

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Direktor Prof. Dr. C. Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

***Einsatz von Everolimus zur Prävention der
chronischen Abstoßung nach orthotoper
unilateraler Lungentransplantation in der Ratte***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elisabeth Brunner

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Karla Lehle

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Pfeifer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2013

*Meinen Eltern und
meinem Bruder Maximilian gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Historischer Rückblick	1
1.2 Postoperativer Langzeitverlauf und Bronchiolitis obliterans	3
1.3 Immunsuppression nach LTx.....	4
1.3.1 Grundzüge der immunsuppressiven Therapie nach LTx	4
1.3.2 Everolimus.....	6
1.4 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe	10
1.5 Studiendesign und –ziel.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Tiermodell.....	15
2.2 Narkose, Beatmung und Transplantation.....	16
2.2.1 Narkose und Beatmung	16
2.2.2 Spenderoperation	17
2.2.3 Empfängeroperation	19
2.3 Postoperativer Verlauf	21
2.4 Versuchsgruppen	22
2.5 Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	25
2.6 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	26
2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	26
2.6.2 Masson-Goldner-Färbung.....	27

2.6.3	Immunperoxydasefärbung	28
2.7	Auswertung der konventionellen Histologie	30
2.7.1	Histologischer Aufbau der Rattenlunge	30
2.7.2	Akute und chronische Abstoßung	33
2.8	Auswertung der Immunhistologie.....	38
2.8.1	Makrophagenmarker ED1	38
2.8.2	CD11a und CD18	40
2.8.3	ICAM-1 und P-Selektin.....	41
2.9	Statistische Auswertungen	46
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	Ergebnisse der konventionellen Histologie	47
3.1.1	0-Kontrolle	47
3.1.2	MP-Kontrolle.....	54
3.1.3	RAD-Gruppe	59
3.2	Ergebnisse der Immunhistologie	71
3.2.1	Expression des Makrophagenmarkers ED1.....	71
3.2.2	Expression von CD11a	75
3.2.3	Expression von CD18.....	79
3.2.4	Expression von ICAM-1.....	83
3.2.5	Expression von P-Selektin.....	87
4	DISKUSSION	91
5	AUSBLICK	109

6 ZUSAMMENFASSUNG.....	111
7 LITERATURVERZEICHNIS	113
8 ANHANG	125
8.1 Messwerte	125
8.2 Publikationen und Posterpräsentationen.....	145
9 DANKSAGUNG	167

Abkürzungsverzeichnis

Sämtliche Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden nach ihrer ersten Nennung im Text erklärt. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden noch mal erwähnt:

<u>Abkürzung</u>	<u>Erläuterung</u>
AR	Acute Rejection , akute Abstoßung
AK	Antikörper
BO	Bronchiolitis obliterans , obliterative Bronchiolitis
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
BALT	Bronchus associated Lymphoid Tissue , Bronchus-assoziertes lymphatisches Gewebe
CD	Cluster of Differentiation
CNI	Calcineurin-Inhibitor
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CR	Chronic Rejection , chronische Abstoßung
CsA	Cyclosporin A
ED1	Endothelial Dysplasia , monoklonaler Antikörper (CD68-artig)
et al.	Et alii , Und andere
FKBP-12	FK506-binding-Protein-12
FRAP	FKBP-Rapamycin-associated-Protein
F344[RT1] ^{lwl} -Ratten	Fischer-Rattenstamm (Spenderstamm)
g	Gramm

HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human leukocyte antigen, HL-Antigen
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal (durch das Bauchfell injiziert)
i.g.	intrastral (per Schlundsonde verabreicht)
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LTx	Lungentransplantation
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitäts - komplex
min	Minute
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MP	Methylprednisolon
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin, zu deutsch: Ziel des Rapamycins im Säugetier
PBS-Lösung	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
POD	Postoperative day, postoperativer Tag
RAD	Rapamycin-Derivat, Synonym: Everolimus
sec	Sekunde
s.c.	Subkutan, unter die Haut
WKY[RT1] ^l -Ratten	Wistar-Kyoto-Rattenstamm (Empfängerstamm)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Stäbchenform und chemische Strukturformel von Everolimus	6
Abbildung 1.2: Molekularer Wirkungsmechanismus von Everolimus	9
Abbildung 2.1: Spenderoperation.....	18
Abbildung 2.2: Empfängeroperation	21
Abbildung 2.3: Indirekte 2-Schritt-Methode	29
Abbildung 2.4: Wandaufbau einer Arterie (muskulärer Typ)	33
Abbildung 2.5: Beispiel für eine ED1-Färbung	39
Abbildung 2.6: Beispiel für ED1-positive Makrophagen.....	40
Abbildung 2.7: Beispiel für eine CD11a-Färbung.	42
Abbildung 2.8: Beispiel für eine CD18-Färbung.	43
Abbildung 2.9: Beispiel für eine ICAM-1-Färbung.	44
Abbildung 2.10: Beispiel für eine P-Selektin-Färbung.	45
Abbildung 3.1: Ausschnitt aus einer rechten unveränderten Lunge.....	48
Abbildung 3.2: Ausschnitt aus linker Lunge der 0-Kontrolle (POD 15)	49
Abbildung 3.3: Ausschnitt aus linker Lunge der 0-Kontrolle (POD 30)	51
Abbildung 3.4: Ausschnitt aus linker Lunge der 0-Kontrolle (POD 60).....	52
Abbildung 3.5: Ausschnitt aus linker Lunge der 0-Kontrolle (POD 100).	53
Abbildung 3.6: Ausschnitt aus linker Lunge der MP-Gruppe (POD 20).	55
Abbildung 3.7: Ausschnitt aus linker Lunge der MP-Gruppe (POD 60)	57
Abbildung 3.8: Ausschnitt aus linker Lunge der MP-Gruppe (POD 100).....	58
Abbildung 3.9: Ausschnitt aus linker Lunge der RAD-Gruppe (syngen POD 100).	59
Abbildung 3.10: Ausschnitt aus linker Lunge der RAD-Gruppe (POD 20)	61
Abbildung 3.11: Ausschnitt aus linker Lunge der RAD-Gruppe (POD 30).	63
Abbildung 3.12: Ausschnitt aus linker Lunge der RAD-Gruppe (POD 60)	65
Abbildung 3.13: Ausschnitt aus zwei linken Lungen am POD 100.....	67
Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der ISHLT-Klassifizierung der akuten Abstoßung.....	69

Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der ISHLT- Klassifizierung der chronischen Abstoßung	70
Abbildung 3.16: Expression von ED1-positiven Makrophagen.....	73
Abbildung 3.17: Expression von CD11a-positiven Leukozyten.....	77
Abbildung 3.18: Expression von CD18-positiven Leukozyten.....	81
Abbildung 3.19: Expression von ICAM-1-positiven Gefäßen.....	85
Abbildung 3.20: Expression von P-Selektin-positiven Gefäßen.....	89
Abbildung 4.1: Risikofaktoren für die Entstehung einer BO	96
Abbildung 4.2: Strukturformel von Methylprednisolon.....	97
Abbildung 4.3: Nebenwirkungsprofil von Everolimus	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Indikationen (Auszug) für eine Lungentransplantation.....	2
Tabelle 1.2: 1-, 5- und 10-Jahresüberlebenrate nach soliden Organtransplantationen....	3
Tabelle 2.1: Einteilung der Versuchsgruppen I-III.....	24
Tabelle 2.2: Ansätze der Färbelösungen.....	27
Tabelle 2.3: Übersicht zu Primärantikörper	30
Tabelle 2.4: Histologische Klassifikation der akuten Abstoßung nach LTx.....	36
Tabelle 2.5: Histologische Klassifizierung der chronischen Abstoßung nach LTx	37
Tabelle 4.1: Neu überarbeitete Klassifikation nach LTx gemäß ISHLT 2007	94
Tabelle 4.2: Wirkung der Glukokortikoide mit Beispielen	98
Tabelle 8.1 A – C: ISHLT-Auswertung der Gruppe I, Gruppe II und Gruppe III	126
Tabelle 8.2 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe I	129
Tabelle 8.3 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe II	134
Tabelle 8.4 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe III	139

