (2)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	20	0	3	23	87,0	0,0	13,0
30	123	0	0	123	100,0	0,0	0,0
34	149	0	0	149	100,0	0,0	0,0
38	17	8	3	28	60,7	28,6	10,7
39	32	7	4	43	74,4	16,3	9,3
42	27	13	0	40	67,5	32,5	0,0
45	53	8	2	63	84,1	12,7	3,2
51	165	13	0	178	92,7	7,3	0,0

**Abbildung 15**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (2)



Nach einer Perfusionszeit von 15 Minuten befinden sich bei einem Sticking-Anteil von 13%, 87% der Leukozyten im freien Fluss durch die Gefäße. Nach 30 und 34 Minuten fließen 100% der Zellen ohne Adhäsion an der Gefäßwand. Zwischen der 38. und 42. Minute kommt es zu einem kurzzeitigem Abfall des freien Flusses auf ein Minimum von etwa 61% in der 38. Minute, bei gleichzeitigem Anstieg des Leukozyten-Rolling auf 29%. Nach 51 Minuten wurde ein 93% Anteil frei fließender Zellen ermittelt, zur selben Zeit konnte kein Sticking mehr festgestellt werden (siehe Tabelle 11, Abbildung 15).

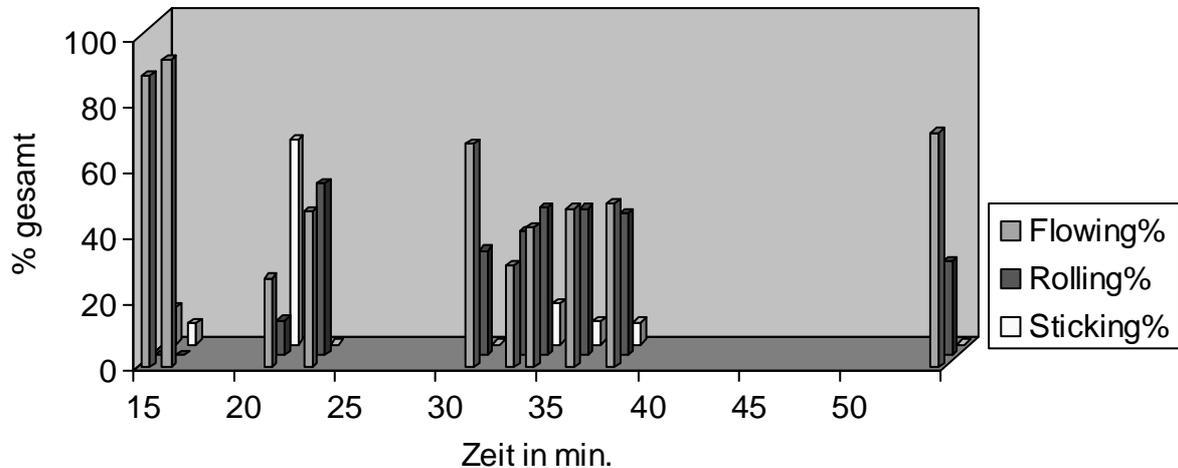
**Tabelle 12**

Fluss nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (3)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	47	0	6	53	88,7	0,0	11,3
16	76	0	5	81	93,8	0,0	6,2
21	10	4	23	37	27,0	10,8	62,2
23	9	10	0	19	47,4	52,6	0,0
31	34	16	0	50	68,0	32,0	0,0
33	9	11	9	29	31,0	37,9	31,0
34	17	18	5	40	42,5	45,0	12,5
36	14	13	2	29	48,3	44,8	6,9
38	15	13	2	30	50,0	43,3	6,7
54	20	8	0	28	71,4	28,6	0,0

**Abbildung 16**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit ATG (Mérieux) (3)



Bei Beobachtungsbeginn in der 15. und 16. Minute befinden sich etwa 90 Prozent der Leukozyten im freien Fluss. 21 Minuten nach Beginn der Perfusion zeigen sich kurzfristig nur 27% der Leukozyten in freiem Fluss durch die Gefäße. Der Sticking-Anteil beträgt 62%. Bis zur 31. Minute kommt es zu einem Anstieg des Flowing-Anteils auf 68% der gezählten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt kann im betrachteten

Gefäß kein Sticking nachgewiesen werden. In der 33. Minute ist ein erneuter Abfall des freien Flusses auf 31% zu beobachten, gleichzeitig nimmt der Anteil an adhärennten Zellen mit 38% Rolling und 31% Sticking deutlich zu. Bis zum Ende der Beobachtungszeit kommt es zu einer Verbesserung des Flusses. Bei 71% frei fließenden Leukozyten und 29% rollenden Zellen konnte in der 54. Minute kein Sticking mehr gesehen werden (siehe Tabelle 12, Abbildung 16).

### 3.1.4. Spenderblut vorbehandelt mit anti-IL-2 (CD25) Rezeptor Antikörpern

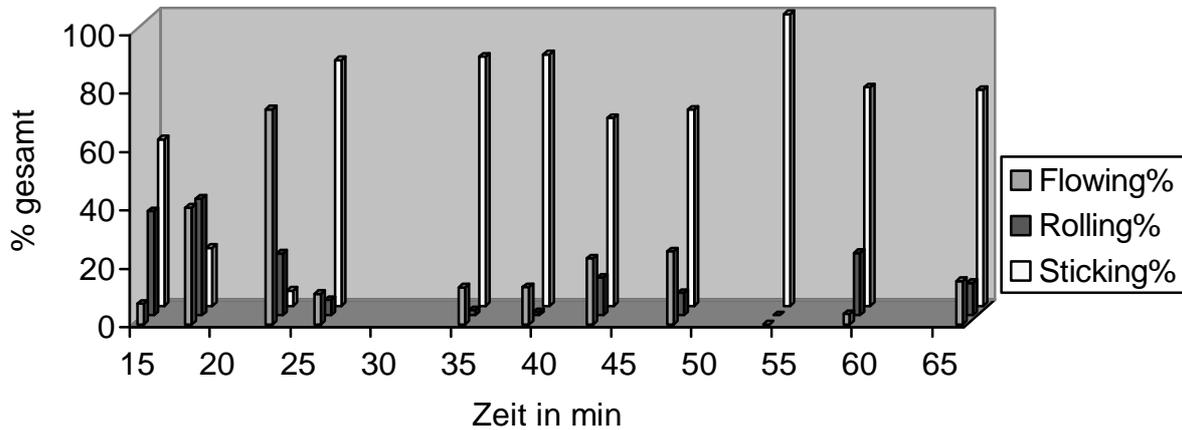
**Tabelle 13**

Fluss nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Simulect) (1)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	1	5	8	14	7,1	35,7	57,1
18	4	4	2	10	40,0	40,0	20,0
23	14	4	1	19	73,7	21,1	5,3
26	2	1	16	19	10,5	5,3	84,2
35	7	1	47	55	12,7	1,8	85,5
39	12	1	81	94	12,8	1,1	86,2
43	14	8	40	62	22,6	12,9	64,5
48	26	8	70	104	25,0	7,7	67,3
54	0	0	50	50	0,0	0,0	100,0
59	1	6	21	28	3,6	21,4	75,0
66	8	6	40	54	14,8	11,1	74,1

### Abbildung 17

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Simulect) (1)



Nach einer Perfusionszeit von 15 Minuten konnte ein Sticking von etwa 57% der Zellen nachgewiesen werden. 7% der gezählten Zellen bewegten sich adhäsionsfrei durch den Gefäßquerschnitt, 36% zeigten ein Rolling entlang des Gefäßendothels. Bis zur 23. Minute kommt es zu einem kurzzeitigen Anstieg des freien Flusses auf maximal 74%. Insgesamt werden in diesem Zeitraum nur wenige Zellen beobachtet. Bis zum Ende der Betrachtung nach 66 Minuten beträgt der Anteil der dauerhaft adhärenen Zellen stets deutlich über 60%. In der 54. Minute werden einmalig 100% Sticking gezählt (siehe Tabelle 13, Abbildung 17). Während der gesamten Perfusion können typische Leukozytenkonglomerate im Blutstrom gefunden werden (Siehe auch entsprechende Videodatei auf beiliegender CD-Rom).

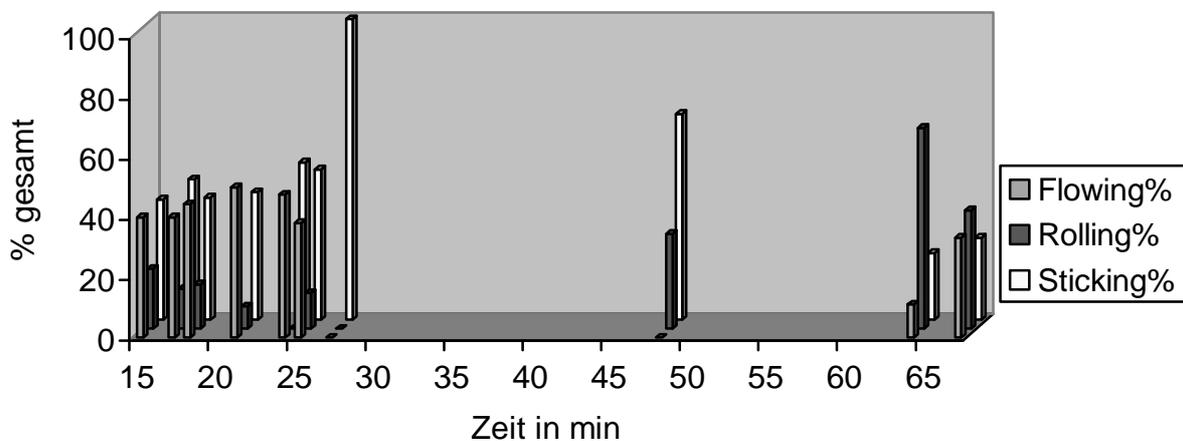
**Tabelle 14**

Fluss nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Simulect) (2)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	6	3	6	15	40,0	20,0	40,0
17	6	2	7	15	40,0	13,3	46,7
18	12	4	11	27	44,4	14,8	40,7
21	20	3	17	40	50,0	7,5	42,5
24	20	0	22	42	47,6	0,0	52,4
25	16	5	21	42	38,1	11,9	50,0
27	0	0	19	19	0,0	0,0	100,0
48	0	12	26	38	0,0	31,6	68,4
64	2	12	4	18	11,1	66,7	22,2
67	11	13	9	33	33,3	39,4	27,3

**Abbildung 18**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Simulect) (2)



Nach einer Perfusionszeit von 15 Minuten findet sich sowohl ein Flowing- als auch Sticking-Anteil von 40%, 20% der Zellen bewegen sich an der Gefäßwand rollend fort. Bei Messungen in der 27. und 48. Minute konnte kein freier Fluss nachgewiesen werden. In der 27. Minute fand sich gleichzeitig ein Sticking aller gezählten Zellen. Zu Ende der Betrachtungen nach 67 Minuten fand sich eine prozentual in etwa gleiche

Verteilung von Flowing, Rolling und Sticking (siehe Tabelle 14, Abbildung 18). Es finden sich auch hier, wie bereits im vorangegangenen Versuch, mit dem selben Antikörper beschriebene, größere Zellkonglomerate im Blutstrom.

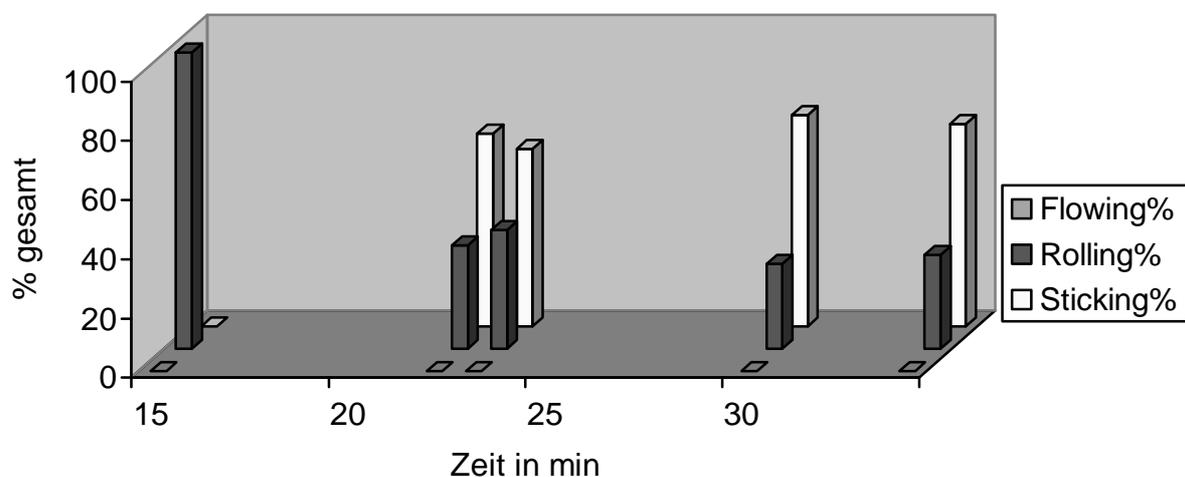
**Tabelle 15**

Fluss nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Zenapax) (1)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	0	9	0	9	0,0	100,0	0,0
22	0	7	13	20	0,0	35,0	65,0
23	0	6	9	15	0,0	40,0	60,0
30	0	10	25	35	0,0	28,6	71,4
34	0	12	26	38	0,0	31,6	68,4

**Abbildung 19**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Zenapax) (1)



Während der gesamten Beobachtungszeit bis zur 34. Minute nach Beginn der Perfusion fanden sich keine frei fließenden Leukozyten. Der 100% Anteil von rollenden Zellen in der 15. Minute fällt in den weiteren Auswertungen auf einen Wert von etwa 30% ab, die übrigen etwa 70% der Leukozyten zeigen eine dauerhafte Adhäsion an der Gefäßwand (siehe Tabelle 15, Abbildung 19). Das mikroskopische

Bild zeigt eine typische, bei den anderen Präparaten nicht auftretende, pflastersteinartige Belegung des Gefäßendothels mit adhärenenten Zellen (siehe auch entsprechende Videodatei auf beiliegender CD-Rom).

