

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christian Hagl

**Die Auswirkungen einer selektiven
Kv1.3-Kanalblockade auf die Transplantatabstoßung
in einem allogenen, heterotopen
Rattenherztransplantationsmodell in nicht
sensibilisierten Empfängertieren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andre Späth

aus

Neuwied

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Bruno Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Schulz
Prof. Dr. Andreas Dendorfer

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. Sonja Güthoff

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	7
I. Einleitung	9
1. Transplantatabstoßung	9
1.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion.....	9
1.2. Akute zelluläre Abstoßungsreaktion	10
1.3. Akute <i>humorale</i> Abstoßungsreaktion.....	10
1.4. Chronische Abstoßungsreaktion - Transplantatvaskulopathie	10
2. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantationen.....	11
2.1. Probleme einer unspezifischen Immunsuppression	11
2.2. Alternative Ansätze einer Immunsuppression	12
3. <i>Memory</i>-T-Lymphozyten	12
3.1. Kalziumabhängige Mechanismen der T_{EM}-Lymphozyten-Aktivierung.....	13
3.2. Die Verteilung von K_V1.3 und K_{Ca}3.1 auf T-Lymphozyten und ihr Anteil an der T-Lymphozyten-Aktivierung	14
3.3 K_V1.3.....	15
4. Wirkweise von <i>cgtx-544</i>.....	15
5. Notwendigkeit eines Tiermodells	16
6. Finanzielle Unterstützung dieser wissenschaftlichen Arbeit.....	16
II. Zielsetzung.....	17
III. Methoden und Materialien	18
1. Das Studienpeptid	18
2. Versuchstiere	18
2.1. Spendertiere.....	18
2.2. Empfängertiere.....	18
2.3. Tierhaltung	18
2.4. Untersuchung des Allgemeinzustandes	19
3. Studiendesign der Transplantationsversuche.....	19
4. Anästhesie	20
4.1. Inhalationsanästhesie	20
4.2. Injektionsanästhesie.....	21
4.3. Postoperative Analgesie	21
5. Heterotope abdominelle Herztransplantation	22
5.1. Präoperative Vorbereitung	22
5.2. Explantation des Spenderherzes.....	22

5.3. Implantation des Spenderherzes	23
5.4. Postoperatives Prozedere	25
5.5. Explantation bei Versuchsende	25
6. Applikation der Studienmedikation	26
7. Transplantatüberleben	26
8. Laboruntersuchungen	27
8.1. Blutentnahme	27
8.2. Gewinnung von Serum	27
8.3. Hämatologische Untersuchung	28
8.4. Serumchemie	28
8.5. Zytokinanalytik	28
9. Histologie	28
9.1. Erstellung von histologischen Gewebeschnitten	28
9.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	29
9.3. Immunhistochemie	29
9.4. Histologische Auswertung	31
9.4.1. Klassifikation der akuten zellulären Abstoßung	32
9.4.2. Klassifikation der antikörpervermittelten Abstoßung	32
9.4.3. Differenzierung lymphozytärer Infiltrate in T- und B-Lymphozyten	34
10. Statistik	34
11. Materialliste	35
IV. Ergebnisse	36
1. Transplantatüberleben	36
2. Histologische Auswertung der Transplantate	37
2.1. HE-Färbung	37
2.2. Immunhistochemischer Nachweis von T-Lymphozyten anhand von CD3	43
2.3. Immunhistochemischer Nachweis von B-Lymphozyten anhand von CD20	44
2.4. Immunhistochemischer Nachweis von intravaskulären Monozyten anhand von CD68	45
2.5. Immunhistochemischer Nachweis der Aktivierung des Komplementsystems anhand von C4d	46
2.6. Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin	48
2.7 Akute zelluläre Abstoßung	50
2.8. Antikörpervermittelte Abstoßung	51
3. Auswertung der Serumchemie	52
3.1. Auswertung des Troponin I-Serumspiegels	52
3.2. Auswertung des LDH-Serumspiegels	52
3.3 Auswertung von GPT- und Kreatinin-Serumspiegel	53

4. Auswertung der hämatologischen Untersuchungen	53
4.1. Auswertung der Erythrozytenzahl	54
4.2. Auswertung der Thrombozytenzahl.....	55
4.3. Auswertung der Leukozytenzahl.....	56
4.4. Auswertung der Lymphozytenzahl	57
5. Auswertung der Zytokine.....	60
5.1. Auswertung der von T _{EM} -Lymphozyten produzierten Zytokine.....	62
5.1.1. Auswertung von Interleukin-4.....	62
5.1.2. Auswertung von Interleukin-5.....	63
5.1.3. Auswertung von INF- γ	64
6. Auswertung des Allgemeinzustands der Versuchstiere.....	65
V. Diskussion	66
1. Verträglichkeit von cgtx-544 im allogenen, heterotopen Rattenherztransplantationsmodell	66
2. Zytokine	66
3. Transplantatüberleben	68
4. Histologische Untersuchungen.....	70
4.1. Beurteilung der Abstoßungsreaktionen	70
4.2. Beurteilung der lymphozytären Infiltrate.....	71
5. Kardiales Troponin.....	71
6. Periphere Leukozyten- und Lymphozytenzahlen	72
7. Weiterführende Versuchsansätze	73
7.1. Transplantationsversuche mit präsensibilisierten Tieren	73
7.2. Mögliche weitere Transplantationsversuche	74
7.3. <i>Mixed-Lymphocyte-Reaction</i>	75
VI. Schlussfolgerung	77
VII. Literaturverzeichnis.....	78
VIII. Abkürzungsverzeichnis	82
IX. Tabellenverzeichnis	85
X. Abbildungsverzeichnis	87
XI. Anhang.....	90
1. Versuchsprotokoll für die Herztransplantation	90
2. Postoperatives Ratten <i>Score Sheet</i>	91
3. Histologische Protokolle und Materialien.....	92
3.1. Programm des Entwässerungsrondells	92
3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	93
3.3. Immunhistochemie-Protokoll: Fibrinogen	94

3.4. Immunhistochemie-Protokoll: CD3.....	95
3.5. Immunhistochemie-Protokoll: CD20.....	96
3.6. Immunhistochemie-Protokoll: CD68.....	97
3.7. Immunhistochemie-Protokoll: C4d	98
3.8. Immunhistochemie-Protokoll: C5b-9	99
3.9. Verwendete Primär-, Sekundär- und Negativkontroll-Antikörper.....	100
4. Histologische <i>Score Sheets</i>	102
4.1. Auswertungsbogen zur histologischen Untersuchung, Seite 1	102
4.2. Auswertungsbogen zur histologischen Untersuchung, Seite 2	103
5. Lösungen für histologische Untersuchungen.....	104
5.1. 0,1 %ige Eosin-Lösung	104
5.2. 1 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung.....	104
5.3. 0,05 M Tris-Buffer Saline pH 7,6.....	104
5.4. TRIS/EDTA Puffer pH 9,0	104
5.5. 10 mM Citratpuffer pH 6,0	104
5.6. DAB-Lösung	105
6. Verwendete Materialien	106
7. Zytokin-Werte am Tag des Transplantatversagens.....	114
XII. Eidesstattliche Versicherung.....	120
XIII. Danksagung.....	121

Zusammenfassung

Die Herztransplantation gilt als eine der letzten Therapieoptionen zur Behandlung terminaler Herzerkrankungen. Hierbei stellen jedoch die verschiedenen Formen der Transplantatabstoßung einen limitierenden Faktor dar.

Durch den Einsatz immer neuerer immunsupprimierender Medikamente konnte die Anzahl akuter Abstoßungsreaktionen in der Nachsorge von Herztransplantationspatienten stetig reduziert werden [1, 2]. Die so hervorgerufene generalisierte Immunsuppression führt jedoch unter Umständen zu gravierenden Nebenwirkungen, sodass weiterhin die Nachfrage nach selektiveren Immunsuppressiva ohne die damit einhergehenden Nebenwirkungen der aktuell verwendeten Therapeutika besteht [3, 4].

Die experimentelle Substanz *cgtx-544* ist ein selektiver Inhibitor des spannungsabhängigen Kaliumkanals 1.3 (K_v1.3), der eine Schlüsselrolle in der Aktivierungskaskade von chronisch aktivierten *Effector-Memory*-T-Lymphozyten (T_{EM}-Lymphozyten) einnimmt. Dieser Lymphozytentyp ist unter anderem in Vorgängen der Transplantatabstoßung involviert[5-7].

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden erstmalig die Verträglichkeit sowie die Auswirkungen einer Therapie mit *cgtx-544* auf Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation experimentell mittels eines allogenen, heterotopen Rattenherztransplantationsmodells untersucht. Hierbei wurden in einem ersten *Proof-of-Concept*-Ansatz Empfängertiere verwendet, welche zuvor nicht mit Spenderantigenen präsensibilisiert wurden.

Hierbei bestätigte sich die gute Verträglichkeit von *cgtx-544* in einem Rattenherztransplantationsmodell. Als Hauptzielgröße der Therapieauswirkung wurde das Transplantatüberleben definiert. Nebenzielgrößen waren die histologisch bestimmten Abstoßungsgrade der Transplantate sowie die Analyse verschiedener labormedizinischer Parameter.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich in der mit *cgtx-544* behandelten Versuchsgruppe die Serumkonzentrationen aller untersuchter Zytokine vermindert. Hierunter befanden sich auch Interleukin (IL)-4 und IL-5 sowie Interferon- γ , Zytokine, welche unter anderem von aktivierten T_{EM}-Lymphozyten gebildet werden [8]. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass eine Therapie mit *cgtx-544* chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten nach Herztransplantationen moduliert.

In dem hier verwendeten Versuchsansatz führte dies jedoch nicht zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens unter der Monotherapie mit *cgtx-544* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch zeigte sich kein positiver Effekt auf den Serumspiegel des kardialen Läsionsmarkers Troponin I in der mit *cgtx-544* behandelten Versuchsgruppe. Ferner konnten keine signifikanten Unterschiede bei der histologischen Bewertung der Abstoßungsgrade am Tag des Transplantatversagens nachgewiesen werden.

Auch wenn in diesem Transplantationsszenario mit nicht-präsensibilisierten Empfängertieren in einem ersten Schritt kein Vorteil der Monotherapie mit *cgtx-544* bezogen auf das Transplantatüberleben nachgewiesen werden konnte, zeigte sich eine immunologische Beeinflussung auf Zytokinebene.

Daher besteht der nächste sinnvolle Schritt darin, die Auswirkungen einer Therapie mit *cgtx-544* als Mono- und vor allem als Kombinationstherapie mit anderen Immunsuppressiva bei präsensibilisierten Empfängertieren mit spenderspezifischen, chronisch aktivierten T_{EM}-Lymphozyten zu untersuchen, wobei ein neues Rattentiermodell in der Forschungsgruppe etabliert werden muss.

I. Einleitung

Die Herztransplantation gilt derzeit neben mechanischen Herzunterstützungssystemen (*Assist-Devices*) als eine der letzten Therapieoptionen in der Behandlung terminaler Herzerkrankungen, wie beispielsweise der medikamentös nicht zufriedenstellend behandelbaren Herzinsuffizienz. Obwohl bisher nur widersprüchliche Daten für einen Überlebensvorteil existieren, besteht eine übereinstimmende Meinung darüber, dass Herztransplantationen sowohl die Lebenserwartung als auch die Lebensqualität der Patienten erhöhen [9-11]. Um dies durch eine Herztransplantation erreichen zu können, müssen grundsätzlich zwei Kriterien erfüllt sein. Auf der einen Seite muss das Transplantat eine ausreichende Funktion und Überlebenszeit aufweisen, auf der anderen Seite müssen die negativen Aspekte der damit einhergehenden Therapien reduziert werden.

1. Transplantatabstoßung

Da sowohl akute als auch chronische Abstoßungsreaktion eine große Rolle für das Transplantat- und somit das Patientenüberleben einnehmen, müssen bei der immunsuppressiven Therapie zum Teil Kompromisse hinsichtlich der daraus resultierenden Nebenwirkungen eingegangen werden [12].

Abstoßungsreaktionen lassen sich grundsätzlich anhand der ablaufenden Mechanismen und dem Zeitpunkt des Auftretens in hyperakut, akut zellulär, akut *humoral* und chronisch einteilen [13].

1.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion

Die hyperakute Abstoßungsreaktion basiert auf dem Vorhandensein präformierter, zytotoxischer Antikörper; sogenannter *Donor-Specific Antibodies* (DSA). Hierzu zählen beispielsweise diejenigen, welche sich gegen die AB0-Blutgruppenantigene oder das *humane* Leukozytenantigen-System (HLA) richten [14, 15]. DSA können sich bei Organempfängern bereits vor einer Transplantation durch Antigenkontakt bilden. Dieser Antigenkontakt kann beispielsweise über eine vorherige Fremdbluttransfusion erfolgen [16].

Sobald das Transplantat mit Empfängerblut perfundiert wird, binden die DSA an die im Spenderorgan exprimierten Antigene. Es resultiert eine Aktivierung des

Komplementsystems, welche zu Endothelzellnekrosen und Thrombenbildung führt und schließlich eine Zerstörung des Transplantats zur Folge hat [14]. Diese Art der Abstoßung tritt innerhalb weniger Minuten bis Stunden auf.

1.2. Akute zelluläre Abstoßungsreaktion

Die akute zelluläre Abstoßung tritt, im Vergleich zur hyperakuten Abstoßung, Tage bis teilweise Jahre nach einer Transplantation auf [14]. Sie ist durch lymphozytenreiche Infiltrate innerhalb des Transplantats gekennzeichnet.

Es kommt entweder durch antigenpräsentierende Zellen des Empfängers oder des Spenders zur Präsentation von transplantateigenen Antigenen über den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) 1, welche die Aktivierung von *Cluster of Differentiation* (CD) 8 positiven, zytotoxischen T-Lymphozyten des Empfängers zur Folge hat [17]. Die von diesen Zellen sezernierten Substanzen, unter anderem Perforine, führen zur Zerstörung des Transplantats. Ferner werden durch antigenpräsentierende Zellen transplantateigene Antigene mittels MHC-2 CD4⁺-T-Helferzellen präsentiert. Die von diesen T-Helferzellen produzierten Zytokine führen zur Chemotaxis anderer immunkompetenter Zellen und zur Aktivierung von B-Lymphozyten.

Akute zelluläre Transplantatabstoßungen lassen sich mit den aktuell vorhandenen Immunsuppressiva größtenteils sowohl vermeiden als auch behandeln [18].

1.3. Akute *humorale* Abstoßungsreaktion

Die akute *humorale* Abstoßung kann Tage bis Wochen nach der Transplantation entstehen. T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen vermitteln die Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche gegen das Transplantat gerichtete Antikörper produzieren. Ein anderer Teil der B-Lymphozyten differenziert zu B-Gedächtniszellen, welche den *humoralen* Anteil des immunologischen Gedächtnisses bilden. Kommt es zu einem erneuten Antigenkontakt werden diese B-Gedächtniszellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen reaktiviert [19].

1.4. Chronische Abstoßungsreaktion - Transplantatvaskulopathie

Die chronische Abstoßungsreaktion, häufig auch als Transplantatvaskulopathie bezeichnet, ist eine der koronaren Herzerkrankung ähnliche Gefäßdegeneration [20]. Hierbei kommt es zu einer Proliferation des Endothels und zur Einwanderung von Makrophagen in das Transplantat [21]. Die so entstehende Entzündung führt zu einer

irreversiblen Fibrosierung der KoronargefäÙe, welche in einer Minderperfusion des Organs resultiert. Die der Transplantatvaskulopathie zugrunde liegenden Pathomechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt. Vermutlich spielen jedoch antigenabhängige zelluläre und antikörpervermittelte Mechanismen sowie eine Erhöhung der Blutfettwerte eine Rolle. Die Transplantatvaskulopathie tritt Monate bis Jahre nach der Transplantation auf [14].

2. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantationen

Um einer TransplantatabstoÙung entgegenzuwirken, hat sich in der Nachsorge von herztransplantierten Patienten eine Dreifachkombination aus immunsuppressiven Medikamenten als Standardtherapie etabliert (Tabelle 1). Zu dieser Kombination gehört ein Calcineurininhibitor, wie zum Beispiel (z. B.) Tacrolimus oder Cyclosporin A. Zusätzlich wird Mycophenolat-Mofetil oder Azathioprin und ein Glukokortikoid, wie beispielsweise Prednison verabreicht [3, 22, 23].

Tabelle 1: Immunsuppressive Medikamente nach Herztransplantationen

Wirkstoffname	Wirkstoffart	Wirkort
Tacrolimus	Calcineurininhibitor	T-Lymphozyten
Cyclosporin A	Calcineurininhibitor	T-Lymphozyten
Mycophenolat-Mofetil	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase-Inhibitor	T- und B-Lymphozyten
Azathioprin	<i>Prodrug</i> , Metabolit hemmt als falsches Purinanalogen die Synthese von Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	T- und B-Lymphozyten
Prednison	Glukokortikoid	Diverse Wirkorte

2.1. Probleme einer unspezifischen Immunsuppression

Obwohl an der Entwicklung neuer Immunsuppressiva geforscht wird, besteht weiterhin eine Nachfrage an neuen Wirkstoffen. Ein Grund ist eine geringe Selektivität der aktuell verwendeten Medikamente. So sind diese zwar geeignet TransplantatabstoÙungen zu reduzieren, dies geht jedoch mit zum Teil (z. T.)

gravierenden Nebenwirkungen wie einer erhöhten Infektanfälligkeit, Nierenschäden und einem erhöhten Langzeitrisiko für die Entwicklung von Malignomen einher [4, 24]. Um das Auftreten solcher Nebenwirkungen zu reduzieren, ist es notwendig, Medikamente zu entwickeln, welche durch spezifischere Angriffspunkte Abstoßungsreaktionen selektiver beeinflussen können.

2.2. Alternative Ansätze einer Immunsuppression

Wie bereits gezeigt werden konnte, spielen T_{EM}-Lymphozyten eine Rolle in der Entstehung von Transplantatabstoßungen [5, 6]. So ist es naheliegend, dass eine selektive Hemmung von T_{EM}-Lymphozyten zu einer Beeinflussung von Transplantatabstoßungen führen könnte. Da bei einer solchen Therapie der Rest des Immunsystems nicht gehemmt wird, wäre es denkbar, dass die Nebenwirkungen der etablierten Immunsuppressiva nicht hervorgerufen werden.

3. Memory-T-Lymphozyten

Kommt es zum Kontakt mit einem organismusfremdem Antigen, so startet das Immunsystem eine Abwehrreaktion gegen dieses Antigen. Im Laufe dieser Immunantwort kommt es zu einer *klonalen* Vermehrung von antigenspezifischen T-Lymphozyten. Nach erfolgreich durchgeführter Immunreaktion geht der größte Teil dieser antigenspezifischen Zellen durch Apoptose unter. Ein kleiner Anteil differenziert sich zu *Memory*-T-Lymphozyten, welche das T-Zell-Gedächtnis darstellen [25]. Eine solche Sensibilisierung kann z. B. durch vorherige Fremdbluttransfusionen, Organtransplantationen oder Schwangerschaften hervorgerufen werden [6]. Zusätzlich ist es möglich, dass *Memory*-T-Lymphozyten ohne direkten Kontakt zu dem für sie spezifischen Antigen gebildet werden. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von *Memory*-T-Lymphozyten gegen HLA-B4402 auf Basis einer molekularen *Mimikry* während einer Epstein-Barr-Infektion [26]. Eine weitere Entstehungsmöglichkeit für *Memory*-T-Lymphozyten ist die zur Aufrechterhaltung des zellulären Immunsystems unabdingbare Proliferation von T-Lymphozyten [27].

Memory-T-Lymphozyten lassen sich in *Central-Memory*-T-Lymphozyten (T_{CM}) und T_{EM}-Lymphozyten unterteilen [8, 25]. T_{CM}-Lymphozyten befinden sich hauptsächlich in Lymphknoten, wohingegen T_{EM}-Lymphozyten zum größten Teil im peripheren Blut zirkulieren [8]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Geschwindigkeit, mit der T_{CM}-

Lymphozyten bei Antigenkontakt aktiviert werden. T_{EM} -Lymphozyten charakterisieren sich im Vergleich zu T_{CM} -Lymphozyten durch eine schnellere Aktivierung, die nicht im Lymphknoten erfolgen muss, sodass sie früher mit der Abwehr eines Fremdanogens beginnen können. Bei T_{CM} -Lymphozyten hingegen kommt es zuvor zu einer Proliferation [10].

Im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder, wie beispielsweise Multipler Sklerose oder Arthritis kommt es durch stetigen Antigenkontakt zur Bildung chronisch aktivierter, krankheitsspezifischer *Memory*-T-Lymphozyten, welche sich unter anderem in den Mechanismen der Zellaktivierung von nicht aktivierten *Memory*-T-Lymphozyten unterscheiden [28].

3.1. Kalziumabhängige Mechanismen der T_{EM} -Lymphozyten-Aktivierung

Die Aktivierung von T_{EM} -Lymphozyten beginnt mit der Bindung eines Antigens an den für es spezifischen T-Zell-Rezeptor-Komplex [29]. Die sich hieran anschließenden Prozesse werden maßgeblich durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beeinflusst. Hierfür stehen den T_{EM} -Lymphozyten zwei Mechanismen zur Verfügung [30].

Zum einen erfolgt nach der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der T_{EM} -Lymphozyten die Abspaltung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) durch die Phospholipase C, welches als *second messenger* Kalziumkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) aktiviert, sodass es zu einem Einstrom von Kalzium (Ca^{2+}) aus intrazellulären Speichern in das Zytosol kommt. Diese Erhöhung der Kalziumkonzentration ist allerdings nicht ausgeprägt genug, um T_{EM} -Lymphozyten zu aktivieren [7].

Zum anderen ist es T_{EM} -Lymphozyten möglich Kalzium aus dem Extrazellularraum aufzunehmen. Hierzu stehen auf der Zellmembran verschiedene Kanäle zur Verfügung. Durch den zuvor beschriebenen Kalziumeinstrom aus dem ER werden *calcium release-activated calcium channels* (CRAC) geöffnet, die durch zusätzlichen Einstrom von extrazellulärem Kalzium die intrazelluläre Kalziumkonzentration weiter erhöhen [30].

An dieser Stelle werden nun zwei Arten von Kaliumkanälen aktiviert. Da Kalzium zweifach positiv geladen ist, entsteht ein Übergewicht an positiven Ladungen innerhalb der Zelle, wodurch der elektrochemische Gradient über der Membran sinkt. Diese Depolarisation führt zur Aktivierung des spannungsabhängigen $Kv1.3$ -Kaliumkanals und einem, dem Konzentrationsgefälle folgenden Ausstrom von Kalium

(K^+) in das extrazelluläre Milieu. Neben $K_V1.3$ existiert der kalziumabhängige Kaliumkanal 3.1 ($K_{Ca}3.1$). Dieser wird direkt über die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert und führt wie der $K_V1.3$ zum Ausstrom von Kalium nach extrazellulär. Dieser Kaliumausstrom erhält den elektrochemischen Gradienten aufrecht und ermöglicht so den weiteren Kalziumeinstrom [30] (Abbildung 1).

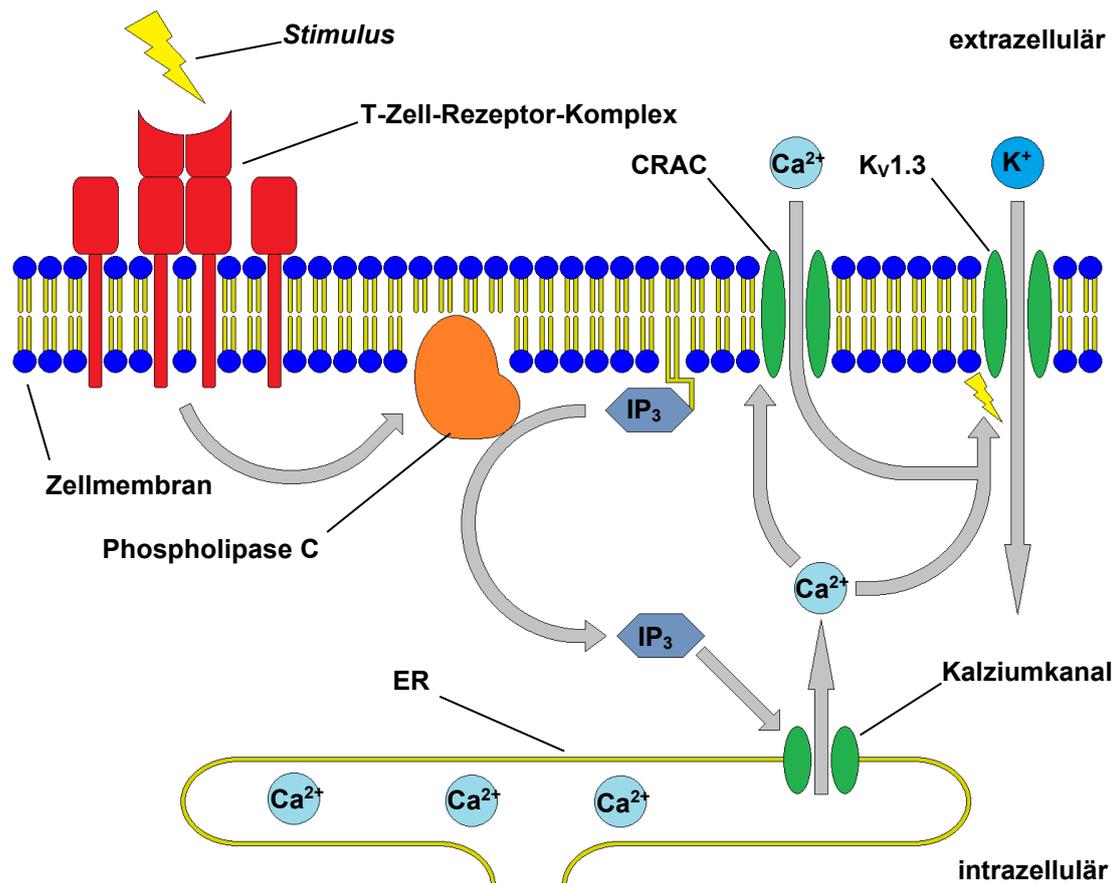


Abbildung 1: Kalziumabhängige, $K_V1.3$ -vermittelte Aktivierungskaskade von T_{EM} -Lymphozyten

3.2. Die Verteilung von $K_V1.3$ und $K_{Ca}3.1$ auf T-Lymphozyten und ihr Anteil an der T-Lymphozyten-Aktivierung

Auf der Zellmembran jedes T-Lymphozyten sind sowohl $K_V1.3$, als auch $K_{Ca}3.1$ vorhanden. So befinden sich sowohl auf der Zelloberfläche von naiven als auch von nicht aktivierten T_{EM} - und T_{CM} -Lymphozyten etwa 300 $K_V1.3$ pro Zelle. Die Anzahl von $K_{Ca}3.1$ liegt bei 10-20 pro Zelle. Bei der Aktivierung dieser Zellen, kommt es zu einer Hochregulation der einzelnen Ionenkanaltypen. Hierbei variiert die Ausprägung je nach T-Lymphozytentyp. So erhöhen T_{EM} -Lymphozyten die Anzahl der $K_V1.3$ auf

etwa 1500 pro Zelle, ohne eine deutliche Erhöhung von $K_{Ca3.1}$ zu zeigen. T_{CM} -Lymphozyten und naive T-Lymphozyten hingegen erhöhen die Anzahl an $K_{Ca3.1}$, ohne $K_{V1.3}$ vermehrt aufzuweisen [31].

Diese zellspezifische Erhöhung einzelner Kanäle bietet jedoch bei physiologisch vorkommenden T-Lymphozyten keinen Angriffspunkt zur selektiven Hemmung. So konnte nachgewiesen werden, dass physiologische T_{EM} -Lymphozyten bei Ausfall der Funktion von $K_{V1.3}$ die Fähigkeit zur Kompensation über $K_{Ca3.1}$ besitzen [28]. Physiologische T_{EM} -Lymphozyten entwickeln sich jedoch nach chronischem Antigenkontakt zu chronisch aktivierten T_{EM} -Lymphozyten. Im Rahmen dieser Transformation verlieren sie die Möglichkeit der Kompensation, sodass sie alleinig von $K_{V1.3}$ abhängig werden [28]. Diese Transformation bietet die Möglichkeit selektiv chronisch aktivierte T_{EM} -Lymphozyten über $K_{V1.3}$ spezifische Inhibitoren zu hemmen.

3.3 $K_{V1.3}$

$K_{V1.3}$ ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, welcher sich unter anderem in der Plasmamembran von T_{EM} -Lymphozyten befindet. Seine Anzahl wird bei Aktivierung von T_{EM} -Lymphozyten deutlich hochreguliert [32]. Als Tetramer aufgebaut, besteht $K_{V1.3}$ aus vier gleichen Untereinheiten, welche jeweils sechs Transmembrandomänen besitzen. Die jeweils fünfte und sechste Domäne bilden die Kanalpore, wohingegen die vierte Domäne als Spannungssensor fungiert. Eine Aktivierung von $K_{V1.3}$ führt über eine Konformationsänderung zur Öffnung der Kanalpore und somit zu einem, dem Konzentrationsgradienten folgend, passiven Ausstrom von Kalium von intrazellulär nach extrazellulär [7, 33].

4. Wirkweise von *cgtx-544*

Cgtx-544 ist ein synthetisch hergestelltes Peptid, welches selektiv $K_{V1.3}$ hemmt, sodass der über diesen Ionenkanal vermittelte Kaliumausstrom aus den T-Lymphozyten unterbunden wird. Da wie zuvor erläutert im Falle von chronisch aktivierten T_{EM} -Lymphozyten ein Aufrechterhalten des elektrochemischen Gradienten durch die Blockierung dieses Mechanismus nicht mehr möglich ist, wird der weitere Einstrom von Kalzium über die CRAC gehemmt. In Folge dessen unterbleibt der notwendige Anstieg der Kalziumkonzentration [30].

5. Notwendigkeit eines Tiermodells

In vitro konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine medikamentöse Blockade von Kv1.3 zu einer Hemmung von krankheitsassoziierten, chronisch aktivierten T_{EM}-Lymphozyten führt [34]. Da Abstoßungsreaktionen jedoch komplexe Vorgänge sind, ist es nicht ausreichend, isolierte Effekte auf T_{EM}-Lymphozyten zu untersuchen. Um eine Aussage über die Verträglichkeit und Effektivität einer Immunsuppression mit *cgtx-544* nach Herztransplantationen treffen zu können, muss die Reaktion des gesamten Immunsystems auf die Beeinflussung von T_{EM}-Lymphozyten während einer Transplantation betrachtet werden. Da hierfür kein suffizientes *in vitro* Modell existiert, ist es notwendig auf ein *in vivo* Tiermodell zurückzugreifen. Hierzu wurde ein in der herzchirurgischen Forschung und unserer Arbeitsgruppe etabliertes Rattenmodell ausgewählt. Die im Rahmen dieses Forschungsansatzes durchgeführten Tierversuche wurde von der Regierung von Oberbayern nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt und dort unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-169-2015 geführt.

6. Finanzielle Unterstützung dieser wissenschaftlichen Arbeit

Diese wissenschaftliche Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 127 (SFB 127: Biologie der xenogenen Zell-, Gewebe- und Organtransplantation von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung) angefertigt. Die finanziellen Mittel wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) bereitgestellt. Der verwendete Kv1.3-Inhibitor wurde vom Hersteller conoGenetix biosciences GmbH (Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

II. Zielsetzung

Das Studienpeptid *cgtx-544* wurde als potenzielle Therapie zur selektiven Inhibition des KV1.3 entwickelt. Seitens des Herstellers erfolgten bereits Studien zur Therapie von rheumatoider Arthritis, die eine gute Verträglichkeit im Rattenmodell zeigten (persönliches Gespräch mit A. Klostermann, conoGenetix biosciences GmbH). Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, als *Proof-of-Concept*-Ansatz erstmalig zu erörtern die Verträglichkeit von *cgtx-544* im Rattentransplantationsmodell, ein Modell mit höherer Belastung für die Tiere, zu eruieren und zum anderen seinen immunologischen Einfluss auf allogene Organabstoßungsreaktionen zu untersuchen. Hierzu wird ein in der Forschungsgruppe etabliertes allogenes, heterotopes Rattenherztransplantationsmodell genutzt. Somit wird das Studienpeptid am etablierten Modell von zuvor nicht durch Spenderantigene präsensibilisierte Empfängertiere evaluiert. In einem nächsten Schritt sollen erste Versuchsansätze im Hinblick auf die Evaluation des Studienpeptids in präsensibilisierten Empfängern diskutiert werden. Auf der Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten sollen erste Erkenntnisse einer selektiven und somit möglicherweise nebenwirkungsärmeren immunsuppressiven Therapie im Rahmen von Transplantationen gewonnen werden, die weiterführenden Forschungsansätze als Grundlage dienen.