X

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Möglichste getan hat.*

J.W. Goethe, Italienische Reise

Caserta, den 16. März 1787

1 EINLEITUNG

1.1 Historischer Rückblick

Lungentransplantationen (LTx) sind derzeit ein etabliertes therapeutisches Verfahren bei Lungenerkrankungen im Endstadium (Meyers et al. 1999), dabei hat sich die Technik der LTx-Chirurgie in den letzten dreißig Jahren ständig weiterentwickelt (Davis und Pasque 1995). Bereits ab 1942 zeigten sich erste experimentelle Ansätze der LTx an Tieren in der früheren Sowjet-Union. Am 11. Juni 1963 führte Dr. James D. Hardy am University of Mississippi Medical Center in den Vereinigten Staaten von Amerika erstmals eine erfolgreiche linksseitige LTx am Menschen durch (Benfield und Wain 2000; Dalton 1995). Zwischen 1968 und 1971 erfolgten drei Herz-Lungen-Transplantationen durch Cooley, Lillehei und Barnard (Reichart und Bittmann 1995) und im Jahre 1986 konnte in Canada die erste bilaterale Transplantation am Menschen vorgenommen werden (Kirby und Mehta 1992). Trotz erfolgreicher Operationstechnik war das Kurzzeitüberleben anfänglich noch stark eingeschränkt. Der im Jahre 1963 von Hardy transplantierte Patient verstarb bereits am 18. postoperativen Tag an den Folgen eines Nierenversagens (Davis und Pasque 1995). Von den mehr als 40 Patienten, welche von 1963 bis Mitte der 80er Jahre transplantiert wurden, verließ nur ein Patient das Krankenhaus lebend, um 10 Monate später zu versterben (Davis und Pasque 1995). Nahezu die Hälfte der Patienten starb nach der ersten postoperativen Woche aufgrund von Transplantatversagen durch Abstoßung oder mangelhafte Präparation. Hauptursache war neben der noch unausgereiften immunsuppressiven Therapie die Insuffizienz der Bronchusnaht (Davis und Pasque 1995). Der Durchbruch gelang, als eine Ärztegruppe der University of Toronto eine neuartige Technik der Bronchusanastomose mit Hilfe eines Omentumlappens entwickelte. Am 7. November 1983 führten die Lungenchirurgen aus Toronto mit dieser Technik eine rechtsseitige LTx bei einem Patienten mit Lungenfibrose durch. Der Patient wurde bereits nach sechs Monaten aus dem Krankenhaus entlassen und überlebte weitere sechs Jahre bevor er im

Alter von 65 Jahren an Nierenversagen verstarb (Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group 1986).

Die operativen Techniken wurden ebenso wie das übrige postoperative Management in den folgenden Jahren ständig weiterentwickelt, so dass von 1983 bis 2006 mehr als 25.000 Transplantationen an über 210 Zentren weltweit durchgeführt werden konnten (Trulock et al. 2006). Dabei ist die LTx Patienten vorbehalten, welche an irreversibler, progressiv fortschreitender Lungenerkrankung im Endstadium leiden und deren Lebenserwartung trotz suffizienter medikamentöser Therapie weniger als 12 bis 18 Monate beträgt (Davis und Pasque 1995). Die Anzahl der verschiedenen Krankheiten, welche im terminalen Stadium eine LTx indizieren, stieg in den letzten Jahren ständig an (Davis und Pasque 1995). Im Hinblick auf die Genese kann zwischen obstruktiven (chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Emphysem), restriktiven (Fibrose), vaskulären (Pulmonale Hypertonie) sowie chronischer Infektion zugrundeliegenden Lungenerkrankungen (Bronchiektasen, Zystische Fibrose) unterschieden werden (Santillán-Doherty et al. 2005). Tabelle 1.1 soll einen Überblick über die wichtigsten Indikationen für eine LTx geben (Davis und Pasque 1995). Die derzeit am häufigsten diagnostizierte Erkrankung, welche zu einem terminalen Lungenversagen führen kann, ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (Santillán-Doherty et al. 2005).

Mögliche Indikationen für die Lungentransplantation

Emphysem (auch: Alpha-1-Antitrypsinmangel)

COPD (chronic obstructive pulmonary disease)

Zystische Fibrose

Primäre und sekundäre Pulmonale Hypertonie

Idiopathische Lungengranulomatose/Interstitielle Lungenerkrankungen

Obliterative Bronchiolitis

Eosinophile Granulomatose

Lymphangioleiomyomatosis

Sarkoidose

Bronchiektasen

Tabelle 1.1: Indikationen (Auszug) für eine Lungentransplantation (nach Davis und Pasque 1995).