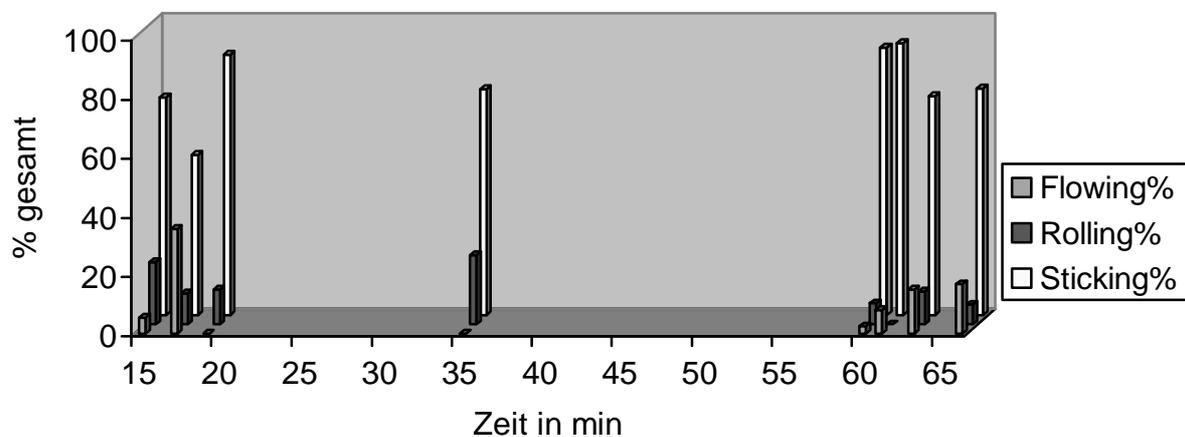
**Tabelle 16**

Fluss nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Zenapax) (2)

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	1	4	14	19	5,3	21,1	73,7
17	17	5	26	48	35,4	10,4	54,2
19	0	6	45	51	0,0	11,8	88,2
35	0	8	26	34	0,0	23,5	76,5
60	1	3	38	42	2,4	7,1	90,5
61	2	0	23	25	8,0	0,0	92,0
63	4	3	20	27	14,8	11,1	74,1
66	5	2	23	30	16,7	6,7	76,7

**Abbildung 20**

Flussdiagramm nach Vorbehandlung mit Anti-CD25 (Zenapax) (2)



Zu Beginn der Betrachtung kann nur eine einzelne Zelle (5,3%) als frei fließend identifiziert werden, 74% der Zellen zeigen ein Sticking an der Gefäßwand. Nur in der 17. Minute konnte mit 35% der gefundenen Zellen ein nennenswerter Anteil an fließenden Leukozyten gezählt werden. Von dieser Ausnahme abgesehen betrug

der Prozentsatz an fest adhärenen Zellen bis zum Ende der Betrachtungen nach 66 Minuten stets zwischen 74% und 92% (siehe Tabelle 16, Abbildung 20). Wie im zuvor beschriebenen Versuch mit dem Antikörper Zenapax findet sich auch hier ein pflastersteinartig mit Leukozyten belegtes Gefäßendothel.

### 3.1.5. Zugabe von ATG unter laufender Perfusion

**Tabelle 17**

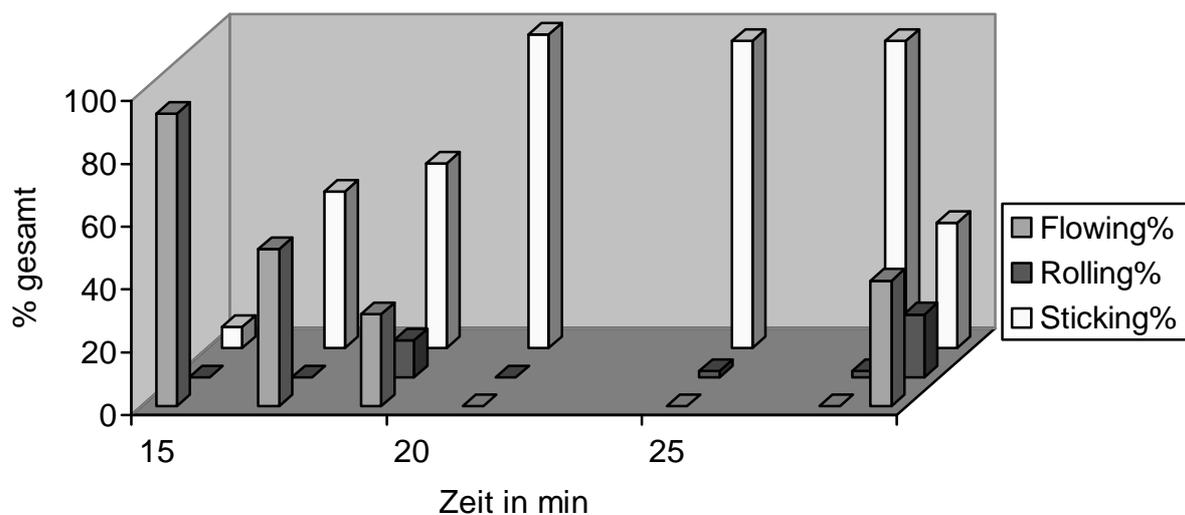
Fluss bei Zugabe von ATG (Fresenius) unter laufender Perfusion

Zeitpunkt 25 Minuten

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	41	0	3	44	93,2	0,0	6,8
17	13	0	13	26	50,0	0,0	50,0
19	5	2	10	17	29,4	11,8	58,8
21	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
<b>25</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>0,0</b>	<b>2,0</b>	<b>98,0</b>
<b>28</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>0,0</b>	<b>2,0</b>	<b>98,0</b>
<b>29</b>	<b>22</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>55</b>	<b>40,0</b>	<b>20,0</b>	<b>40,0</b>

**Abbildung 21**

Flussdiagramm Zugabe von ATG (Fresenius) bei 25 Minuten



Nach Erliegen des Flusses in der 21. Minute (100% Sticking), wurde in der 22. Minute ATG-Fresenius direkt in den Perfusionskreislauf gegeben. Bei gleichzeitigem vorübergehendem Anstieg des Leukozyten-Rolling kommt es bis zur 29. Minute zu einem Anstieg des freien Flusses auf 40%. Dieser Wert entspricht in etwa den Verhältnissen zu Beginn der Beobachtung (siehe Tabelle 17, Abbildung 21). Nach der 29. Minute kann aufgrund schlechter Sichtverhältnisse bei der IVM keine weitere Beobachtung erfolgen.

### **Tabelle 18**

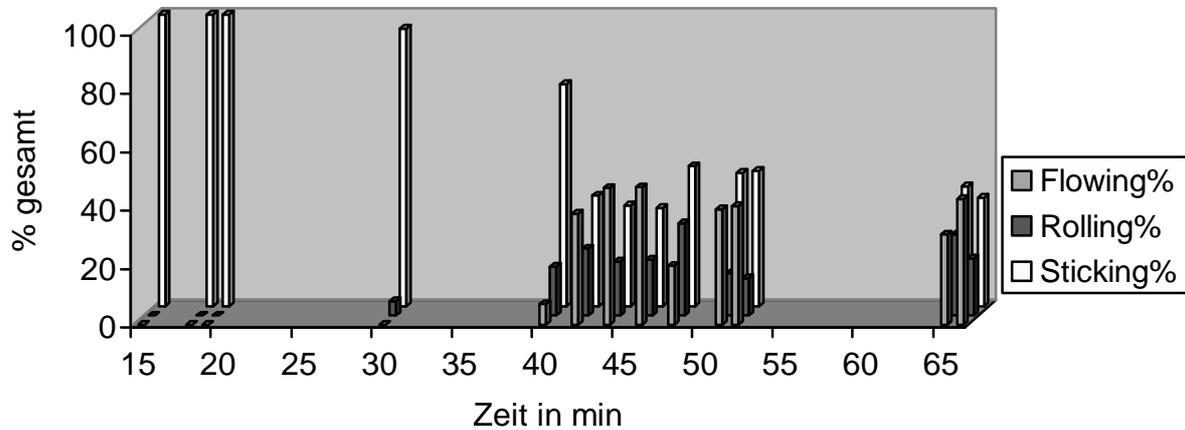
Fluss bei Zugabe von ATG (Fresenius) unter laufender Perfusion

Zeitpunkt 40 Minuten

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
18	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
19	0	0	100	100	0,0	0,0	100,0
30	0	5	100	105	0,0	4,8	95,2
<b>40</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>32</b>	<b>42</b>	<b>7,1</b>	<b>16,7</b>	<b>76,2</b>
<b>42</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>23</b>	<b>60</b>	<b>38,0</b>	<b>23,0</b>	<b>38,0</b>
<b>44</b>	<b>38</b>	<b>15</b>	<b>28</b>	<b>81</b>	<b>46,9</b>	<b>18,5</b>	<b>34,6</b>
<b>46</b>	<b>49</b>	<b>20</b>	<b>35</b>	<b>104</b>	<b>47,1</b>	<b>19,2</b>	<b>33,7</b>
<b>48</b>	<b>21</b>	<b>33</b>	<b>50</b>	<b>104</b>	<b>20,2</b>	<b>31,7</b>	<b>48,1</b>
<b>51</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>48</b>	<b>39,6</b>	<b>14,6</b>	<b>45,8</b>
<b>52</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>40</b>	<b>86</b>	<b>40,7</b>	<b>12,8</b>	<b>46,5</b>
<b>65</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>40</b>	<b>97</b>	<b>30,9</b>	<b>27,8</b>	<b>41,2</b>
<b>66</b>	<b>44</b>	<b>20</b>	<b>38</b>	<b>102</b>	<b>43,1</b>	<b>19,6</b>	<b>37,3</b>

**Abbildung 22**

Flussdiagramm Zugabe von ATG (Fresenius) bei 40 Minuten



Nach Erliegen des Flusses bereits 15 Minuten nach Beginn der Perfusion (100% Sticking) wurde in der 40. Minute ATG-Fresenius direkt in den Perfusionskreislauf gegeben. Bei gleichzeitigem Anstieg des Leukozyten-Rolling kommt es bis zur 44. Minute zu einem Anstieg des freien Flusses auf 47%. Bei Beendigung der Beobachtung nach 66 Minuten befinden sich noch immer 43% der Zellen im freien Fluss durch die Gefäße, gleichzeitig konnte ein Rolling bei 37% der Zellen festgestellt werden (siehe Tabelle 18, Abbildung 22).

**Tabelle 19**

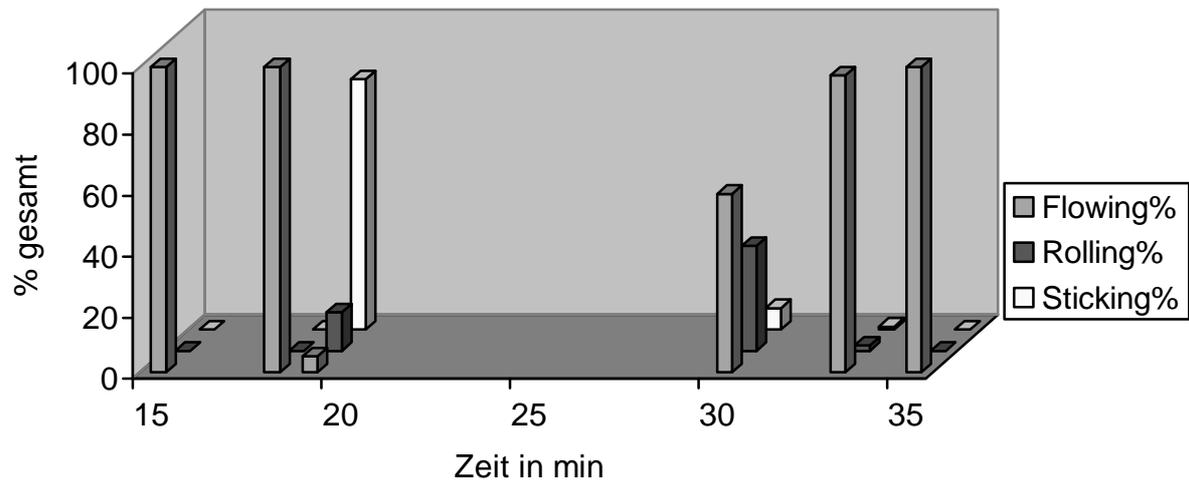
Fluss bei Zugabe von ATG (Fresenius) unter laufender Perfusion

Zeitpunkt 28 Minuten

Zeit in min	Flowing	Rolling	Sticking	Summe	%Flowing	%Rolling	%Sticking
15	188	0	0	188	100,0	0,0	0,0
18	22	0	0	22	100,0	0,0	0,0
19	13	31	200	244	5,3	12,7	82,0
<b>30</b>	<b>92</b>	<b>54</b>	<b>11</b>	<b>157</b>	<b>58,5</b>	<b>34,4</b>	<b>7,0</b>
<b>33</b>	<b>108</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>111</b>	<b>97,3</b>	<b>1,8</b>	<b>0,9</b>
<b>35</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

### Abbildung 23

Flussdiagramm Zugabe von ATG (Fresenius) bei 28 Minuten



Nach weitgehendem Erliegen des Flusses in der 19. Minute (82% Sticking, 13% Rolling), wurde in der 28. Minute ATG-Fresenius direkt in den Perfusionskreislauf gegeben. Bei gleichzeitigem vorübergehendem Anstieg des Leukozyten-Rolling auf maximal 34% in der 30 Minute kommt es bis zur 33. Minute zu einem Anstieg des freien Flusses auf 97%. In der 35. Minute befanden sich 100% der gezählten Zellen im freien Fluss durch die Gefäße. Dieser Wert entspricht den Verhältnissen zu Beginn der Beobachtung (siehe Tabelle 19, Abbildung 23).