III. Methoden und Materialien

1. Das Studienpeptid

Bei dem Studienpeptid *cgtx-544* handelt es sich um einen selektiven Kv1.3-Inhibitor. Es wurde von der Firma conoGenetix biosciences GmbH (Martinsried) zur Verfügung gestellt. Das Peptid liegt als Acetat in Pulverform mit einer Reinheit von über 94 % vor. Das Molekulargewicht beträgt 4212 g/mol. Basierend auf Vorstudien der Firma conoGenetix wurde die Dosierung auf 150 µg/kg Körpergewicht (KG) in einer Lösung von 250 µl 0,9 %iger Natriumchlorid-Infusionslösung (NaCl) festgelegt. In Pulverform wurde das Peptid lichtgeschützt bei -80 °C für mehrere Monate und in Lösung bei 4 °C für wenige Wochen aufbewahrt.

2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ausschließlich für die Forschung gezüchtete Ratten. Um einen zyklusabhängigen Einfluss von Hormonen auszuschließen und den Einfluss von unentdeckten Schwangerschaften zu vermeiden, wurden nur männliche Tiere verwendet.

2.1. Spendertiere

Als Spendertiere wurden Brown Norway-Ratten (BN/OrlRj, JANVIER LABS) vom MHC-Typ RT1ⁿ verwendet. Zum Zeitpunkt der Herztransplantation waren die Spendertiere 6 bis 8 Wochen alt und wogen zwischen 200 g und 250 g.

2.2. Empfängertiere

Als Empfängertiere wurden Lewis-Ratten (LEW/OrlRj, JANVIER LABS) vom MHC-Typ RT1^l verwendet. Mit einem Gewicht von 250 g bis 300 g und einem Alter von 8 bis 10 Wochen waren die Empfängertiere schwerer und größer als die Spendertiere.

2.3. Tierhaltung

Alle Tiere wurden in der von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierhaltung des *Walter-Brendel-Zentrums* für experimentelle Medizin gehalten. Um eine Eingewöhnung in das neue Umfeld zu gewährleisten, wurden die Tiere frühestens sieben Tage nach Ankunft in der Tierhaltung in den Versuch genommen. Die Tiere wurden in Makrolon Typ IV Käfigen mit erhöhtem Käfigdeckeln gehalten. Die mit

Holzfasereinstreu ausgelegten Käfige wurden in einem maximalen Abstand von sieben Tagen gereinigt und die Käfigdeckel alle zwei Wochen erneuert. Um das Sozialverhalten der Tiere zu unterstützen, wurde eine Gruppenhaltung von bis zu vier Tieren pro Käfig bevorzugt. Um mögliche Effekte ausgeschiedener Peptidreste auf Kontrolltiere zu verhindern, wurden Tiere verschiedener Versuchsgruppen nach der Herztransplantation getrennt gehalten. Als *Enrichment* wurden den Tieren Tunnel aus Pappe, Plastikrohre, Plastikhäuser und Nestbaumaterial aus Holzfasern angeboten. Als Nahrung dienten Hartpellets, welche genauso wie Flüssigkeit den Tieren *ad libitum* zur Verfügung standen. Die Haltungsbedingungen der Tiere waren standardisiert. Die Temperatur betrug 22 ± 2 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 %. Im Haltungsraum herrschte ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden mit einer maximalen Lichtintensität von 250 lx. Der Luftwechsel im Haltungsraum lag etwa bei 15- bis 20-mal pro Stunde.

2.4. Untersuchung des Allgemeinzustandes

Im Hinblick auf die Verträglichkeit von *cgtx-544* wurde der Allgemeinzustand der in den Versuch genommenen Tiere täglich mittels eines *Score Sheets* beurteilt. Belastungen wurden anhand eines errechneten Punktwertes bewertet und die Abbruchkriterien des Versuchs definiert. Das *Score Sheet* ist im Anhang zu finden (siehe XI, 2.).

3. Studiendesign der Transplantationsversuche

Für die *in vivo* Versuche wurden insgesamt 28 Lewis-Ratten und 37 Brown Norway-Ratten verwendet. Es wurden nur Tiere ausgewertet, deren Transplantatfunktion nicht durch eine perioperative Komplikation beeinflusst wurde. Hierzu zählten alle Tiere, deren Transplantatfunktion am ersten postoperativen Tag mit „+++“ bewertet wurde (Tabelle 3). Für die Evaluation des Studienpeptids im *in vivo* Transplantationsmodell wurden auf diese Weise 18 Empfängertiere hinsichtlich der Hauptzielgröße, dem Transplantatüberleben, ausgewertet.

Die Versuchstiere wurden einer von zwei Behandlungsgruppen randomisiert zugeordnet und anschließend heterotop abdominell herztransplantiert. Tiere in der *cgtx-544*-Gruppe erhielten das Studienpeptid *cgtx-544* in einer Dosierung von 150 µg/kg KG gelöst in 250 µl 0,9 % NaCl-Infusionslösung. Tiere in der Kontrollgruppe erhielten 250 µl 0,9 % NaCl-Infusionslösung. Die Studiensubstanz wurde etwa 30

Minuten vor der Herztransplantation und im Anschluss täglich in die laterale Schwanzvene injiziert.

Zur Evaluation des Transplantatüberlebens wurde das Transplantatversagen als primärer Endpunkt definiert. Nach Erreichen des primären Endpunktes wurde der Versuch beendet (Abbildung 2).

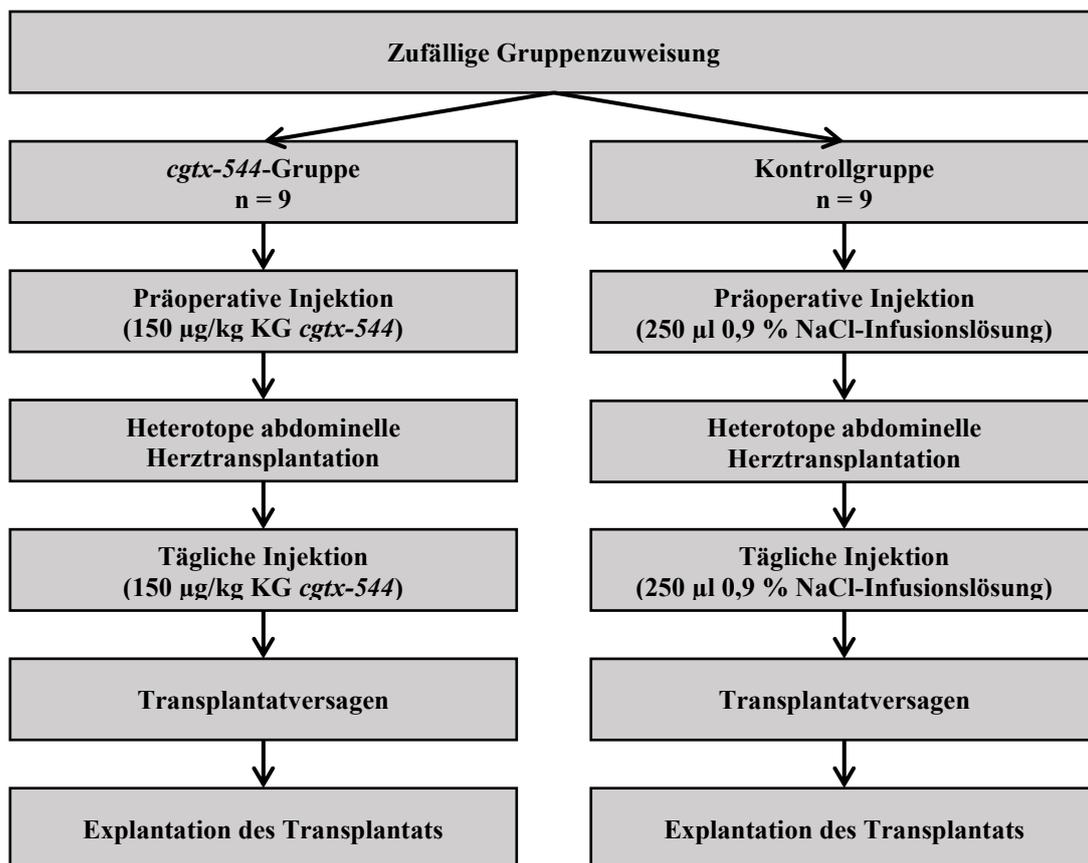


Abbildung 2: Studiendesign der Transplantationsversuche

4. Anästhesie

Eine Anästhesie der Versuchstiere erfolgte immer dann, wenn ein belastender Eingriff an den Tieren durchgeführt wurde. Es wurden sowohl Inhalations-, als auch Injektionsanästhetika verwendet.

4.1. Inhalationsanästhesie

Alle belastenden Eingriffe, mit Ausnahme der Herztransplantation, wurden unter einer Inhalationsanästhesie durchgeführt. Hierzu zählten die Injektionen der Studienmedikation, die Blutentnahmen aus der Schwanzvene, die finale

Transplantatexplantation und kardiale Punktion. Zusätzlich wurde die Injektionsanästhesie des Empfängertiers während der Transplantation bei Bedarf mittels inhalativer Anästhetika vertieft. Die Einleitung der inhalativen Anästhesie erfolgte in einer Induktionskammer. Über ein Narkosegerät (Trajan 808, Dräger) wurde mittels eines Vaporisators (Vapor 19.3, Dräger) ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch mit einer Konzentration von 5 % Isofluran in 2 l/min Sauerstoffflow eingeleitet. Nach Erlöschen des Stellreflexes der Tiere erfolgte die weitere Aufrechterhaltung der Narkose mit einer Maskenanästhesie durch ein halboffenes System mit Absaugung. Die Konzentration von Isofluran betrug je nach Anforderung an die Narkostiefe zwischen 0,6 % und 5 % in 2 l/min Sauerstoffflow.

4.2. Injektionsanästhesie

Zur intraoperativen Anästhesie erhielten sowohl Spender- als auch Empfängertier eine Injektion einer aus Fentanyl, Midazolam und Medetomidin bestehenden Anästhesielösung (Tabelle 2) in die ischiocrurale Muskulatur. Um einen postoperativen Narkotikaüberhang zu vermeiden, wurde die intramuskuläre Injektionsnarkose am Ende der Operation antagonisiert. Die Antagonisierung erfolgte als subkutane Injektion einer Kombinationslösung aus Naloxon, Flumazenil und Atipamezol (Tabelle 2). Da eine solche Antagonisierung auch die analgetische Komponente betrifft, wurde dem Empfängertier intraoperativ, deutlich vor der Antagonisierung, Metamizol subkutan appliziert (Tabelle 2).

4.3. Postoperative Analgesie

Postoperativ erhielten die Empfängertiere im Abstand von vier Stunden zur ersten Injektion eine weitere subkutane Injektion von Metamizol. Zudem erhielten die Tiere am selben Tag und am folgenden Morgen eine subkutane Injektion mit Buprenorphin (Tabelle 2). Die postoperative Analgesie mit Buprenorphin wurde bei Bedarf auf die ersten drei postoperativen Tage ausgeweitet.

Tabelle 2: Verwendete Narkotika, Analgetika und Antagonisten, sowie ihre auf das Körpergewicht adaptierte Dosierung

Verwendung	Wirkstoffname	Wirkstoffklasse	Dosierung in mg/kg KG
Injektionsanästhesie	Fentanyl	Opioid	0,005
	Midazolam	Benzodiazepin	0,15
	Medetomidin	α_2 -Adrenorezeptor-Agonist	2,0
Antagonisierung	Naloxon	Opioid-Antagonist	0,12
	Flumazenil	Benzodiazepin-Antagonist	0,75
	Atipamezol	α_2 -Adrenorezeptor-Antagonist	0,2
Postoperative Analgesie	Metamizol	Nichtsteroidales Antirheumatikum	200
	Buprenorphin	Opioid	0,01 - 0,1

5. Heterotope abdominelle Herztransplantation

5.1. Präoperative Vorbereitung

Das Empfängertier wurde mittels inhalativer Isofluran-Narkose anästhesiert, gewogen und es erfolgte die intravenöse Injektion der ersten Dosis der jeweiligen für das Versuchstier definierten Studienmedikation. Im Anschluss wurde das Empfängertier in den Käfig zurückgesetzt. Das Spendertier wurde durch eine intramuskuläre Injektion narkotisiert und gewogen. Thorax und Abdomen des Spenders wurde rasiert und desinfiziert.

5.2. Explantation des Spenderherzes

Sobald das chirurgische Toleranzstadium (Anästhesie-Stadium III₂, Erlöschen des Zwischenzehenreflexes) erreicht wurde, erfolgte die Laparotomie des in Rückenlage positionierten Spendertiers mittels Hautskalpell (Klingentyp 22 nach Rüttgers) und Präparationsschere. Zur systemischen Vollheparinisierung wurden 500 IE Heparin in 1 ml 0,9 % NaCl-Infusionslösung in die abdominelle Vena cava inferior (Vena cava caudalis) injiziert. Nach zweiminütiger Zirkulation wurden Vena cava inferior und Aorta abdominalis durchtrennt.

Im Anschluss erfolgte eine Sternotomie mittels Präparationsschere. Das Perikard wurde eröffnet, der Thorax aufgespreizt und fixiert. Es wurden Entlastungsschnitte in die thorakale Vena cava inferior und den Truncus pulmonalis gesetzt und 3 ml 4 °C kalte Bretschneider-Kardioplegielösung retrograd in die thorakale Aorta infundiert. Um den Abfluss der Kardioplegielösung über die thorakale Vena cava inferior zu

verbessern, wurde das Lumen mit einer Pinzette aufgehalten. Die kardioplegiebedingte Hypothermie des Herzes wurde durch eine äußere Spülung mit weiteren 2 ml 4 °C kalter Kardioplegielösung intensiviert. Durch das Eröffnen der großen Gefäße und die Kardioplegie verstarbt das Spendertier in tiefer Narkose.

Sobald das Herz keine Kontraktion mehr aufwies, erfolgte die weitere Präparation der herznahen Gefäße. Die thorakale Vena cava inferior wurde mit einem nicht resorbierbaren 5-0 Polyesterfaden ligiert und distal abgesetzt. Die Venae cavae superiores wurden freipräpariert, herznah mittels eines Gefäßclips verschlossen und abgesetzt. Der Truncus pulmonalis und die Aorta ascendens wurde distal abgesetzt. Die Venae pulmonales wurden mit einem nicht resorbierbaren 5-0 Polyesterfaden gemeinsam ligiert und anschließend das Herz distal der Ligatur abgesetzt und entnommen. Um die warme Ischämiezeit zu minimieren wurde das Transplantat unverzüglich gewogen und bis zum Zeitpunkt der Implantation in 4 °C kalter Kardioplegielösung aufbewahrt.

5.3. Implantation des Spenderherzes

Nach erfolgter Explantation wurde das Empfängertier auf die gleiche Art wie zuvor das Spendertier narkotisiert. Zur Prophylaxe einer intraoperativen Hypoglykämie erhielt das Empfängertier ein Gemisch aus 1 ml 5 %iger Glukose-Infusionslösung und 2 ml 0,9 %iger NaCl-Infusionslösung subkutan injiziert. Ein Austrocknen der Augen wurden mit der Applikation einer dexpanthenolhaltigen Salbe verhindert. Das Empfängertier wurde in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert, um einer intraoperativen Hypothermie entgegenzuwirken.

Es erfolgte eine mediane Laparotomie. Das Abdomen wurde unter Zuhilfenahme eines Wundspreizers übersichtlich dargestellt. Der durch Präparation des Mesenteriums mobilisierte Darm wurde in einer in 0,9 %iger NaCl-Infusionslösung getränkten Kompresse vor dem Austrocknen geschützt außerhalb des Abdomens gelagert. Die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis wurden unterhalb der Nierengefäßabgänge freipräpariert und mittels einer Bulldog-Gefäßklemme ausgeklemmt. Anschließend wurde die ausgeklemmte Aorta mit einem Spitzskalpell (Klingentyp 11 nach Rüttgers) längs inzidiert. Eine Thrombenbildung wurde durch Ausspülung des Gefäßes mit 0,9 %iger NaCl-Infusionslösung verhindert. Die Aorta des Transplantats wurde mittels eines doppelt armierten, nicht resorbierbaren Polypropylen-Fadens der Stärke 8-0 in fortlaufender Naht End-zu-Seit mit der Aorta des Empfängers anastomosiert. Im Anschluss wurde die Vena cava des Empfängers

längs inzidiert und mit 0,9 %iger NaCl-Infusionslösung von thrombotischem Material freigespült. Mit dem gleichen Nahtmaterial, welches auch für die arterielle Anastomose verwendet wurde, wurde die Vena cava End-zu-Seit mit dem Truncus Pulmonalis des Transplantats anastomosiert. Um eine, durch das Anziehen der Naht entstehende Stenose der zarten Vena cava zu verhindern, wurde die fortlaufende Naht jeweils am proximalen und distalen Ende der Anastomose fixiert. Um postoperativ eine bereits ausreichende Analgesie zu gewährleisten, erhielt das Tier bereits zum Zeitpunkt der arteriellen Anastomosierung eine subkutane Injektion Metamizol. Nach Anlage beider Anastomosen wurde die Gefäßklemme geöffnet. Der so geschaffene Blutfluss durch das Transplantat entspricht dem Prinzip des Langendorff-Modells (Abbildung 3).

Ein Abknicken der Anastomosen wurde durch Umlegung eines resorbierbaren hämostatischen Gelatineschwammes verhindert. Etwa 10-30 Sekunden nach Reperfusion fing das Transplantat an eigenständig zu kontrahieren. Vorhof- oder Kammerflimmern wurden durch mechanische Defibrillation beendet. Der zuvor mobilisierte Darm wurde zurück in das Abdomen verlagert und um das Transplantat ausgebreitet. Die Bauchmuskulatur wurden mit einem nicht resorbierbaren Polyesterfaden der Stärke 2-0, die Haut mit einem Polypropylen-Faden der Stärke 3-0 in fortlaufender Naht verschlossen. Die Anästhesie, jedoch nicht der analgetische Anteil der Metamizolinjektion, wurde mit einer subkutanen Injektion des Antidots antagonisiert und das Tier in den Käfig zurückgesetzt.

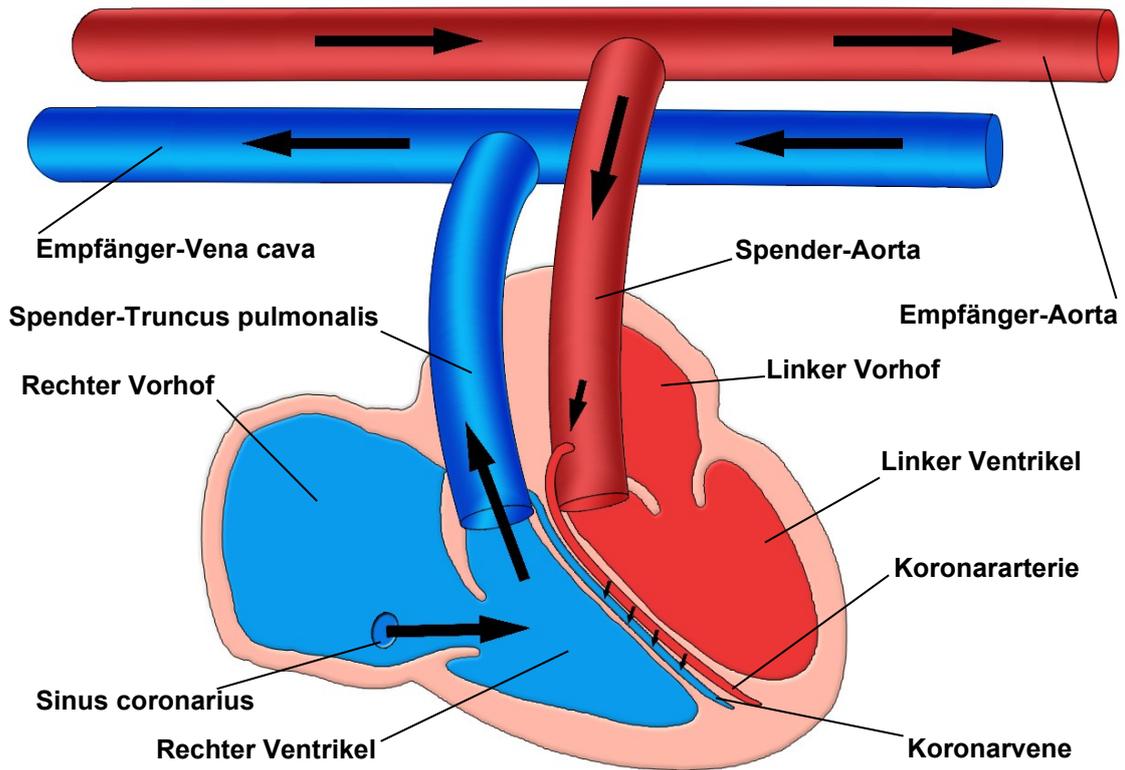


Abbildung 3: Prinzip des Langendorff-Modells

5.4. Postoperatives Prozedere

Postoperativ standen den Tieren Wasser und Futterpellets *ad libitum* zur Verfügung. Zusätzlich wurde den Empfängertieren regelmäßig direkt Flüssigkeit angeboten. Um die Aufnahme von Nahrung zu erleichtern, wurden Futterpellets direkt in den Käfig gelegt. Alle Empfängertiere erhielten eine ihrem Allgemeinzustand angepasste postoperative Analgesie nach dem zuvor beschriebenen Schema.

5.5. Explantation bei Versuchsende

Sobald ein Versuchstier den primären Endpunkt erreicht hatte oder die mittels *Score Sheet* errechnete Belastung nicht zu rechtfertigen war, wurde der Versuch beendet und das Transplantat entnommen. Das Empfängertier wurde mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert und in Rückenlage positioniert. Um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten, erhielt das Spendertier eine subkutane Injektion mit Metamizol. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums, wurde das Abdomen median mit einer Präparationsschere eröffnet und das Transplantat inspiziert. Anschließend wurde eine finale Blutabnahme aus dem nativen Empfängerherz durchgeführt. Das Empfängertier

verstarb in tiefer Narkose durch Entbluten. Das Transplantat wurde mit einer Präparationsschere abgesetzt, von Ligaturen befreit, parallel zur Klappenebene halbiert und gewogen. Anschließend wurde das Transplantat in 4 %iges Formaldehyd überführt und für die histologischen Untersuchungen weiter aufbereitet.

6. Applikation der Studienmedikation

Alle Empfängertiere erhielten täglich, mit dem Tag der Transplantation beginnend (30 Minuten vor der Transplantation), eine intravenöse Injektion der für ihre Gruppe definierten Studiensubstanz. Zur Applikation wurden die Tiere mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert. Die gestaute und zuvor durch Erwärmung dilatierte, laterale Schwanzvene wurde mit einer Butterflykanüle (25 G) punktiert. Um ein Verbleib von Resten des Studienmedikaments im Infusionsschlauch der Butterflykanüle zu verhindern, wurde nach der Injektion der Studiensubstanz mit 250 µl 0,9 %iger NaCl-Infusionslösung nachgespült.

7. Transplantatüberleben

Jedes Transplantat wurde täglich palpatorisch auf seine Funktion untersucht. Dies erfolgte vor der Injektion des Studienmedikaments. Die Transplantatfunktion wurde mittels *heartbeat strength score* nach Gordon beurteilt [35] (Tabelle 3). Konnte keine Kontraktion palpirt werden, galt der primäre Endpunkt als erreicht. Ergänzend wurde eine transabdominale Sonographie (SONOS 7500, Philips) durchgeführt. Hierfür wurde ein s12 Schallkopf mit einer Eindringtiefe von 2 cm und einer Frequenz von 88 MHz verwendet (Abbildung 4).

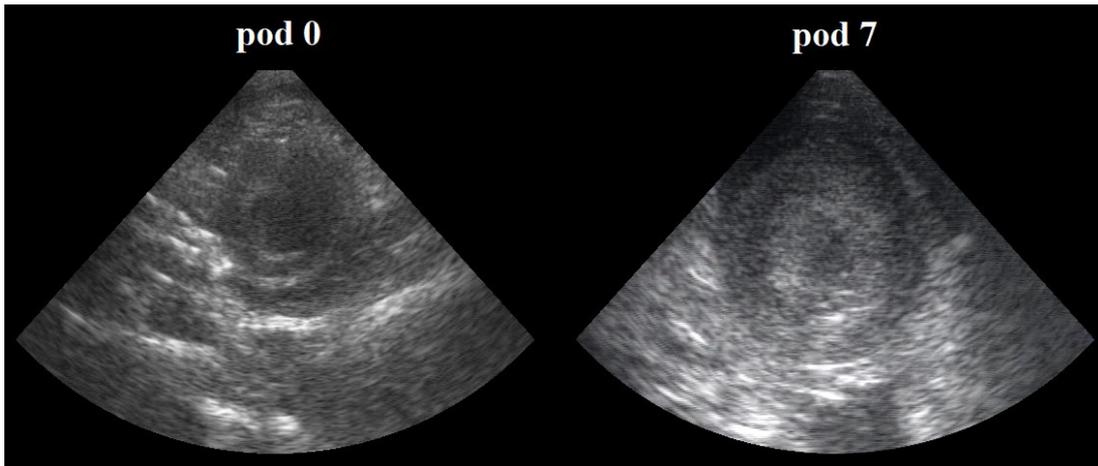


Abbildung 4: Transabdominelle Sonographie von zwei Transplantaten: das Transplantat zum Zeitpunkt des 7. postoperativen Tages (pod 7) zeigt im Vergleich mit dem Transplantat zum Zeitpunkt direkt postoperativ (pod 0) eine deutliche Zunahme der Ventrikelwand, eine Verengung des Ventrikellumens, sowie das Vorhandensein eines intraventrikulären Thrombus

Tabelle 3: *Heartbeat strength score* nach Gordon [35]

Transplantatfunktion	(-)	(+)	(++)	(+++)	Nicht beurteilbar
Per Palpation					
Per Echo					
Kontraktionsstärke: (-) keine, (+) sehr schwach, (++) stark, (+++) sehr stark					

8. Laboruntersuchungen

8.1. Blutentnahme

Vor der Explantation wurde allen Empfängertieren final Blut entnommen. Hierfür wurden die Empfängertiere mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert und durch eine subkutane Injektion von 200 mg/kg KG Metamizol analgesiert. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde das empfangereigene Herz transthorakal punktiert, sodass die Empfängertiere durch Entbluten in tiefer Narkose verstarben.

8.2. Gewinnung von Serum

Für laborchemische Untersuchungen wurde Serum der Empfängertiere gewonnen. Das entnommene Vollblut wurde bei 4 °C mit 2000 G für 5 Minuten zentrifugiert und das

überstehende Serum abpipettiert. Die zu je 200 µl aliquotierten Serumproben wurde bei -80 °C konserviert.

8.3. Hämatologische Untersuchung.

Jeweils 50 µl des Blutes wurde in Ethylendiamintetraacetat-Proberöhrchen (EDTA) aufgefangen und mittels eines Hämatologie-Analysegerätes (ProCyte Dx, Idexx Laboratories) untersucht.

8.4. Serumchemie

500µl Serum wurde durch das klinische Labor des Klinikums der Universität München untersucht. Dort wurden die Parameter Troponin I (hochsensitives Troponin), Kreatinin, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt.

8.5. Zytokinanalytik

Zur Analyse verschiedener Zytokine wurde von jedem Empfängertier 200 µl Serum an das Institut „Kardiale Diagnostik und Therapie“ (Berlin) versendet. Dort wurde mittels eines Multiplex-Immunoassay (Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine Th1/Th2 12-Plex Multiplex-Immunoassay, BIO-RAD Laboratories, München) und zweier Singleplex-Immunoassays (Bio-Plex Pro™ Rat Single-plex IL-17A, BIO-RAD Laboratories, München und Bio-Plex Pro™ Rat Single-plex IL-12p40, BIO-RAD Laboratories, München) die Zytokine Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), IL-17A, IL-12p40 (entspricht dem *humanen* IL-23) bestimmt.

9. Histologie

Sobald ein Empfängertier den Versuchsendpunkt erreicht hatte, wurde das Transplantat entnommen und für histologische Untersuchungen aufbereitet.

9.1. Erstellung von histologischen Gewebeschnitten

Die Transplantate wurde direkt nach der Explantation parallel zur Klappenebene halbiert und für 24 Stunden in 4 %igem Formaldehyd eingelagert. Um eine

Überfixation zu verhindern wurden die Präparate im Anschluss für weitere 24 Stunden in 70 %igem Ethanol aufbewahrt. Anschließend wurde das Transplantat mit einem Skalpell in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten und in einer Einbettkassette zum Entwässern in ein Entwässerungsrondell (Citadel 1000, SHANDON) gelegt. Das Entwässerungsprotokoll des Rondells befindet sich im Anhang (siehe XI, 3.1.).

Im Anschluss wurden die Präparate mithilfe einer Ausgießstation (Tissue-Tek TEC 5, SAKURA) in Paraffinblöcke gegossen. Mit einem Mikrotom (Microm HM 325, Thermo Scients) wurden 1 µm und 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Um ein Erweichen der Paraffinblöcke zu verhindern, wurden diese vor dem Schneiden auf einer -15 °C kalten Kälteplatte (COP 30 Cooling Plate, MEDITE) gelagert. Zum Glätten wurden die Gewebeschnitte zuerst in ein kaltes und anschließend in ein ca. 40 °C warmes Wasserbad überführt, von wo aus sie auf einen speziell für Immunhistochemie beschichteten Adhäsivobjektträger aufgezogen wurden. Die fertigen Gewebeschnitte wurden zum Trocknen für mindestens 24 Stunden in einem 37 °C temperierten Wärmeschrank aufbewahrt.

9.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologisch-morphologischen Bewertung wurde von jedem Transplantat ein Gewebeschnitt mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eingefärbt. Das Färbeprotokoll ist im Anhang zu finden (siehe XI, 3.2.).

9.3. Immunhistochemie

Im Gegensatz zur HE-Färbung beruht das Prinzip der Immunhistochemie nicht auf dem direkten Anfärben der Zielstruktur. Bei der Immunhistochemie wird die gesuchte Zielstruktur durch Antikörper gebunden (Primärantikörper). Nach Auswaschen ungebundener Antikörper wird ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen, welcher an das kristallisierbare Fragment (F_c) des Primärantikörpers bindet. An das F_c des Sekundärantikörpers ist entweder eine Peroxidase gebunden oder er ist biotinyliert, sodass er durch Hinzugeben weiterer Substanzen reagiert. Die entstehende Verfärbung zeigt das gesuchte Antigen indirekt an (Abbildung 5).