1.2 Postoperativer Langzeitverlauf und Bronchiolitis obliterans

Seit der Einführung der LTx in den frühen 1980igern wurden signifikante Verbesserungen hinsichtlich der Operationstechniken, der Diagnose, des postoperativen Managements und der Behandlung häufig auftretender Infektionen gemacht. Diese Verbesserungen führten zu einem Anstieg im Kurzzeitüberleben der Patienten, wohingegen das Langzeitüberleben, vor allem durch die Entwicklung einer chronischen Abstoßung (CR) begrenzt bleibt (Estenne und Hertz 2002). Gemäß den aktuellen Daten der International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) betragen die 5-Jahresüberlebensrate nach LTx 52% und die 10-Jahresüberlebensrate nach LTx 29% (Gomez und Reynaud-Gaubert 2010), womit sie immer noch weit unter den Überlebensraten nach Herz-, Leber- oder Nierentransplantation liegen (Åberg et al. 2011; Maron et al. 2010; Hashiani et al. 2010; Sandhu et al. 2011) (siehe Tabelle 1.2).

Transplantiertes Organ	1- JÜR	5- JÜR	10- JÜR
Lungen-TPL (Gomez et al., 2010)	79%	52%	29%
Herz-TPL (Maron et al., 2010)	82%	70%	49%
Leber-TPL (Sandhu et al., 2011; Åberg et al., 2011)	91%	75%	66%
Nieren-TPL (Hashiani et al., 2010)	94%	82%	80%

Tabelle 1.2: Überblick über die 1-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten nach Lungen-, Herz-, Nieren- sowie Lebertransplantation. Abkürzungen: TPL = Transplantation, JÜR = Jahresüberlebensrate.

Die chronische Abstoßung, welche sich als Bronchiolitis obliterans (BO) oder als das klinische Korrelat der BO, dem Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) manifestiert, stellt die bedeutendste Ursache für Langzeitmorbidity und –mortalität dar. Sie betrifft über 40% der Patienten nach dem zweiten und zwischen 43-80% nach dem fünften postoperativen Jahr (Estenne und Hertz 2002; Belperio et al. 2009). Die BO wird als entzündlich fibrotischer Prozess definiert, der die kleinen, nicht-knorpeligen Atemwege

bzw. Bronchiolen betrifft (Belperio et al. 2009). Die Ätiologie der BO ist immer noch unklar. Hinsichtlich der Pathogenese wird vermutet, dass die BO auf einem wiederkehrenden Verletzungsmechanismus der Epithelzellen des Transplantatorgans beruht, der schließlich zur fibrotischen Vernarbung und Obliteration der bronchialen Lumina der kleineren Luftwege führt. Die Krankheitsentstehung der BO ist komplex und beinhaltet sowohl alloimmune als auch nicht-alloimmune Prozesse, die entweder allein oder in Kombination agieren (Belperio et al. 2009). Die durch allogene Abstoßungsreaktionen freigesetzten Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren bilden dabei jeweils nur einen Baustein in der Entwicklungskaskade der BO (Belperio et al. 2009). Eine erfolgreiche Therapie der BO steht weiterhin aus. Als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung einer BO werden die akuten Abstoßungen (AR) nach LTx angesehen (Hachem 2009). Sharples et al. (2002) beschreibt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Entstehung der BO und der Häufigkeit sowie dem Schweregrad einer AR. Als weitere Risikofaktoren gelten Infektionen, Ischämie, ein mit dem Zytomegalievirus infizierter Spender sowie HLA-Mismatch (HLA= human leukocyte antigen, zu Deutsch: HL-Antigen) (Yousem et al. 1996). Der derzeitige Schwerpunkt liegt auf der Steuerung und Inhibierung der AR. Die Grundzüge der Immunsuppression, speziell die neueren Immunsuppressiva sollen im Folgenden erläutert werden.

1.3 Immunsuppression nach LTx

1.3.1 Grundzüge der immunsuppressiven Therapie nach LTx

Langzeitergebnisse nach LTx blieben in den Anfängen der LTx versagt, da es an einer ausreichend nebenwirkungsarmen Immunsuppression noch mangelte, wobei insbesondere die Bronchusnaht unter der damals üblichen Kortisongabe limitierend wirkte (Reichart und Bittmann 1995). Eine verbesserte Immunsuppression war erst ab Ende der siebziger Jahre gegeben, als der Schweizer Borel das Cyclosporin A entdeckte, ein Polypeptid, das durch seine neuartigen Eigenschaften keinen Effekt auf die