## **D. Diskussion**

### **1. Einführung**

Bei der klinischen Organtransplantation trifft die Medizin immer wieder auf zwei kardinale Probleme: Zum einen stellt bereits seit längerer Zeit die ungenügende Verfügbarkeit geeigneter Spenderorgane das größte Hindernis für eine suffiziente Patientenversorgung dar (<sup>1</sup>Evans RW et al.). Die Fortschritte der Transplantationschirurgie, Intensivmedizin und Immunologie (Brent LB., Perrico N et al.), um nur einzelne Fachdisziplinen herauszugreifen, werden durch das begrenzte Angebot an geeigneten allogenen Spenderorganen relativiert. Dieses Problem wird durch die oftmals unsachliche und häufig polemische Diskussion und Berichterstattung in der Öffentlichkeit verschärft. Ungeklärte ethische Aspekte (Whetstone L et al.) und die konträren Standpunkte verschiedener religiöser Gruppierungen tragen ihr Übriges dazu bei, einem breiteren Einsatz der Organspende entgegenzuwirken.

Dem gegenüber stehen die unbestreitbaren Vorzüge der Transplantation (Ponticelli C et al.) gegenüber jahrelanger chronischer Krankheit verbunden mit invasiven Behandlungen (z.B. Dialyse), und das Versterben möglicher Transplantatempfänger während der Wartezeit auf ein geeignetes Spenderorgan. Auch wirtschaftliche Aspekte sprechen insbesondere bei der klinisch besonders häufigen Nierentransplantation für eine rechtzeitige Organtransplantation (<sup>2</sup>Evans RW et al.).

#### **1.1. Grundlagen der Xenotransplantation**

Um diese oben beschriebene Problematik zu umgehen, wurde bereits frühzeitig nach Alternativen zur allogenen Transplantation gesucht. Während mechanische Systeme als Ersatz und Unterstützungsorgane in der Herzchirurgie immer mehr an Bedeutung gewinnen (Hetzer R et al.), sind medizintechnische Transplantate für Nieren, Pankreas und Leber (<sup>2</sup>Pascher A et al.) in den meisten Fällen noch Zukunftsmusik.

Einen möglichen Ausweg aus der beschriebenen Dilemmasituation könnte die Xenotransplantation bieten (<sup>2</sup>Hammer C., Goddard MJ et al., O'Rourke K.). Bisher stellen jedoch die mit diesem Ansatz verbundenen immunologischen (Knosalla C et al., Geller RL et al.) und physiologischen (<sup>5</sup>Hammer C et al.) Reaktionen eine

scheinbar unüberwindbare Barriere dar. Auch mit den modernen Möglichkeiten der Gentechnologie konnten die mit dieser Art der Transplantation verbundenen Probleme nicht oder nur teilweise eliminiert werden (Nottle MB et al., Costa C et al.). Aufgrund des genetischen Verwandtschaftsgrades und der deshalb weniger zu erwartenden hyperakuten Abstoßungsreaktion kommen in erster Linie Primaten als Spender in Frage. Limitierende Faktoren stellen strenge Tier- und Artenschutzauflagen sowie die bei vielen Menschen vorhandene emotionale Bindung an Primaten dar (Goodall J.).

## **1.2. Xenogene Abstoßung**

Trotz der großen Fortschritte auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin blieben aktuellere Versuche einer xenogenen Transplantation beim Menschen hinsichtlich der Langzeitfunktion der Organe und des Überlebens der Patienten weitgehend erfolglos (Dorling A., <sup>7</sup>Hammer C., <sup>1,2</sup>Starzl TE et al). Calne teilte 1970 aufgrund der Schwere und Verteilung des Abstoßungsmusters die möglichen xenogenen Organtransplantate in konkordante und diskordante Organe ein. Nach seiner Definition werden alle xenogenen Organe, die eine hyperakute Abstoßungsreaktion nach Transplantation auslösen (<sup>1</sup>Paltt JL.), als diskordant bezeichnet. Xenotransplantate bei denen keine hyperakute Abstoßungsreaktion ausgelöst wird, werden als konkordant bezeichnet. Hierzu zählt die Gruppe der Primaten (Calne RY.).

Entgegen allen Erwartungen ist die T-Zellantwort auf konkordante und diskordante Xenoantigene weniger ausgeprägt, als die zelluläre Antwort auf allogene Antigene. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass die zelluläre Immunantwort um so insuffizienter ist, je weiter die beteiligten Spezies voneinander phylogenetisch entfernt sind (Moses RD et al., Loss M et al.). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass mit zunehmender phylogenetischer Entfernung die Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen MHC unwahrscheinlicher werden und dadurch die zelluläre Immunantwort ihres primären Ansatzpunktes beraubt wird. Ein anderer entscheidender Punkt scheint die Tatsache der ineffektiven molekularen Interaktion zwischen T-Zellen und xenogenen Zellen zu sein. Dies führt im Endeffekt zu einer verminderten zellulären Immunantwort. Trotz dieser eigentlich günstigen Ausgangssituation zeigen die etablierten Verfahren der Immunsuppression, die bei

der allogenen Transplantation äußerst erfolgreich sind (Hong JC et al.), beim Ansatz im xenogenen Modell nur unbefriedigende Ergebnisse. Insbesondere die Langzeitüberlebensraten sind im Vergleich zur allogenen Transplantation enttäuschend (Sadeghi AM et al., <sup>4</sup>Hammer C et al.).

Die immunologischen Vorgänge am xenogenen Primatenmodell wurden in der vorliegenden Arbeit mit immunhistochemischen und intravitalmikroskopischen Methoden untersucht. Hierbei sollte die Modulierung der immunologischen Kaskaden durch poly- und monoklonale Anti- Lymphozytenantikörper evaluiert und veranschaulicht werden.

### **1.3. Einflüsse von Ischämie und Reperfusion**

Jedes Organtransplantat durchläuft nach Explantation aus dem Kreislauf des Donors unvermeidbar eine ischämische Phase. Die darauf folgende Reperfusion schädigt das Transplantat teilweise irreversibel, bedingt durch die plötzliche Wiederversorgung mit frisch oxigeniertem Blut. Dieser Reperfusionsschaden steht in direktem Zusammenhang mit der Dauer der Ischämie, der Sauerstoffversorgung und der Bereitstellung von Substraten für die Verstoffwechselung des wieder anflutenden Blutes (Schneeberger H et al.). Die meisten Transplantate erholen sich schnell, jedoch zeigen z.B. bis zu 45% der transplantierten Nieren eine verlängerte Organdysfunktion nach erfolgter Transplantation (Gjertson DW., Ceck J et al.). Die postischämische Leberdysfunktion nach Reperfusion konnte als Korrelat einer gestörten Mikrozirkulation identifiziert werden (<sup>1,2</sup>Vollmar B et al.). In beiden Fällen scheinen die beobachteten Funktionsstörungen durch die Abläufe von Ischämie und Reperfusion bedingt zu sein. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob unbehandeltes Blut tatsächlich die ideale Flüssigkeit zur Reperfusion eines zuvor ischämischen Transplantates darstellt (Hallenbeck J et al.). Eine signifikante Reduktion der Organdysfunktion kann jedoch durch die Begrenzung der ursächlich vorausgegangen Ischämiezeit erreicht werden. Dies erklärt auch die guten Ergebnisse der Organ- Lebendspende, bei der die Ischämiezeit durch optimale operative Logistik auf ein Minimum verkürzt werden kann.

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen, die durch Ischämie und Reperfusion ausgelöst werden, manifestieren sich primär auf der Ebene der

Mikrozirkulation. Der Ischämie/Reperfusionsschaden ist ein Prozess, in dem das Gewebe bzw. die Zellen durch den temporären Sauerstoffmangel und den anschließenden Sauerstoffpartialdruck, verbunden mit der wiederhergestellten Perfusion mit oxigeniertem Blut, geschädigt werden. Einer der zugrundeliegenden Abläufe ist die Aktivierung von Endothelzellen des Transplantates sowie beider Typen von weißen Blutzellen, mononukleären und polymorph-nukleären Zellen. Dieser Vorgang führt schließlich zum Verschluss kleinster Gefäße. Ein weiterer in diesem Zusammenhang bedeutender biochemischer Mechanismus ist die sofortige Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die zur Schädigung von Zellmembranen, zu Ödemen und zur Aktivierung der Komplementkaskade (Kirschfink M.) führt. Zusätzlich kommt es zu einer Veränderung der Endothelzellen von einem anti-koagulativen zu einem pro-koagulativem Status. Dieser Status geht mit der raschen Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Endothelzellen einher. Eine derartige Interaktion führt entweder, unter der Beteiligung von Selectinen (Hickey MJ et al., Johnston B et al., Kanwar S et al.), zur vorübergehenden Adhäsion der Leukozyten auf dem Endothel (Rolling), oder, unter Vermittlung von  $\beta$ 2-Integrinen, zur permanenten Adhäsion (Sticking) derselben. Diese Adhäsion ermöglicht eine Interaktion der immunkompetenten Zellen im Sinne einer Antigen-Erkennung, mit der Antigen präsentierenden Endothelzelle. Die endotheliale Adhäsion der Leukozyten, die Thrombozytenaggregation und die Stase des kapillären Blutflusses führen nach derzeitigem Wissen zu einer inflammatorischen Reaktion auf der Ebene der Mikrozirkulation. Dieser Zustand ist charakterisiert durch eine Störung der Kapillarperfusion mit Rekrutierung von Leukozyten. Die funktionelle Beeinträchtigung der Endothelzellbarriere führt zu einer verstärkten molekularen Extravasation, dem sogenannten Capillary Leakage. Aktivierte temporär und permanent adhärente Granulozyten setzen ihre gewebezerstörenden Mediatoren, wie Peroxidasen, Elastasen und Lactoferrin frei, die ihrerseits den bereits manifesten Ischämie/Reperfusionsschaden verstärken (<sup>2</sup>Menger MD, <sup>1,2</sup>Vollmar B. et al.).

## **2. Wahl der Versuchstiere**

Zur Untersuchung der klinisch relevanten Fragestellungen ist das konkordante Modell Primat- Mensch ein Idealfall. Es entspricht dem klinisch möglichen

Transplantationsansatz. Da mit den derzeitigen medizinischen Behandlungsmethoden, die im diskordanten Ansatz zu erwartende hyperakute Abstoßungsreaktion nur unzureichend beherrscht werden kann, wurde zur Klärung der vorliegenden Fragestellungen ein konkordantes Modell gewählt. Dieses ist adäquat, um die Auswirkungen einer xenogenen Transplantation auf die Blutzirkulation sowie die Wirkungen der verwendeten Antikörper zu untersuchen, da durch diese eine wirksame Beeinflussung der zu erwartenden zellulären Immunantwort erreicht werden kann .

Jedoch bedingt die Wahl der Versuchstiere, die der Wissenschaft in Deutschland nur in Ausnahmefällen zu Verfügung stehen, eine Begrenzung der Versuche. Die Durchführung der Versuche mit Primaten ist zwar in besonderer Weise dazu geeignet, Rückschlüsse auf die Anwendung der getesteten Präparate beim Menschen zu ziehen, jedoch ist die Verwendung dieser Tiere für wissenschaftliche Versuchsanordnungen mit erhöhten Auflagen (ex vivo Perfusion) und nicht zuletzt mit hohen Kosten verbunden. Die öffentliche Diskussion in den letzten Jahren sowie die Berichterstattung in den Medien hat diesen Zustand weiter verschärft.

### **3. Nierenperfuisionsmodell**

#### **3.1. Ex vivo Perfusion isolierter Organe**

Die Perfusion isolierter Organe ermöglicht die Erforschung pathophysiologischer Prozesse unter Bedingungen, die in dieser Form nicht oder nur unzureichend durch in vivo Experimente erreicht werden können. Vergleichbare experimentelle Modelle werden beispielweise bei der Erforschung von Metabolismen in der Pharmakologie (Brannstrom M et al, Wahlberg J et al ) und Toxikologie oder bei der Untersuchung des transplazentaren Transports von Substanzen (Dancis J et al, Schenker S et al, Schneider H et al) verwendet. Auch immunologische (Badimon L et al) und pathophysiologische (Bowers BA et al, Doyle MP et al) Fragestellungen werden unter Anwendung der ex vivo Perfusion isolierter Organe beantwortet.

Gerade in der Xenotransplantation stellen ex vivo Ansätze, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, ein unverzichtbares Instrument dar. Die lebensnahe Simulation physiologischer und pathophysiologischer Abläufe (<sup>2</sup>Platt JL et al, Storck M et al) macht es möglich, Rückschlüsse auf klinische Perspektiven und

Lösungsansätze zu ziehen (Candinas D et al, Linke R et al, <sup>1,2</sup>Pascher A et al). Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde die Bindung von ATG beim Einsatz im Rahmen der Transplantationsmedizin, im besonderen die Bindung an Strukturen der Niere von *Macaca Cynomolgus* Affen genauer untersucht.