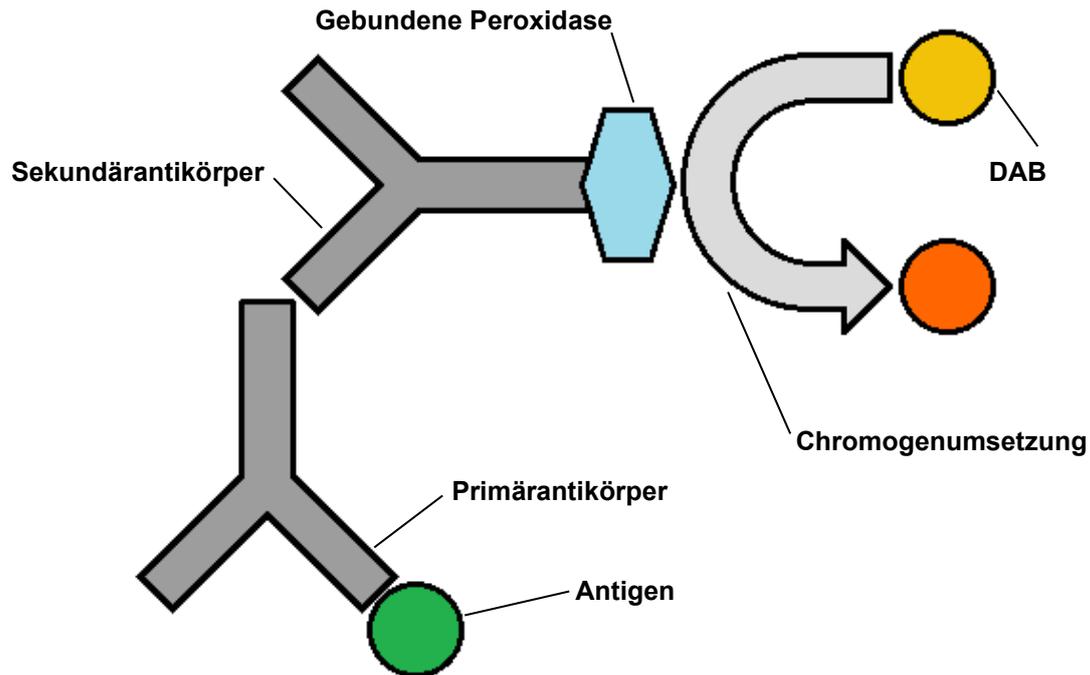


Abbildung 5: Prinzip der Immunhistochemie

Zu allen immunhistochemischen Nachweisen wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt.

Die bei 37 °C in einem Trockenschrank über Nacht gelagerten Gewebeschnitte wurden für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurde das Xylol durch eine absteigende Alkoholreihe ausgewaschen und das Präparat schrittweise rehydriert. Für die immunhistochemischen Nachweise von CD3, die Komplementfaktoren C4d und C5b-9 und Fibrin wurde eine Demaskierung der durch das Formaldehyd vernetzten Antigene durchgeführt, sodass die Bindestellen für die Primärantikörper freigelegt wurden. Die Demaskierung für die Antigene CD3 und C4d erfolgte durch Hitzedemaskierung.

Um eine vorzeitige Chromogenumsetzung zu verhindern, wurde im nächsten Schritt die endogene Peroxidase des Gewebes mit 1 %igem Wasserstoffperoxid blockiert. In den immunhistochemischen Nachweisen von C5b-9 und Fibrin wurde erst nach Blockierung der endogenen Peroxidase eine Demaskierung durch Zugabe von Proteinase K erreicht. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit *Tris-Buffer-Saline* (TBS) gespült. Um hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu reduzieren, wurden die Präparate mittels Normalserum gepuffert. Das Normalserum stammte von der jeweiligen Tierart, von der der Sekundärantikörper gewonnen wurde.

Im Anschluss wurde der für das gesuchte Antigen passende Primärantikörper aufgetragen. Im Falle der Negativkontrollen wurden anstelle des Primärantikörpers ein Antikörper verwendet, dessen Antigen nicht in den Gewebeschnitten vorkommt. Eine ausreichende Bindung des Primärantikörpers wurde durch eine Inkubation gewährleistet. Bevor der Sekundärantikörper aufgetragen und inkubiert wurde, wurde der ungebundene Anteil an Primärantikörper mit TBS ausgewaschen. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde bei den immunhistochemischen Nachweisen, bei denen ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet wurde, ein Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen. Danach wurden ebendiese Nachweise inkubiert und erneut mit TBS gewaschen.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) bedeckt, wobei sich bei einem positiven Antigennachweis eine Verfärbung auf dem Objektträger entwickelte. Um eine überschießende Chromogenumsetzung zu verhindern, wurde das DAB unter fließendem Wasser ausgewaschen. Mittels Hämatoxylin und anschließendem Bläuen unter fließendem Wasser, wurde eine Gegenfärbung der Präparate erreicht.

Die Gewebsschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, der Alkohol mit Xylol ausgewaschen und die Gewebeschnitte mittels Histokitt und Deckgläsern eingedeckelt. Alle Zeitangaben und Substratkonzentrationen sind in den einzelnen Protokollen festgehalten. Die bereits zuvor in der Arbeitsgruppe etablierten Färbeprotokolle sind im Anhang zu finden (siehe XI, 3.3. - 3.8.). Eine Auflistung der verwendeten Primär-, Sekundär-, und Negativ-Kontrollantikörper ist ebenfalls im Anhang zu finden (siehe XI, 3.9. Tabelle 25).

9.4. Histologische Auswertung

Alle Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (LEICA DMIL LED, Leica Camera AG) bei verschiedenen Vergrößerungen (Leica HI Plan I 10x/0.22 Ph1, Leica HI Plan I 20x/0.30 Ph1, Leica HI Plan I 40x/0.50 Ph2, Leica Camera AG) nach einem standardisierten *Score Sheet* anhand der von der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) definierten Kriterien auf Abstoßungsreaktionen hin untersucht und ausgewertet [36, 37] (Tabelle 4, Tabelle 5). Für eine aussagekräftige Beurteilung fordert die ISHLT mindestens je drei Schnittebenen von drei verschiedenen Biopsieorten [37]. In den hier dargestellten Versuchen wurde eine vergleichbar große Gewebsfläche durch die Auswertung der kompletten Flächen von vier Herzquerschnitten erreicht. Das *Score Sheet* kann im Anhang gefunden werden

(siehe XI, 4.1., 4.2.). Alle histologischen Bilder wurden mit einer Mikroskopkamera (LEICA DFC425 C, Leica Camera AG) und der zugehörigen Software (Leica Application Suite V4.5, Leica Camera AG) aufgenommen.

9.4.1. Klassifikation der akuten zellulären Abstoßung

Zur Auswertung der Transplantate auf eine akute zelluläre Abstoßung (ACR) wurden, den Richtlinien der ISHLT entsprechend, HE-gefärbte Präparate herangezogen [37]. Es erfolgte eine Untersuchung auf Kardiomyozytenschäden sowie auf mononukleäre Infiltrate als Kriterien einer ACR. Ferner wurde das Vorhandensein von Gewebsödemen, Einblutungen und Vaskulitis ausgewertet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Grading: Akute zelluläre Abstoßung (R) nach ISHLT 2004 [37]

Grad	Histopathologische Korrelate
0 R	Keine Infiltrate, keine Kardiomyozytenschäden
1 R	Interstitielle und/oder perivaskuläre Infiltrate mit ≤ 1 Kardiomyozytenschadensherd
2 R	≥ 2 Infiltratherde mit assoziierten Kardiomyozytenschäden
3 R	Diffuse Infiltrate mit Kardiomyozytenschäden \pm Gewebsödem \pm Einblutung \pm Vaskulitis

9.4.2. Klassifikation der antikörpervermittelten Abstoßung

Gemäß den Kriterien der ISHLT für die Einteilung der antikörpervermittelten Abstoßung (AMR) (Tabelle 5) werden sowohl histopathologische Kriterien (Tabelle 6) als auch entweder ein immunhistochemischer Nachweis von intrakapillärem CD68 und C4d (Tabelle 7) oder ein Immunfluoreszenz-Nachweis von intrakapillären Immunglobulinen und Komplementablagerungen benötigt [36]. Dementsprechend wurden zusätzlich zu den HE-gefärbten Präparaten, die immunhistochemischen Nachweise von intrakapillärem C4d und Monozyten ausgewertet.

Tabelle 5: Grading: Antikörpervermittelte Abstoßung (pAMR) nach ISHLT 2013 [36]

Grad	Histopathologische/Immunopathologische Korrelate
pAMR 0	Fehlende histopathologische und immunopathologische Kriterien
pAMR 1 (H+)	Fehlende immunopathologische, vorhandene histopathologische Kriterien
pAMR 1 (I+)	Fehlende histopathologische, vorhandene immunopathologische Kriterien
pAMR 2	Vorhandene histopathologische und immunopathologische Kriterien
pAMR 3	Hochgradige histopathologische und immunopathologische Kriterien

Tabelle 6: Histologisch morphologische Kriterien der AMR nach ISHLT 2013 [36]

Kriterium	Histopathologische Korrelate	Ergebnis
Intravaskuläre aktivierte mononukleäre Zellen	<ul style="list-style-type: none"> - Ansammlung von Monozyten in Kapillaren oder Venolen, die die Gefäße ausdehnen oder ausfüllen - großkernige Endothelzellen mit ausgedehntem Zytoplasma, welche die Gefäße einengen oder verschließen 	<p>Negativ: Kein passendes Korrelat</p> <p>Positiv: ≥ 1 passendes Korrelat</p>
Hochgradige antikörper-vermittelte Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> - Einblutungen - Thromben - Kardiomyozytennekrose - Interstitielle Ödeme - gemischte inflammatorische intra-beziehungsweise (bzw.) perivaskuläre Infiltrate - kapilläre Fragmentation - Endotheliale <i>Pyknosis</i> und/oder <i>Karyorrhesis</i> 	<p>Negativ: Kein passendes Korrelat</p> <p>Positiv: ≥ 1 passendes Korrelat</p>

Tabelle 7: Immunhistochemische Kriterien der AMR nach ISHLT 2013 [36]

Kriterium	Einteilungsgrade	Ergebnis
Intrakapilläres C4d	Verteilung: 0: $\leq 10\%$ negativ 1: 10-50 % negativ 2: $< 50\%$ positiv Intensität: 0: kein Nachweis 1: schwacher Nachweis 2: starker Nachweis	Negativ: Verteilungsgrad ≤ 1 Positiv: Verteilungsgrad = 2 und Intensitätsgrad ≥ 1
Intravaskuläre Monozyten (CD68)	Verteilung: 0: $\leq 10\%$ negativ 1: 10-50 % fokal positiv 2: $> 50\%$ multifokal/diffus positiv	Negativ: Verteilungsgrad = 0 Positiv: Verteilungsgrad ≥ 1

9.4.3. Differenzierung lymphozytärer Infiltrate in T- und B-Lymphozyten

Unabhängig von den Klassifikationen der ISHLT wurden die lymphozytären Infiltrate auf ihre Zusammensetzung aus T- und B-Lymphozyten untersucht. Hierzu wurden immunhistochemische Nachweise von CD3 und CD20 erstellt und nach Häufigkeit des Auftretens der unterschiedlichen Lymphozytentypen hin ausgewertet.

10. Statistik

Als Hauptzielgröße wurde das Transplantatüberleben definiert. Sowohl das Studiendesign als auch die Berechnung der Gruppengrößen basierten auf bereits von unserer Arbeitsgruppe an diesem Tiermodell durchgeführten Studien [38]. Unterschiede im Transplantatüberleben wurde durch den Log-Rank-Tests berechnet und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Für das Transplantatüberleben wurden die Mediane und Interquartilsabstände der jeweiligen Gruppen verwendet, wobei ein p-Wert unter 0,05 als signifikant anerkannt wurde. Die Nebenzielgrößen wurden nach Cohen in Form von Effektgrößen (d_{cohen}) und ihren 95 %-Konfidenzintervallen

dargestellt. Numerische Daten wurden mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Unterschiede der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden als standardisierte Mittelwertdifferenzen angegeben. Die als d_{cohen} vorliegenden Ergebnisse wurden in drei Gruppen unterteilt, wobei Werte von $\geq 0,2$ bis $< 0,5$ kleine, $\geq 0,5$ bis $< 0,8$ mittlere und $\geq 0,8$ große Effekte darstellen [39, 40]. Für die statistische Auswertung und die Erstellung von Diagrammen wurden IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, U.S.), GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, U.S.) und Excel 2016 (Microsoft, Redmond, U.S.) genutzt.

11. Materialliste

Eine ausführliche Liste der verwendeten Materialien kann im Anhang gefunden werden (siehe XI, 6. Tabelle 26).

IV. Ergebnisse

1. Transplantatüberleben

In dieser Studie wurde das Transplantatüberleben als Hauptzielgröße definiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei der *cgtx-544*-Gruppe keine signifikante Verlängerung des mittleren Transplantatüberlebens beobachtet werden (Log-Rank-Test 1,0, $p = 0,317$) (Tabelle 8, Abbildung 5).

Tabelle 8: Transplantatüberleben der verschiedenen Versuchsgruppen in Tagen (d) (n = 18)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe
Transplantatüberleben (d)	$6,89 \pm 0,33$	$7,00 \pm 0,00$

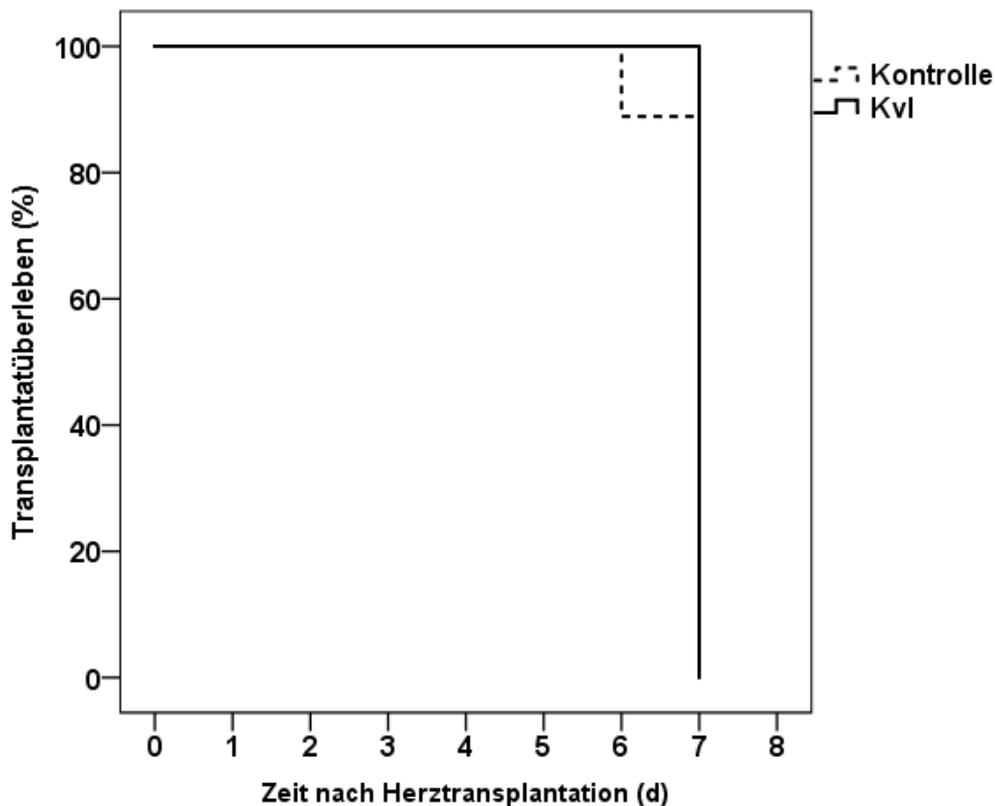


Abbildung 5: Transplantatüberleben in Tagen (d) der Kontrollgruppe und *cgtx-544*-Gruppe (Kv1.3-Inhibitor: KvI), der Log-Rank beträgt 1,0 mit einem $p = 0,317$ (n = 18)

2. Histologische Auswertung der Transplantate

Aufgrund von technischen Problemen während der Organfixierung konnten nur jeweils die Transplantate von sechs Versuchstieren pro Versuchsgruppe ausgewertet werden. Während der Entwässerung in dem Entwässerungsrondell kam es über Nacht zu einem Stromausfall, sodass die Präparate nicht fachgerecht bearbeitet wurden und so für die weitere Verarbeitung unbrauchbar waren.

2.1. HE-Färbung

In den Transplantaten beider Versuchsgruppen stellte sich ein multifokaler bis diffuser hochgradiger Kardiomyozytenschaden dar (Tabelle 9, Abbildung 6). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der *cgtx-544*-Gruppe konnten mittel- sowie hochgradige, gemischte Infiltrate nachgewiesen werden (Tabelle 10, Abbildung 7). Alle Transplantate wiesen eine bandartige Epikarditis auf (Abbildung 8). Des Weiteren zeigten sich in allen Transplantaten Ödeme, Hämorrhagien und perivaskuläre bzw. intravaskuläre Infiltrate (Tabelle 11, Tabelle 12, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 13). In allen Präparaten konnte ein ventrikulärer Abscheidungsthrombus nachgewiesen werden (Abbildung 12).

Tabelle 9: Auftreten von Kardiomyozytenschäden in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Keine	0	0	0
Geringgradig	0	0	0
Mittelgradig	0	0	0
Hochgradig	6	6	12
Gesamt	6	6	12

Tabelle 10: Auftreten von zellulären Infiltraten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
keine	0	0	0
geringgradig	0	0	0
mittelgradig	2	2	4
hochgradig	4	4	8
gesamt	6	6	12

Tabelle 11: Auftreten von interstitiellem Ödem in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Nicht vorhanden	0	0	0
Vorhanden	6	6	12
Gesamt	6	6	12

Tabelle 12: Auftreten von Hämorrhagien in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Nicht vorhanden	0	0	0
Vorhanden	6	6	12
Gesamt	6	6	12

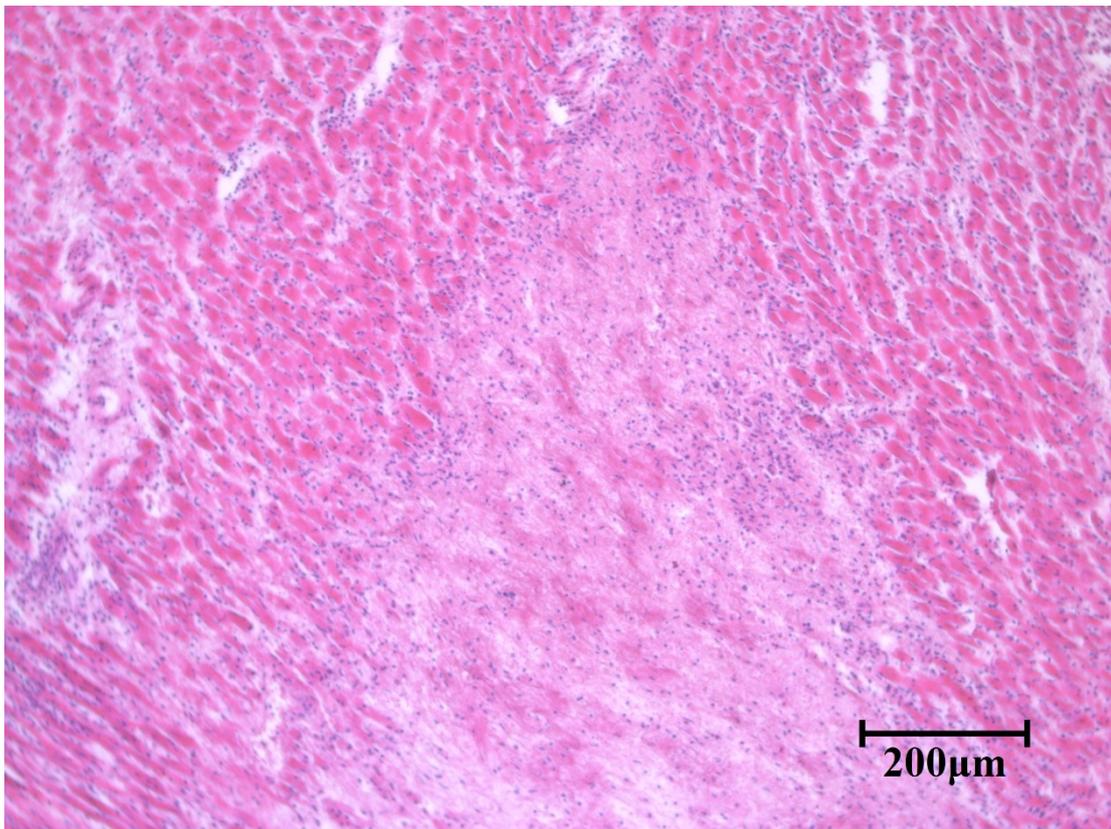


Abbildung 6: Großflächiger Kardiomyozytenschaden in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

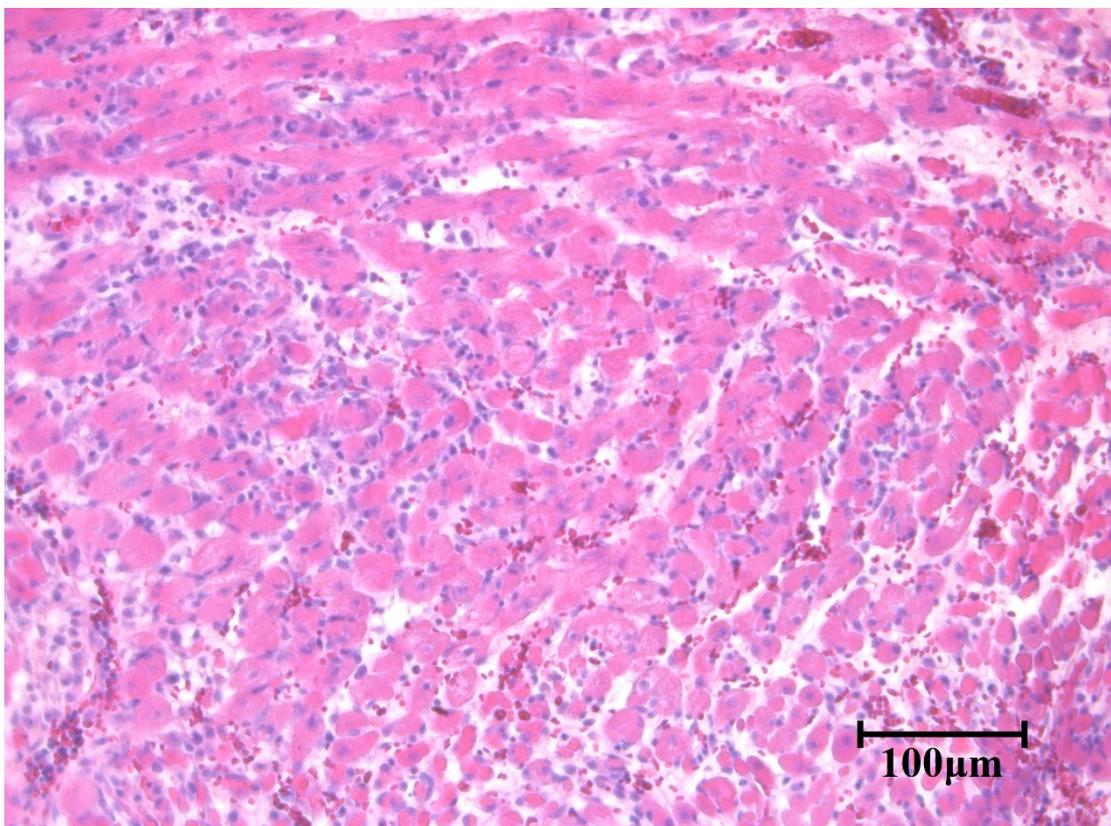


Abbildung 7: Gemischtzellige Infiltrate in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung)

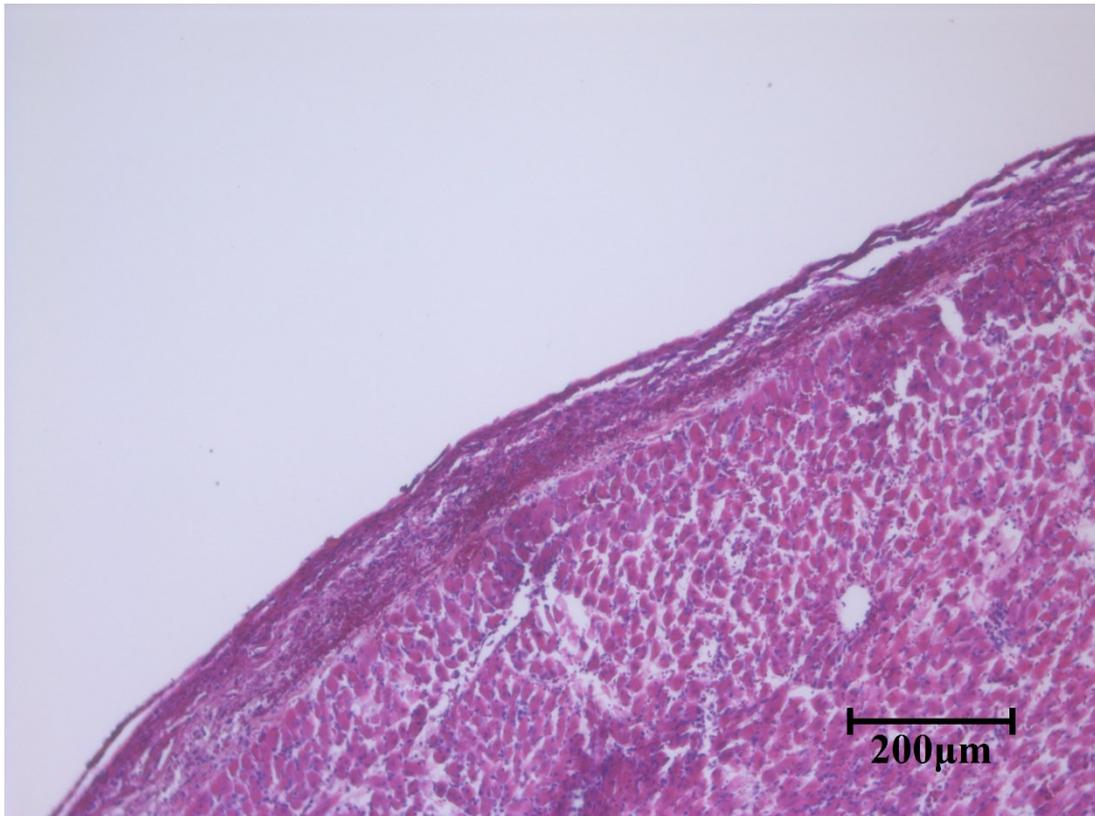


Abbildung 8: Gemischtzellige, bandförmige Epikarditis in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

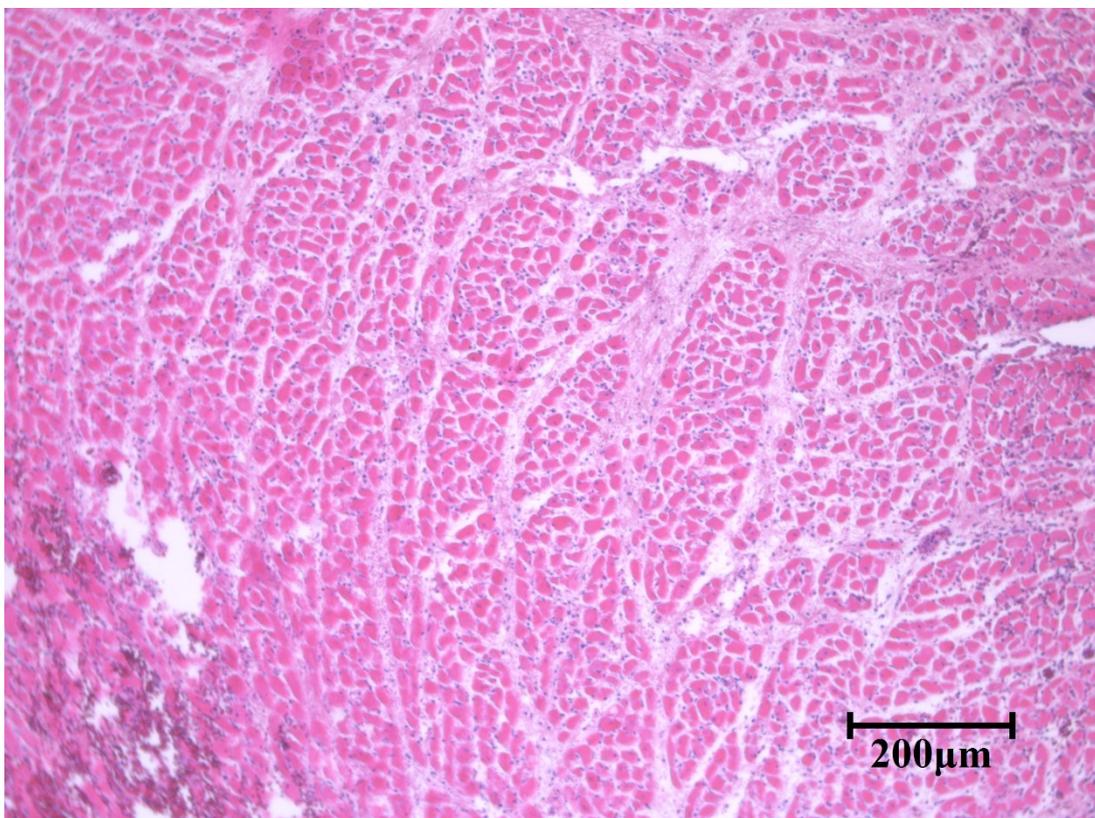


Abbildung 9: Interstitielles Ödem in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

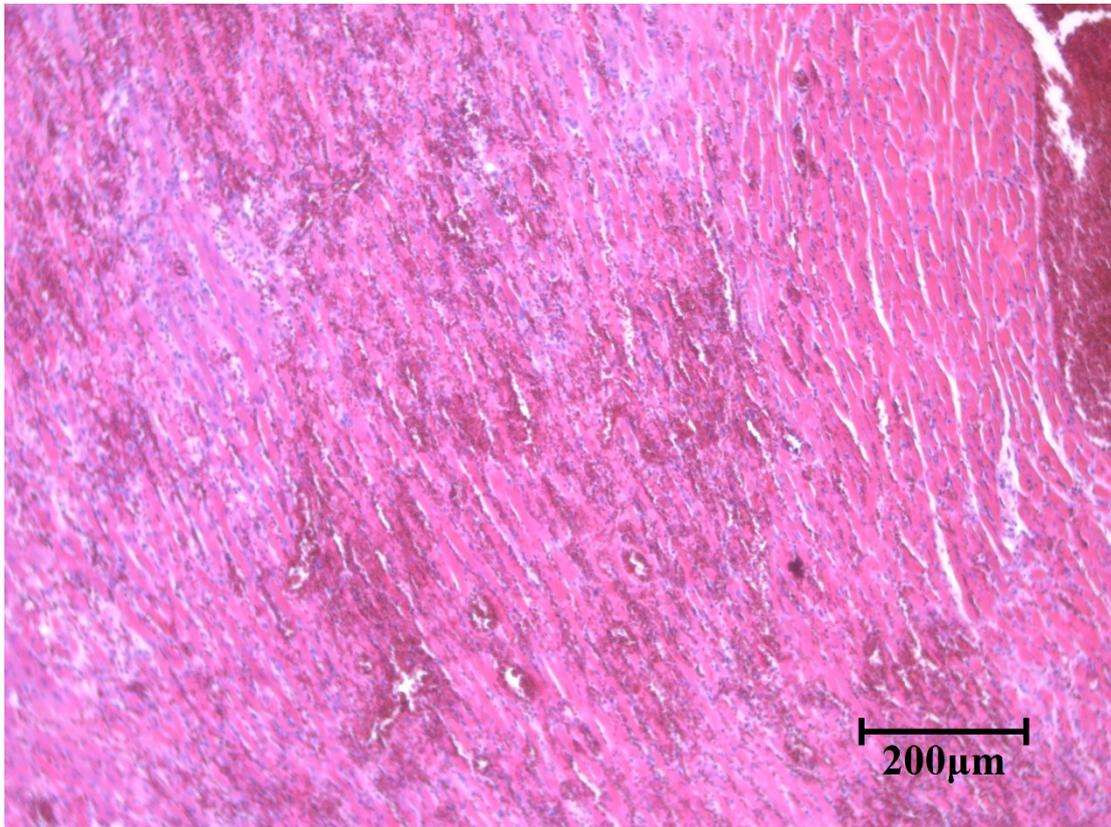


Abbildung 10: Massive Hämorrhagien in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