Wundheilung und das retikuloendotheliale System aufwies (Reichart und Bittmann 1995). Das heutzutage von der ISHLT empfohlene Therapieregime im postoperativen Verlauf ist eine sogenannte Triple-Therapie, bestehend aus drei Typen von Immunsuppressiva, einem Calcineurin-Inhibitor (CNI), einem Antimetaboliten sowie einem Kortikosteroid (Snell und Westall 2007). Die Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin und Tacrolimus bilden dabei einen Grundstein in der Langzeit-Immunsuppression nach LTx (Trulock et al. 2006). Durch die Inhibition des intrazytoplasmatischen Ciclosporins wird sowohl die Aktivierung von T-Lymphozyten als auch die Interleukin-2-Produktion gehemmt (Snell und Westall 2007; Schreiber et al. 1991). Als Antimetaboliten werden häufig Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil (MMF) eingesetzt (Snell und Westall 2007). Azathioprin wirkt durch die Hemmung der DNA, RNA und de novo Purinsynthese limitierend auf die Proliferation von B- und T-Lymphozyten. Auch MMF hemmt die Proliferation von Lymphozyten, zeigt jedoch als Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase eine erhöhte Selektivität und verminderte Toxizität im Vergleich zu Azathioprin, was sich auch in der steigenden Anwendungshäufigkeit der letzten Jahre zeigt (Snell und Westall 2007; Trulock et al. 2006). Methylprednisolon (MP) als Kortisonabkömmling wird häufig als drittes Immunsuppressivum gegeben, obwohl von einem erfolgreichen Absetzen nach Jahren der Transplantation nur eingeschränkt berichtet wird (Knoop et al. 2004; Borro et al. 2005). MP wird häufig universal eingesetzt: als dreitägige, intravenöse Bolustherapie in der Phase der akuten Abstoßung (10mg/kg/Tag) (Snell und Westall 2007), als Hochdosistherapie zur Behandlung des Bronchiolitis obliterans Syndroms (Snell et al. 1996), aber auch als Langzeitimmunsuppressivum nach LTx (Knoop et al. 2004).

Da die Patienten oft verschiedenen Alters sind und eine unterschiedlich körpereigene Toleranz gegenüber Immunsuppressiva und ihren Nebenwirkungen besitzen, muss für jeden Patienten eine individuell zusammengestellte Therapie angewendet werden (Trulock et al. 2006). Um dieses Ziel zu erreichen und Abstoßungsrisiken zu vermindern, wird von der ISHLT eine breite Palette an Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Immunsuppressiva vorgeschlagen, welche auch gegeneinander ausgetauscht und in der Dosis variiert werden können (Trulock et al. 2006; Trulock 1993). Die derzeit am häufigsten eingesetzten Langzeit-Immunsuppressiva, die Calcineurin-Inhibitoren und Tacrolimus, besitzen jedoch ein erhebliches

Nebenwirkungspotential. Sie erhöhen nicht nur das Risiko für Infektionen und Krebsentstehung, sondern haben auch eine fibrosefördernde Komponente, was ein chronisches Transplantatversagen induzieren kann (Kessler et al. 2006). Um diese Nachteile zu minimieren und das Transplantatüberleben zu verbessern, ist es nötig nach neuartigeren Substanzen zu forschen, die an Stelle der CNI oder zusätzlich verabreicht werden können (Koch 2009).

1.3.2 Everolimus

Eine Klasse dieser erst seit einigen Jahren bekannten Immunsuppressiva sind die „mammilian target of rapamycin- Inhibitoren“ (mTOR-Inhibitoren), zu denen auch Rapamycin (Synonym: Sirolimus) und sein Derivat Everolimus (Synonym: RAD (=Rapamycin-Derivat)) gehören (Koch 2009). Rapamycin ist ein Makrolid, das von den Streptomyzeten *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird und 1975 das erste Mal aus Bodenproben der Osterinseln (Rapa Nui) isoliert wurde (Saunders et al. 2001; Sacks 1999).