In dem vorliegenden konkordanten Versuchsaufbau werden ATG Präparationen in therapeutischer Dosis über eine selektive Perfusion (siehe B.3.2.) mit den Oberflächen der Niere in Kontakt gebracht. Eine anschließende kurze Inkubation ermöglicht eine Bindung des ATG an die Kontaktflächen. Nach Biopsierung erfolgt eine zweite Perfusion derselben Niere mit menschlichem Plasma. Hierdurch sollen die Plasmaeinflüsse auf das Bindungsverhalten bei der Behandlung *in vivo* simuliert werden. Die Perfusion der zweiten Niere 24 Stunden nach Explantation soll die in der Transplantationsmedizin bedeutsamen Einflüsse von Ischämie und Reperfusion simulieren.

### **3.1.1. Bindung von ATG an Strukturen von Primatennieren**

ATG stellt heute eine wichtige Säule der modernen Immuntherapie bei Transplantatempfängern dar. Wirkungen und insbesondere Nebenwirkungen von ATG wurden in zahlreichen Studien eingehend untersucht (<sup>1,2</sup>Abou-Jaoude MM et al, Belitsky P et al, Billaud EM., Rahman GF et al., Pescovitz MD.). Nach der Induktion einer anti-xenogenen Antikörperbildung (Hricik DE et al.), kommt es auf dieser Grundlage zu Veränderungen der Serumzusammensetzung (Belitsky P et al). Durch die Bindung der Antikörper an ihre Zielepitope kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und den damit verbundenen vegetativen Symptomen und Dysfunktionen (Zaltzman JS et al., Book B et al., Chatenoud L et al.).

Über die spezifische Bindung der Antikörper und die damit verbundenen ziel-spezifischen Wirkungen im Sinne der erwünschten Immunsuppression wird auch eine Bindung mit nicht Antikörper-spezifischem Gewebe beschrieben. Neben der Bindung an Granulozyten und Thrombozyten (Samsel R et al., Hurault de Ligny B et al.) stellt die mögliche Bindung von ATG an Epithelzellen ein bisher weitgehend unerforschtes Szenario dar. Bereits in den neunziger Jahren wurden am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität durch C. Hammer, nach isolierter extrakorporaler Perfusion von Primatennieren mit ATG, immunhistologische Untersuchungen an Gefrierschnitten durchgeführt. Diese bisher nicht veröffentlichten

Studien erbrachten analoge Ergebnisse zu den später am gleichen Institut durchgeführten, hier beschriebenen Versuchen. Eine unspezifische Bindung von polyklonalem Kaninchen ATG (Fresenius) konnte in keinem der vorliegenden Fälle eindeutig nachgewiesen werden. Eine direkte, adhäsionsvermittelte Schädigung oder Modifikation der Epithelzellen durch das verwendete ATG erscheint nach den vorliegenden Daten äußerst unwahrscheinlich und von allenfalls untergeordneter klinischer Relevanz.

### **3.1.2. Bindung mononukleärer Zellen auf Nierenbiopsien**

Reife Lymphozyten wandern im lebenden Organismus kontinuierlich durch den Körper. Sie rezirkulieren vom Blut über Lymphknoten und andere Gewebe in die lymphatischen Organe und gelangen von dort zurück in die Blutbahn. Es wird angenommen, dass diese Lymphozytenrezirkulation den Prozess der Immunitätsbildung erst möglich macht. Sie ermöglicht spezifisch reaktiven Lymphozyten den Kontakt mit Antigenen, die Interaktion mit anderen Lymphozytenpopulationen und die Rekrutierung zu inflammatorischen Körperarealen unabhängig von deren Lokalisation (Weissman IL et al). Migration und Rezirkulation der Zellen können an verschiedenen Punkten reguliert werden. So unterscheiden sich Zugang und Spezifität zu den einzelnen Organsystemen sowie die Zeitabläufe bei Durchgang und Freisetzung aus den selbigen (Springer TA.). Die Komplexität der Interaktion innerhalb der verschiedenen Komponenten, die in zahlreichen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen simultan stattfindet, macht die Untersuchung dieser Vorgänge in vivo äußerst schwierig. Die Bindung humaner Lymphozyten an Zellen des Nierengewebes von Primaten stellt im vorliegenden konkordanten xenogenen System einen ersten Schritt in der Kaskade der xenogenen Immunisierung dar.

Aus dem Blut gelangen zirkulierende Lymphozyten durch Adhäsion an und Migration durch die Endothelwände der postkapillären HEV in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques (Gowans JL et al). Das Entstehen der HEV ähnelt in der Phylo- und Ontogenese der Entwicklung organisierter Lymphknoten und Peyer'scher Plaques (Miller JJ., Friedberg SH et al). Die Interaktionen von Lymphozyten und HEV spielt demzufolge eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, dem Erhalt und der Funktion lymphatischer Strukturen, sowie bei der Kontrolle der

Lymphozytenzirkulation innerhalb des Organismus. Zur Untersuchung der Lymphozytenadhäsion wurden verschiedene in vitro Systeme entwickelt (<sup>1,2</sup>Stamper HB et al, Woodruff JJ et al). Stamper und Woodruff beschrieben in ihren Versuchen die spezifische Bindung der Lymphozyten an HEV nach Inkubation auf Gefrierschnitten an die HEV von Lymphknoten der Ratte.

Zur Evaluation der Lymphozytenadhäsion auf den wie unter B.3.3.1. angefertigten Gefrierschnitten der Primatenniere wurde ein modifizierter „Stamper-Woodruff in vitro binding assay“ durchgeführt (Butcher EC et al.). Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, die Affinität des untersuchten Gewebes für die darauf inkubierten Testzellen zu untersuchen.

Die Adhäsion von unbehandelten und zuvor mit ATG inkubierten mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) auf den Gefrierschnitten der Primatenniere soll Aufschluss über das Bindungsverhalten menschlicher Lymphozyten im untersuchten konkordanten Modell geben.

Eine spezifische Bindung der Lymphozyten an Strukturen der Primatenniere konnte in keinem der untersuchten Präparate festgestellt werden. Deutlich ist ein nahezu völliges Fehlen adhärenter Zellen an Gefäß- und Tubulusstrukturen zu sehen, während sich im Bereich der Glomeruli vereinzelt ein Zellenachweis führen lässt. Die von uns gezeigten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass im hier vorliegenden Aufbau vor Entnahme der Nierenbiopsien noch keine ausreichende Aktivierung der Endothelzellen stattgefunden und so eine Bindung der Lymphozyten noch nicht möglich war. Eine möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist die ausgesprochen kurze Ischämiezeit des direkt zuvor explantierten Organs im vorliegenden Ansatz und die damit verbundene Minimierung des Reperfusionsschadens.

### **3.1.3. Einflüsse von Ischämie und Reperfusion auf die Bindung von ATG an Primatennieren**

Auch im neuen Jahrtausend ist es weiter unmöglich, Organe zu transplantieren, ohne dabei eine Schädigung des Transplantats und damit eine Verschlechterung des Patienten-outcomes durch Ischämie und die darauf folgende Reperfusion in Kauf zu nehmen (Schneeberger H et al). Einer der wichtigsten ursächlichen Mechanismen ist die Aktivierung von Endothelzellen des Spenderorgans (Fuller BJ.). Das zuvor

antikoagulative Endothel ändert diesen Zustand und schaltet rasch auf einen prokoagulativen Status um. Hiermit verbunden ist die Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen (Carlos TM et al). Die damit verbundenen Pathomechanismen sind unter 3.5. nochmals ausführlich erläutert.

Diese transplantationsmedizinische Gegebenheit und ihre schwerwiegenden Folgen machen es notwendig, bei der Untersuchung pathophysiologischer und pharmakologischer Vorgänge die Einflüsse von Ischämie und der damit verbundenen Reperfusion zu berücksichtigen. Dem Folge tragend wurde im vorliegenden Modell die zweite Niere erst nach einer gewollten Ischämiezeit von 24 Stunden der vorgesehenen Perfusion mit ATG unterzogen. Die dadurch induzierten Veränderungen und Schädigung des Endothels könnten zumindest theoretisch eine verstärkte unspezifische Bindung des pATG induzieren und so zu einem positiven Testergebnis in der Immunhistologie führen. Jedoch konnte bei der hier vorliegenden Versuchsreihe keine Beeinflussung des Tests durch Ischämie und Reperfusion festgestellt werden. Trotz der polyklonalen Ausrichtung von pATG und der damit verbundenen Varianz bindet pATG nicht an Strukturen des Nierengewebes von *Macaca fascicularis*. Die schlechteren Transplantationsergebnisse nach verlängerter Ischämiezeit, auch bei Behandlung mit pATG, lassen sich den vorliegenden Ergebnissen zufolge nicht mit einer direkten Bindung von pATG an Nierenstrukturen, insbesondere Epithelzellen in Verbindung bringen. Eine bestmögliche Reduzierung der Transplantatischämie, verbunden mit einer Minimierung des Reperfusionsschadens, bleibt deshalb eines der Hauptziele der Transplantationschirurgie (Mayer H et al).

#### **4. Intravitalmikroskopie**

##### **4.1. Methodik**

Erste Berichte über den Einsatz der Intravitalmikroskopie (IVM) zur Analyse von Gefäßperfusion und Zell-Interaktionen datieren bereits zurück ins Jahr 1839 (Wagner R.). Die Fortschritte und Entwicklungen auf diesem Gebiet haben die Methode zu einem attraktiven Medium reifen lassen, um speziell in der chirurgischen Forschung mikrovaskuläre, zelluläre und molekulare Mechanismen zu studieren und so die Zusammenhänge besser verstehen zu können (Vollmar et al.). Die hochkomplexen

Vorgänge bei der Abstoßung allogener und xenogener Organe und die damit verbundenen Veränderungen der Makro- und Mikrozirkulation sowie der Gefäßpermeabilität sind für die Erforschung mittels IVM besonders geeignet. Die Hinzunahme der Fluoreszenztechnik führte seit ihrer Einführung zu einer weiteren Verbesserung der Untersuchungsergebnisse (<sup>1</sup>Menger MD et al). Zwar ermöglichen die Errungenschaften der Immunhistochemie eine exakte und spezifische Beurteilung der Abläufe bei der Abstoßungsreaktion und der Aktivierung von Leukozyten und anderen an diesen Vorgängen beteiligten Zellen, der Nachteil aller histologischen Untersuchungsmethoden liegt jedoch in der begrenzten Potenz, lediglich zu einem definierten Zeitpunkt und am entnommenen Gewebe Aussagen treffen zu können.

In mehreren experimentellen Studien wurde bisher die IVM zur Evaluierung der Transplantatabstosung und Bewertung therapeutischer Ansätze verwendet (<sup>3</sup>Hammer C et al., Sawaya DE et al., Zhang XY et al., Langer S et al.). Der Einsatz der IVM in einem konkordanten, xenogenen Modell bei gleichzeitiger Behandlung mit immunsuppressiv wirksamen Antikörpern wurde zuvor noch nicht beschrieben.

Im vorliegenden Versuchsaufbau ist es möglich, den Verlauf der Veränderungen auf mikrozirkulatorischer Ebene direkt zu analysieren und dabei verschiedene therapeutisch wirksame Substanzen in Ihrer Wirkung zu vergleichen.

Durch die angewandte Doppelfärbung mittels zweier Fluorochrome mit unterschiedlichem Emissionsspektrum und die Verwendung eines variablen Filtersystems (siehe B.4.5.1) konnten nicht nur Aussagen zur mikrovaskulären Hämodynamik, sondern insbesondere zum Fließverhalten der Leukozyten, welches bei Fragestellungen zur xenogenen Abstoßungsreaktion und zur Beurteilung der Wirksamkeit der getesteten Immunglobuline von besonderem Interesse ist, getroffen werden.

Die Zugabe der Farbstoffe zum Perfusat bereits vor Einschleussung in den Kreislauf ermöglicht eine ausreichende Kontrastierung der Bilder bereits zu Beginn der Beobachtungszeit, die durch die zuvor durchzuführende sorgfältige Präparation des Beobachtungsfensters (siehe B.4.3.) und die Einstellung und Fokussierung eines geeigneten Gefäßabschnittes in der Realität erst 15 Minuten nach Beginn der Perfusion begonnen werden konnte.

Von Harris wurde 2002 die Auswirkung der Lichtexposition durch IVM auf Fluoreszenz-markierte Leukozyten und Plasma und das Adhäsionsverhalten der

Leukozyten untersucht. Bei einer Lichtexposition von bis zu 300 Sekunden konnte kein signifikanter Einfluss auf die Leukozyten-Endothel Interaktion (Rolling/Sticking) festgestellt werden (Harris AG et al.). Saetzler konnte in seinen 1997 publizierten Untersuchungen zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, in einem dem hier verwendeten Modell vergleichbaren Versuchsaufbau, eine lichtinduzierte Phototoxizität und eine damit verbundene Adhäsion fluoreszenzmarkierter Leukozyten zeigen (Saetzler RK et al.).

Um bei den vorliegenden Betrachtungen eine optische und thermische Schädigung des betrachteten Gewebes und der zirkulierenden Zellen durch längere Epiilluminiierung und Fluorochrome zu vermeiden, wurde bei der Durchführung der Versuche der Bildausschnitt nach spätestens 15 Minuten verlagert. Da hiermit auch eine Veränderung von Gefäßdurchmesser und Architektur verbunden ist, wurden neben der absoluten Zahl von frei fließenden, rollenden und adhärenen Leukozyten die prozentualen Werte dieser Subpopulationen in die Auswertung miteinbezogen.