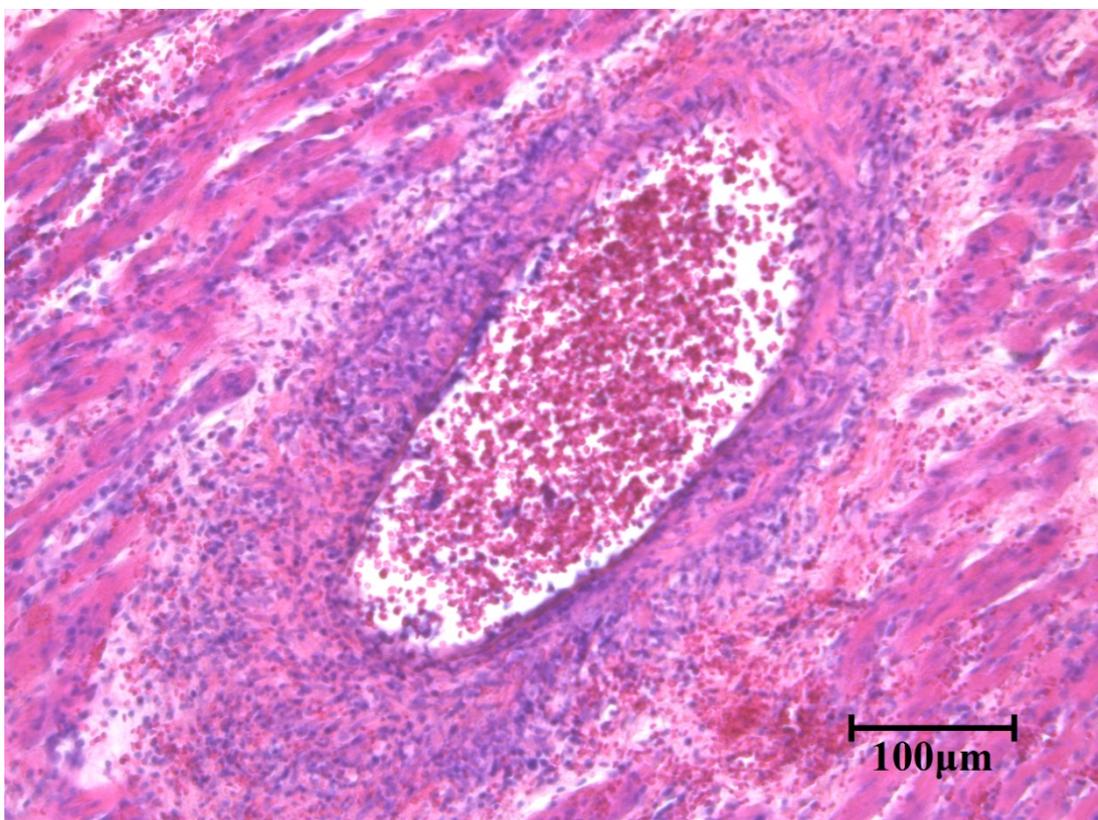


Abbildung 11: Perivaskulärer Infiltrate in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung)

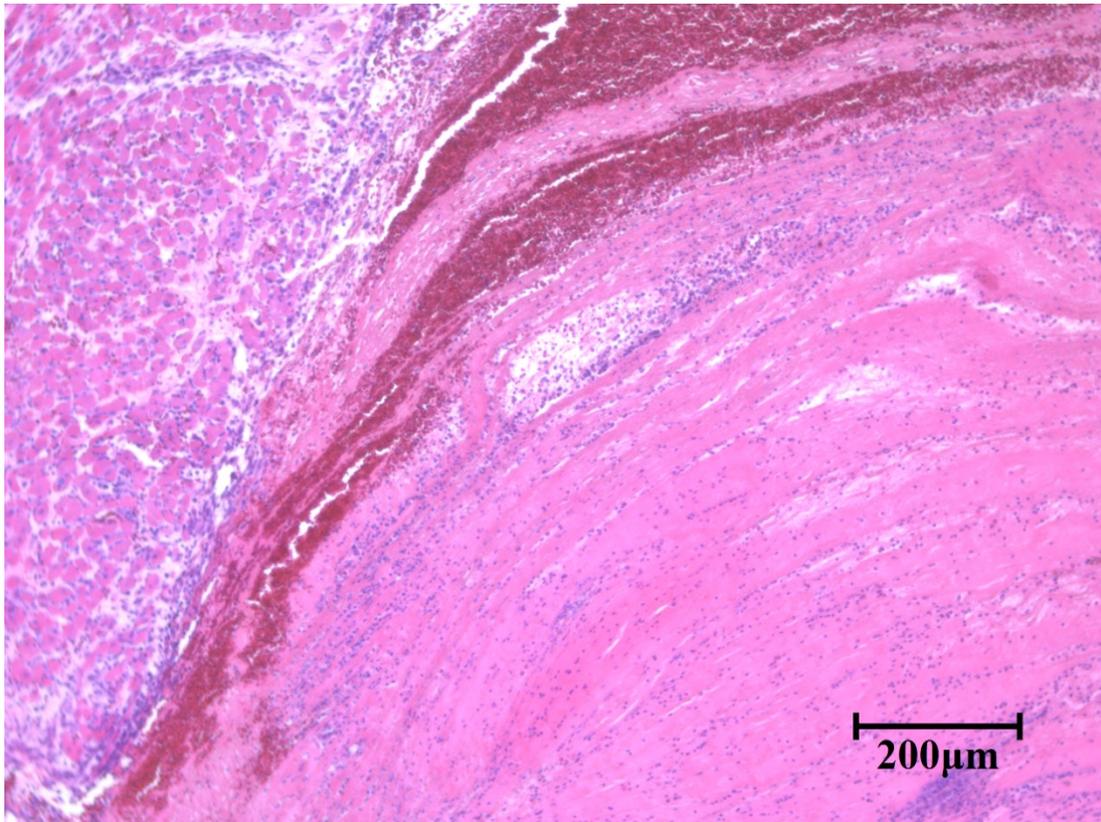


Abbildung 12: Linksventrikulärer Abscheidungsthrombus in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

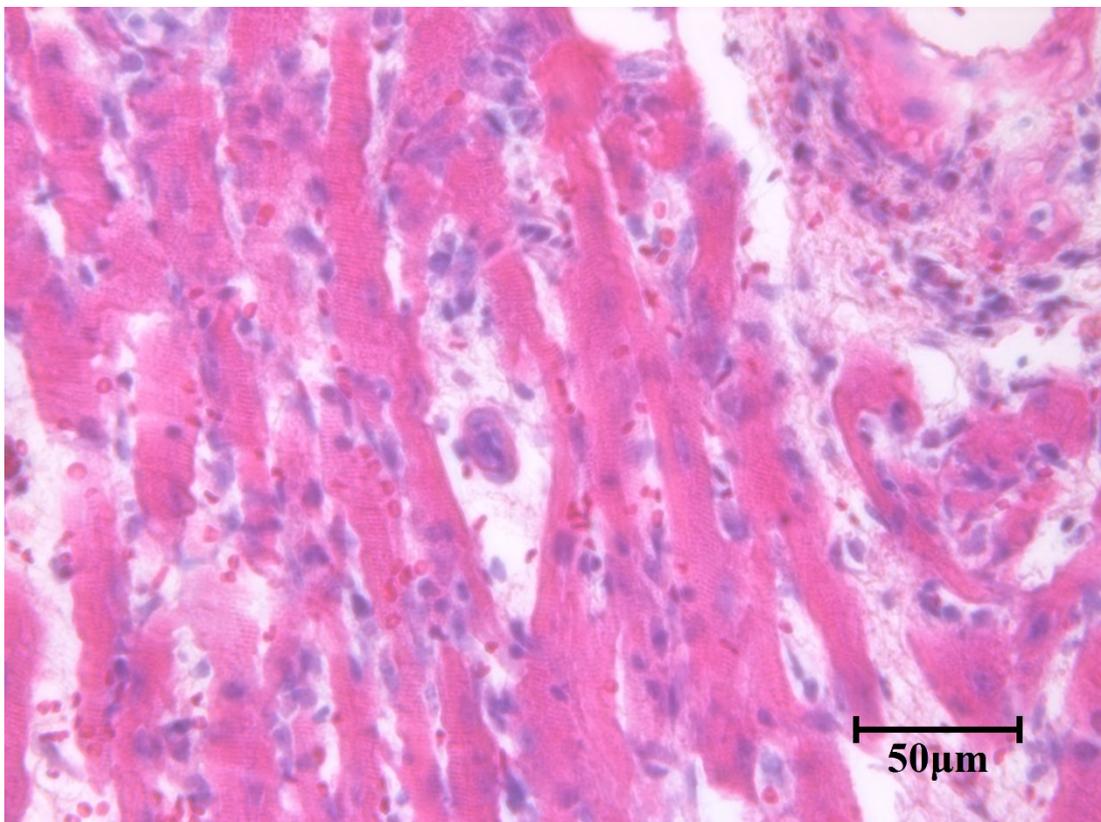


Abbildung 13: Intravaskuläre Ansammlung von mononukleären Zellen in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)

2.2. Immunhistochemischer Nachweis von T-Lymphozyten anhand von CD3

In allen Transplantaten der Kontrollgruppe konnten massenhaft T-Lymphozyten nachgewiesen werden. In der *cgtx-544*-Gruppe hingegen zeigten sich in zwei Transplantaten viele und in vier Transplantaten massenhaft T-Lymphozyten (Tabelle 13, Abbildung 14).

Tabelle 13: Verteilung von T-Lymphozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Keine	0	0	0
Wenige	0	0	0
Viele	0	2	2
Massenhaft	6	4	10
Gesamt	6	6	12

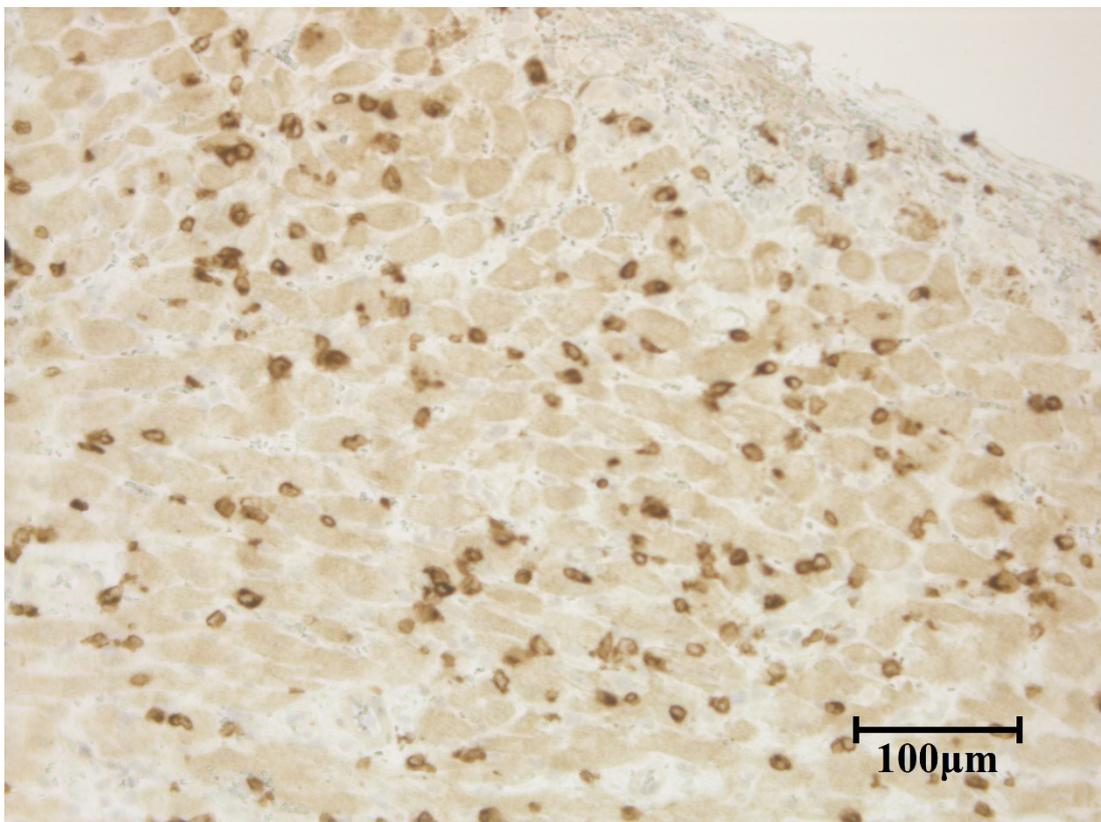


Abbildung 14: Interstitielle T-Lymphozyten in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (CD3-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung)

2.3. Immunhistochemischer Nachweis von B-Lymphozyten anhand von CD20

B-Lymphozyten zeigten sich im Vergleich zu T-Lymphozyten in einer deutlich geringeren Anzahl. In der Kontrollgruppe konnten drei Transplantate mit vereinzelt und drei Transplantate mit wenigen B-Lymphozyten beobachtet werden. In der *cgtx-544*-Gruppe konnte bei den Transplantaten von vier Tieren vereinzelt und bei zwei Transplantaten wenige B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Tabelle 14, Abbildung 15).

Tabelle 14: Verteilung von B-Lymphozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Keine	0	0	0
Vereinzelt	3	4	7
Wenige	3	2	5
Viele	0	0	0
Gesamt	6	6	12

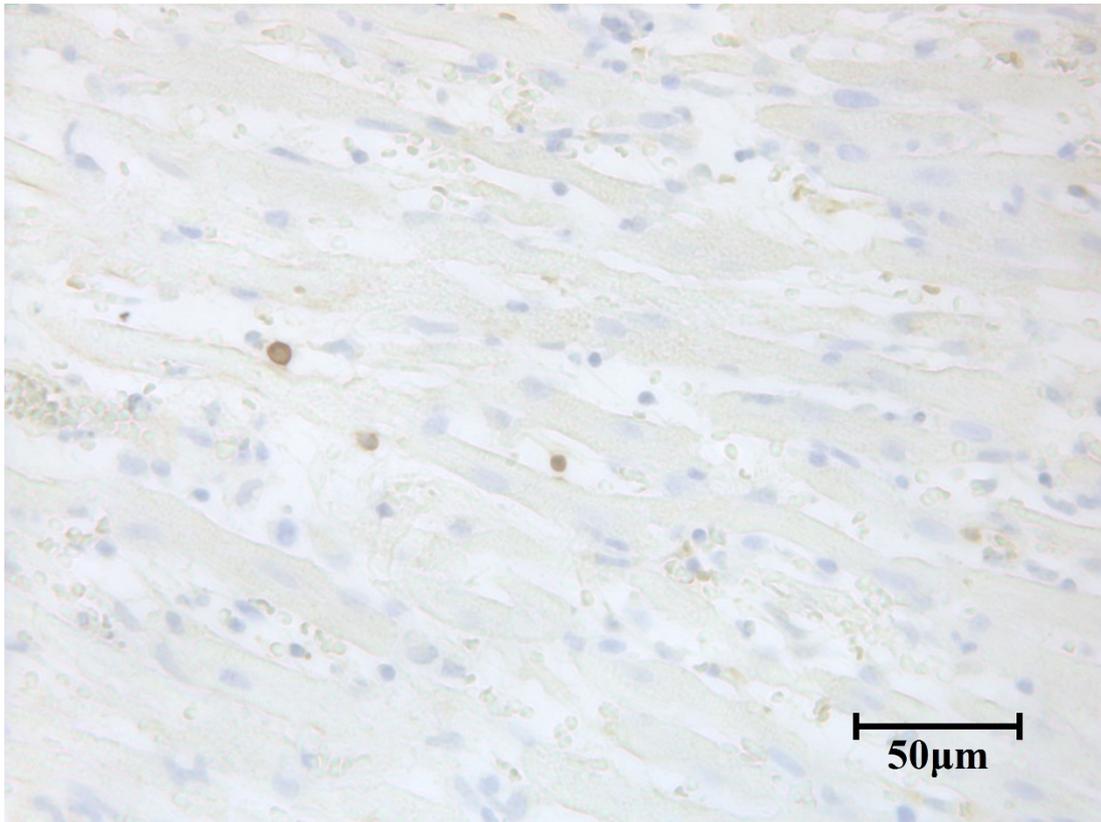


Abbildung 15: Vereinzelt interstitielle B-Lymphozyten in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (CD20-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)

2.4. Immunhistochemischer Nachweis von intravaskulären Monozyten anhand von CD68

Sowohl in den Transplantaten der Kontrollgruppe als auch in denen der *cgtx-544*-Gruppe ließen sich intravaskuläre Monozyten nachweisen. In beiden Gruppen waren in jeweils zwei Transplantaten fokal Monozyten nachweisbar. Innerhalb der restlichen Transplantate war eine multifokale bzw. diffuse Verteilung von Monozyten nachweisbar (Tabelle 15, Abbildung 16).

Tabelle 15: Auftreten von intravasalen Monozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
< 10 % negativ	0	0	0
10 %-50 % fokal	2	2	4
> 50 % multifokal/diffus	4	4	8
Gesamt	6	6	12

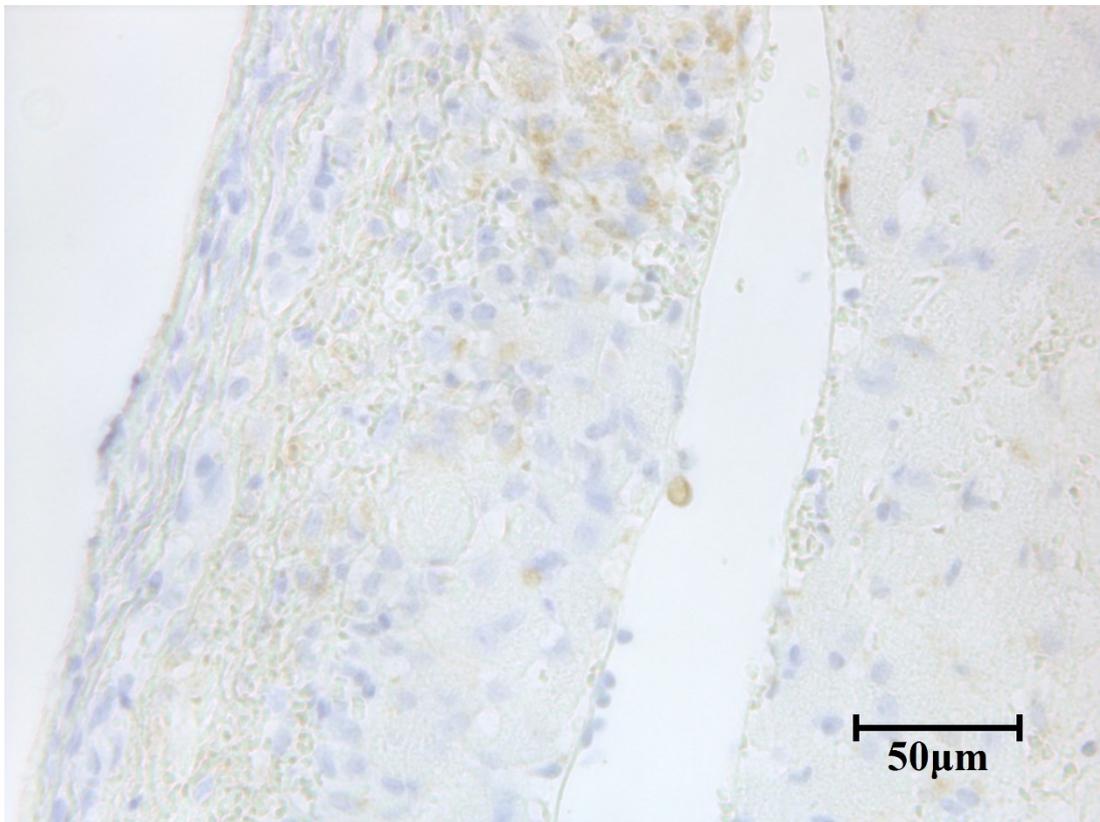


Abbildung 16: Vereinzelter intravasaler Makrophage in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (CD68-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)

2.5. Immunhistochemischer Nachweis der Aktivierung des Komplementsystems anhand von C4d

In allen Transplantaten konnte eine diffuse Verteilung von C4d in über 50 % des untersuchten Gewebes nachgewiesen werden (Tabelle 16, Abbildung 17). Alle Transplantate der Kontrollgruppe und fünf Transplantate der *cgtx-544*-Gruppe wiesen

eine starke Signalintensität auf. Ein Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe zeigte eine schwache Signalintensität (Tabelle 17).

Tabelle 16: Verteilung von C4d in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

Verteilung	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
< 10 %	0	0	0
10 %-50 %	0	0	0
> 50 %	6	6	12
Gesamt	6	6	12

Tabelle 17: Intensität des C4d-Nachweises in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

Signalintensität	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Nicht angefärbt	0	0	0
Schwach angefärbt	0	1	1
Stark angefärbt	6	5	11
Gesamt	6	6	12

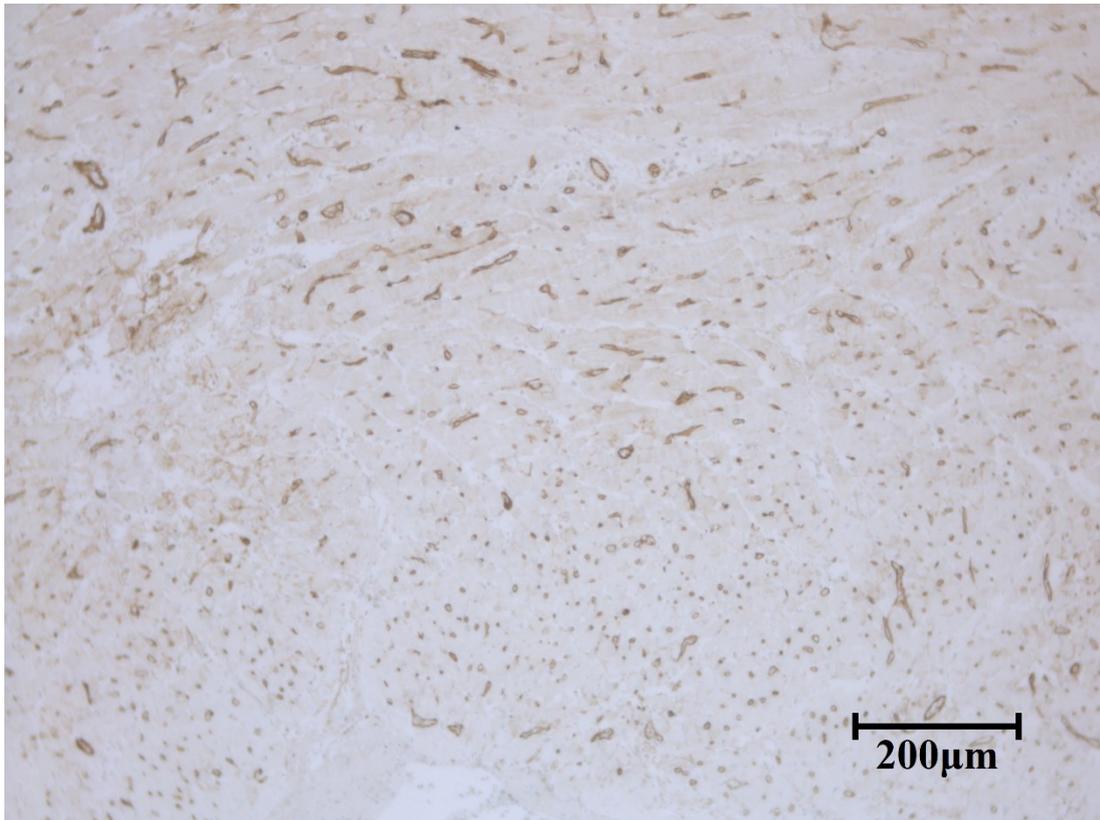


Abbildung 17: Kapilläre C4d-Ablagerungen in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (C4d-Immunhistochemie, 100-fache Vergrößerung)

2.6. Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin

In allen Transplantaten konnten Thromben in Venolen und Kapillaren nachgewiesen werden (Tabelle 18, Abbildung 18). Des Weiteren konnte in allen Transplantaten diffuse Fibrinexsudationen und epikardiale Fibrinbeläge nachgewiesen werden (Abbildung 19, Abbildung 20).

Tabelle 18: Auftreten von Thromben in Venolen und Kapillaren in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Nicht vorhanden	0	0	0
Vorhanden	6	6	12
Gesamt	6	6	12

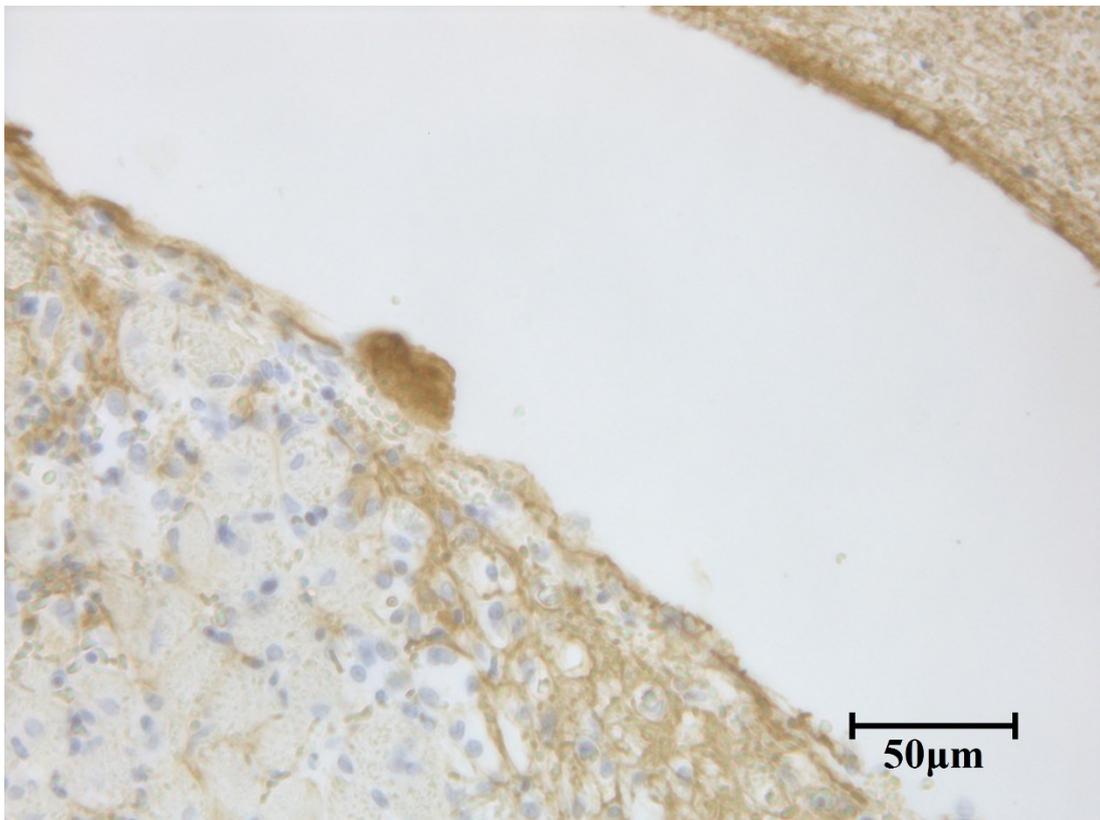


Abbildung 18: Intravasaler Thrombus in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)

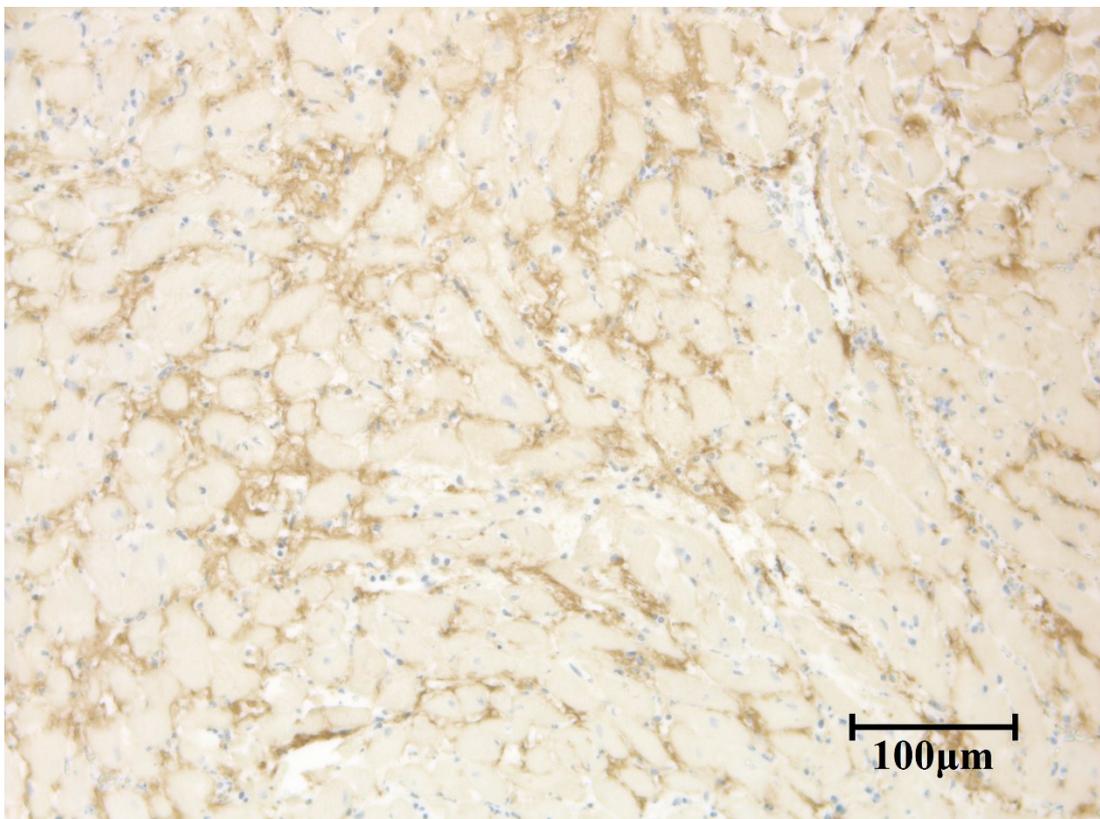


Abbildung 19: Diffuse interstitielle Fibrinexsudation in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung)

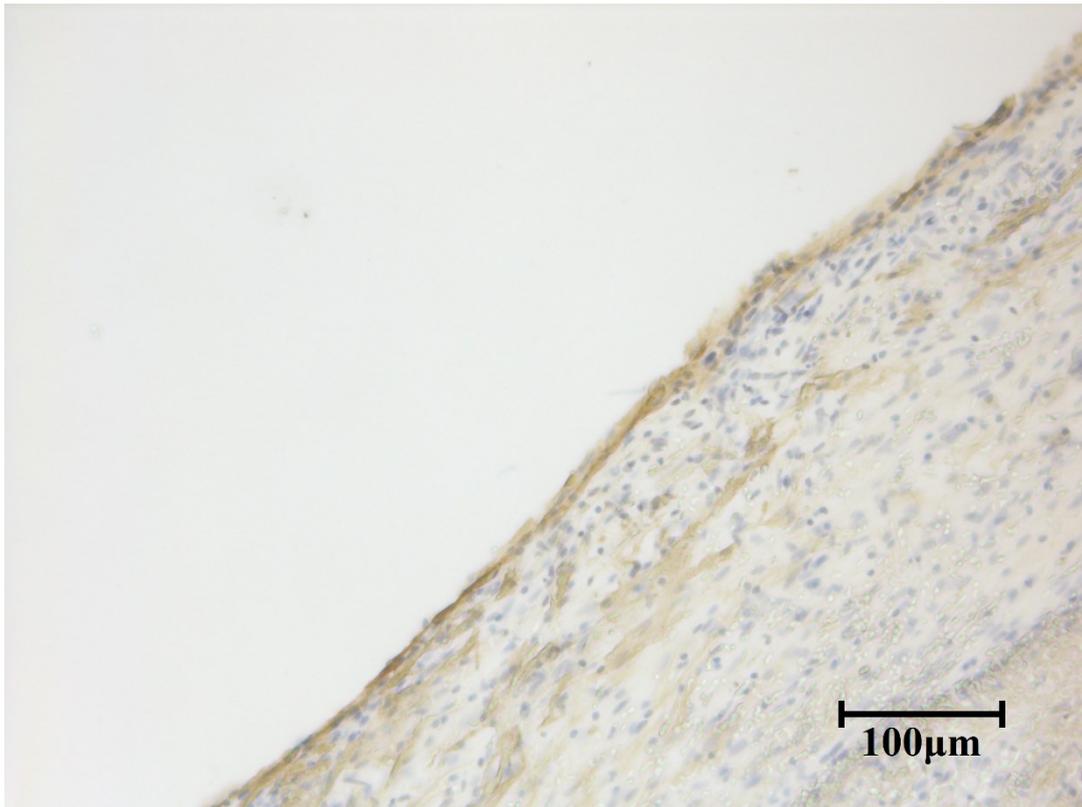


Abbildung 20: Epikardialer Fibrinbelag in einem Transplantat der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung)

2.7 Akute zelluläre Abstoßung

Anhand der in der HE-Färbung untersuchten Kriterien der ISHLT (Tabelle 5) konnte in allen Transplantaten beider Versuchsgruppen eine hochgradige, akute zelluläre Abstoßung (Grad 3) nachgewiesen werden (Tabelle 219).

Tabelle 19: Einteilung der akuten zellulären Abstoßung (R) der Transplantate beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens nach den Kriterien der ISHLT (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
Grad 0 R	0	0	0
Grad 1 R, geringgradig	0	0	0
Grad 2 R, mittelgradig	0	0	0
Grad 3 R, hochgradig	6	6	12
Gesamt	6	6	12

2.8. Antikörpervermittelte Abstoßung

Mittels der durchgeführten histologischen und immunhistologischen Untersuchungen konnten alle untersuchten Transplantate der nach ISHLT klassifizierten hochgradig pathologischen antikörpervermittelten Abstoßung (Grad 3) zugeordnet werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Einteilung der antikörpervermittelten Abstoßung (pAMR) der Transplantate beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens nach den Kriterien der ISHLT, Nachweis in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H+), Nachweis in der immunhistologischen Untersuchung (I+) (n = 12)

	Kontrollgruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe	Gesamt
pAMR 0	0	0	0
pAMR 1 (H+)	0	0	0
pAMR 1 (I+)	0	0	0
pAMR 2	0	0	0
pAMR 3	6	6	12
Gesamt	6	6	12

3. Auswertung der Serumchemie

3.1. Auswertung des Troponin I-Serumspiegels

Am Tag des Transplantatversagens war der Troponin I-Serumspiegel der *cgtx-544*-Gruppe im Durchschnitt 19 % höher als der der Kontrollgruppe ($11,53 \pm 3,37$ ng/ml gegenüber $9,65 \pm 3,00$ ng/ml). Dies entspricht einem mittleren Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = 0,59$, 95 % CI -0,38 bis 1,50) (Abbildung 21).

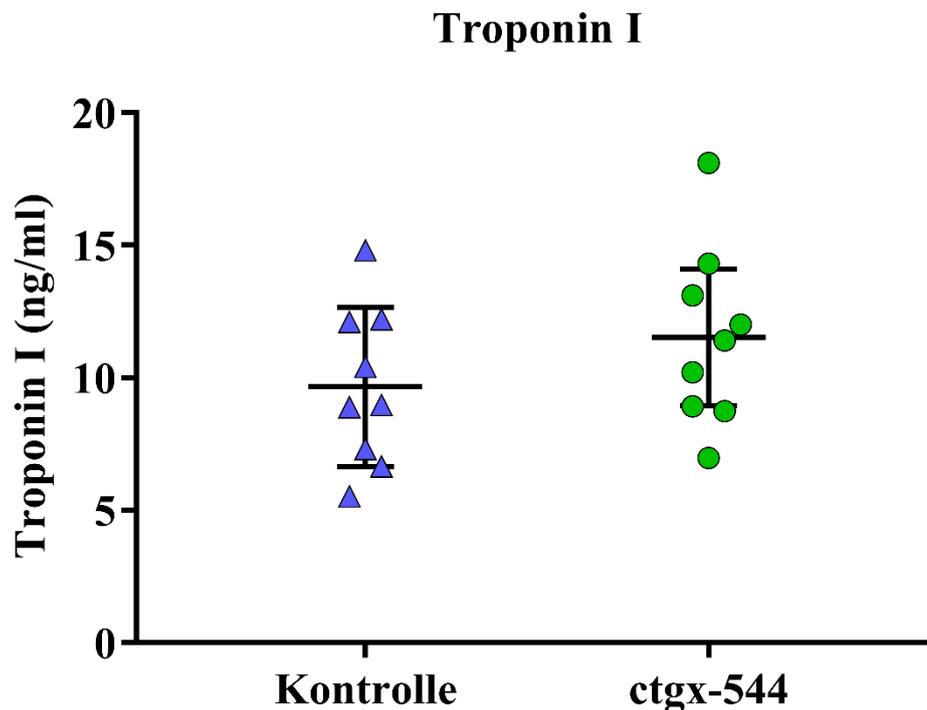


Abbildung 21: Troponin I-Serumspiegel im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 18)

3.2. Auswertung des LDH-Serumspiegels

Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag der mittlere LDH-Wert der *cgtx-544*-Gruppe am Tag des Transplantatversagens durchschnittlich 16 % höher ($1401,44 \pm 743,73$ U/l gegenüber $1203 \pm 545,67$ U/l). Dies entspricht einem kleinen Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = 0,30$, 95 % CI -0,64 bis 1,22).

3.3 Auswertung von GPT- und Kreatinin-Serumspiegel

Der Kreatinin-Serumspiegel wurde am Tag des Transplantatversagens in der *cgtx-544*-Gruppe 3 % höher gemessen als in der Kontrollgruppe ($0,39 \pm 0,11$ mg/dl gegenüber $0,38 \pm 0,04$ mg/dl).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag der finale GPT-Serumspiegel bei der *cgtx-544*-Gruppe 1% höher ($51,89 \pm 14,27$ U/l gegenüber $51,22 \pm 11,70$ U/l).

Somit konnte sowohl bei den Kreatinin- als auch den GPT-Werten der *cgtx-544*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Effekt nach Cohen nachgewiesen werden (Kreatinin: $d_{\text{Cohen}} = 0,14$, 95 % CI -0,79 bis 1,06; GPT: $d_{\text{Cohen}} = 0,05$, 95 % CI -0,88 bis 0,97).

4. Auswertung der hämatologischen Untersuchungen

Von allen Tieren wurde am Tag des Transplantatversagens Blut für hämatologische Untersuchungen entnommen. Aufgrund einer vorzeitigen Gerinnung einer Probe konnte in der *cgtx-544*-Gruppe nur das Blut von acht Empfängertieren untersucht werden. In der Kontrollgruppe konnte das Blut aller neun Empfängertiere verwendet werden. Des Weiteren konnte in der *cgtx-544*-Gruppe aufgrund einer apparativen Fehlmessung eines der acht Versuchstiere hinsichtlich der Zahl der neutrophilen Granulozyten nicht ausgewertet werden. Infolgedessen waren auch die absolute Zahl der Leukozyten und die relativen Anzahlen der unterschiedlichen Leukozytentypen für dieses Versuchstier nicht auswertbar.

4.1. Auswertung der Erythrozytenzahl

Am Tag des Transplantatversagens lag die durchschnittliche Zahl der Erythrozyten im Blut der Tiere der Kontrollgruppe 2 % höher als die der *ctgx-544*-Gruppe ($8,35 \pm 0,76$ M/ μ l gegenüber $8,51 \pm 0,66$ M/ μ l). Dies entspricht einem kleinen Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = -0,22$, 95 % CI $-0,74$ bis $1,17$) (Abbildung 22, Tabelle 21).

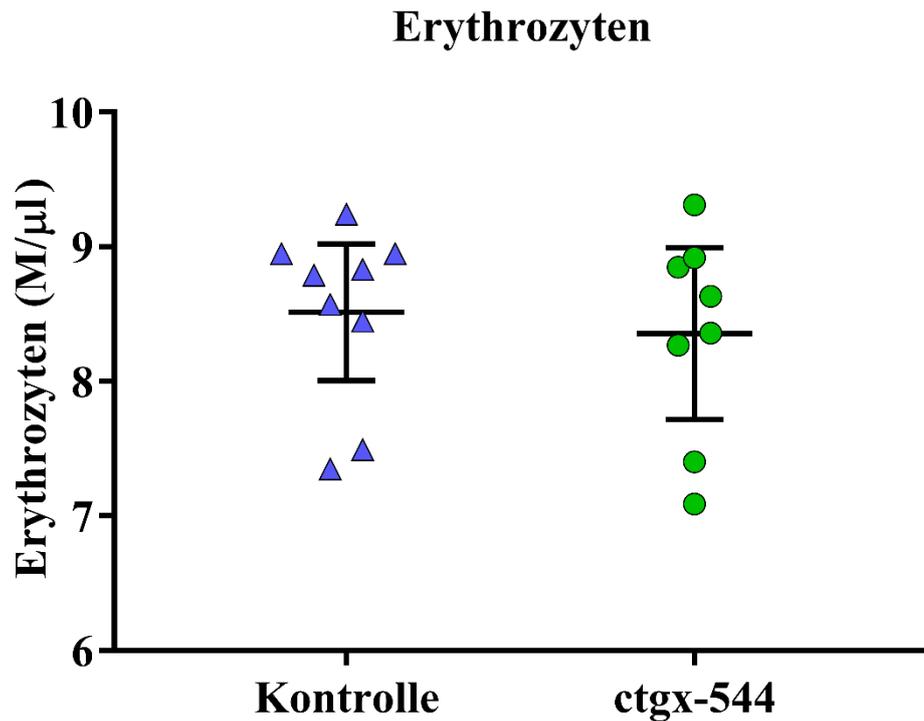


Abbildung 22: Erythrozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)

4.2. Auswertung der Thrombozytenzahl

Die mittlere Anzahl der Thrombozyten im Blut der Empfängertiere der *ctgx-544*-Gruppe lag im Vergleich zur Kontrollgruppe 9 % höher ($552,12 \pm 90,95$ k/ μ l gegenüber $506,33 \pm 152,94$ k/ μ l). Dieser Unterschied entspricht einem kleinen Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = 0,36$, 95 % CI -0,62 bis 1,30) (Abbildung 23, Tabelle 21).

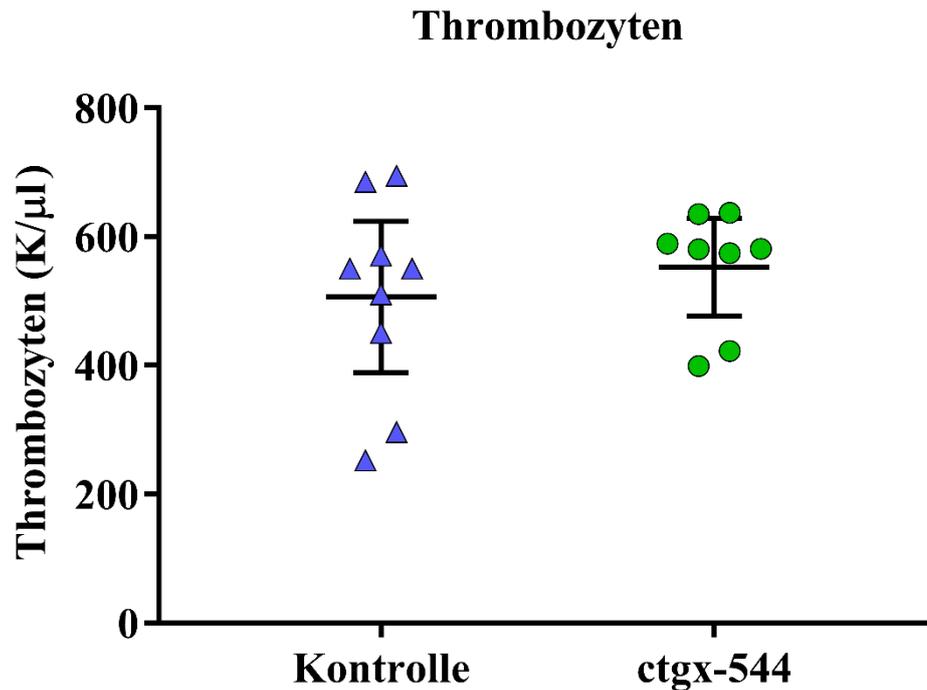


Abbildung 23: Thrombozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)

4.3. Auswertung der Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahlen im Blut der *ctgx-544*-Gruppe lag am Tag des Transplantatversagens im Vergleich zur Kontrollgruppe 13 % höher ($19,98 \pm 3,80$ k/ μ l gegenüber $17,62 \pm 4,76$ k/ μ l). Dies entspricht einem mittleren Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = 0,54$, 95 % CI -0,49 bis 1,51) (Abbildung 24, Tabelle 21).

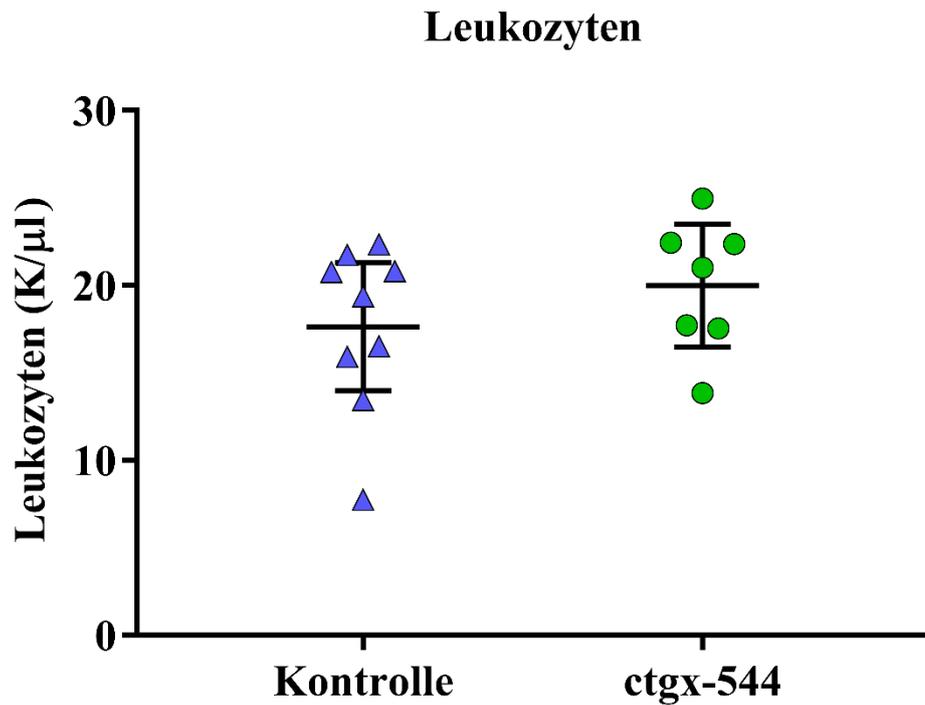


Abbildung 24: Leukozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 16)

4.4. Auswertung der Lymphozytenzahl

Die Lymphozytenzahlen im Blut der Kontroll- und der *ctgx-544*-Gruppe unterschieden sich am Tag des Transplantatversagens nicht ($11,21 \pm 3,39$ k/ μ l gegenüber $11,20 \pm 3,34$ k/ μ l). Dies entspricht keinem Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = 0,00$, 95 % CI -0,95 bis 0,95) (Abbildung 25, Tabelle 22).

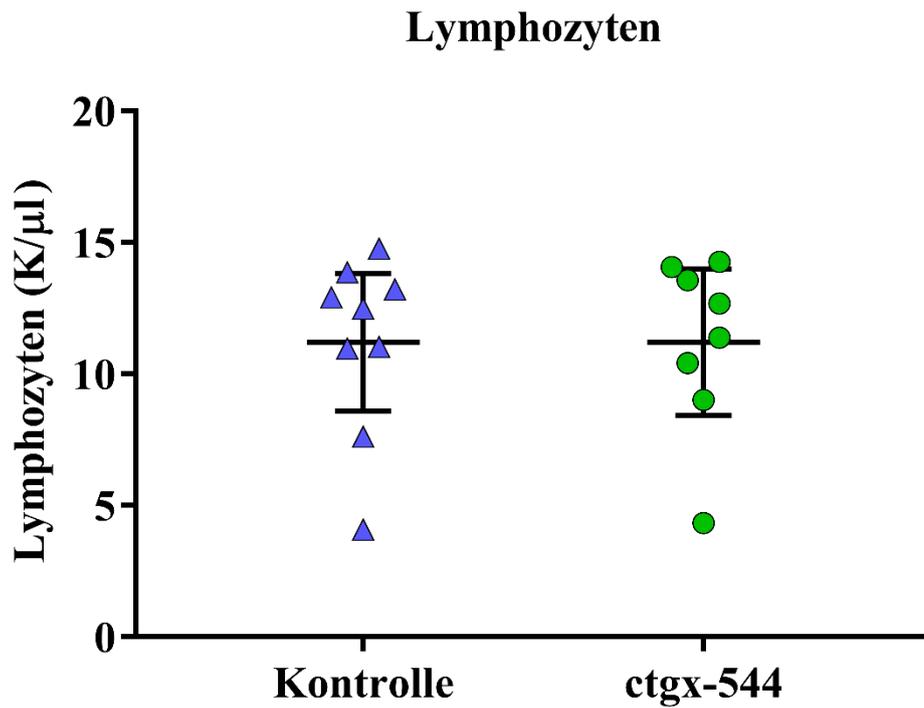


Abbildung 25: Lymphozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)

Tabelle 21: „Kleines Blutbild“ beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17; für Leukozyten n = 16)

	Kontroll- gruppe	cgtx-544- Gruppe	Effekt-Size nach Cohen / 95 % CI
Erythrozyten (M/μl)	8,51 \pm 0,66	8,35 \pm 0,76	d _{Cohen} = -0,22 95 % CI -1,17 bis 0,74
Hämoglobin (g/dl)	13,78 \pm 1,02	13,38 \pm 1,19	d _{Cohen} = -0,36 95 % CI -1,31 bis 0,61
Hämatokrit (%)	41,41 \pm 2,51	39,49 \pm 3,63	d _{Cohen} = -0,62 95 % CI -1,56 bis 0,38
Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) (fl)	48,71 \pm 1,32	47,28 \pm 1,10	d _{Cohen} = -1,18 95 % CI -2,14 bis -0,09
Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) (pg)	16,19 \pm 0,25	16,00 \pm 0,23	d _{Cohen} = -0,78 95 % CI -1,72 bis 0,25
Mittlere korpuskuläre Hämoglobin- Konzentration (MCHC) (g/dl)	33,24 \pm 0,67	33,88 \pm 0,54	d _{Cohen} = 1,03 95 % CI -0,03 bis 1,99
Retikulozyten (k/μl)	351,93 \pm 124,16	316,25 \pm 75,27	d _{Cohen} = -0,34 95 % CI -1,28 bis 0,63
Retikulozyten (%)	4,25 \pm 1,86	3,85 \pm 1,14	d _{Cohen} = -0,25 95 % CI -1,20 bis 0,71
Thrombozyten (k/μl)	506,33 \pm 152,94	552,12 \pm 90,95	d _{Cohen} = 0,36 95 % CI -0,62 bis 1,30
Leukozyten (k/μl)	17,62 \pm 4,76	19,98 \pm 3,80	d _{Cohen} = 0,54 95 % CI -0,49 bis 1,51

Tabelle 22: Differenzialblutbild beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17; für die absolute Anzahl an neutrophilen Granulozyten und alle prozentualen Zahlenangaben n = 16)

	Kontroll- gruppe	cgtx-544- Gruppe	Effekt-Size nach Cohen / 95 % CI
Lymphozyten (k/μl)	11,21 ± 3,39	11,20 ± 3,34	d _{Cohen} = 0,00 95 % CI -0,95 bis 0,95
Monozyten (k/μl)	2,01 ± 0,65	2,49 ± 1,01	d _{Cohen} = 0,57 95 % CI -0,43 bis 1,51
Neutrophile Granulozyten (k/μl)	4,25 ± 1,47	5,01 ± 1,96	d _{Cohen} = 0,45 95 % CI -0,58 bis 1,42
Basophile Granulozyten (k/μl)	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	d _{Cohen} = -0,16 95 % CI -1,11 bis 0,80
Eosinophile Granulozyten (k/μl)	0,12 ± 0,05	0,16 ± 0,23	d _{Cohen} = 0,24 95 % CI -0,73 bis 1,18
Lymphozyten (%)	62,96 ± 7,70	61,76 ± 8,16	d _{Cohen} = -0,15 95 % CI -1,16 bis 0,85
Monozyten (%)	11,36 ± 1,34	12,79 ± 3,97	d _{Cohen} = 0,51 95 % CI -0,52 bis 1,49
Neutrophile Granulozyten (%)	24,8 ± 7,19	24,47 ± 5,55	d _{Cohen} = -0,05 95 % CI -1,04 bis 0,94
Basophile Granulozyten (%)	0,73 ± 0,29	0,84 ± 1,05	d _{Cohen} = -0,14 95 % CI -1,12 bis 0,86
Eosinophile Granulozyten (%)	0,16 ± 0,09	0,14 ± 0,10	d _{Cohen} = 0,15 95 % CI -0,84 bis 1,13

5. Auswertung der Zytokine

Für die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL17A, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α konnten alle Versuchstiere beider Versuchsgruppen ausgewertet werden. Bei der Bestimmung von IL-12p40 konnten aufgrund von z. T. extrapolierten Messwerten nur fünf Versuchstiere der Kontrollgruppe und vier Versuchstiere der *cgtx-544*-Gruppe ausgewertet werden. Die durchschnittlichen Messwerte aller Zytokine waren in der *cgtx-544*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger. Hierbei zeigten die meisten Werte einen großen, jedoch alle Messwerte mindestens einen kleinen Effekt nach Cohen (Tabelle 23, Abbildung 29 bis Abbildung 39).

Tabelle 23: Ergebnisse der Zytokinmessung beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (für IL-12p40 n = 9, für alle anderen Zytokine n = 18)

	Kontroll-Gruppe	cgtx-544-Gruppe	Relativer Unterschied / Effekt-Size / 95 % CI
IL-1α	663,90 ± 107,27pg/ml	562,25 ± 149,70pg/ml	-18 % / d _{Cohen} = -0,78 95 % CI -1,70 bis 0,21
IL-1β	1974,66 ± 154,00pg/ml	1606,27 ± 430,25pg/ml	-23 % / d _{Cohen} = -1,14 95 % CI -2,08 bis -0,10
IL-2	3054,63 ± 311,54pg/ml	2636,42 ± 411,02pg/ml	-16 % / d _{Cohen} = -1,15 95 % CI -2,08 bis -0,10
IL-4	170,25 ± 32,71pg/ml	136,09 ± 34,97pg/ml	-25 % / d _{Cohen} = -1,01 95 % CI -1,94 bis 0,02
IL-5	1750,27 ± 54,54pg/ml	1544,90 ± 224,17pg/ml	-13 % / d _{Cohen} = -1,26 95 % CI -2,20 bis -0,20
IL-6	2179,48 ± 488,09pg/ml	1868,34 ± 590,59pg/ml	-17 % / d _{Cohen} = -0,57 95 % CI -1,49 bis 0,39
IL-10	3653,59 ± 414,48pg/ml	3012,69 ± 700,97pg/ml	-21 % / d _{Cohen} = -1,11 95 % CI -2,05 bis -0,07
IL-12p40	11,24 ± 4,03pg/ml	9,53 ± 3,44pg/ml	-18 % / d _{Cohen} = -0,45 95 % CI -1,73 bis 0,93
IL-12p70	994,27 ± 76,82pg/ml	772,11 ± 204,06pg/ml	-29 % / d _{Cohen} = -1,44 95 % CI -2,40 bis -0,35
IL-13	494,80 ± 49,09pg/ml	398,25 ± 116,81pg/ml	-24 % / d _{Cohen} = -1,08 95 % CI -2,01 bis -0,04
IL-17A	435,29 ± 39,10pg/ml	387,81 ± 68,41pg/ml	-12 % / d _{Cohen} = -0,85 95 % CI -1,77 bis 0,15
GM-CSF	1254,07 ± 196,48pg/ml	1012,26 ± 303,35pg/ml	-24 % / d _{Cohen} = -0,95 95 % CI -1,87 bis 0,07
IFN-γ	2435,85 ± 530,19pg/ml	2091,48 ± 629,32pg/ml	-16 % / d _{Cohen} = -0,59 95 % CI -1,51 bis 0,38
TNF-α	1233,33 ± 208,88pg/ml	1031,91 ± 304,09pg/ml	-20 % / d _{Cohen} = -0,77 95 % CI -1,69 bis 0,22

5.1. Auswertung der von T_{EM}-Lymphozyten produzierten Zytokine

IL-4 und IL-5 sowie Interferon- γ sind Zytokine, welche unter anderem von aktivierten T_{EM}-Lymphozyten ausgeschüttet werden. Sie zeigten sich in der *ctgx-544*-Gruppe erniedrigt.

5.1.1. Auswertung von Interleukin-4

Am Tag des Transplantatversagens war der durchschnittliche IL-4-Wert der *ctgx-544*-Gruppe 25 % niedriger als der der Kontrollgruppe ($136,09 \pm 34,97$ pg/ml gegenüber $170,25 \pm 32,71$ pg/ml). Dies entspricht einem großen Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = -1,01$, 95 % CI -1,94 bis 0,02) (Abbildung 26).

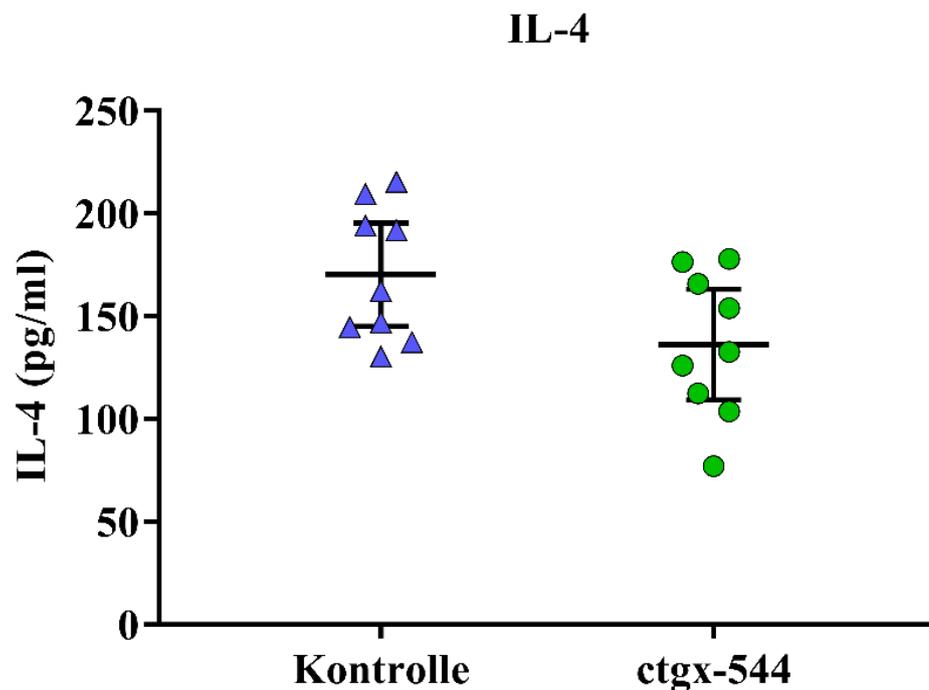


Abbildung 26: IL-4-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($170,25 \pm 32,71$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($136,09 \pm 34,97$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,01$, 95 % CI -1,94 bis -0,02) ($n = 18$)

5.1.2. Auswertung von Interleukin-5

Bei der IL-5-Messung lag der durchschnittliche Wert in der *ctgx-544*-Gruppe 13 % niedriger als in der Kontrollgruppe ($1544,90 \pm 224,17$ pg/ml gegenüber $1750,27 \pm 54,54$ pg/ml). Dies entspricht einem großen Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = -1,26$, 95 % CI $-2,20$ bis $-0,20$) (Abbildung 27).

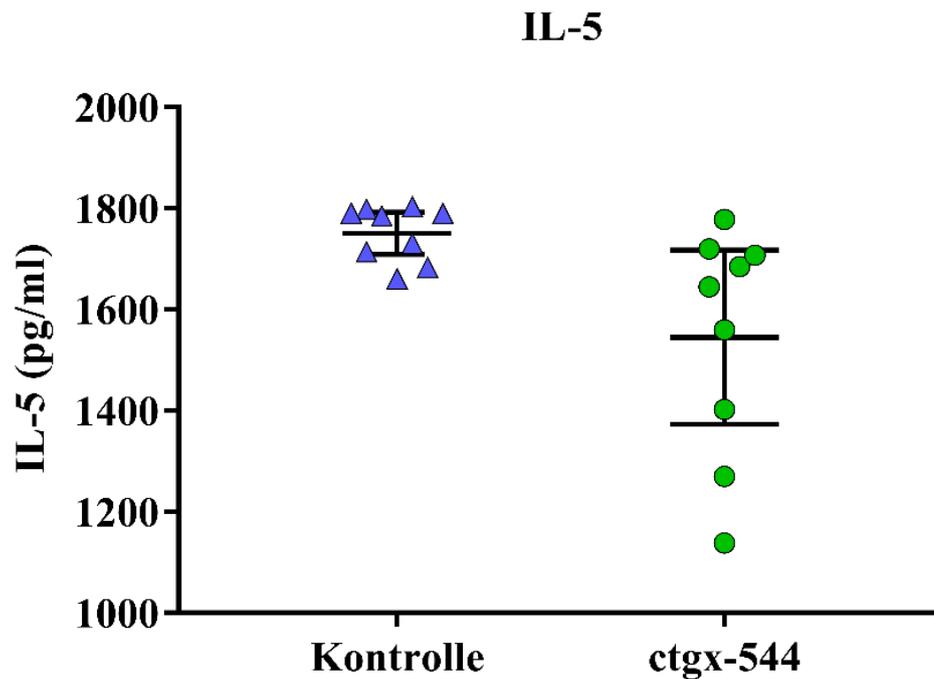


Abbildung 27: IL-5-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1750,27 \pm 54,54$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($1544,90 \pm 224,17$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,26$, 95 % CI $-2,20$ bis $-0,20$) ($n = 18$)

5.1.3. Auswertung von IFN- γ

Der durchschnittliche Werte für Interferon- γ war in der *cgtx-544*-Gruppe 16 % geringer als der der Kontrollgruppe ($2091,48 \pm 629,32$ pg/ml gegenüber $2435,85 \pm 530,19$ pg/ml). Dies entspricht einem mittleren Effekt nach Cohen ($d_{\text{Cohen}} = -0,59$, 95 % CI -1,51 bis 0,38) (Abbildung 28).