## **4.2. Polyklonale ATG**

### **4.2.1. Spezifität und Wirkungsweise**

Polyklonale Anti-Human-T-Lymphozyten Antikörper vom Kaninchen werden seit Jahren erfolgreich zur Behandlung und Prävention der Abstoßungsreaktionen sowie der „graft versus host“ Reaktion in der Transplantationsmedizin eingesetzt (Böhming GA et al.). Dabei ergänzen sie die konventionelle immunsuppressive Therapie häufig in Kombination mit Steroiden, Azathioprin, Cyclosporin und anderen wirksamen Substanzen und tragen so zu einem verlängerten Transplantatüberleben durch Vermeidung von Abstoßungsepisoden bei (Baldi A et al, Belitsky P et al, Billaud EM., Carrier M et al, Dominguez JP et al.). Derzeit werden verschiedene Produkte für diese Indikationen verwendet. Aufgrund unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen, Spezifität und biologischer Aktivität muss die Einteilung besser nach der Generica, denn nach der Substanzklasse erfolgen (Siehe hierzu auch Tabelle 1). Dies wird dem pharmazeutischen Produkt und seinen spezifischen biologischen Eigenschaften am ehesten gerecht. Zwei dieser Medikamente, ATG-Fresenius und ATG-Mérieux, wurden hier näher untersucht. Beide ATG Präparate werden im Kaninchen hergestellt. Antigen für die Präparation der Firma Fresenius sind Kulturzellen der

Jurkat-Zelllinie. Bei der Herstellung der Mérieux- ATG Präparation fungieren humane Thymozyten als Antigen. Durch einen spezifischen Reinigungsprozess wird eine konzentrierte Immunglobulinzubereitung hergestellt. Die Zugabe von Glycin, Natrium, Chlorid und Mannitol bewirkt eine weitgehende Stabilität und einen konstanten pH-Wert der Suspensionen. Die im ATG enthaltenen Antikörper binden an die Empfänger-Thymozyten und führen zu einer Depletion der T-Lymphozyten. Der Polyklonale Antikörper führt nach Bindung an T-Zellen in Verbindung mit dem Komplementsystem (Kirschfink M.), zu einer Zellyse.

#### **4.2.2. Nebenwirkungen von polyklonalem ATG**

Insgesamt können die unter Antikörpertherapie auftretenden Nebenwirkungen in vier Arten eingeteilt werden (Pescovitz MD.). Zum Ersten führt die Anwesenheit dieser Immunglobuline zur Bildung von anti-xenogenen Antikörpern. Diese treten in 40-80% der Fälle auf. Die Häufigkeit dieser Antikörper hängt in erster Linie von der Basisimmunsuppression ab. So führen sowohl Mycophenolat Mofetil als auch Cyclosporin zu einer Reduktion der Bildungsrate (Hricik DE et al.). Diese anti-xenogenen Antikörper sind mit einem verschlechterten Transplantatüberleben, wahrscheinlich durch die dadurch herabgesetzte Wirksamkeit der immunsuppressiven Therapie, bedingt. Zusätzlich kommt es zu Veränderungen der Serumzusammensetzung auf dem Boden dieser Antikörperkonstellationen (Belitsky P et al.)

Einen weiteren Faktor stellen Kreuzreaktionen und Bindungen mit nicht Antikörper-spezifischem Gewebe (Siehe hierzu auch C.3.1) bzw. nicht-Lymphozyten dar. Diese Reaktionen führen bei 20-50% der Patienten zu Neutro- und Thrombozytopenien (Samsel R et al., Hurault de Ligny B et al.). Eine Bindung von ATG an Nierengewebe nach zuvor durchgeführter Perfusion konnte in der hier vorliegenden Arbeit immunhistologisch nicht nachgewiesen werden.

Die dritte Nebenwirkungsgruppe ist durch die spezifische Bindung der Antikörper und die damit verbundenen zielspezifischen Effekte, wie die Ausschüttung von Zytokinen, bedingt. So kommt es beim Einsatz therapeutischer Antikörper immer wieder zu sogenannten „first-dose reactions“ wie Fieber, Schüttelfrost, Bluthochdruck, Lungenödem und renaler Dysfunktion (Zaltzman JS et al., Book B et al., Chatenoud L et al.).

Ein weiterer Risikofaktor ist die bei vorausgegangener Behandlung mit ATG erhöhte Rate an lymphoproliferativen Erkrankungen nach Organtransplantation (Cherikh WS et al.).

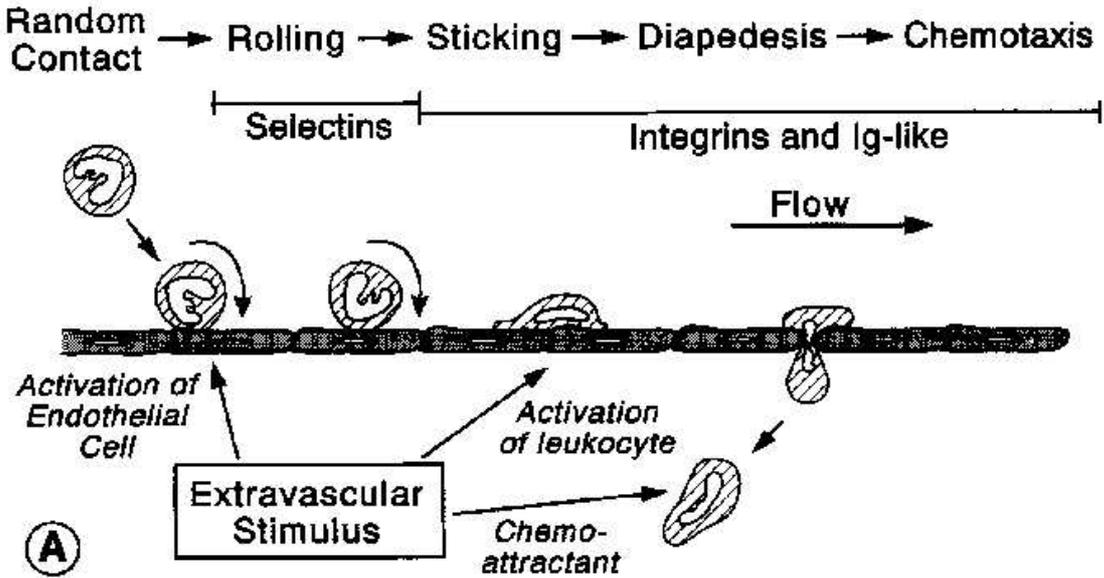
#### **4.2.3. Prophylaktische Therapie mit pATG**

Die Effektivität einer Induktionstherapie mit ATG wurde in Fachkreisen immer wieder kontrovers diskutiert (Charpentier B et al.). Derzeit ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die Induktionstherapie mit ATG gegenüber der konventionellen immunsuppressiven Therapie einen signifikanten Vorteil bezüglich des Transplantatüberlebens erreichen kann (Norrby J et al.). In verschiedenen Studien und Analysen konnte jedoch die Überlegenheit einer Induktionstherapie mit polyklonalen ATG nachgewiesen werden (MacMillan ML et al., Carrier M et al., Cantarovich D et al., Zuckermann AO et al.). Shield et al. konnten in einer retrospektiven Multicenterstudie des „United Network for Organ Sharing“ ein verbessertes Outcome von Patienten nachweisen, die Minnesota Anti-Lymphozytenglobulin für fünf oder mehr Tage innerhalb von 24 Stunden um den Transplantationszeitpunkt erhielten (Shield CF et al.). 1992 veröffentlichten Cecka und Terasaki die Ergebnisse ihrer Untersuchungen bezüglich des Transplantatüberlebens nach Nierentransplantation und konnten nur einen minimalen Nutzen durch eine ATG-Induktionstherapie feststellen (Cecka JM et al.). In neuerer Zeit wurde auch die Wirksamkeit einer intraoperativ verabreichten, prophylaktischen Antikörpertherapie mit pATG in klinischen Studien nachgewiesen (<sup>1</sup>Abou-Jaoude MM).

#### **4.2.4. Beeinflussung der Leukozytenadhäsion durch polyklonales ATG**

Ischämie und Reperfusion sowie immunologische Vorgänge im Rahmen der allogenen und xenogenen Transplantation führen zu einer verstärkten Adhärenz der Leukozyten in den Gefäßen (<sup>1</sup>Menger M et al). Die adhäsiven Interaktionen während der Leukozytenbewegung sind in Abbildung A (aus Carlos TM et al.) dargestellt. Durch den Einsatz der Intravitalmikroskopie konnte eine Kaskade von Ereignissen, die an der Leukozyten Adhäsion und Emigration beteiligt sind, identifiziert werden. Unter Flussbedingungen sieht man Leukozyten zuerst entlang des dem aktivierten Gewebe anliegenden Endothels postkapillärer Venolen rollen. Im weiteren Verlauf

haften einzelne der rollenden Leukozyten fest an der Endotheloberfläche. Es kommt zur Diapedese der haftenden Leukozyten durch die Endothelzellen und schließlich zur Migration in das subendotheliale Gewebe. Aktuelle in vitro und in vivo Untersuchungen konnten das Rolling als einen Vorgang identifizieren, der durch zahlreiche Interaktionen geringer Affinität zwischen Selectin Rezeptoren und Carbohydrat-Counter Strukturen getriggert wird. Sticking und Diapedese werden in erster Linie durch Integrin- und Ig-like Adhäsionsproteine vermittelt (Abbildung B).



	Rolling	Activation → Firm Adhesion	Transendothelial Migration	Subendothelial Migration
Leukocyte	SLF, CLA, and other sialylated, fucosylated structures L-selectin	Cytokine, chemokine, and chemoattractant receptors	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , and B <sub>7</sub> Integrins	PECAM-1, B <sub>2</sub> integrins; B <sub>1</sub> and B <sub>7</sub> integrins
Endothelial	P-selectin L-selectin ligand E-selectin CD34 MAdCAM-1	Chemokines (e.g., IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) PAF PECAM-1 E-selectin	ICAM-1; ICAM-2; VCAM-1; MAdCAM-1	PECAM-1 ICAM-1 VCAM-1
Tissue	Matrimin Thrombin Oxidants LPS Leukotrienes Cytokines (e.g., IL-1, TNF- $\alpha$ )	Cytokines (e.g., GM-CSF, IL-5) Chemoattractants (e.g., C5a, FMLP) Chemokines (e.g., IL-8, MCP-1)	Cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-4)	Chemokines Chemoattractants

Diese Vorgänge konnten in dem hier vorliegenden konkordanten Modell gut nachvollzogen werden.

Beide pATG Präparationen enthalten eine Vielzahl wirksamer Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind, die an der Induktion und Vermittlung der Zelladhäsion beteiligt sind (siehe Tabelle 1). Eine exakte Unterscheidung der an diesen Vorgängen beteiligten Leukozytenpopulationen ist in dem hier verwendeten Modell nicht möglich. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass der Einsatz von pATG an entscheidender Stelle in die Adhäsionsvermittlung und so in die Einleitung des Reperfusionsschadens eingreift. Möglicher Angriffspunkt ist die Modulation der Zelloberflächen -Selectine (P- und L-Selectin) und -Integrine (LFA und ICAM-1). Bei der rasanten Bindung von Neutrophilen an die Endothelien spielt der Typ 3 Komplementrezeptor eine entscheidende Rolle. Die durch diesen Rezeptor vermittelte Adhäsion geschieht vor allem innerhalb der ersten 20 Minuten nach Aktivierung (Hallenbeck JM et al). Zu diesem Zeitpunkt konnte in 2 von 3 Versuchen ohne prophylaktische Antikörpertherapie kein freier Leukozytenfluss mehr nachgewiesen werden.

Nach Diapedese der aktivierten Lymphozyten und der Migration zu den lymphatischen Geweben werden verschiedene Effektorzellen generiert, die eine entscheidende Rolle bei der Transplantatabstoßung und der Bildung einer Immunität spielen (Lanzavecchia A et al, Djamali A et al.). Es ist zu vermuten, dass durch die Hemmung der T- und B-Lymphozyten- sowie der Neutrophilenadhäsion an Antigen präsentierende Endothelzellen diese frühe Immunisierung in der direkten Phase der Reperfusion nach Transplantation unterdrückt werden kann. Dies könnte für die Abnahme der frühen und das Auftreten der späten Transplantatdysfunktion, der sog. „chronischen Abstoßungsreaktion“, verantwortlich sein. Eine wirksame Therapie, die diese Effekte maximal nützt, müsste demzufolge vor der Transplantation begonnen werden, um eine Immunisierung und die damit verbundene Gefahr der Transplantatschädigung zu verhindern (Kirkman RL.).