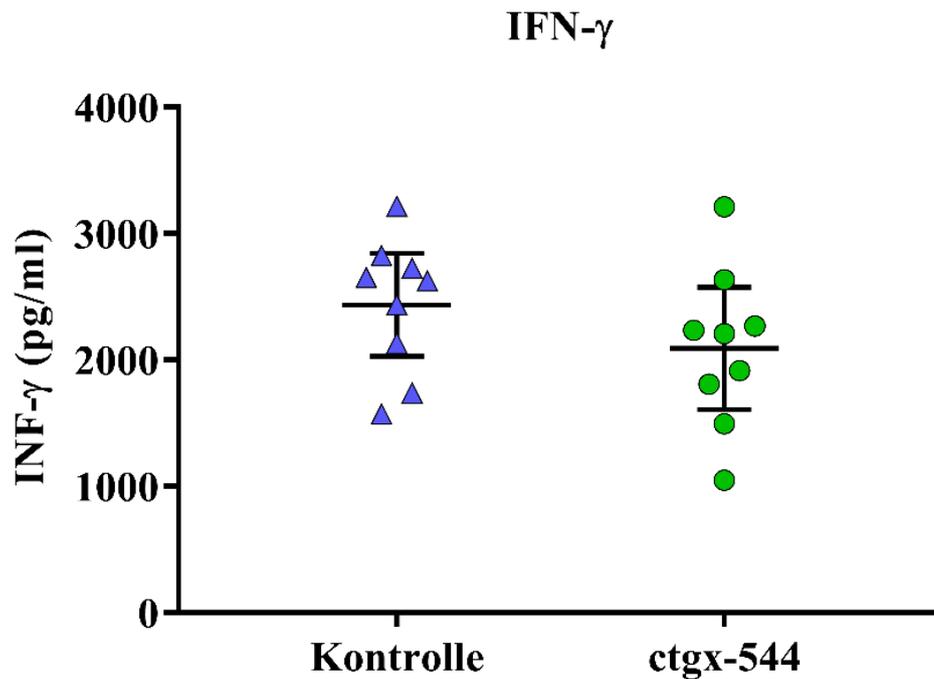


Abbildung 28: IFN- γ -Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($2435,85 \pm 530,19$ pg/ml) und der *cgtx-544*-Gruppe ($2091,48 \pm 629,32$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,59$, 95 % CI -1,51 bis 0,38) ($n = 18$)

6. Auswertung des Allgemeinzustands der Versuchstiere

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde anhand eines von der Ethikkommission genehmigten *Score Sheets* zur Einschätzung der postoperativen Belastung bestimmt. Hierbei konnte ein maximaler Wert von 28 Punkten erreicht werden, wobei die einzelnen Kategorien wie Verhaltensauffälligkeiten, Schmerzsymptome und Organsysteme mit jeweils bis zu vier Punkten bewertet wurden. Ein *Score*-Wert von unter zwei Punkten wurde als geringe Belastung ohne Interventionsbedarf angesehen (siehe XI, 2.). Die postoperative Belastung der Versuchstiere zeigte in beiden Versuchsgruppen im Mittel jeweils *Score*-Werte unter zwei und ab dem dritten postoperativen Tag jeweils unter eins (Tabelle 24). Keines der Versuchstiere musste wegen hoher Belastung euthanasiert werden, da in beiden Gruppen kein Tier einen Belastungs-*Score* von über mehr als drei und keines der Versuchstiere länger als einen Tag einen Belastungs-*Score* von drei aufwies. Somit kann eine gute postoperative Behandlung der Tiere und für die Verabreichung des Studienpeptids keine klinisch relevante zusätzliche Belastung dokumentiert werden.

Tabelle 24: Mittelwert \pm Standardabweichung der Belastung der Tiere der beiden Versuchsgruppen an den einzelnen postoperativen Tagen (pod) bestimmt durch das postoperative Ratten *Score Sheet* (siehe XI, 2.)

	Kontroll-Gruppe	<i>cgtx-544</i> -Gruppe
pod 1	1,89 \pm 0,60	1,89 \pm 0,60
pod 2	1,33 \pm 0,71	1,67 \pm 0,50
pod 3	0,56 \pm 0,53	0,89 \pm 0,60
pod 4	0,22 \pm 0,44	0,33 \pm 0,50
pod 5	0,22 \pm 0,44	0,56 \pm 0,53
pod 6	0,89 \pm 0,33	1,00 \pm 0,87
pod 7	0,38 \pm 0,52	0,78 \pm 0,44

V. Diskussion

1. Verträglichkeit von *cgtx-544* im allogenen, heterotopen

Rattenherztransplantationsmodell

In den durchgeführten Versuchen konnte unter einer Therapie mit dem Kv1.3-Inhibitor *cgtx-544* bei allogenen, heterotopen Herztransplantationen im Rattenmodell eine durchweg gute Verträglichkeit des Studienpeptids gezeigt werden. Dies bestätigt die vom Hersteller zuvor durchgeführten Versuche zur Verträglichkeitsprüfung im weniger belastenden Arthritis-Modell (noch unveröffentlicht; persönliches Gespräch mit A. Klostermann, conoGenetix biosciences GmbH). Zur Beurteilung der Verträglichkeit wurden ein *Score* zur Berechnung der postoperativen Belastung und somit des Allgemeinzustands der Versuchstiere sowie laborchemische Marker für die Organfunktionen von Nieren und Leber herangezogen.

Die durchschnittlichen Werte des postoperativen Belastungs-*Scores* der Tiere beider Versuchsgruppen zeigten eine geringe Belastung (Tabelle 24). Keines der Versuchstiere musste aufgrund einer höhergradigen oder anhaltenden mittelgradigen Belastung euthanasiert werden. Neben der tolerablen operativen Belastung kann für die Therapie mit *cgtx-544* kein klinisch relevanter negativer Effekt auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere festgestellt werden.

Zur Beurteilung der Verträglichkeit von *cgtx-544* für Niere und Leber erfolgte die laborchemische Bestimmung von Kreatinin und GPT. Vergleicht man die Werte beider Versuchsgruppen, so zeigten sich keine relevanten Unterschiede, sodass sich eine Organverträglichkeit von *cgtx-544* für Niere und Leber ableiten lässt.

Auch in den im Blutbild gemessenen Parametern zeigten sich bei den mit *cgtx-544* behandelten Versuchstieren keine Auffälligkeiten wie beispielsweise eine Leukopenie, Thrombozytopenie oder Anämie.

So ergibt sich im Hinblick auf die in diesem Versuch bestimmten Parameter kein Zweifel an einer Verträglichkeit von *cgtx-544* im allogenen, heterotopen Rattenherztransplantationsmodell.

2. Zytokine

Vergleicht man die durchschnittlichen Werte der gemessenen Zytokine, so zeigen sich durchweg niedrigere mittlere Messwerte in der *cgtx-544*-Gruppe. T_{EM}-Lymphozyten

produzieren nach ihrer Aktivierung die Zytokine IL-4, IL-5 sowie IFN- γ [8]. Auch diese Zytokine waren in der *cgtx-544*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Eine Verdünnung der gemessenen Zytokine durch die Applikation der Studienmedikation in der Verumgruppe wurde durch die Gabe des gleichen Volumens an NaCl-Lösung in der Kontrollgruppe verhindert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Behandlung von nicht präsensibilisierten Organempfängern mit *cgtx-544* zu einer Immunmodulation führt.

Während Abstoßungsreaktionen kommt es zur Sezernierung von IFN- γ durch aktivierte *Memory*-T-Lymphozyten [41]. Ein Unterdrücken der Produktion von IFN- γ führt im Mäuseherztransplantationsmodell zu einer Erhöhung des Transplantatüberlebens [42]. So ist es möglich, analog zum DSA-detektierenden *Cross-Match-Test*, mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) IFN- γ -sezernierende *Memory*-T-Lymphozyten bei Organempfängern zu bestimmen [43]. Stimuliert man T_{EM}-Lymphozyten mit den passenden Antigenen und blockiert gleichzeitig K_v1.3 mit verschiedenen, für diesen Kanal selektiven, Substanzen, so kommt es zu einer deutlich reduzierten Ausschüttung von IFN- γ im Vergleich zur Kontrollgruppe [44]. Analog dazu zeigte sich auch unter der Blockade von K_v1.3 mit *cgtx-544* eine Erniedrigung der IFN- γ -Serumspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Während Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation kommt es zu einer erhöhten Produktion von IL-6 [42]. Unter anderem unterstützt IL-6 die Aktivierung und Vermehrung von antigenspezifischen T-Lymphozyten [45, 46]. Des Weiteren hat es einen überlebensverlängernden Einfluss auf T-Lymphozyten [46, 47]. So konnte im Herztransplantationsmodell bei MHC-inkompatiblen Mäusen gezeigt werden, dass eine IL-6-Defizienz in Kombination mit einer IFN- γ -Blockade, verglichen mit einer alleinigen IFN- γ -Blockade, zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens führt [42]. Vergleicht man die IL-6-Werte der *cgtx-544*-Gruppe und der Kontrollgruppe, so zeigt sich in der *cgtx-544*-Gruppe ein erniedrigter Serumspiegel.

TNF- α hat eine proabstoßende Wirkung. So kann im Mausmodell durch eine gemeinsame Blockade von TNF- α und IL-6 eine Transplantatakzeptanz induziert werden [48]. In der *cgtx-544* Gruppe lag der TNF- α -Serumspiegel unter dem der Kontrollgruppe.

IL-2 ist ein weiteres Zytokin, dessen Serumspiegel sich während Abstoßungsreaktionen erhöht [41]. In Modellen zur Multiple Sklerose konnte unter der Blockade von T_{EM}-Lymphozyten mittels eines K_V1.3-Kanalblockers eine Reduktion der IL-2 Produktion nachgewiesen werden [34, 44]. Auch in der Gruppe der mit *cgtx-544* behandelten Empfänger zeigte sich eine Reduktion der IL-2-Serumspiegel. Dies könnte Hinweis auf eine reduzierte T_{EM}-Lymphozyten-Aktivität geben.

Im Multiple Sklerose-Modell kommt es unter einer K_V1.3-Kanalblockade neben IL-2 und IFN- γ des Weiteren zu einer Reduktion in der Produktion von IL-17 [44]. Ein erniedrigter IL-17A-Serumspiegel ließ sich auch unter der Therapie mit *cgtx-544* nachweisen, sodass auch hier ein Hinweis auf eine Hemmung der T_{EM}-Lymphozyten besteht.

3. Transplantatüberleben

In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte kein Vorteil für das Transplantatüberleben nach allogenen, heterotopen Herztransplantationen in nicht präsensibilisierten Empfängern für eine Therapie mit einem selektiven K_V1.3-Kanalinhibitor nachgewiesen werden. In zwei zuvor von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Herztransplantationsstudien mit Lewis- und Brown Norway-Ratten lag das durchschnittliche Transplantatüberleben in der Kontrollgruppe bei 6,5 Tagen, bzw. 7,9 Tagen [38, 49]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Studie mit einem mittleren Transplantatüberleben in der Kontrollgruppe von 7 Tagen reproduziert werden.

Als einen anderen Ansatz zur Evaluation einer selektiven K_V1.3-Inhibition im allogenen Transplantationsmodell führten HAUTZ et al. eine *Vascularized Composite Allograft Transplantation*-Studie (VCA) im Rattenmodell durch. Eine Blockierung des K_V1.3-Kanals wurde durch Correolide C hervorgerufen. HAUTZ et al. konnten bei der Behandlungsgruppe (Monotherapie Correolide C intraperitoneal appliziert) eine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens von 1,67 Tagen zeigen [50].

Diese Studie unterschied sich in einigen Aspekten. So führten HAUTZ et al. die Transplantation eines Hinterlaufs von Brown Norway- auf Lewis-Ratten durch. Des Weiteren erfolgte die Applikation des K_V1.3-Inhibitors durch eine intraperitoneale,

Injektion (eine lokale Applikation führte nicht zur Verlängerung des Transplantatüberlebens) [50].

Sowohl die unterschiedliche Transplantatart (funktionelles Organ versus Extremität), das unterschiedliche Studienpräparat, als auch die sich unterscheidende Applikationsform oder eine Kombination hiervon, könnte grundsätzlich für die Differenz der Verbesserung des Transplantatüberlebens durch die K_V1.3-Inhibition ursächlich sein.

Bei HAUTZ et al. erfolgte in der Kontrollgruppe ohne K_V1.3-Inhibition eine Transplantatabstoßung der Extremität Grad III nach $8,83 \pm 0,98$ Tagen und mit systemischer (intraperitoneale Applikation) K_V1.3-Inhibition nach $10,50 \pm 1,38$ Tagen ($p=0,037$). Es wäre zu klären, ob es durch den etwas längeren Versuchsverlauf zur Differenzierung von chronisch aktivierten T_{EM}-Lymphozyten gekommen sein sollte, was im Herztransplantationmodell, das in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, mit einer akuten Abstoßung von 7 Tagen ungenügend erscheint.

Die Arbeit von HAUTZ et al. zeigte jedoch auch, dass die beiden Tiere mit den höchsten Plasmaleveln des Studienpräparates auch das längste Transplantatüberleben mit 12 Tagen zeigten [50]. Dies wirft die Frage auf, ob das Studienpeptid *cgtx-544* in der vorliegenden Arbeit für das Herztransplantationsmodell eventuell unterdosiert gewesen sein könnte, da sich die Dosierung am Rattenmodell zur rheumatoiden Arthritis orientiert hat. Eine Dosisfindung wäre somit für weiterführende Untersuchungen im Transplantationsmodell empfohlen und vor allem in Kombination mit anderen Immunsuppressiva.

GRGIC et al. führten zur Untersuchung einer selektiven Blockade von T-Lymphozyten Nierentransplantationsversuche im Rattenmodell durch [51]. Um eine Blockade der T-Lymphozyten zu erreichen, wurde neben der K_V1.3-Inhibition mit Triarylmethane-34 (TRAM-34) eine K_{Ca}3.1-Inhibition mittels *Stichodactyla-Toxins* (ShK) hervorgerufen. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch transplantationsbedingte technische Fehler auszuschließen, erfolgte eine initiale Monotherapie der Empfängertiere mit Cyclosporin A für sieben Tage, gefolgt von einem *Second-Look* zur Beurteilung der Transplantatfunktion.

Zeigte sich hierbei ein intaktes Transplantat, so erhielt das Empfängertier für weitere 10 Tage, je nach Versuchsgruppenzugehörigkeit, entweder Cyclosporin A, TRAM-34 in Kombination mit ShK oder NaCl-Infusionslösung. Anschließend erfolgten die Explantation sowie histologische Untersuchung der Transplantate [51]. Hierbei

untersuchten GRGIC et al. die Infiltrationen mit mononukleären Zellen innerhalb der Transplantate der verschiedenen Versuchsgruppen. So zeigten sich in den Transplantaten der mit TRAM-34 und ShK behandelten Gruppe im Vergleich zu den Transplantaten der Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion der Infiltrationen mit CD43⁺ T-Lymphozyten (-32%), zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten (-32%) und CD68⁺ Makrophagen.

Im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit erfolgte für die ersten sieben Tage eine Immunsuppression mit Cyclosporin A sowie ein *Second-Look*, um ein Transplantatversagen auf Basis eines transplantationsbedingten technischen Fehlers auszuschließen. In der hier präsentierten Arbeit erfolgte eine solche Kontrolle der transplantierten Herzen durch Palpation, sodass eine zusätzliche initiale Immunsuppression nicht notwendig ist. Wenn man davon ausgeht, dass aufgrund der in dieser Arbeit vergleichsweise kurzen Versuchszeit keine Bildung von T-Lymphozyten erfolgen konnte, kann diese fehlende zusätzliche Versuchszeit zu den unterschiedlichen Ergebnissen der beiden wissenschaftlichen Arbeiten beitragen.

GRGIC et al. führten in ihren Versuchen zusätzlich zu einer K_V1.3-Inhibition eine K_{Ca}3.1-Inhibition durch [51]. Auch diese zusätzliche Beeinflussung der T-Lymphozyten könnte die verschiedenen Ergebnisse der beiden Arbeiten erklären.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass GRGIC et al. den Einfluss einer K_V1.3- und K_{Ca}3.1-Inhibition auf Transplantatabstoßungen lediglich auf zellulärer und histologischer Ebene untersucht haben. Aufgrund des Versuchsaufbaus konnte keine direkte Aussage zur Transplantatfunktion und zum Transplantatüberleben gegeben werden.

4. Histologische Untersuchungen

4.1. Beurteilung der Abstoßungsreaktionen

Laut den Kriterien der ISHLT müssen zur Beurteilung von Abstoßungsreaktionen mindestens Proben von drei Biopsieorten untersucht werden [37]. Um diesem Kriterium nachzukommen, wurde bei der Bewertung der histologischen Präparate auf Abstoßungsreaktionen je vier Querschnittsflächen pro Transplantat untersucht.

Betrachtet man beide Versuchsgruppen im Hinblick auf die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen, so stellt man fest, dass in allen Transplantaten eine akute zelluläre und antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion stattgefunden hat. Die Transplantate der *cgtx-544*-Gruppe und diejenigen der Kontrollgruppe zeigten

keinen Unterschied hinsichtlich der Abstoßungsgrade. Ein weiterführender Versuchsansatz wäre die histologische Untersuchung der Transplantate beider Versuchsgruppen vor dem jeweiligen Transplantatversagen. Auf diese Weise könnten mögliche Unterschiede der Abstoßungsreaktionen zu früheren Zeitpunkten untersucht werden.

4.2. Beurteilung der lymphozytären Infiltrate

Im immunhistochemischen Nachweis von CD3 zeigte sich in der *cgtx-544*-Gruppe viermal massenhaft und zweimal viele T-Lymphozyten, wohingegen in der Kontrollgruppe alle sechs Transplantate massenhaft T-Lymphozyten aufwiesen. Da *cgtx-544* chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten hemmt, welche sich wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Abstoßung aufgrund der vergleichsweise kurzen Versuchsdauer noch nicht maßgeblich gebildet haben, ist dieser Unterschied mutmaßlich nicht auf die Wirkung von *cgtx-544* zurückzuführen. Des Weiteren handelt es sich bei dem immunhistochemischen Nachweis von CD3 um eine Methode alle T-Lymphozyten in den Transplantaten nachzuweisen. Da chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten nur einen Teil der an Abstoßungen beteiligten T-Lymphozyten darstellen, wäre es, selbst wenn es bereits zur Ausbildung dieses Zelltyps gekommen wäre, nicht sicher, ob die Beeinflussung dieses einzelnen Zelltyps eine mit diesem immunhistochemischen Nachweis erfassbare Reduktion der Infiltrate ergeben hätte. Um eine differenzierte Beurteilung der Infiltrate zu ermöglichen, wäre es denkbar, einen für T_{EM}-Lymphozyten selektiven immunhistochemischen Nachweis zu nutzen. Eine solche Methode müsste in unserer Arbeitsgruppe zuerst neu etabliert werden.

5. Kardiales Troponin

Troponin ist ein hoch sensitiver Marker für eine Kardiomyozytenschädigung, ohne jedoch Rückschlüsse auf die Ursache zuzulassen. So kommt es nicht nur während Abstoßungen von Herztransplantaten zu einer Erhöhung, sondern auch beispielsweise im Rahmen eines Myokardinfarkts oder einer Myokarditis [52]. Auch andere, das Herz belastende Erkrankungen, wie beispielsweise eine Lungenarterienembolie oder eine Niereninsuffizienz gehen mit einer Troponinerhöhung einher [53]. Für das Vorliegen einer Niereninsuffizienz der Empfängertiere ergab sich bei normwertig gemessenen Kreatinin-Werten keinen Hinweis.

DENGLER et al. konnten zeigen, dass bei Abstoßungen von Herztransplantaten die Troponinwerte proportional mit dem Grad der Abstoßungsreaktion steigen [54]. In den ersten Tagen nach Herztransplantationen kommt es regelhaft zu einem durch die Operation selbst verursachten Anstieg von Troponin. Diese Erhöhung kann noch bis zu zwei Monate nach einer Herztransplantation nachgewiesen werden [55]. Da die Troponinmessungen in diesem Zeitraum erfolgten, können die Troponinwerte nur eingeschränkt zur vergleichenden Beurteilung von Abstoßungen genutzt werden [55, 56].

Vergleicht man trotz dieser Einschränkung die durchschnittlichen Troponin-Serumspiegel der Versuchsgruppen, so kann kein Vorteil einer Monotherapie mit *cgtx-544* nachgewiesen werden.

6. Periphere Leukozyten- und Lymphozytenzahlen

Betrachtet man die durchschnittliche Leukozytenzahl, so ist sie in der *cgtx-544*-Gruppe um 13 % gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Erhöhte Leukozytenzahlen werden im klinischen Alltag als Indikator für eine Aktivierung des Immunsystems, z. B. im Falle einer Infektion, genutzt. Während Abstoßungsreaktionen kommt es jedoch nicht zu einem signifikanten Anstieg der im peripheren Blut gemessenen Leukozytenzahl [57]. Ferner muss bedacht werden, dass eine Infiltration des Transplantats mit Leukozyten nicht zwangsläufig mit einer peripheren Leukozytose einhergehen muss.

Für die Evaluation der Studiensubstanz ist die Anzahl der Lymphozyten interessanter als die Gesamtzahl der Leukozyten, da *cgtx-544* selektiv chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten hemmt. Vergleicht man die durchschnittliche Lymphozytenzahl beider Versuchsgruppen, so lässt sich kein Unterschied nachweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Zeitpunkt der hämatologischen Untersuchungen. Da sich T_{EM}-Lymphozyten erst nach mehrfacher Stimulation mit dem zu ihnen passenden Antigen in ihre chronisch aktivierte Form umwandeln, könnte die Zeitspanne zwischen Antigenkontakt und Blutuntersuchung zu gering gewesen sein, um diese Differenzierung ermöglicht zu haben, sodass noch kein Effekt nachweisbar sein kann. Ferner machen T_{EM}-Lymphozyten und somit auch chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten nur einen geringen Teil der Lymphozytenpopulation aus, sodass auch bei Unterschieden in der Anzahl dieser Subtypen die Gesamtanzahl der Lymphozyten nicht signifikant verändert sein muss. Um den Einfluss von *cgtx-544* auf die T_{EM}-

Lymphozyten besser beurteilen zu können, muss dieser Zelltyp selektiver betrachtet werden. Hierbei wäre ein Nachweis per *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) denkbar. So exprimieren T_{EM}-Lymphozyten weder den Chemokinrezeptor 7 (CCR7⁻), noch CD45RA⁻, sodass sie per FACS eindeutig von nativen T-Lymphozyten und T_{CM}-Lymphozyten zu unterscheiden sind [58].

7. Weiterführende Versuchsansätze

7.1. Transplantationsversuche mit präsensibilisierten Tieren

Diese Arbeit beschäftigte sich zum ersten Mal als *Proof-of-Concept* Ansatz mit dem Einfluss einer Monotherapie mit dem selektiven K_v1.3-Inhibitor *cgtx-544* auf das Transplantatüberleben nach experimenteller Organtransplantation. Es handelt sich dabei um zuvor nicht mit Spenderantigenen präsensibilisierten Organempfängern. Sie können jedoch über verschiedenste Mechanismen zuvor T_{EM}-Lymphozyten gebildet haben [26, 27].

Aufgrund der vergleichsweise kurzen Versuchsdauer bis zur Transplantatabstoßung muss davon ausgegangen werden, dass chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Abstoßung in keiner relevanten Menge gebildet wurden und somit auch keinen maßgeblichen Einfluss auf die Abstoßung gehabt haben dürften.

Um die Wirkung bei Empfängern mit spenderspezifischen, chronisch aktivierten T_{EM}-Lymphozyten besser untersuchen zu können, sollten Empfängertiere vor der Transplantation durch Spenderantigene sensibilisiert werden. Hierzu würde sich ein in unserem Forschungsverbund (DFG SFB/Transregio 127) bisher nur in der Maus etabliertes Modell der Präsensibilisierung durch ein vorheriges Hauttransplantat anbieten [59]. Mäuse exprimieren jedoch im Vergleich zu Ratten oder dem Menschen mehrere spannungsabhängige Kaliumkanäle, sodass eine alleinige Blockade von K_v1.3 durch die nicht blockierten Kanäle kompensiert werden würde [60]. Aufgrund dieser Tatsache müsste die Methode der Präsensibilisierung durch ein Hauttransplantat zuerst auf das Rattenmodell übertragen und in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden. Diese für die Empfängertiere zusätzlich belastende Methode, bei der die Ratten einer zweiten Operation unterzogen und zum Schutz der transplantierten Haut bereits nach der ersten Operation in Einzelkäfigen (nicht artgerecht) gehalten werden müssten, ist

jedoch nicht in dem für diese Forschungsarbeit genehmigten Tierversuchsantrag enthalten.

Auf der Idee der Präsensibilisierung basierend erfolgten jedoch bereits genehmigte Vorversuchen in dieser Arbeit. Dabei erfolgte der Antigenkontakt mittels einer Transfusion von Spenderblut an das Empfängertier sieben Tage vor der Herztransplantation. HUANG et al. beschrieben in einem Rattenmodell durch diese Methode eine Präsensibilisierung, die zu einer vorzeitigen akuten humoralen Abstoßung von transplantierten Nieren führte [61]. Analog hierzu versuchten wir mit dieser Methode eine Präsensibilisierung und somit eine Induktion von Memory-T-Lymphozyten zu erreichen, die ein verkürztes Transplantatüberleben erwarten ließen. Jedoch zeigten die so behandelten Empfängertiere auch in der nicht mit *cgtx-544* behandelten Kontrollgruppe ein deutlich verlängertes Transplantatüberleben (Kontrollgruppe (n=2) $15,25 \pm 6,85$ Tage gegenüber *cgtx-544*-Gruppe (n=4) $11,5 \pm 0,71$ Tage, p=ns). Diese Beobachtung könnte sich mit der Generierung von regulatorischen T-Zellen erklären lassen, welche eine Transplantattoleranz hervorrufen können [62]. Aufgrund dieses Mechanismus ist eine Präsensibilisierung mit Blut in unserem Versuchsansatz nicht zielführend gewesen, sodass in einem nächsten Schritt basierend auf das bereits in der Maus beschriebene Modell mittels Hauttransplantation ein entsprechendes Rattenmodell etabliert werden sollte [59].

7.2. Mögliche weitere Transplantationsversuche

Im Rahmen einer Präsensibilisierung erfolgt, wie HUANG et al. bereits zeigen konnten, nicht nur die Aktivierung des zellulären, sondern auch des humoralen Immunsystems [61]. Möchte man die Auswirkungen von sich durch Präsensibilisierung bildenden DSA und Plasmazellen verringern, könnte man über zusätzliche Versuchsgruppen mit einer kombinierten Therapie aus *cgtx-544* und intravenösen Immunglobulinen oder CD20-Antikörpern vor der erneuten Organtransplantation diskutieren [63].

Auch wären Versuche mit Kombinationstherapien denkbar. Ein möglicher Ansatz wäre es die Empfängertiere mit einer Kombination aus *cgtx-544* und einem konventionellen immunsuppressiven Medikament wie Cyclosporin A zu behandeln. Hierbei können verschiedene Dosierungen des konventionellen Immunsuppressivums verwendet werden. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob *cgtx-544* eine

Einsparung der etablierten Immunsuppressiva in der Therapie der akuten Abstoßungsreaktionen ermöglicht.

Geht man davon aus, dass es in den hier durchgeführten Versuchen aufgrund der vergleichsweise kurzen Versuchsdauer noch zu keiner Bildung von T_{EM}-Lymphozyten gekommen ist, wäre ein weiterer Ansatz zur Verlängerung der Versuchszeit denkbar. So könnte eine initiale Therapie mit konventionellen Immunsuppressiva bis zur Bildung von T_{EM}-Lymphozyten akute Abstoßungsreaktionen verhindern. Ab diesem Zeitpunkt wird auf eine weitere Gabe des konventionellen Immunsuppressivums verzichtet und die Versuchstiere erhalten entweder *cgtx-544* oder NaCl-Infusionslösung. Auf diese Weise können Effekte einer Therapie mit *cgtx-544* welche durch die kurze Versuchsdauer nicht eintreten können gezeigt werden

T_{EM}-Lymphozyten werden zum Teil von den aktuell verwendeten Immunsuppressiva kaum gehemmt [64]. Nichtsdestotrotz spielen sie bei Abstoßungen und der Entstehung der Transplantatvaskulopathie eine Rolle [65, 66]. Auf diesem Wissen basierend könnte man Transplantatversuche planen, die die Auswirkung von *cgtx-544* auf die Entstehung der Transplantatvaskulopathie in Empfängern mit der aktuell etablierten Immunsuppression untersuchen. So könnte man, wie zuvor beschrieben, Empfänger mittels Hauttransplantation der Spendertiere sensibilisieren, diese darauffolgend herztransplantieren und sie mit der etablierten Standardtherapie zuzüglich *cgtx-544* behandeln. Im Anschluss könnte man die Entstehung der Transplantatvaskulopathie im Langzeitverlauf untersuchen. Da die Transplantatvaskulopathie bei vielen Transplantationen den limitierenden Faktor darstellt, wäre es interessant zu erfahren, ob *cgtx-544* einen supportiven Effekt zur aktuell etablierten immunsuppressiven Therapie haben könnte [67, 68].

7.3. Mixed-Lymphocyte-Reaction

Um verschiedene Auswirkungen von *cgtx-544* auf die Proliferation und die Zytokinproduktion von T_{EM}-Lymphozyten weiter zu erforschen, bietet sich die Evaluation mittels *mixed-lymphocyte-reaction* an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden orientierend bereits erste solcher Experimente in unserem Forschungsverbund (DFG SFB/Transregio 127) an der Universität Hannover durchgeführt. Hierbei wurde in einer ersten Versuchsreihe die Beeinflussung von *cgtx-544* auf die generelle Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten evaluiert. Hierzu wurden T-

Lymphozyten von Lewis-Ratten mit dem MHC Rt1^l und bestrahlten Milzzellen von Lewis-Ratten mit dem MHC Rt1^u in *mixed-lymphocyte-reactions* mit und ohne Hinzunahme von *cgtx-544* untersucht. Interessanterweise zeigten die T-Lymphozyten ab einer bestimmten Konzentration von *cgtx-544* eine reduzierte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen (*data on file*).

In einem weiteren Schritt ist es naheliegend, diese T-Lymphozyten mittels FACS-Analyse zu differenzieren, um Aufschluss über die einzelnen Subtypen zu erhalten. Ferner wäre es sinnvoll, anstelle von unselektierten T-Lymphozyten bereits vorher selektierte chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten zu verwenden, sodass eine genauere Betrachtung des Effekts von *cgtx-544* auf diese Zellen erlaubt wird. Zusätzlich könnte man im Anschluss an die erfolgten *mixed-lymphocyte-reactions* die von den Zellen gebildeten Zytokine messen und diese Werte mit denen bereits in den Transplantationsmodellen erhobenen Werten vergleichen.

VI. Schlussfolgerung

In Anbetracht der in diesen ersten *Proof-of-Concept* Versuchen gewonnenen Ergebnisse zeigte das Studienpeptid *cgtx-544* bei allen Versuchstieren eine gute Verträglichkeit im Transplantationsmodell. Eine Monotherapie mit *cgtx-544* führte jedoch nicht zu einer histologisch objektivierbaren Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation bei vorher nicht sensibilisierten Empfängern und nicht zu einem verlängerten Transplantatüberleben. Allerdings zeigte sich auf Zytokinebene eine positive immunologische Beeinflussung durch die Behandlung mit *cgtx-544*. In weiterführenden Untersuchungen sollte eruiert werden, ob präsensibilisierte Empfängertiere, welche nach Herztransplantation im Verlauf chronisch aktivierte T_{EM}-Lymphozyten bilden, von einer selektiven Hemmung dieser T_{EM}-Lymphozyten durch *cgtx-544* profitieren. Interessant wäre auch eine Kombinationstherapie anderer Immunsuppressiva mit *cgtx-544*, um zu untersuchen, ob diese Therapieregime durch Einsparung von herkömmlichen Immunsuppressiva zu einer nebenwirkungsärmeren Immunsuppression führen würden. Um diese Frage beantworten zu können, muss im nächsten Schritt zuerst ein Tiermodell zur Präsensibilisierung von Ratten in unserer Forschungsgruppe etabliert werden, um weitere Experimente mit *cgtx-544* durchführen zu können. Auch müssen angesichts der gewonnenen Erkenntnisse weiterführende Versuche zur Dosisfindung in den jeweiligen Kombinations-Therapieregimen erfolgen.