Bei den unter C.3.1.5. beschriebenen Versuchsergebnissen wurde ATG-Fresenius erst dann direkt in den Perfusionskreislauf eingeschleust, wenn keine frei fließenden Leukozyten im Gefäßdurchmesser mehr nachweisbar waren. Dieser Versuchsaufbau ist mit dem postoperativen Einsatz von ATG nach Beginn subklinischer Abstoßungsreaktionen sowie des Reperfusionsschadens am Patienten vergleichbar. ATG wurde bei drei Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten (28., 28, und 40. Minute) jeweils nach Sistieren des freien Flusses in der unter B 4.4.2.2. beschriebenen Dosierung zugegeben. Bei zwei Versuchen kam es nach vorherigem

Sistieren des freien Zellflusses (100% Sticking) zu einem deutlichen Nachweis von frei fließenden Zellen innerhalb weniger Minuten. In zwei Fällen konnten nach 15-20 Minuten die Ausgangswerte (93 bzw. 100% frei fließende Leukozyten) wieder erreicht werden. Bei einem der drei Versuche wurden, nach zuvor festgestellten 100% Sticking, Flowing-Raten von über 40% erreicht. Im vorliegenden Versuchsansatz konnte die Zugabe von ATG-Fresenius ein zuvor eingetretenes maximales Sticking wirksam bekämpfen. Bei zwei der insgesamt drei Versuchstiere konnte ein nahezu vollständig freier Fluss wiedererreicht werden. Dies deckt sich mit den guten klinischen Ergebnissen, die bei der Behandlung der Transplantatabstoßung und der postoperativen Routinetherapie mit pATG erreicht werden (Baldi A et al, Cantarovich D et al).

Die prophylaktische Gabe beider pATG Präparate führte in 4 von 6 Fällen zu einer nahezu völligen Vermeidung der Leukozytenadhäsion (2 x ATG-F, 2 x ATG-M). In den beiden anderen Fällen war über den gesamten Versuchszeitraum nur ein geringer Prozentsatz der Leukozyten an der Gefäßwand adhärent. Auch wenn aufgrund der geringen Fallzahl keine endgültige Aussage möglich ist, so scheinen die gesehenen Flussmuster nur durch die verwendeten pATG möglich.

Die beschriebenen positiven Aspekte einer prophylaktischen pATG Therapie eröffnen jedoch noch ein zweites Fenster. Durch die Vermeidung der Leukozytenadhäsion und der damit verbundenen Bildung einer gegen das Transplantat gerichteten Immunität könnte langfristig die Rate später Organdysfunktionen gesenkt werden ( Hayry P et al.).

### **4.3. Therapie mit Anti CD25 Antikörpern**

#### **4.3.1. Entwicklung von Anti CD25 Antikörpern**

Daclizumab ist ein humanisierter Antikörper, abgeleitet von einem rekombinanten Gen, in welches die hypervariable Region des Maus anti-CD25 Antikörpers eingebracht wurde (Queen C et al.).

Basiliximab ist ein chimärer Antikörper, ebenfalls abgeleitet von einem rekombinanten Gen, jedoch wurde hier die gesamte variable Region von der Maus abgeleitet, während der konstante Teil menschlicher Herkunft ist (Amlot PL et al.).

Da es sich um monoklonale Antikörper handelt, kommt es wie bei anderen monoklonalen Antikörpern (z.,B. OKT3) nicht zu einer Kreuzreaktivität. Durch die Beschränkung der Bindung an spezifische Epitope auf der Oberfläche der T-Zell Lymphozyten kommt es kaum zu unspezifischen Bindungen. Durch die zusätzliche Reduktion xenogener Epitope kommt es bei diesen Antikörpern zu keiner relevanten Bildung von anti-xenogenen Antikörpern. Die Veränderungen in der konstanten Region des Immunglobulins reduzierten bzw. eliminierten die Zytokinproduktion.

#### **4.3.2. Angriffspunkte der Antikörper bei der Adhäsionsvermittlung**

Bei der Adhäsionsvermittlung spielt der IL-2 Rezeptor eine zentrale Rolle. Der Einfluss von IL-2 auf die Mikrozirkulation konnte bereits in Intravitalmikroskopischen Untersuchungen evaluiert werden. An Ratten konnte in vivo die Induktion einer Thrombo- und Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel durch IL-2 beobachtet werden. Gleichzeitig kam es zu einer Schädigung des Gefäßendothels im Sinne eines leak-Syndroms. Bei den Versuchstieren konnten klinisch Tachykardien, Hypotension, Tachypnoe und Hypoxämie festgestellt werden (Edwards MJ et al., Gassel HJ et al.).

IL-2 ist ein kritisches Zytokin in der Kaskade der Transplantatabstoßung, das zur klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Zellen unabdingbar ist. IL-2 überträgt das Wachstumssignal durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor, der aus drei Ketten besteht: einer 55 KD großen alpha-Kette, auch als CD25- oder Tac-Untereinheit bezeichnet, die nur auf aktivierten Zellen nachweisbar ist, einer 75 KD beta-Kette und einer 64 KD gamma-Kette. Die beta und gamma Untereinheiten sind auf allen Lymphozyten vorhanden. Für die Amplifikation der T-Zell- Antwort ist die Interaktion von IL-2 und dem dazugehörigen Rezeptor auf der Zelloberfläche unumgänglich. Ein monoklonaler Antikörper, der gegen die alpha-Kette (CD25/Tac) auf aktivierten T-Zellen gerichtet ist, bietet die Möglichkeit einer äußerst selektiven Hemmung der Immunantwort, da dieser nur die Funktion von Klonen beeinträchtigt, die bereits mit einer Aktivierung auf das vorhandene Antigen reagiert haben (Kupiec-Weglinski JW., Kovarik JM et al.)). Ein weiterer Vorteil der CD25 Untereinheit ist, dass durch diesen Rezeptor bei der Bindung des Antikörpers kein transmembranes Signal vermittelt und kein agonistischer Effekt ausgelöst wird. Trotzdem bleibt die Immunantwort auf dem Organismus bereits bekannte und neue Infektionen durch die

Stimulation der beta- Kette auf der Oberfläche von NK und CD8+ Zellen erhalten (Koch M et al.).

### **4.3.3. Klinische Anwendung**

Die Verfügbarkeit von Maus-Antikörpern gegen die CD25 Untereinheit und die vorher erläuterten Vorteile dieses Angriffspunktes führten zu einer extensiven Erforschung dieser Immunglobuline (Przepiorka D et al., Rinon M et al.). Die reduzierte Immunogenität und die verbesserte Pharmakokinetik von humanisierten Konstrukten (chimär bzw voll humanisiert); die aus den Maus-anti human IL-2 Rezeptor Antikörpern entwickelt wurden, machten eine klinische Anwendung dieser Immunglobuline beim Menschen möglich (Hausen B et al.).

Zwei monoklonale anti-CD25 Antikörper (Daclizumab und Basiliximab) wurden bisher von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zum Einsatz bei nierentransplantierten Patienten zugelassen (Masroor S et al.). Beide Medikamente konnten in abgeschlossenen Phase III Studien eine signifikante Erniedrigung der Abstoßungsraten durch Bindung an die CD25 Untereinheit und Verhinderung der Bindung von IL-2 an den IL-2 Rezeptor nachweisen (Berard JL et al., Beniaminovitz A et al., Ciancio G et al., Eckhoff DE et al., Ekberg H et al., Fahlke J et al., Hirose r et al., Nashan B et al., <sup>1,2,3</sup>Vincenti F, Nashan B et al.). Im direkten Vergleich zu ATG Präparaten zeigen IL-2 Antikörper äquivalente Erfolge beim Einsatz in der Transplantationsmedizin (<sup>1</sup>Abou-Jaoude MM et al). In den vorliegenden intravitalmikroskopischen Versuchen konnten die klinischen Erfolge mit den verwendeten anti-CD25 Antikörpern nicht im Sinne einer Vermeidung der Leukozytenadhäsion visualisiert werden. Die Ursache für diese Beobachtung ist am ehesten in der zuvor bereits beschriebenen spezifischen Wirkungskaskade zu suchen. Im Gegensatz zu den im gleichen Ansatz getesteten pATG binden anti-CD25 Antikörper nur an bereits aktivierte T-Zellen: Trotz Blockierung der IL-2 Bindung ist hier eine primäre Adhäsion der bereits aktivierten T-Zellen, vermittelt über andere Zytokine, denkbar.

## **E. Zusammenfassung**

Es wurden zwei tierexperimentelle Versuchsaufbauten erarbeitet:

1. Die ex vivo perfusion isolierter Nieren von Macaca Fascicularis mit poliklonalem ATG
2. Perfusion der unteren Extremität von Macaca Fascicularis mit menschlichem Blut in einem geschlossenen Perfusionssystem

Mit Hilfe der o.g. Aufbauten wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Bindet poliklonales ATG im xenogenen konkordanten Modell an Strukturen der Niere von Macaca Fascicularis und
2. wird diese Bindung durch verlängerte Ischämiezeit moduliert?
3. Binden mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten) an Gefrierschnitte der Niere von Macaca fascicularis und
4. wird diese Bindung durch vorherige Behandlung der mononukleären Zellen mit polyklonalem ATG moduliert?
5. Beeinflusst die Behandlung mit polyklonalem ATG das Adhäsionsverhalten menschlicher Lymphozyten bei der konkordanten Xenotransplantation und
6. gibt es diesbezüglich Unterschiede zwischen ATG-Fresenius und ATG-Mérieux?
7. Beeinflusst die Behandlung mit anti- IL-2 Rezeptor Antikörpern das Adhäsionsverhalten menschlicher Lymphozyten bei der konkordanten Xenotransplantation?
8. Ist die prophylaktische Therapie mit polyklonalem ATG einer verzögerten Therapie im vorliegenden Ansatz überlegen?

Die Ergebnisse im ersten Versuchsaufbau waren:

1. Polyklonales ATG bindet im konkordanten Modell Mensch zu Macaca Fascicularis nicht an Strukturen der Niere.
2. Eine verlängerte Ischämiezeit hat keinen Einfluss auf die Bindung von polyklonalem ATG an Strukturen der Niere von Macaca Fascicularis.
3. Mononukleäre Zellen binden nicht an nach kurzer Ischämiezeit entnommene, Gefrierschnitte der Niere von Macaca Fascicularis.
4. Eine vorherige Behandlung der Zellen mit polyklonalem ATG beeinflusst dieses Bindungsverhalten nicht.

Die Ergebnisse im zweiten Versuchsaufbau waren:

1. Ohne vorherige Behandlung des menschlichen Blutes kommt es bereits nach etwa 15 Minuten zu einer weitgehend vollständigen Adhäsion humaner Leukozyten an das Gefäßendothel von Macaca Fascicularis.
2. Die Zugabe von polyklonalem ATG nach vollständiger Leukozytenadhäsion führt zu einer partiellen Aufhebung der Leukozyten-Endothel Interaktion.
3. Durch die prophylaktische Therapie mit polyklonalem ATG kann im vorliegendem Versuchsaufbau eine Leukozyten-Endothel Bindung in 4 von 6 Fällen vollständig, und in 2 Fällen nahezu vollständig verhindert werden.
4. Die prophylaktische Therapie mit polyklonalem ATG ist im vorliegenden Versuchsaufbau einer zeitversetzten Therapie überlegen.
5. Die prophylaktische Therapie mit anti- IL-2 Rezeptor Antikörpern hat im vorliegenden Versuchsaufbau keine positiven Effekte auf die Leukozyten-Endothel- Interaktion.

Folgende klinische Hypothesen lassen sich aus den durchgeführten Experimenten ableiten:

1. Polyklonales ATG vermittelt keine direkte Wirkung durch Bindung an das Gewebe der Niere, unabhängig von der Ischämiezeit des transplantierten Organs.
2. Die prophylaktische Therapie mit polyklonalem ATG ist wirksam bei der Verhinderung zellulärer Abstoßungsreaktionen und verbessert das Transplantatüberleben durch Vermeidung einer Immunisierung.

## **F. Literaturverzeichnis**

<sup>1</sup>Abou-Jaoude MM, Almawi WY.

Intraoperative anti-thymocyte globulin-Fresenius (ATG-F) administration as induction immunosuppressive therapy in kidney transplantation.

Mol Immunol. 2003 Jul;39(17-18):1089-94.

<sup>2</sup>Abou-Jaoude MM, Ghantous I, Almawi WY.

Comparison of daclizumab, an interleukin 2 receptor antibody, to anti-thymocyte globulin-Fresenius induction therapy in kidney transplantation.

Mol Immunol. 2003 Jul;39(17-18):1083-8.

Amlot PL, Rawlings E, Fernando ON, Griffin PJ, Heinrich G, Schreier MH, Castaigne JP, Moore R, Sweny P.

Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation.

Transplantation. 1995 Oct 15;60(7):748-56.

Baan CC, van Gelder T, Balk AH, Knoop CJ, Holweg CT, Maat LP, Weimar W.

Functional responses of T cells blocked by anti-CD25 antibody therapy during cardiac rejection.

Transplantation. 2000 Feb 15;69(3):331-6.

Baatz H, Steinbauer M, Harris A, Krombach F

Kinetics of white blood cells staining by intravascular administration of Rhodamine 6G

Int J Microcirc Clin Exp. 1995;15:85-91

Badimon L, Badimon JJ, Rand J, Turitto VT, Fuster V  
Platelet deposition on von Willebrand factor-deficient vessels. Extracorporeal perfusion studies in swine with von Willebrand's disease using native and heparinized blood  
J Lab Clin Med. 1987 Nov;110(5):634-47.

Baldi A, Malaise J, Mourad M, Squifflet JP.  
A prospective randomized study comparing poly-ATG to mono-OKT3 clonal antibodies for the first rejection therapy after kidney transplantation: long-term results.  
Transplant Proc. 2000 Mar;32(2):429-31.

Belitsky P, MacDonald AS, Lawen J, McAlister V, Bitter-Suermann H, Kiberd B.  
Use of rabbit anti-thymocyte globulin for induction immunosuppression in high-risk kidney transplant recipients.  
Transplant Proc. 1997 Nov;29(7A):16S-17S.