VII. Literaturverzeichnis

1. Lund, L.H., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time*. J Heart Lung Transplant, 2017. **36**(10): p. 1037-1046.
2. Grimm, M., et al., *Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients--a large European trial*. Am J Transplant, 2006. **6**(6): p. 1387-97.
3. Aliabadi, A., A.B. Cochrane, and A.O. Zuckermann, *Current strategies and future trends in immunosuppression after heart transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2012. **17**(5): p. 540-5.
4. Zafar, S.Y., D.N. Howell, and J.P. Gockerman, *Malignancy after solid organ transplantation: an overview*. Oncologist, 2008. **13**(7): p. 769-78.
5. Su, C.A., et al., *Endogenous memory CD8 T cells directly mediate cardiac allograft rejection*. Am J Transplant, 2014. **14**(3): p. 568-79.
6. Benichou, G., et al., *Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance*. Front Immunol, 2017. **8**.
7. Lam, J. and H. Wulff, *The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression*. Drug Dev Res, 2011. **72**(7): p. 573-584.
8. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
9. Baba, H.A., et al., *[Heart transplantation. Pathology, clinical work-up and therapy]*. Pathologie, 2011. **32**(2): p. 95-103.
10. Banner, N.R., et al., *Effect of heart transplantation on survival in ambulatory and decompensated heart failure*. Transplantation, 2008. **86**(11): p. 1515-22.
11. Nicolini, F. and T. Gherli, *Alternatives to transplantation in the surgical therapy for heart failure*. Eur J Cardiothorac Surg, 2009. **35**(2): p. 214-28.
12. Taylor, D.O., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report—2004*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2004. **23**(7): p. 796-803.
13. Law, Y.M., *Pathophysiology and diagnosis of allograft rejection in pediatric heart transplantation*. Curr Opin Cardiol, 2007. **22**(2): p. 66-71.
14. Lindenfeld, J., et al., *Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs*. Circulation, 2004. **110**(24): p. 3734-40.
15. Motyka, B., et al., *Antibody-Mediated Rejection in a Blood Group A-Transgenic Mouse Model of ABO-Incompatible Heart Transplantation*. Transplantation, 2016. **100**(6): p. 1228-37.
16. Barten, M.J., et al., *The clinical impact of donor-specific antibodies in heart transplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2018.
17. Martinu, T., et al., *Acute Allograft Rejection: Cellular and Humoral Processes*. Clin Chest Med, 2011. **32**(2): p. 295-310.
18. Patel, J.K., M. Kittleson, and J.A. Kobashigawa, *Cardiac allograft rejection*. Surgeon, 2011. **9**(3): p. 160-7.
19. Stegall, M.D., P.G. Dean, and J. Gloor, *Mechanisms of alloantibody production in sensitized renal allograft recipients*. Am J Transplant, 2009. **9**(5): p. 998-1005.
20. Weis, M. and W. von Scheidt, *Cardiac allograft vasculopathy: a review*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 2069-77.
21. Skorić, B., et al., *Cardiac allograft vasculopathy: diagnosis, therapy, and prognosis*. Croat Med J, 2014. **55**(6): p. 562-76.
22. Tonsho, M., *Heart Transplantation: Challenges Facing the Field*. 2014. **4**(5).
23. Khush, K.K., et al., *The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart*

- transplantation report - 2019; focus theme: Donor and recipient size match.* J Heart Lung Transplant, 2019. **38**(10): p. 1056-1066.
24. Soderlund, C. and G. Radegran, *Immunosuppressive therapies after heart transplantation--The balance between under- and over-immunosuppression.* Transplant Rev (Orlando), 2015. **29**(3): p. 181-9.
 25. MacLeod, M.K.L., J.W. Kappler, and P. Marrack, *Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment.* Immunology, 2010. **130**(1): p. 10-5.
 26. Amir, A.L., et al., *Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common.* Blood, 2010. **115**(15): p. 3146-57.
 27. Lombardi, G., et al., *Are primary alloresponses truly primary?* Int Immunol, 1990. **2**(1): p. 9-13.
 28. Chiang, E.Y., et al., *Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions.* Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 14644.
 29. Hwang, J.R., et al., *Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development.* Exp Mol Med, 2020. **52**(5): p. 750-761.
 30. Quintana, A., et al., *Calcium-dependent activation of T-lymphocytes.* Pflugers Arch, 2005. **450**(1): p. 1-12.
 31. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes.* Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 59-87.
 32. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS.* J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1703-13.
 33. Perez-Verdaguer, M., et al., *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is a promising multitherapeutic target against human pathologies.* Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(5): p. 577-91.
 34. Beeton, C., et al., *Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases.* Mol Pharmacol, 2005. **67**(4): p. 1369-81.
 35. Gordon, C.R., et al., *A new modified technique for heterotopic femoral heart transplantation in rats.* J Surg Res, 2007. **139**(2): p. 157-63.
 36. Berry, G.J., et al., *The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation.* J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(12): p. 1147-62.
 37. Stewart, S., et al., *Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection.* J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1710-20.
 38. Kleinert, E., et al., *Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation.* J Am Heart Assoc, 2016. **5**(5).
 39. Cohen, J., *Things I have learned (so far).* American Psychologist, 1990. **45**: p. 1304-1312.
 40. Cohen, J., *The earth is round (p <.05).* American Psychologist, 1994. **49**: p. 997-1003.
 41. Matesic, D., P.V. Lehmann, and P.S. Heeger, *High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice.* Transplantation, 1998. **65**(7): p. 906-14.
 42. Zhao, X., et al., *Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance.* Am J Transplant, 2012. **12**(1): p. 90-101.
 43. Heeger, P.S., et al., *Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes.* J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2267-75.
 44. Li, Z., et al., *Selective Inhibition of CCR7(-) Effector Memory T Cell Activation by a Novel Peptide Targeting Kv1.3 Channel in a Rat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model.* J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 29479-94.

45. Lotz, M., et al., *B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 1253-8.
46. Rochman, I., W.E. Paul, and S.Z. Ben-Sasson, *IL-6 increases primed cell expansion and survival*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4761-7.
47. Ayroldi, E., et al., *Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4212-9.
48. Shen, H. and D.R. Goldstein, *IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 1032-40.
49. Ai Erken, M.H., et al., *Immune responses on allograft heart transplantation in inbred rats infected with Echinococcus multilocularis*. Chin Med J (Engl), 2012. **125**(24): p. 4412-7.
50. Hautz, T., et al., *Targeting the Kv1.3 potassium channel for immunosuppression in vascularized composite allotransplantation - a pilot study*. Transpl Int, 2013. **26**(5): p. 552-61.
51. Grgic, I., et al., *Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection*. Transplant Proc, 2009. **41**(6): p. 2601-6.
52. Agewall, S., et al., *Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease*. Eur Heart J, 2011. **32**(4): p. 404-11.
53. Inbar, R. and Y. Shoenfeld, *Elevated cardiac troponins: the ultimate marker for myocardial necrosis, but not without a differential diagnosis*. Isr Med Assoc J, 2009. **11**(1): p. 50-3.
54. Dengler, T.J., et al., *Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(2): p. 405-12.
55. Zimmermann, R., et al., *Troponin T release after heart transplantation*. Br Heart J, 1993. **69**(5): p. 395-8.
56. Fitzsimons, S., et al., *Utility of troponin assays for exclusion of acute cellular rejection after heart transplantation: A systematic review*. J Heart Lung Transplant, 2018. **37**(5): p. 631-638.
57. Daar, A.S., P.J. Morris, and D.O. Oliver, *Leucocytosis is not a manifestation of rejection*. Br Med J, 1977. **2**(6102): p. 1570-1.
58. Sallusto, F., et al., *Pillars article: two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature. 1999. **401**: 708-712. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 840-4.
59. Ge, W., et al., *Regulatory T cells are critical to tolerance induction in presensitized mouse transplant recipients through targeting memory T cells*. Am J Transplant, 2010. **10**(8): p. 1760-73.
60. Freedman, B.D., et al., *Identification of Kv1.1 expression by murine CD4-CD8-thymocytes. A role for voltage-dependent K+ channels in murine thymocyte development*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22406-11.
61. Huang, G., et al., *Characterization of Transfusion-Elicited Acute Antibody-Mediated Rejection in a Rat Model of Kidney Transplantation*. American Journal of Transplantation, 2014. **14**(5): p. 1061-1072.
62. Kitade, H., et al., *Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 4963-70.
63. Kaufman, B.D. and R.E. Shaddy, *Immunologic considerations in heart transplantation for congenital heart disease*. Curr Cardiol Rev, 2011. **7**(2): p. 67-71.
64. Devarajan, P. and Z. Chen, *Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good*. Immunol Res, 2013. **57**(0): p. 12-22.
65. Wang, H., et al., *Memory T Cells Mediate Cardiac Allograft Vasculopathy and are Inactivated by Anti-OX40L Monoclonal Antibody*. Cardiovasc Drugs Ther, 2014. **28**(2): p. 115-22.

66. Espinosa, J.R., K.P. Samy, and A.D. Kirk, *Memory T cells in organ transplantation: progress and challenges*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 339-47.
67. Lund, L.H., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure*. J Heart Lung Transplant, 2015. **34**(10): p. 1244-54.
68. Van Keer, J.M., et al., *Long-term outcome of cardiac allograft vasculopathy: Importance of the International Society for Heart and Lung Transplantation angiographic grading scale*. J Heart Lung Transplant, 2019. **38**(11): p. 1189-1196.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm	Mikrometer
ACR	Akute zelluläre Abstoßungsreaktion
AMR	Antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion
BN	Brown Norway
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
CCR7	C-C-Chemokinrezeptor Typ 7
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CRAC	<i>calcium release-activated calcium channels</i>
d	Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
d _{Cohen}	Effektgröße nach Cohen
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	<i>Donor-Specific Antibodies</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
F _C	Kristallisierbares Fragment
fl	Femtoliter
g	Gramm
G	Gauge
G	Erdschwerebeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase

H ⁺	Hämatoxylin-Eosin positiv
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>humanes</i> Leukozytenantigen-System
I ⁺	Immunhistochemie positiv
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
k	Kilo
K ⁺	Kalium
K _{Ca} 3.1	Kalziumabhängiger Kaliumkanal 3.1
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K _V 1.3	Spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.3
KVI	K _V 1.3-Inhibitor
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LEW	Lewis
lx	Lux
M	Mega
MBA	<i>Master of Business Administration</i>
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHz	Megahertz
min	Minuten
mm	Millimeter
mol	Mol
n	Anzahl
ns	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm

pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pod	Postoperativer Tag
R	Akute zelluläre Abstoßung
RNA	Ribonukleinsäure
SFB	Sonderforschungsbereich
ShK	Stichodactyla-Toxins
TBS	<i>Tris-Buffer-Saline</i>
T _{CM}	<i>Central-Memory-T-Lymphozyten</i>
T _{EM}	<i>Effector-Memory-T-Lymphozyten</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM-34	Triarylmethane-34
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

IX. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunsuppressive Medikamente nach Herztransplantationen	11
Tabelle 2: Verwendete Narkotika, Analgetika und Antagonisten, sowie ihre auf das Körpergewicht adaptierte Dosierung	22
Tabelle 3: Heartbeat strength score nach Gordon [35]	27
Tabelle 4: Grading: Akute zelluläre Abstoßung (R) nach ISHLT 2004 [37]	32
Tabelle 5: Grading: Antikörpervermittelte Abstoßung (pAMR) nach ISHLT 2013 [36]	33
Tabelle 6: Histologisch morphologische Kriterien der AMR nach ISHLT 2013 [36]	33
Tabelle 7: Immunhistochemische Kriterien der AMR nach ISHLT 2013 [36]	34
Tabelle 8: Transplantatüberleben der verschiedenen Versuchsgruppen in Tagen (d) (n = 18)	36
Tabelle 9: Auftreten von Kardiomyozytenschäden in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	37
Tabelle 10: Auftreten von zellulären Infiltraten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	38
Tabelle 11: Auftreten von interstitiellem Ödem in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	38
Tabelle 12: Auftreten von Hämorrhagien in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	38
Tabelle 13: Verteilung von T-Lymphozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	43
Tabelle 14: Verteilung von B-Lymphozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	44
Tabelle 15: Auftreten von intravasalen Monozyten in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	46
Tabelle 16: Verteilung von C4d in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	47
Tabelle 17: Intensität des C4d-Nachweises in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	47
Tabelle 18: Auftreten von Thromben in Venolen und Kapillaren in den Transplantaten beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 12)	48
Tabelle 19: Einteilung der akuten zellulären Abstoßung (R) der Transplantate beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens nach den Kriterien der ISHLT (n = 12)	50
Tabelle 20: Einteilung der antikörpervermittelten Abstoßung (pAMR) der Transplantate beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens nach den Kriterien der ISHLT, Nachweis in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H+), Nachweis in der immunhistologischen Untersuchung (I+) (n = 12)	51
Tabelle 21: „Kleines Blutbild“ beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17; für Leukozyten n = 16)	58
Tabelle 22: Differenzialblutbild beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17; für die absolute Anzahl an neutrophilen Granulozyten und alle prozentualen Zahlenangaben n = 16)	59
Tabelle 23: Ergebnisse der Zytokinmessung beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (für IL-12p40 n = 9, für alle anderen Zytokine n = 18)	61
Tabelle 24: Mittelwert \pm Standardabweichung der Belastung der Tiere der beiden Versuchsgruppen an den einzelnen postoperativen Tagen (pod) bestimmt durch das postoperative Ratten Score Sheet (siehe XI, 2.)	65
Tabelle 25: Liste der verwendeten Antikörper	100

Tabelle 26: Liste der verwendeten Materialien 106

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kalziumabhängige, $K_v1.3$-vermittelte Aktivierungskaskade von T_{EM}-Lymphozyten	14
Abbildung 2: Studiendesign der Transplantationsversuche	20
Abbildung 3: Prinzip des Langendorff-Modells	25
Abbildung 4: Transabdominelle Sonographie von zwei Transplantaten: das Transplantat zum Zeitpunkt des 7. postoperativen Tages (pod 7) zeigt im Vergleich mit dem Transplantat zum Zeitpunkt direkt postoperativ (pod 0) eine deutliche Zunahme der Ventrikelwand, eine Verengung des Ventrikellumens, sowie das Vorhandensein eines intraventrikulären Thrombus	27
Abbildung 5: Transplantatüberleben in Tagen (d) der Kontrollgruppe und cgtx-544-Gruppe ($K_v1.3$-Inhibitor: K_v1), der Log-Rank beträgt 1,0 mit einem $p = 0,317$ ($n = 18$)	36
Abbildung 6: Großflächiger Kardiomyozytenschaden in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)	39
Abbildung 7: Gemischtzellige Infiltrate in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung)	39
Abbildung 8: Gemischtzellige, bandförmige Epikarditis in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)	40
Abbildung 9: Interstitielles Ödem in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)	40
Abbildung 10: Massive Hämorrhagien in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)	41
Abbildung 11: Perivaskulärer Infiltrate in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung)	41
Abbildung 12: Linksventrikulärer Abscheidungsthrombus in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)	42
Abbildung 13: Intravaskuläre Ansammlung von mononukleären Zellen in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)	42
Abbildung 14: Interstitielle T-Lymphozyten in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (CD3-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung)	43
Abbildung 15: Vereinzelt interstitielle B-Lymphozyten in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (CD20-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)	45
Abbildung 16: Vereinzelter intravasaler Makrophage in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (CD68-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)	46
Abbildung 17: Kapilläre C4d-Ablagerungen in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (C4d-Immunhistochemie, 100-fache Vergrößerung)	48
Abbildung 18: Intravasaler Thrombus in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 400-fache Vergrößerung)	49
Abbildung 19: Diffuse interstitielle Fibrinexsudation in einem Transplantat der Kontrollgruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung)	49

Abbildung 20: Epikardialer Fibrinbelag in einem Transplantat der cgtx-544-Gruppe am Tag des Transplantatversagens (Fibrin-Immunhistochemie, 200-fache Vergrößerung).....	50
Abbildung 21: Troponin I-Serumspiegel im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 18).....	52
Abbildung 22: Erythrozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)	54
Abbildung 23: Thrombozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)	55
Abbildung 24: Leukozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 16).....	56
Abbildung 25: Lymphozyten im Blut der Versuchstiere beider Versuchsgruppen am Tag des Transplantatversagens (n = 17)	57
Abbildung 26: IL-4-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (170,25 ± 32,71 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (136,09 ± 34,97 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,01, 95 % CI -1,94 bis -0,02) (n = 18)	62
Abbildung 27: IL-5-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (1750,27 ± 54,54 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (1544,90 ± 224,17 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,26, 95 % CI -2,20 bis -0,20) (n = 18)	63
Abbildung 28: IFN-γ-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (2435,85 ± 530,19 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (2091,48 ± 629,32 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -0,59, 95 % CI -1,51 bis 0,38) (n = 18)	64
Abbildung 29: IL-1α-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (663,90 ± 107,27 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (562,25 ± 149,70 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -0,78, 95 % CI -1,70 bis 0,21) (n = 18)	114
Abbildung 30: IL-1β-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (1974,66 ± 154,00 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (1606,27 ± 430,25 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,14, 95 % CI -2,08 bis -0,10) (n = 18)	114
Abbildung 31: IL-2-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (3054,63 ± 311,54 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (2636,42 ± 411,02 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,15, 95 % CI -2,08 bis -0,10) (n = 18)	115
Abbildung 32: IL-6-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (2179,48 ± 488,09 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (1868,34 ± 590,59 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -0,57, 95 % CI -1,49 bis 0,39) (n = 18)	115
Abbildung 33: IL-10-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (3653,59 ± 414,48 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (3012,69 ± 700,97 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,11, 95 % CI -2,05 bis -0,07) (n = 18)	116
Abbildung 34: IL-12p40-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (11,24 ± 4,03 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (9,53 ± 3,44 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -0,45, 95 % CI -1,73 bis 0,93) (n = 9).....	116
Abbildung 35: IL-12p70-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (994,27 ± 76,82 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (772,11 ± 204,06 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,44, 95 % CI -2,40 bis -0,35) (n = 18)	117
Abbildung 36: IL-13-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (494,80 ± 49,09 pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe (398,25 ± 116,81 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI (d_{Cohen} = -1,08, 95 % CI -2,01 bis -0,04) (n = 18)	117

Abbildung 37: IL-17A-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($435,29 \pm 39,10$ pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe ($387,81 \pm 68,41$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,85$, 95 % CI -1,77 bis 0,15) (n = 18)	118
Abbildung 38: GM-CSF-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1254,07 \pm 196,48$ pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe ($1012,26 \pm 303,35$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,95$, 95 % CI -1,87 bis 0,07) (n = 18)	118
Abbildung 39: TNF-α-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1233,33 \pm 208,88$ pg/ml) und der cgtx-544-Gruppe ($1031,91 \pm 304,09$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,77$, 95 % CI -1,69 bis 0,22) (n = 18)	119

2. Postoperatives Ratten Score Sheet

Score Sheet für Ratten			
Projektnr.:	ID Ratte/OP-Tag/Gruppe	ID / OP /	Datum:
Beobachtung:	Projektleiter:		
Verhalten	Score:		
	unauffällig, normal		0 Punkte
	reduziert aber normal auf Reiz		1 Punkte
	Selbstisolation, auch unter Reiz reduziert, Hyperkinesie oder reduzierte Motorik		2 Punkte
	Lautäußerung, Lahmheit		3 Punkte
	Autoaggression, Apathie, Bewußtseinsverlust; Automutilation		4 Punkte
Allgemein- oder Pflegezustand	Fell glatt, glänzend Körperöffnung sauber, Augen klar		0 Punkte
	reduzierte oder gesteigerte Körperpflege		1 Punkt
	Fell stumpf, Haare gestäubt, Körperöffnung ungepflegt, Augen weit offen/halb geschlossen		2 Punkte
	schmutziges Fell, verklebte Körperöffnung, schnelle Lähmungen; Augen geschlossen, Tränenfluss		4 Punkte
Atmungssystem	normal (60 – 230 Atemzüge/min.)		0 Punkte
	geringfügig verstärkte Atmung		1 Punkt
	schnelle, flache Atmung oder Schnappatmung		4 Punkte
Schmerzsymptome	Keine		0 Punkte
	Vorübergehende gekrümmte Haltung, Leib aufgezogen bzw. staksiger Gang		3 Punkte
	Lautäußerung in Ruhe, Automutilation, anhaltende gekrümmte Haltung, Leib aufgezogen bzw. staksiger Gang trotz Analgesie		4 Punkte
Herz-/Kreislaufsystem	Schleimhäute rosa		0 Punkte
	Ödembildung, trübe Augen, Blässe der Schleimhäute, Augen, Ohren, Haut		1 Punkt
	Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation, Schleimhäute zyanotisch		4 Punkte
Körpergewicht	Kein Gewichtsverlust		0 Punkte
	0-6% Gewichtsverlust		1 Punkt
	6-10% Gewichtsverlust		2 Punkte
	10-16% Gewichtsverlust		3 Punkte
	> 16% Gewichtsverlust		4 Punkte

ZNS	o.b.B	0 Punkte			
	Teilnahmslosigkeit, Ruhelosigkeit	1 Punkt			
	Tier vermeidet Bewegungen, vorübergehendes Torkeln, vorübergehende Apathie, Kopfschüttelung	2 Punkte			
	Vorübergehende Parese(n), einmaliger Krampfanfall von max. 2 min.	3 Punkte			
	Anhaltende Parese(n) bzw. Paralyse, wodurch das Tier aus eigener Kraft das Futter/Wasser nicht erreichen kann, Krampfanfall über 2 min., sich wiederholende Krampfanfälle, anhaltendes Torkeln, anhaltende Apathie	4 Punkte			
Scoresumme:					
	Bei einem Score über 3 wird das Tier umgehend in tiefer Narkose euthanasiert! Bei einem Score von 3, der über 2 Tage besteht, wird das Tier umgehend in tiefer Narkose euthanasiert! Bei einem Score von 2, der über 4 Tage besteht, wird das Tier umgehend in tiefer Narkose euthanasiert!				
	Euthanasie wegen Score > 3 angezeigt	Nein Ja			
	Euthanasie wegen Score 3, der über 2 Tage besteht, angezeigt	Nein Ja			
	Euthanasie wegen Score 2, der über 4 Tage besteht, angezeigt	Nein Ja			
Untersucher:					
Unterschrift:					
Heartbeat strength score nach Gordon et al. 2007					
Postoperative Day					
Morgens					
Transplantatfunktion	(-)	(+)	(++)	(+++)	Nicht beurteilbar
Per Palpation					
Per Echo					
Abends					
Transplantatfunktion	(-)	(+)	(++)	(+++)	Nicht beurteilbar
Per Palpation					
Per Echo					
	(-) no beat, (+) very weak beat, (++) strong beat, (+++) very strong beat				

3. Histologische Protokolle und Materialien

3.1. Programm des Entwässerungsrondeils

Medium	Dauer
Alkohol 70 %	60 Minuten
Alkohol 70 %	60 Minuten
Alkohol 96 %	60 Minuten
Alkohol 96 %	60 Minuten
Alkohol 96 %	60 Minuten
Alkohol 99 %	60 Minuten
Alkohol 99 %	60 Minuten
Alkohol 99 %	60 Minuten
Xylol	90 Minuten
Xylol	90 Minuten
Paraplast	90 Minuten
Paraplast	90 Minuten

3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bearbeitungsschritt	Dauer
Entparaffinierung mit Xylol	10 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
Hämatoxylin	7 Minuten
Leitungswasser	17 Minuten
Eosin	3 Minuten
Mehrmals in Leitungswasser tauchen	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.3. Immunhistochemie-Protokoll: Fibrinogen

Immunhistochemie-Protokoll: Fibrinogen

Gesuchtes Antigen: Fibrinogen

Datum:

Kontrolle: *Graft*

Schnitte:

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	10 Minuten
Proteinase K	10 Minuten
TBS	10 Minuten
Normalserum: <i>swine</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>polyclonal rabbit anti Fibrinogen</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 6,2 mg/ml Verdünnung: 1:800 in TBS Negativkontrolle: <i>polyclonal rabbit anti Escherichia coli</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 13 mg/ml Verdünnung: 1:3300 in TBS	60 Minuten
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>polyclonal swine anti rabbit IG/HRP</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 1,3 mg/ml Verdünnung: 1:100 in TBS	60 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1 µl H ₂ O ₂	2 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.4. Immunhistochemie-Protokoll: CD3

Immunhistochemie-Protokoll: CD3

Gesuchtes Antigen: CD3
Kontrolle: Lymphknoten
Schnitte:

Datum:

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Demaskierung: Mikrowelle bei 700 Watt TRIS/EDTA Puffer pH 9,0	2x 10 Minuten
Abkühlen	25 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	5 Minuten
Normalserum: <i>goat</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>polyclonal rabbit anti human CD3</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 0,6 mg/ml Verdünnung: 1:100 in TBS Negativkontrolle: <i>polyclonal rabbit anti Escherichia coli</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 13 mg/ml Verdünnung: 1:2000	60 Minuten
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>goat anti rabbit biotinylated</i> Hersteller/Konzentration: Vector Laboratories; 1,5 mg/ml Verdünnung: 1:400 in TBS + 5 % Rattenserum	60 Minuten
TBS	5 Minuten
Avidin-Biotin-Komplex	30 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1 µl H ₂ O ₂	2 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.5. Immunhistochemie-Protokoll: CD20

Immunhistochemie-Protokoll: CD20**Gesuchtes Antigen: CD20****Datum:****Kontrolle: Lymphknoten****Schnitte:**

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	5 Minuten
Normalserum: <i>rabbit</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>polyclonal goat anti CD20</i> Hersteller/Konzentration: Santa Cruz; 0,2 mg/ml Verdünnung: 1:25 in TBS Negativkontrolle: <i>goat anti FeLV</i> Hersteller/Konzentration: Biodesign International; 4-5 mg/ml Verdünnung: 1:500	60 Minuten
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>polyclonal rabbit anti goat Ig/HRP</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 0,55 mg/ml Verdünnung: 1:100 in TBS	60 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1 µl H ₂ O ₂	2 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.6. Immunhistochemie-Protokoll: CD68

Immunhistochemie-Protokoll: CD68**Gesuchtes Antigen: CD68****Datum:****Kontrolle: Lymphknoten****Schnitte:**

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	5 Minuten
Normalserum: <i>rabbit</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>monoclonal mouse anti rat CD68</i> Hersteller/Konzentration: Acris; 1 mg/ml Verdünnung: 1:200 in TBS Negativkontrolle: <i>negative control mouse IgG</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 100 mg/ml Verdünnung: 1:20	60 Minuten
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>rabbit anti mouse Ig/HRP</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 1,3 mg/ml Verdünnung: 1:200 in TBS + 5 % Rattenserum	60 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1µl H ₂ O ₂	3,5 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.7. Immunhistochemie-Protokoll: C4d

Immunhistochemie-Protokoll: C4d**Gesuchtes Antigen: C4d****Datum:****Kontrolle: *Graft*****Schnitte:**

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Demaskierung: Mikrowelle: Dampfkochtopf bei 700 Watt 10mM Citratpuffer pH 6,0	33 Minuten
Abkühlen	25 Minuten
<i>aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	5 Minuten
Normalserum: <i>swine</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>polyclonal rabbit anti human C4d</i> Hersteller/Konzentration: Emelca; 0,2 mg/ml Verdünnung: 1:50 in TBS Negativkontrolle: <i>polyclonal rabbit anti Escherichia coli</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 13 mg/ml Verdünnung: 1:3300	Über Nacht
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>swine anti rabbit biotinylated</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 0,56 mg/ml Verdünnung: 1:200 in TBS	60 Minuten
TBS	5 Minuten
Avidin-Biotin-Komplex	30 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1 µl H ₂ O ₂	3 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.8. Immunhistochemie-Protokoll: C5b-9

Immunhistochemie-Protokoll: C5b-9

Gesuchtes Antigen: C5b-9

Datum:

Kontrolle: *Graft*

Schnitte:

Bearbeitungsschritt	Dauer
Trocknung bei 37 °C im Wärmeschrank	Über Nacht
Entparaffinierung mit Xylol	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
<i>aqua destillata</i>	
Blockierung mit H ₂ O ₂ 1 %	15 Minuten
TBS	5 Minuten
Proteinase K	10 Minuten
TBS	5 Minuten
Normalserum: <i>goat</i> Verdünnung: 1:10 in TBS	30 Minuten
1. Antikörper: <i>mouse anti rat C5b-9</i> Hersteller/Konzentration: Hycult biotech; 0,83 mg/ml Verdünnung: 1:200 in TBS Negativkontrolle: <i>negative control mouse IgG</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 100 mg/ml Verdünnung: 1:25	60 Minuten
TBS	5 Minuten
2. Antikörper: <i>polyclonal goat anti mouse Ig biotinylated</i> Hersteller/Konzentration: DAKO; 0,77 mg/ml Verdünnung: 1:300 in TBS + 5 % Rattenserum	60 Minuten
TBS	5 Minuten
Avidin-Biotin-Komplex	30 Minuten
TBS	5 Minuten
DAB und H ₂ O ₂ 30 % Verhältnis: 1 ml DAB zu 1 µl H ₂ O ₂	4 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Leitungswasser	5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindeckeln mit Histokitt	

3.9. Verwendete Primär-, Sekundär- und Negativkontroll-Antikörper

Tabelle 25: Liste der verwendeten Antikörper

Verwendung	Antigen	Bezeichnung	Konzentration	Verdünnung
Primär-Antikörper	CD3	<i>Polyclonal rabbit anti human CD3</i>	0,6 mg/ml	1:100
	CD20	<i>Polyclonal goat anti CD20</i>	0,2 mg/ml	1:25
	CD68	<i>Monoclonal mouse anti rat CD68</i>	1 mg/ml	1:200
	C4d	<i>Polyclonal rabbit anti human C4d</i>	0,2 mg/ml	1:50
	C5b-9	<i>Anti-rat C5b-9</i>	0,83 mg/ml	1:200
	Fibrinogen	<i>Polyclonal rabbit anti Fibrinogen</i>	6,2 mg/ml	1:800
Negativkontroll-Antikörper	CD3	<i>Rabbit anti E. coli</i>	13 mg/ml	1:2000
	CD20	<i>Goat anti FeLV</i>	4-5 mg/ml	1:500
	CD68	<i>Negativ control mouse IgG</i>	100 mg/ml	1:20
	C4d	<i>Rabbit anti E. coli</i>	13 mg/ml	1:3300
	C5b-9	<i>Negative control mouse IgG</i>	100 mg/ml	1:25
	Fibrinogen	<i>Rabbit anti E. coli</i>	13 mg/ml	1:3300

Sekundär- Antikörper	CD3	<i>Goat anti rabbit biotinylated</i>	1,5 mg/ml	1:400
	CD20	<i>Rabbit anti goat PO</i>	0,55 mg/ml	1:100
	CD68	<i>Rabbit anti mouse PO</i>	1,3 mg/ml	1:200
	C4d	<i>Swine anti rabbit biotinylated</i>	0,56 mg/ml	1:200
	C5b-9	<i>Polyclonal goat anti mouse Ig biotinylated</i>	0,77 mg/ml	1:300
	Fibrinogen	<i>Swine anti rabbit PO</i>	1,3 mg/ml	1:100

4. Histologische Score Sheets

4.1. Auswertungsbogen zur histologischen Untersuchung, Seite 1

ID der Ratte:

AUSWERTUNGSBOGEN ZUR HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG DER TRANSPLANTATABSTOßUNG nach den Richtlinien der ISHLT (STEWART et al., 2005; BERRY et al., 2013)

Quilty-Effekt (Endokardiale Infiltrate im Endokard und evtl. auch im angrenzenden Myokard, die mit Myozytenschäden assoziiert sein können; kein Zusammenhang mit ACR)

- nein
- ja (Hinweise sind Dichte der Infiltrate, Anwesenheit von B-Zellen und Plasmazellen, Fibrose und prominente Vaskularisation)
- Endokard Zusätzlich im angrenzenden Myokard

Perioperative ischämische Schädigung (Häufigkeit der zellulären Infiltrate ist proportional geringer als der Grad an Myozytenschäden)

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <u>Zelluläre Infiltrate</u> | <u>Grad an Myozytenschäden</u> |
| <input type="checkbox"/> keine | <input type="checkbox"/> keine |
| <input type="checkbox"/> geringgradig | <input type="checkbox"/> geringgradig |
| <input type="checkbox"/> mittelgradig | <input type="checkbox"/> mittelgradig |
| <input type="checkbox"/> hochgradig | <input type="checkbox"/> hochgradig |

Differenzierung von perivaskulären und interstitiellen Lymphozyten

- | | |
|---|---|
| <u>Auftreten von T-Zellen (CD3)</u> | <u>Auftreten von B-Zellen (CD20)</u> |
| <input type="checkbox"/> keine/einzelne | <input type="checkbox"/> keine/einzelne |
| <input type="checkbox"/> wenige | <input type="checkbox"/> wenige |
| <input type="checkbox"/> viele | <input type="checkbox"/> viele |
| <input type="checkbox"/> zahlreiche | <input type="checkbox"/> zahlreiche |

Akute zelluläre Abstoßung in der HE-Färbung im Myokard

- Grad 0 R = Keine Infiltrate und kein Myozytenschaden
- Grad 1 R, egr = Interstitielle und/oder perivaskuläre Infiltrate mit bis zu einem Focus eines Myozytenschadens
- Grad 2 R, mgr = Zwei oder mehr Foci von Infiltraten mit assoziierten Myozytenschäden
- Grad 3 R, hgr = Diffuse Infiltrate mit multifokalen Myozytenschäden
 Ödem
 Einblutungen
 Vaskulitis

4.2. Auswertungsbogen zur histologischen Untersuchung, Seite 2

Antikörper vermittelte Abstoßung

ID der Ratte:

Histopathologische Kriterien (HE-Färbung, Fibrin)

- Intravaskuläre aktivierte mononukleäre Zellen
- Hochgradige Antikörper vermittelte Abstoßung
- Intravaskuläre Ansammlungen von Makrophagen in Kapillaren und Venolen, die die vaskulären Lumina ausdehnen bzw. ausfüllen
- Endothelzellen mit großen Zellkernen und ausgedehntem Zytoplasma, die die Gefäßlumina einengen bzw. verschließen
- Einblutungen
- Interstitielles Ödem
- Nekrose von Myozyten
- Kapilläre Fragmentation
- Gemischte inflammatorische Infiltrate im Lumen bzw. im perivaskulären Raum
- Pyknosis und/oder Karyorrhexis von Endothelzellen
- Thromben

Immunpathologische Kriterien (C4d, CD68/CD31)

Verteilung des kapillären C4d

- 0: < 10% negativ
- 1: 10% - 50% = fokal negativ
- 2: > 50% = multifokal/diffus

Farbintensität des kapillären C4d

- 0: nicht anfärbt negativ
- 1: Schwach anfärbt
- 2: Stark anfärbt

Verteilung von intravaskulären Makrophagen (CD68)

- 0: < 10% negativ
- 1: 10% - 50% = fokal
- 2: > 50% = multifokal/diffus

Grading für die pathologische Diagnose der Antikörper vermittelte Abstoßung

- pAMR 0 = negativ
- pAMR 1 = Histologische AMR
- pAMR 1 = Immunpathologische AMR
- pAMR 2 = Pathologische AMR
- pAMR 3 = Hgr pathologische AMR

- Histopathologische & immunpathologische Kriterien fehlen
- Histopathologische Kriterien vorhanden, Immunpathologische Kriterien fehlen
- Histopathologische Kriterien vorhanden (CD68 und/oder C4d +)
- Histopathologische und immunpathologische Kriterien vorhanden
- Hochgradige histopathologische und immunpathologische Kriterien vorhanden

positiv für intravaskuläre Makrophagen

5. Lösungen für histologische Untersuchungen

5.1. 0,1 %ige Eosin-Lösung

- 40 ml 0,5 %ige Eosin G-Lösung mit 160 ml *aqua destillata* mischen
- 100 µl 100 %ige Essigsäure hinzugeben

5.2. 1 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung

- 6 ml 30 %iges H₂O₂ und 174 ml *aqua destillata* mischen

5.3. 0,05 M Tris-Buffer Saline pH 7,6

Stammlösung:

- 121,0 g TRIS in 1900 ml *aqua destillata* lösen
- 90,0 g NaCl hinzugeben
- pH-Wert mit 37 % Salzsäure auf pH 7,6 einstellen
- Lösung auf 2000 ml mit *aqua destillata* auffüllen
- pH-Wert überprüfen

Gebrauchslösung:

- 1800 ml *aqua destillata* und 200 ml TBS-Stammlösung pH 7,6 mischen
- pH-Wert überprüfen

5.4. TRIS/EDTA Puffer pH 9,0

- 4 ml 0,5M EDTA-Lösung in 2000 ml *aqua destillata* lösen
- 2,42 g TRIS hinzugeben
- pH-Wert mit 25 % HCl auf pH 9,0 einstellen

5.5. 10 mM Citratpuffer pH 6,0

Stammlösung A:

- 21,01 g Citronensäure-Monohydrat in 1000 ml *aqua destillata* lösen

Stammlösung B:

- 29,41 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat in 1000 ml *aqua destillata* lösen

Gebrauchslösung:

- 27 ml Stammlösung A und 123 ml Stammlösung B in 1350 ml *aqua destillata* lösen
- 1,5 ml Tween 20 hinzugeben

5.6. DAB-Lösung

- 5 3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid-Tabletten in 50 ml *aqua destillata* geben und im Dunklen über 45 Minuten lösen lassen
- DAB-Lösung filtrieren
- Filtrat aliquotieren und bei -30 °C tiefrieren
- Vor Nutzung auftauen und 1 µl 30 %iges H₂O₂ pro 1 ml DAB-Lösung hinzugeben

6. Verwendete Materialien

Tabelle 26: Liste der verwendeten Materialien

Materialbezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Einmalartikel		
Butterflykanüle	Safety-Multifly 25 G 80mm lang	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Chirurgischer Mundschutz	Convertors OP-Maske	Cardinal Health, Inc., Dublin, Ohio, U.S.
Combi-Stopper	Combi-Stopper blau	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalkanüle 20G	BD Microlance 3 20G	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Einmalkanüle 25G	BD Microlance 3 25G	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Einmalskalpell Klingentyp 11	Feather Disposable Scalpel	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Einmalskalpell Klingentyp 22	Einmal- Sicherheitsskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kapillarblutröhrchen	Mikrotainer K2E Tubes	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Latex-Handschuhe L, unsteril	Vasco Basic L	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Latex-Handschuhe M, unsteril	Vasco Basic M	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mullkompressen, unsteril, 10x10 cm 12-lagig	Mullkompressen, unsteril, 10x10 cm 12- lagig	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter
Multi-Clipapplikator	Ligaclip MCA / 23,8 cm 20 kleine Titanclips, 3,8 mm	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Nitril-Handschuhe L, unsteril	sempercare nitrile skin ² L	Semperit Aktiengesellschaft Holding, Wien, Österreich

Nitril-Handschuhe M, unsteril	sempercare nitrile skin ² M	Semperit Aktiengesellschaft Holding, Wien, Österreich
OP-Haube	Convertors Cosmos Light	Cardinal Health, Inc., Dublin, Ohio, U.S.
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	ratiolab Pipettenspitzen Kristall -E-0,5-20 µl	ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen 1-200 µl	ratiolab Pipettenspitzen Gelb -E-1-200 µl	ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen 100-1000 µl	LLG- Pipettenspitzen Economy 100-1000 µl, unsteril	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Reaktionsgefäß 0,6 ml	Reaktionsgefäß 0,6 ml, rot	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß 2 ml	Reaktionsgefäß 2,0 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Serummonovette	S-Monovette 4,5 ml Z	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Stark klebendes Fixierpflaster	Leukoplast hospital, 1,25 cm	BSN medical GmbH, Hamburg
Sterile Einwegspritzen 10 ml	BD Discardit II 10 ml	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Sterile Einwegspritzen 2 ml	BD Discardit II 2 ml	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Sterile Einwegspritzen 5 ml	BD Discardit II 5 ml	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Sterile Eppendorf-Gefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Latex puderfreie Handschuhe 6 1/2	Protexis Latex Micro 6 1/2	Cardinal Health, Inc., Dublin, Ohio, U.S.

Sterile Latex puderfreie Handschuhe 7 1/2	Protexis Latex Micro 7 1/2	Cardinal Health, Inc., Dublin, Ohio, U.S.
Strauss Kanüle	Strauss Kanüle Luer 1,8 mm	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml	FALCON BLUE MAX Jr. 15 ml Konisches Röhrchen	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	FALCON 50 ml Konisches Röhrchen	Becton, Dickinson und Company, Heidelberg
Materialien für die Histologie		
3,3'-Diaminobenzidin	DAB	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
ABC-Kit	VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)	Vector Laboratories, Burlingame, U.S.
Adhäsivobjektträger	Star Frost Adhäsiv	Knittel Glasbearbeitungs GmbH
Biopsie-Schwämmchen	Biopsie-Schwämmchen, blau	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Calciumchlorid	Calciumchlorid $\geq 98\%$, getrocknet, Pulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Citronensäure-Monohydrat, ACS, ISO, Reag. Ph.Eur.	Merck KGaA, Darmstadt
Dampfkochtopf	Nordic Ware Microwave Tender Cooker 2.5 Quart	Holländer & Zacharias GbR, Frankfurt
Deckgläser 24x40 mm	Menzel-Gläser, Deckgläser 24x40 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
EDTA-Lösung pH 8,0	EDTA-Lösung pH 8,0 (0,5 M) für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt

Einbettkassetten	Einbettkassetten, blau	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig für die Mikroskopie	Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Essigsäure Rotipurpuran 100 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 96 %	Ethanol 96 % Vollst. Verg. MEK/BITREX	CLN GmbH, Niederhummel
Ethanol 99 %	Ethanol S99 % VG 1 %Petrolether SAV K5L	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
Hämalaunlösung sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Hämalaunlösung sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Histokitt	Histokitt Nr. 1025/500	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön
Mikrotom-Klingen	Feather Microtome Blade S35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Natriumchlorid	Natriumchlorid reinst Ph.Eur., USP	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraffin	Paraplast Plus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteinase K	Proteinase K Ready-to- Use for Autostainer	DAKO GmbH, Jena
Salzsäure rauchend 37 %	Salzsäure rauchend 37 %, Ph.Eur.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 25 %	Salzsäure 25 %, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Tri-Natriumcitrat Dihydrat ≥ 99 % Ph.Eur.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris	Tris für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tween 20 (Polysorbat)	Tween 20 (Polysorbat)	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Wasserstoffperoxid 30 % (w/v) (100vol.)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylol	Xylol – Isomergemisch für die Histologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Medikamente		
Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml	Revertor 10 ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Buprenorphin 0,3 mg/ml	Temgesic Ampullen 1ml	RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, U.K.
Dexpanthenol-Salbe 5 %	Bepanthen Augen-und Nasensalbe 5 g	Bayer AG, Leverkusen
Fentanyl 0,5 mg/10 ml	Fentanyl B. Braun 0.5 mg 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Flumazenil 0,5 mg/5 ml	Flumazenil Hexal 0,1 mg/ml Injektionslösung	Hexal AG, Holzkirchen
Glucose-Infusionslösung 5 %	Glucose 5 % B.Braun G- 5	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml	Heparin-Natrium-25000- ratiopharm 5 ml	ratiopharm GmbH, Ulm
HTK-Lösung nach Bretschneider	Custodiol 1000 ml	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim
Isofluran	Forene 100 % (V/V) 250 ml	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml	Dorbene vet 10 ml	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Metamizol-Natrium 2,5 g/5ml	Novalminsulfon- ratiopharm 2,5 g/5 ml Injektionslösung	ratiopharm GmbH, Ulm
Midazolam 15 mg/3 ml	Midazolam B.Braun 5 mg/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Naloxonhydrochlorid 0,4 mg/ml	Naloxon Inresa 0,4 mg	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg

Natriumchlorid- Infusionslösung 0,9 %	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sonstiges		
Alkoholisches Hautantiseptikum	Kodan Tinktur forte gefärbt	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Haut-Desinfektionsspray	Cutasept F	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Ohrmarken	Ohrmarken für Laboratoriumstiere	HAUPTNER INSTRUMENTE GMBH, DIETLIKON- ZÜRICH, Schweiz
Ohrmarkenzange	Kleine Ohrmarkenzange 73855	HAUPTNER INSTRUMENTE GMBH, DIETLIKON- ZÜRICH, Schweiz
Resorbierbarer Hämostatischer Gelantineschwamm	Spongostan Standard	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Nahtmaterial		
Nahtmaterial, Polyester beschichtet, 2-0, MH	Ethibond Excel 2-0, MH	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Nahtmaterial, Polyester, 5-0, C-1	Ethibond Excel 5-0, C-1	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Nahtmaterial, Polypropylen, 3-0, PS-1	Prolene 3-0, PS-1	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Nahtmaterial, Polypropylen, 8-0, MV-14	Prolene 8-0, MV-14	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Chirurgische Instrumente		
Anatomische Pinzette mittelbreit 145 mm, 5 3/4	BD 27 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen

Anatomische Pinzette schmal/fein 115 mm	BD 210 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Atraumata-Pinzette 2,0 mm breit 150 mm, 6	FB 400 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Chirurgische Pinzette 1x2 Zähne 130 mm, 5 1/8	BD 555 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Chirurgische Pinzette 1x2 Zähne 180 mm, 7	BD 670 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
DeBakey Atraumata Bulldogklemme gebogen, Maullänge 27 mm	FB 353 Stainless	Aesculap AG, Tuttlingen
DeBakey-Hess Bulldogklemme gebogen, Maullänge 20 mm 3/4	BH 30 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Dieffenbach Bulldogklemme gebogen, Maullänge 12 mm, 1/2	BH 21	Aesculap AG, Tuttlingen
Federschere	91501-09	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Fogarty Einweg-Federclip	CSOFT12	Edwards Lifesciences Services GmbH, Unterschleißheim
Knopfkanüle 95 mm 1.5	gängig	Nicht näher bezeichnet
Metallschale 400 ml	gängig	Nicht näher bezeichnet
Mikrogefäßschere 125° Spitz	BRA-5	Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein
Mikrogefäßschere 25° Spitz	BCL-2	Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein
Mikroknüpfpinzette gerade, 0,5 mm 180 mm, 7	FD 286	Aesculap AG, Tuttlingen

Mikronadelhalter	ZCO-9	Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein
Mikronahtpinzette, gerade, 0,6 mm, 15 cm, 6"	RU 4068-51G	RUDOLF Medical GmbH + Co. KG, Fridingen
Mikroskopische Pinzette fein, gebogen 105 mm	HWC 071-10	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Nadelhalter 14 cm	gängig	Nicht näher bezeichnet
Nadelhalter 15 cm	25164-15 R1/06	Handel Marketing Service, Benningen
Plastikschale 250 ml	gängig	Nicht näher bezeichnet
Präparierklemme gebogen 140 mm, 5 ½	BJ008R	Aesculap AG, Tuttlingen
Präparierschere Metzenbaumtyp / Größe 20,5 cm - 8 1/8 "	11-943-20	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Präparierschere 18 cm	HM04.63.68	MEDICON eG, Chirurgiemechaniker- Genossenschaft, Tuttlingen
Splitterpinzette 80 mm, 3 1/8	BD 952R	Aesculap AG, Tuttlingen
Wundspreizer scharf 165 mm, 6 1/2	BV 72 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen

7. Zytokin-Werte am Tag des Transplantatversagens

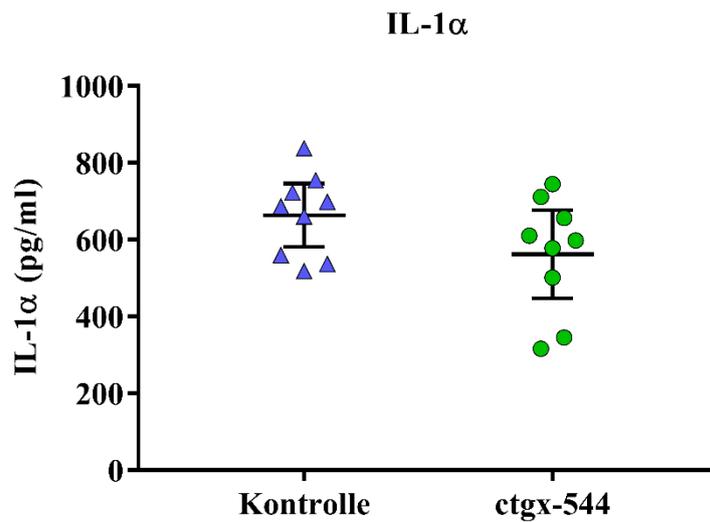


Abbildung 29: IL-1 α -Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($663,90 \pm 107,27$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($562,25 \pm 149,70$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,78$, 95 % CI -1,70 bis 0,21) (n = 18)

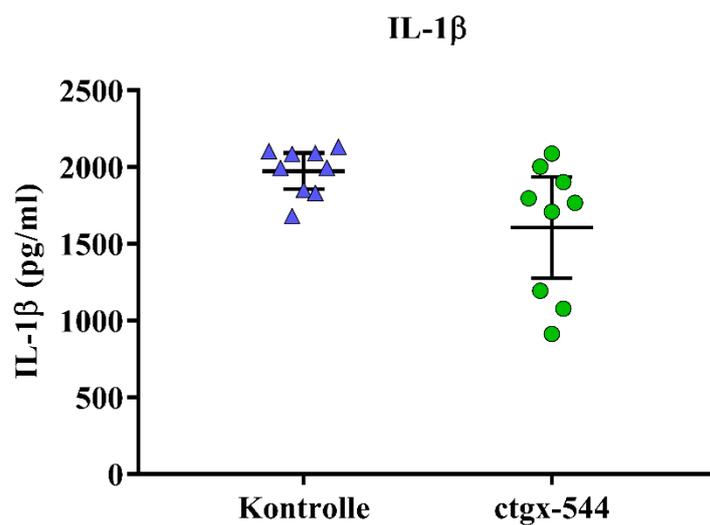


Abbildung 30: IL-1 β -Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1974,66 \pm 154,00$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($1606,27 \pm 430,25$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,14$, 95 % CI -2,08 bis -0,10) (n = 18)

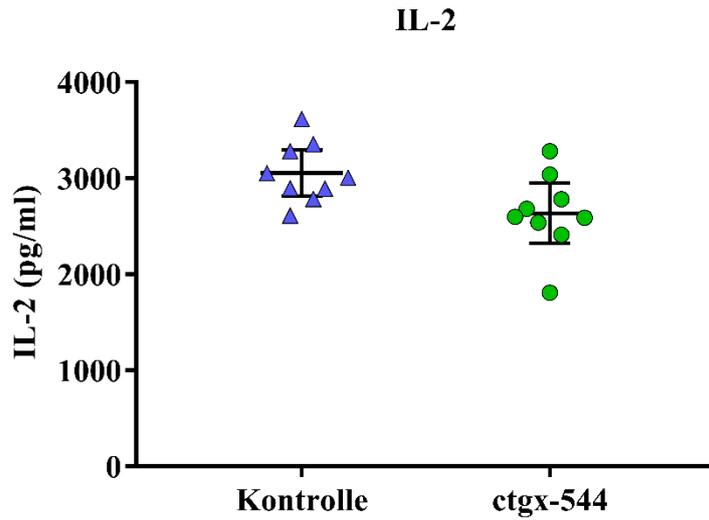


Abbildung 31: IL-2-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (3054,63 ± 311,54 pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe (2636,42 ± 411,02 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,15$, 95 % CI -2,08 bis -0,10) (n = 18)

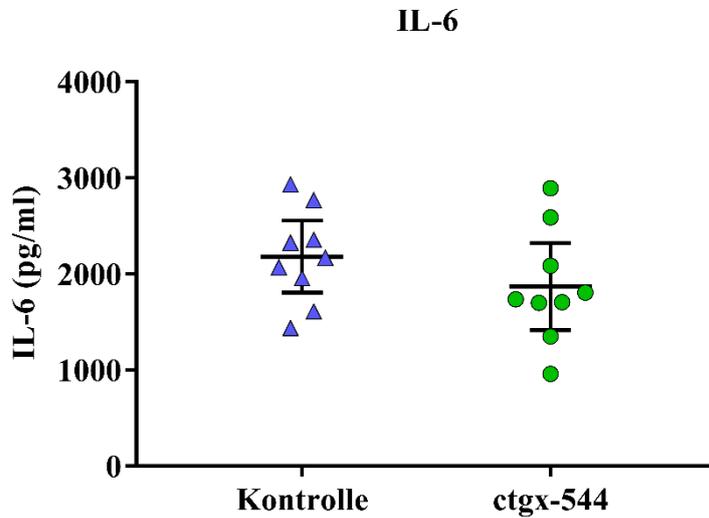


Abbildung 32: IL-6-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe (2179,48 ± 488,09 pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe (1868,34 ± 590,59 pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,57$, 95 % CI -1,49 bis 0,39) (n = 18)

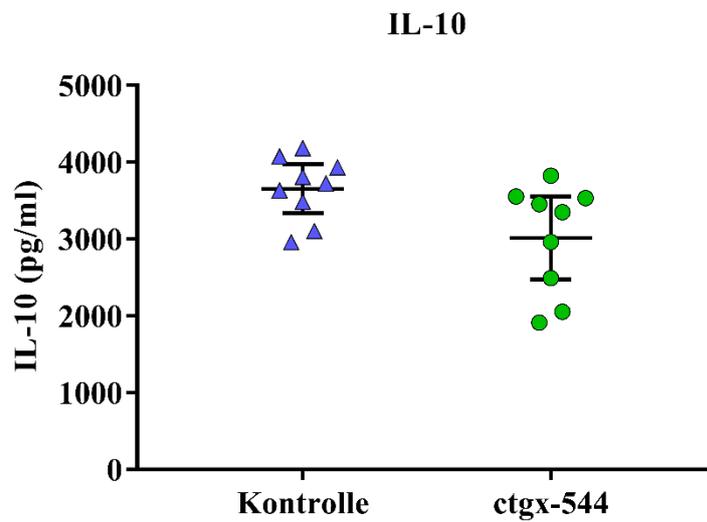


Abbildung 33: IL-10-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($3653,59 \pm 414,48$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($3012,69 \pm 700,97$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,11$, 95 % CI -2,05 bis -0,07) (n = 18)

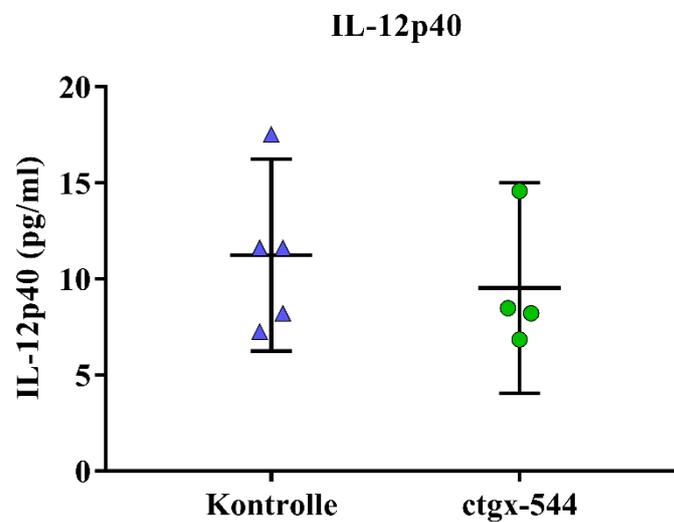


Abbildung 34: IL-12p40-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($11,24 \pm 4,03$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($9,53 \pm 3,44$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,45$, 95 % CI -1,73 bis 0,93) (n = 9)

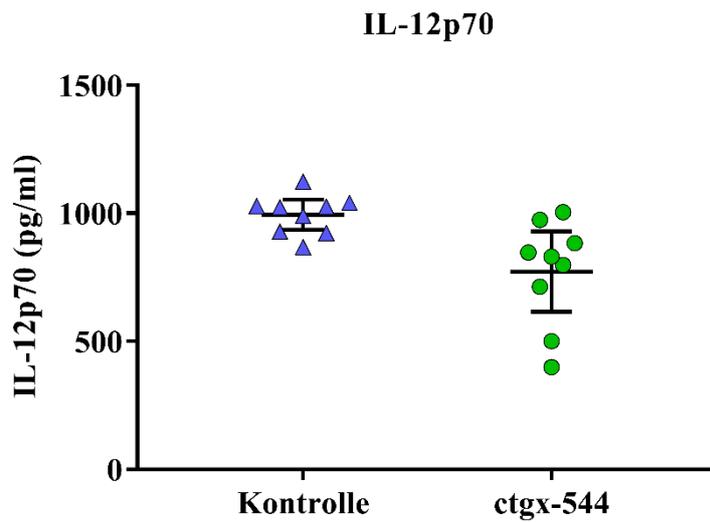


Abbildung 35: IL-12p70-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($994,27 \pm 76,82$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($772,11 \pm 204,06$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,44$, 95 % CI -2,40 bis -0,35) ($n = 18$)

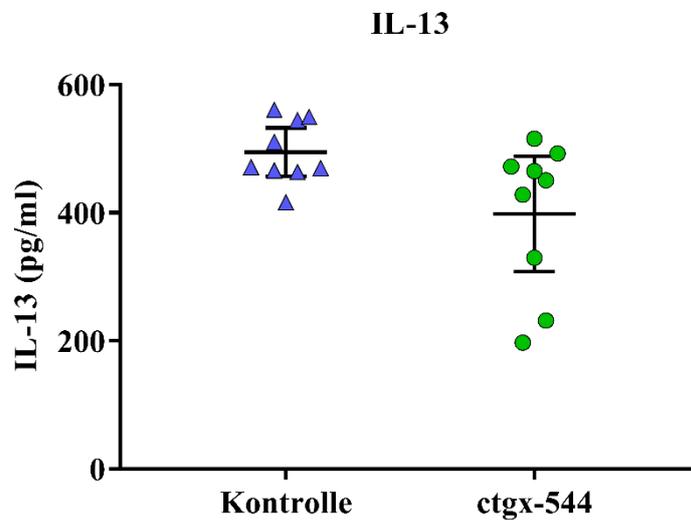


Abbildung 36: IL-13-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($494,80 \pm 49,09$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($398,25 \pm 116,81$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -1,08$, 95 % CI -2,01 bis -0,04) ($n = 18$)

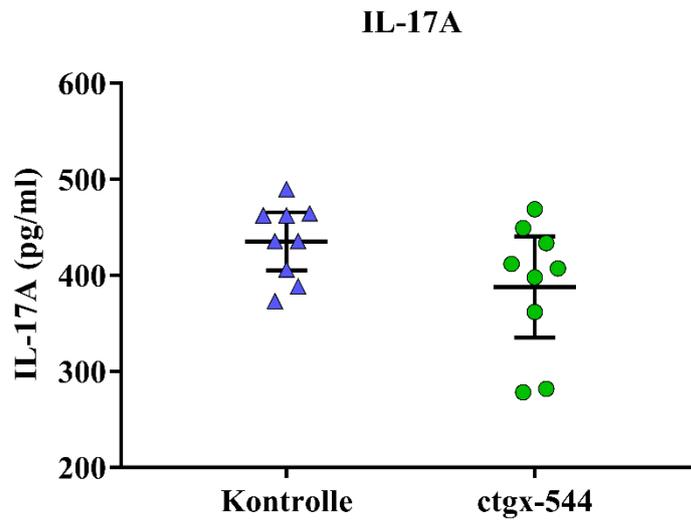


Abbildung 37: IL-17A-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($435,29 \pm 39,10$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($387,81 \pm 68,41$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,85$, 95 % CI -1,77 bis 0,15) (n = 18)

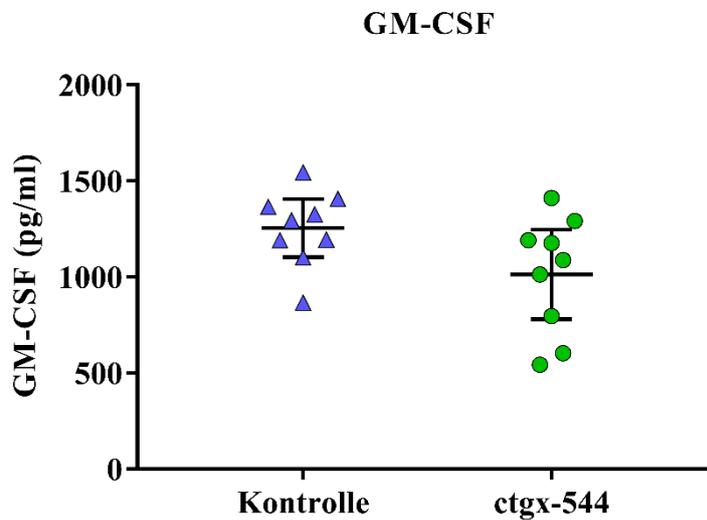


Abbildung 38: GM-CSF-Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1254,07 \pm 196,48$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($1012,26 \pm 303,35$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,95$, 95 % CI -1,87 bis 0,07) (n = 18)

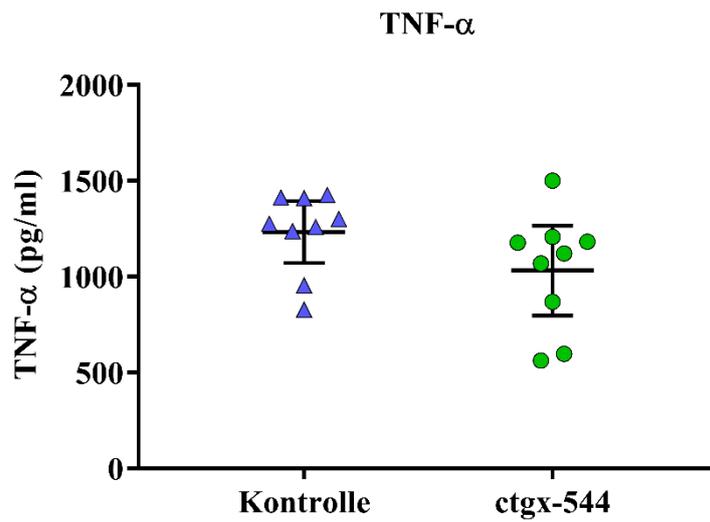


Abbildung 39: TNF- α -Werte und Mittelwerte der Kontrollgruppe ($1233,33 \pm 208,88$ pg/ml) und der *ctgx-544*-Gruppe ($1031,91 \pm 304,09$ pg/ml) am Tag des Transplantatversagens mit Angabe des 95 % CI ($d_{\text{Cohen}} = -0,77$, 95 % CI -1,69 bis 0,22) (n = 18)

XII. Eidesstattliche VersicherungDekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro**Eidesstattliche Versicherung**

Späth, Andre

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Auswirkungen einer selektiven KV1.3-Kanalblockade auf die Transplantatabstoßung in einem allogenen, heterotopen Rattenherztransplantationsmodell in nicht sensibilisierten Empfängertieren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Andernach, 26.02.2023

Ort, Datum

Andre Späth

Unterschrift Doktorand

XIII. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Bruno Reichart für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Dr. med. Sonja Güthoff für ihre intensive und herausragende Betreuung bedanken. Ihre Motivation und Geduld halfen mir auch in einfalllosen Momenten mit der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne ihren Rat bei Fragen und Problem hätte ich die Arbeit in dieser Form nicht verwirklichen können.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft und dem Sonderforschungsbereich 127 für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Anfertigung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Firma conoGenetix biosciences GmbH bedanken, ohne deren großzügige Bereitstellung des Studienmedikamentes diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. med. vet. Tanja Mayr und Herrn Dr. med. Jan-Michael Abicht sowie dem Team des Instituts für chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum, die mir bei Fragen rund um das wissenschaftliche Arbeiten immer zur Verfügung standen.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Elisabeth Kemter für die Bereitstellung der für die Histologie notwendigen Gerätschaften bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwinzer für den konstruktiven Input und die informativen Gespräche.

Auch möchte ich mich bei Dr. Joachim Hundrieser und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der *in vitro* Versuch bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung wäre mir weder das Studium noch die Anfertigung dieser Arbeit möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich Lisa Späth für den Rückhalt und die Geduld danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.