Beniaminovitz A, Itescu S, Lietz K, Donovan M, Burke EM, Groff BD, Edwards N, Mancini DM.  
Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of the interleukin-2 receptor with a monoclonal antibody.  
N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):613-9.

Berard JL, Velez RL, Freeman RB, Tsunoda SM.  
A review of interleukin-2 receptor antagonists in solid organ transplantation.  
Pharmacotherapy. 1999 Oct;19(10):1127-37. Review.

Billaud EM.  
Clinical pharmacology of immunosuppressive drugs: year 2000 time for alternatives.  
Therapie. 2000 Jan-Feb;55(1):177-83.

Böhmig GA, Regele H, Saemann MD, Exner M, Druml W, Kovarik J, Horl WH, Zlabinger GJ, Watschinger B.

Role of humoral immune reactions as target for antirejection therapy in recipients of a spousal-donor kidney graft.

Am J Kidney Dis. 2000 Apr;35(4):667-73.

Book B, Pescovitz M, Leapman S, Filo R.

Polyclonal antilymphocyte sera induce immune activation in human renal allograft recipients.

Transplant Proc. 1998 Jun;30(4):1348-50.

Bourdage JS, Hamlin DM.

Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry.

Transplantation 1995 April 27;59 (8):1194-1200

Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC

Bile flow – an index of ischemic injury.

J Surg Res 1987;42:565

Brannstrom M, Janson PO

Progesterone is a mediator in the ovulatory process of the in vitro perfused rat ovary

Biol Reprod. 1989 Jun;40(6):1170-8.

Brent LB.

The immunobiology of transplantation.

Int Surg. 1999 Oct-Dec;84(4):275-8.

Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL.

Lymphocyte adherence to high endothelial venules: characterization of a modified in vitro assay, and examination of the binding of syngeneic and allogeneic lymphocyte populations.

J Immunol. 1979 Nov;123(5):1996-2003.

Calne RY

Organ transplantation between widely disparate species

Transplant Proc 1970;2:550

Candinas D, Lesnikoski BA, Hancock WW, Otsu I, Koyamada N, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH

Inhibition of platelet integrin GPIIb/IIIa prolongs survival of discordant cardiac xenografts

Transplantation. 1996 Jul 15;62(1):1-5.

Cantarovich D, Giral-Classe M, Hourmant M, Dantal J, Blancho G, Karam G, Souillou JP

Low incidence of kidney rejection after simultaneous kidney-pancreas transplantation after antithymocyte globulin induction and in the absence of corticosteroids: results of a prospective pilot study in 28 consecutive cases.

Transplantation 2000 Apr 15;69(7):1505-8

Carlos TM, Harlan JM

Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules

Blood, Vol 84, No7 (Oct1), 1994: pp 2068-2101

Carrier M, White M, Perrault LP, Pelletier GB, Pellerin M, Robitaille D, Pelletier LC.

A 10-year experience with intravenous thymoglobulin in induction of immunosuppression following heart transplantation.

J Heart Lung Transplant. 1999 Dec;18(12):1218-23.

Cecka J, Shikes D, Gjertson D.

Clinical Impact of delayed graft function for kidney transplantation

Transplant Rev 2001;15:57-67

Cecka JM, Cho YW, Terasaki PI.

Analyses of the UNOS Scientific Renal Transplant Registry at three years--early events affecting transplant success.

Transplantation. 1992 Jan;53(1):59-64.

Charpentier B, Hiesse C, Marchand S, Boubenider S, Ammor M, Kechrid C, Benoit G, Durrbach A.

Induction therapies with polyclonal antithymocyte globulins or monoclonal antibodies. *Transplant Proc.* 2000 Mar;32(2):367.

Chatenoud L, Ferran C, Legendre C, Thouard I, Merite S, Reuter A, Gevaert Y, Kreis H, Franchimont P, Bach JF.

In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids.

*Transplantation.* 1990 Apr;49(4):697-702.

Cherikh WS, Kauffman HM, McBride MA, Maghirang J, Swinnen LJ, Hanto DW.

Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation.

*Transplantation.* 2003 Nov 15;76(9):1289-93.

Ciancio G, Burke GW, Suzart K, Roth D, Kupin W, Rosen A, Olson L, Esquenazi V, Miller J.

Daclizumab induction, tacrolimus, mycophenolate mofetil and steroids as an immunosuppression regimen for primary kidney transplant recipients.

*Transplantation* 2002 Apr 15;73(7):1100-6

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY.

Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).

*J Histochem Cytochem.* 1984 Feb;32(2):219-29.

Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Dalmaso AP, Fodor WL.

Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection.

Xenotransplantation 2002 Jan;9(1):45-57

Dancis J, Wilson D, Hoskins IA, Levitz M

Placental transfer of thiamine in the human subject: in vitro perfusion studies and maternal-cord plasma concentration

Am J Obstet Gynecol. 1988 Dec;159(6):1435-9.

Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, Levenson G, Chong G, Clot J, Mourad G.

Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring.

Transplantation. 2000 Mar 15;69(5):799-805.

Dominguez JP, Pulpon LA, Chafer M, Segovia J, Crespo MG, Barrera A, Pradas G.

OKT3 monoclonal antibody readministration for allograft rejection treatment in heart transplant recipients.

Transplante 1990;1 (3):104-107

Dorling A.

Clinical xenotransplantation: pigs might fly?

Am J Transplant 2002 Sep;2(8):695-700

Doyle MP, Galey WR, Walker BR

Reduced erythrocyte deformability alters pulmonary hemodynamics

J Appl Physiol. 1989 Dec;67(6):2593-9.

Edwards MJ, Miller FN, Sims DE, Abney DL, Schuschke DA, Corey TS.

Interleukin 2 acutely induces platelet and neutrophil-endothelial adherence and macromolecular leakage.

Cancer Res. 1992 Jun 15;52(12):3425-31.

Eckhoff DE, McGuire B, Sellers M, Contreras J, Frenette L, Young C, Hudson S, Bynon JS.

The safety and efficacy of a two-dose daclizumab (zenapax) induction therapy in liver transplant recipients.

Transplantation. 2000 May 15;69(9):1867-72.

Ekberg H, Backman L, Tufveson G, Tyden G, Nashan B, Vincenti F.

Daclizumab prevents acute rejection and improves patient survival post transplantation: 1 year pooled analysis.

Transpl Int. 2000;13(2):151-9.

Elias TJ, Bannister KM, Clarkson AR, Russ GR, Mathew TH, Barratt LJ, Faull RJ.

Excellent long-term graft survival in low risk, primary renal allografts treated with prednisolone-avoidance immunosuppression.

Clin Transplant. 2000 Apr;14(2):157-61.

Ertel W, Reichenspurner H, Lersch C, Hammer C, Plahl M, Lehmann M, Kemkes BM, Osterholzer G, Reble B, Reichart B, et al.

Cytoimmunological monitoring in acute rejection and viral, bacterial or fungal infection following transplantation.

J Heart Transplant. 1985 Jul-Aug;4(4):390-4.

<sup>1</sup>Evans RW, Manninen DL, Garrison LP Jr, Maier AM.

Donor availability as the primary determinant of the future of heart transplantation.

JAMA 1986 Apr 11;255(14):1892-8

<sup>2</sup>Evans RW, Kitzmann DJ.

An economic analysis of kidney transplantation.

Surg Clin North Am 1998 Feb;78(1):149-74

Fahlke J, Wolff S, Mantke R, Pross M, Weiss G, Buerger T, Lippert H.  
Staggered immunosuppression with the interleukin-2 receptor antagonist daclizumab combined with tacrolimus, prednisolone, and mycophenolate mofetil after orthotopic liver transplantation: a pilot efficacy and safety study.  
Transplant Proc 2002 Jun;34(4):1242-4

Friedberg SH, Weissman IL  
Lymphoid tissue architecture. II. Ontogeny of peripheral T cells in mice  
J Immunol 1974;113:1477

Fuller BJ.  
Ischaemia/reperfusion injury and inflammation.  
Transplantation. 2000 Feb 15;69(3):327-8.

Gassel HJ, Otto C, Gassel AM, Meyer D, Steger U, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A.  
Tolerance of rat liver allografts induced by short-term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies directed against CD25 and CD54 with subtherapeutic cyclosporine.  
Transplantation. 2000 Mar 27;69(6):1058-67.

Geller RL, Turman MA, Dalmaso AP, Platt JL.  
The natural immune barrier to xenotransplantation.  
J Am Soc Nephrol 1992 Dec;3(6):1189-200

Gjertson DW.  
Impact of delayed graft function and acute rejection on graft survival.  
Transplant Proc 2002 Sep;34(6):2432

Goddard MJ, Foweraker JE, Wallwork J.  
Xenotransplantation 2000.  
J Clin Pathol. 2000 Jan;53(1):44-8. Review.

Goodall J

Ethical concerns in the use of animals as donors.

In: Xenograft.

Hardy MA (Ed.) Elsevier; Amsterdam, New York 1989;25:335

Gowans JL, Knight EJ

The route of re-circulation of lymphocytes in the rat

Proc R Soc Lond (Biol) 1964;159:257

Hallenbeck JM, Dutka AJ.

Background review and current concepts of reperfusion injury.

Arch Neurol 1990 Nov;47(11):1245-54

<sup>1</sup>Hammer C.

In vivo Microscopic assessment of Microcirculatory changes in a concordant xenogeneic primate experimental set up.

Ann Transplant 2001;6(3):17-24

<sup>2</sup>Hammer C.

Xenotransplantation: the good, the bad and the ugly.

Ann Transplant 2001;6(3):5

<sup>3</sup>Hammer C, Linke R, Seehofer D, Diefenbeck M.

Xenogeneic rejection mechanisms shown by intravital Microscopy.

Transplant Proc. 1998 Dec;30(8):4166-7.

<sup>4</sup>Hammer C, Saumweber D, Krombach F

Xenotransplantation in canines

In: Xenograft.

Hardy MA (Ed.) Elsevier; Amsterdam, New York 1989;25: 67

<sup>5</sup>Hammer C, Thein E.

Physiological aspects of xenotransplantation, 2001.

Xenotransplantation 2002 Sep;9(5):303-5

<sup>6</sup>Hammer C, Thein E.

Visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on adhesion of leukocytes.

Transplant Proc 2002 Sep;34(6):2486

<sup>7</sup>Hammer C

Xenotransplantation: Perspective and limits

Blood Purif 2001;19:322-328

Harris AG, Sinitsina I, Messmer K.

Intravital fluorescence Microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes.

Eur J Med Res 2002 Mar 28;7(3):117-24

Hausen B, Gummert J, Berry GJ, Christians U, Serkova N, Ikonen T, Hook L, Legay F, Schuler W, Schreier MH, Morris RE.

Prevention of acute allograft rejection in nonhuman primate lung transplant recipients: induction with chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody improves the tolerability and potentiates the immunosuppressive activity of a regimen using low doses of both Microemulsion cyclosporine and 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin.

Transplantation. 2000 Feb 27;69(4):488-96.

Hayry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchenkov M, Aavik E.

Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection.

Transplant Proc. 2000 May;32(3):519.

Hetzer R, Jurmann MJ, Potapov EV, Hennig E, Stiller B, Muller JH, Weng Y.

Herz 2002 Aug;27(5):407-17

Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty DM, Granger DN, Eppihimer MJ, Kubes P.

Varying roles of E-selectin and P-selectin in different Microvascular beds in response to antigen.

J Immunol. 1999 Jan 15;162(2):1137-43.

Hirose R, Roberts JP, Quan D, Osorio RW, Freise C, Ascher NL, Stock PG.  
Experience with daclizumab in liver transplantation: renal transplant dosing without calcineurin inhibitors is insufficient to prevent acute rejection in liver transplantation.  
Transplantation. 2000 Jan 27;69(2):307-11.

Hong JC, Kahan BD.  
Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future.  
Semin Nephrol. 2000 Mar;20(2):108-25. Review.

Hricik DE, Mayes JT, Schulak JA.  
Inhibition of anti-OKT3 antibody generation by cyclosporine--results of a prospective randomized trial.  
Transplantation. 1990 Aug;50(2):237-40.

Hurault de Ligny B, Lebranchu Y.  
The use of thymoglobuline induction in renal transplantation: a pharmacovigilance study.  
Transplant Proc. 2000 Mar;32(2):351-2.

Johnston B, Walter UM, Issekutz AC, Issekutz TB, Anderson DC, Kubes P.  
Differential roles of selectins and the alpha4-integrin in acute, subacute, and chronic leukocyte recruitment in vivo.  
J Immunol. 1997 Nov 1;159(9):4514-23.

Kanwar S, Steeber DA, Tedder TF, Hickey MJ, Kubes P.  
Overlapping roles for L-selectin and P-selectin in antigen-induced immune responses in the Microvasculature.  
J Immunol. 1999 Mar 1;162(5):2709-16.

Kirkman RL.  
New usage paradigms in antibody therapy: induction or true prophylaxis?  
Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):1234-5. Review.

Kirschfink M.

Controlling the complement system in inflammation.

Immunopharmacology 1997 Dec;38(1-2):51-62

Knosalla C, Cooper DK.

Xenotransplantation and tolerance.

Front Biosci 2002 May 1;7:d1280-7

Koch M, Niemeyer G, Patel I, Light S, Nashan B.

Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and immunodynamics of daclizumab in a two-dose regimen in liver transplantation.

Transplantation 2002 May 27;73(10):1640-6

Kovarik JM, Kahan BD, Rajagopalan PR, Bennett W, Mulloy LL, Gerbeau C, Hall ML.

Population pharmacokinetics and exposure-response relationships for basiliximab in kidney transplantation. The U.S. Simulect Renal Transplant Study Group.

Transplantation. 1999 Nov 15;68(9):1288-94.

Kupiec-Weglinski JW.

CD25-targeted therapy revisited.

Transplantation. 2000 Feb 15;69(3):328-30.

Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K.

Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters.

Ann Plast Surg 2002 Jan;48(1):53-9

Lanzavecchia A, Sallusto F

Dynamics of T-lymphocyte responses: Intermediates, effectors and memory cells

Science 2000;290:92-97

Linke R, Wagner F, Terajima H, Thiery J, Teupser D, Leiderer R, Hammer C  
Prevention of initial perfusion failure during xenogeneic ex vivo liver perfusion by  
selectin inhibition  
Transplantation. 1998 Nov 27;66(10):1265-72.

Loss M, Kunz R, Przemeczek M, Schmidtke J, Arends H, Jalali A, Lorenz R,  
Piepenbrock S, Klempnauer J, Winkler M.  
Influence of cold ischemia time, pretransplant anti-porcine antibodies, and  
donor/recipient size matching on hyperacute graft rejection after discordant porcine  
to cynomolgus kidney transplantation.  
Transplantation. 2000 Mar 27;69(6):1155-9.

MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, Wagner  
JE, Blazar BR.  
Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-  
resistant acute graft-versus-host disease.  
Biol Blood Marrow Transplant 2002;8(1):40-6

Masroor S, Schroeder TJ, Michler RE, Alexander JW, First MR.  
Monoclonal antibodies in organ transplantation: an overview.  
Transplant Immunology 1994;2:176-189

Mayer H, Schmidt J, Thies J, Ryschich E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E.  
Characterization and reduction of Ischemia/Reperfusion injury after experimental  
pancreas transplantation.  
J Gastrointest Surg. 1999 Mar-Apr;3(2):162-6.

<sup>1</sup>Menger MD, Lehr HA  
Scope and perspective of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo  
Immunol Today 1993; 14:519-522

<sup>2</sup>Menger MD, Vollmar B.  
Role of Microcirculation in transplantation.  
Microcirculation 2000 Oct;7(5):291-306

Miller JJ

Studies of phylogeny and ontogeny of the specialized lymphatic tissue vessels

Lab Invest 1969;21:484

Moses RD, Auchincloss H Jr.

Mechanism of cellular xenograft rejection.

In: Xenotransplantation.

Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG (Eds.)

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1991; 101

Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt AG, Abeywickrama K, Souillou JP.

Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group.

Lancet. 1997 Oct 25;350(9086):1193-8.

Norrby J, Olausson M.

A randomized clinical trial using ATG Fresenius or ATG Merieux as induction therapy in kidney transplantation.

Transplant Proc. 1997 Nov;29(7):3135-6.

Nottle MB, D'Apice AJ, Cowan PJ, Boquest AC, Harrison SJ, Grupen CG.

Transgenic perspectives in xenotransplantation, 2001.

Xenotransplantation 2002 Sep;9(5):305-8

Onrust SV, Wiseman LR.

Basiliximab.

Drugs. 1999 Feb;57(2):207-13; discussion 214. Review.

O'Rourke K.

Xenotransplantation: promising advances cause excitement, uneasiness.

J Am Vet Med Assoc 2002 Apr 15;220(8):1129, 1131-2

<sup>1</sup>Pascher A, Poehlein C, Stangl M, Hoebel G, Thiery J, Mueller-Derlich J, Hammer C.  
Application of immunoapheresis for delaying hyperacute rejection during isolated  
xenogeneic pig liver perfusion  
Transplantation. 1997 Mar 27;63(6):867-75.

<sup>2</sup>Pascher A, Sauer IM, Hammer C, Gerlach JC, Neuhaus P.  
Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world  
experience.  
Xenotransplantation 2002 Sep;9(5):309-24

Perico N, Remuzzi G.  
Prevention of transplant rejection, current treatment guidelines and future  
developments.  
Drugs. 1997 Oct;54 (4):533-570

Pescovitz MD.  
New usage paradigms in antibody therapy: safety of the new agents.  
Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):1201-2. Review.

Przepiorka D, Kernan NA, Ippoliti C, Papadopoulos EB, Giralt S, Khouri I, Lu JG,  
Gajewski J, Durett A, Cleary K, Champlin R, Andersson BS, Light S.  
Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for  
treatment of acute graft-versus-host disease.  
Blood. 2000 Jan 1;95(1):83-9.

<sup>1</sup>Platt JL.  
Hyperacute rejection: fact or fancy.  
Transplantation. 2000 Mar 27;69(6):1034-5.

<sup>2</sup>Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman MR, Bach FH  
Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to primate model  
Trasplantation 1991;53:214

Ponticelli C, Tarantino A, Vegeto A.

Renal transplantation, past, present and future.

J Nephrol. 1999 Jul-Aug;12 Suppl 2:S105-10. Review.

Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Dunca JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA.

A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Dec;86(24):10029-33.

Rahman GF, Hardy MA, Cohen DJ

Administration of equine anti-thymocyte globulin via peripheral vein in renal transplant recipients.

Transplantation 2000 May 15;69(9):1958-60

Rebellato LM, Groß U, Verbanac KM, Thomas JM.

A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin.

Transplantation 1994 Mar 15;57(5):685-94

Rinon M, Maruri N, Arrieta A, Fernandez JR, Ortiz de Urbina J, Garcia Masdevall MD.

Selective immunosuppression with daclizumab in liver transplantation with graft-versus-host disease.

Transplant Proc 2002 Feb;34(1):109-10

Sadeghi AM, Laks H, Drinkwater DC, Pearl JM, Chang P, Haas G, Burnison CM, Horton D.

Heart-lung xenotransplantation in primates.

J Heart Lung Transplant 1991 May-Jun;10(3):442-7; discussion 447-8

Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF

Intravital Fluorescence Microscopy: Impact of Light-induced Phototoxicity on Adhesion of Fluorescently Labeled Leucocytes

J Histochem Biochem 1997;45:505-514

Samsel R, Rowinski W, Chmura A, Wlodarczyk Z, Wyzgal J, Cieciora T, Lagiewska B, Pliszczynski J, Korczak G, Paczek L, Walaszewski J, Lao M.

Perioperative administration of single, high-dose of ATG-Fresenius-S as an induction immunosuppressive therapy in cadaveric renal transplantation: preliminary results.

Transplant Proc 2001 Sep;33(6):2952-4

Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Zibari GB.

The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion.

J Surg Res. 1999 Jul;85(1):163-70.

Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Messmer K, Land W.

The impact of free radical-mediated reperfusion injury on acute and chronic rejection events following cadaveric renal transplantation.

Clin Transpl 1993;:219-32

Schenker S, Johnson RF, Hays SE, Ganeshappa R, Henderson GI

Effects of nicotine and nicotine/ethanol on human placental amino acid transfer

Alcohol 1989; 6:289

Schneider H, Proegler M

Placental transfer of beta adrenergic antagonists studied in an in vitro perfusion system of human placental tissue

Am J Obstet Gynecol 1988; 159:42

Schutz A, Fischlein T, Breuer M, Haushofer M, Uhlig A, Detter C, Kemkes BM, Hammer C, Reichart B.

Cytoimmunological monitoring after homograft valve replacement.

Eur J Cardiothorac Surg 1994;8(11):609-12

Shield CF, Edwards EB, Davies DB, Daily OP.

Antilymphocyte induction therapy in cadaver renal transplantation: a retrospective, multicenter United Network for Organ Sharing Study.

Transplantation. 1997 May 15;63(9):1257-63.

Springer TA

Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leucocyte Emigration: The Multistep Paradigm

Cell 1998 Jan; 76:301-314

<sup>1</sup>Stamper HB Jr., Woodruff JJ

Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high endothelial venules

J Exp Med 1976;144:828

<sup>2</sup>Stamper HB Jr., Woodruff JJ

An in vitro model of lymphocyte homing. I. Characterization of the interaction between thoracic duct lymphocytes and specialized high-endothelial venules of lymph nodes

J immunol 1977;119:772

<sup>1</sup>Starzl TE, Fung J, Tzakis A

Baboon to human liver transplantation

Lancet 1993;341:65

<sup>2</sup>Starzl TE, Tzakis A, Fung J

Prospects of clinical xenotransplantation

Transplant Proc 1994;26:1082

Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C

Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion

Transpl Int. 1994;7 Suppl 1:S647-9

Thein E, Sevilimis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K.  
Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs.  
Xenotransplantation 2001 May;8(2):94-9

<sup>1</sup>Vincenti F, Grinyo J, Ramos E, Nashan B, Stuart F, Kuypers D, Brattstrom C, Cho S, Ekberg H, Johnson R.  
Can antibody prophylaxis allow sparing of other immunosuppressives?  
Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):1246-8.

<sup>2</sup>Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, Neylan J, Wilkinson A, Ekberg H, Gaston R, Backman L, Burdick J.  
Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group.  
N Engl J Med. 1998 Jan 15;338(3):161-5.

<sup>3</sup>Vincenti F, Nashan B, Light S.  
Daclizumab: outcome of phase III trials and mechanism of action. Double Therapy and the Triple Therapy Study Groups.  
Transplant Proc. 1998 Aug;30(5):2155-8.

<sup>1</sup>Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD.  
Role of Microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury.  
J Surg Res 1996 Jan;60(1):49-54

<sup>2</sup>Vollmar B, Menger MD.  
The use of intravital Microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery.  
Langenbecks Arch Surg. 1998 Aug;383(3-4):282-5.

Wagner R (1839)  
Erläuterungstafeln zur Physiologie und Entwicklungsgeschichte  
Voss, Leipzig

Wahlberg J, Southard JH, Belzer FO

Preservation-induced pancreatitis in an isolated pancreas model in the dog

Transpl Int 1989; 2:165

Whetstine L, Bowman K, Hawryluck L.

Pro/con ethics debate: is nonheart-beating organ donation ethically acceptable?

Crit Care 2002;6(3):192-5

Weissman IL, Gutman GA, Friedberg SH

Tissue localization of lymphoid cells

Ser Haematol 1974;7:482

Wiseman LR, Faulds D.

Daclizumab: a review of its use in the prevention of acute rejection in renal transplant recipients.

Drugs. 1999 Dec;58(6):1029-42. Review.

Wood RF, Pockley AG.

Bioengineered monoclonals--easier on patients, but still hard on rejection.

Transplantation. 1999 Dec 15;68(11):1625-6. Review.

Woodruff JJ, Katz IM, Lucas LE, Stamper HB Jr.

An in vitro model of lymphocyte homing: membrane and cytoplasmic events involved in lymphocyte adherence to specialized high endothelial venules of lymph nodes

J Immunol 1977;119:1603

Zaltzman JS, Paul LC.

Single center experience with thymoglobulin in renal transplantation.

Transplant Proc. 1997 Nov;29(7A):27S-28S.

Zeitler R

ATG Fresenius S, Substantial features

lectures to the first ATG-F satellite Symposium 1999; p64-65

Zhang XY, Francis RJ, Sun Ck CK, Wheatley AM.

Endothelin receptor A blockade ameliorates hypothermic ischemia-reperfusion-related Mycrohemodynamic disturbances during liver transplantation in the rat.

J Surg Res 2002 Feb;102(2):63-70

Zuckermann AO, Grimm M, Czerny M, Ofner P, Ullrich R, Ploner M, Wolner E, Laufer G

Improved long-term results with thymoglobuline induction therapy after cardiac transplantation: a comparison of two different rabbit-antithymocyte globulines.

Transplantation 2000 May 15;69(9):1890-8

## G. Anhang

### 1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

ATG	Anti- Thymozyten Globulin
h	Stunde
HEV	high endothelial venules
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
mATG	monoklonales Anti- Thymozyten Globulin
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
pATG	poliklonales Anti-Thymozyten Globulin
IVM	Intravitalmikroskopie
min	Minuten

## 2. Lebenslauf

Franz Edler von Koch auf Rohrbach.

Gunta Stölzl Strasse 10

München

Geburtsdatum: 13. Februar 1972

Geburtsort: Regensburg, Bayern

Vater: Franz Edler von Koch auf Rohrbach, Notar in Ingolstadt

Mutter: Renate Edle von Koch auf Rohrbach, Hausfrau und Mutter von 4 Kindern, Grundschullehrerin, verstorben 1988

1972 - 77 wohnhaft in Regensburg, Mitterfels und Rohrbach an der Ilm

1978 - 82 Grundschule Monheim/Schwaben

1982 - 85 Gymnasium Donauwörth

1985 - 91 Reuchlin Gymnasium in Ingolstadt

1991 - 92 16-monatiger Militärdienst, Sanitätszentrum 607, Regensburg und Ingolstadt

1992 - 99 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1999 Beginn der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern

Seit 2001 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern

2002 Heirat mit Michaela Edle von Koch auf Rohrbach, geb. Riegel

### **3. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Messmer für die freundliche Aufnahme am Institut für chirurgische Forschung und die Unterstützung bei der Umsetzung der wissenschaftlichen Arbeit

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Bereitstellung und Entwicklung des interessanten Themas und seine stets kompetente chirurgische und theoretische Betreuung

Herrn Dr. med R. Linke für seine Hilfe bei der Einarbeitung in das Labor der Institution und beim Aufbau der ersten Versuchsanordnungen

Allen Mitarbeitern des Instituts, stellvertretend Frau G. Höbel, Frau A. Allmeling und Herrn D. Müller, gebührt besonderer Dank für die freundliche Aufnahme und die tägliche bereitwillige Unterstützung bei der Umsetzung der Forschungsarbeiten