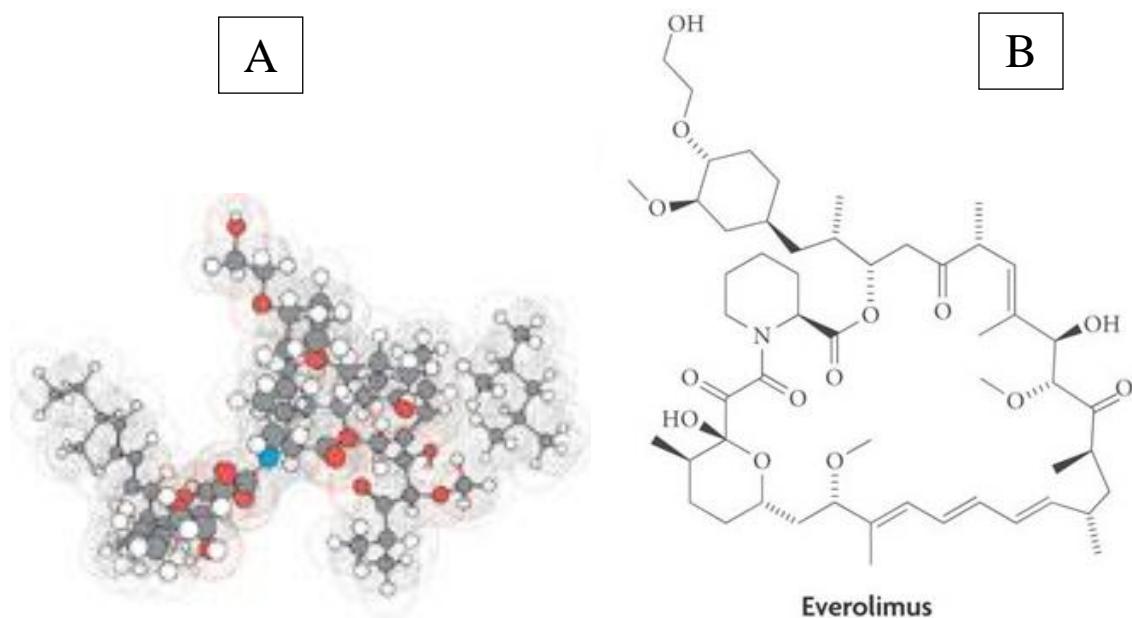


Abbildung 1.1: Stäbchenform (A) und chemische Strukturformel von Everolimus/RAD (B) (Atkins et al. 2009).

Bei dem Derivat Everolimus handelt es sich um ein makrozyklisches Lakton, welches aus Rapamycin durch die Ergänzung einer Hydroxylgruppe und Alkylierung in Position 40 synthetisch hergestellt wird (Hussar 2000) (siehe Abbildung 1.1).

Everolimus und Rapamycin besitzen die gleiche molekulare Wirkung, unterscheiden sich jedoch voneinander hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften. Everolimus hat eine kürzere Halbwertszeit (23h statt 60h) und benötigt eine geringere Zeit bis zum Erreichen des Steady state (4 statt 6 Tage) als Rapamycin (Koch 2009). Auch kann Everolimus zeitgleich mit Ciclosporin A gegeben werden, während Rapamycin in einem vierstündigen Abstand verabreicht werden soll (Chapman et al. 2007).

Das Rapamycin-Derivat (RAD) inhibiert die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation von Lymphozyten und mesenchymalen Zellen, welche im Verlauf der zellulären Immunantwort auf ein körperfremdes Antigen eingeleitet wird (Schuler et al. 1997). Auf molekularer Ebene lässt sich die antiproliferative Wirkung von RAD damit erklären, dass es an sein intrazelluläres Rezeptorprotein, das FK506-Binding-Protein-12 (FKBP-12) bindet. Der Komplex aus RAD/FKBP-12 bindet wiederum an das FKBP-Rapamycin-associated-Protein (FRAP), das auch als mTOR (mammalian target of rapamycin, etwa: „Ziel des Rapamycins bei Säugetieren“) bezeichnet wird, so dass ein trimolekularer Komplex entsteht (Hentges et al. 2001). Durch diese Interaktion wird die FRAP (mTOR)-gesteuerte Phosphorylierung und Aktivierung der Zellzyklus-spezifischen Kinase p70S6-Kinase sowie des elongation-factor-4E-bindenden Proteins (4E-BP1) inhibiert. Die p70S6-Kinase stimuliert im aktiven Zustand die Biosynthese von ribosomalen Kompomenten und ist somit bedeutend für das Fortschreiten des Zellzyklus und der Zellproliferation (Hentges et al. 2001).

Durch die Blockade ist eine Induktion der G1- in die S-Phase des Zellzyklus nicht mehr möglich, was eine Hemmung der Zellproliferation zur Folge hat (Nashan 2002; Vilella-Bach et al. 1999; Manger 2004).

Die Abbildung 1.2A und 1.2B geben einen Überblick über den molekularen Wirkungsmechanismus von Everolimus.

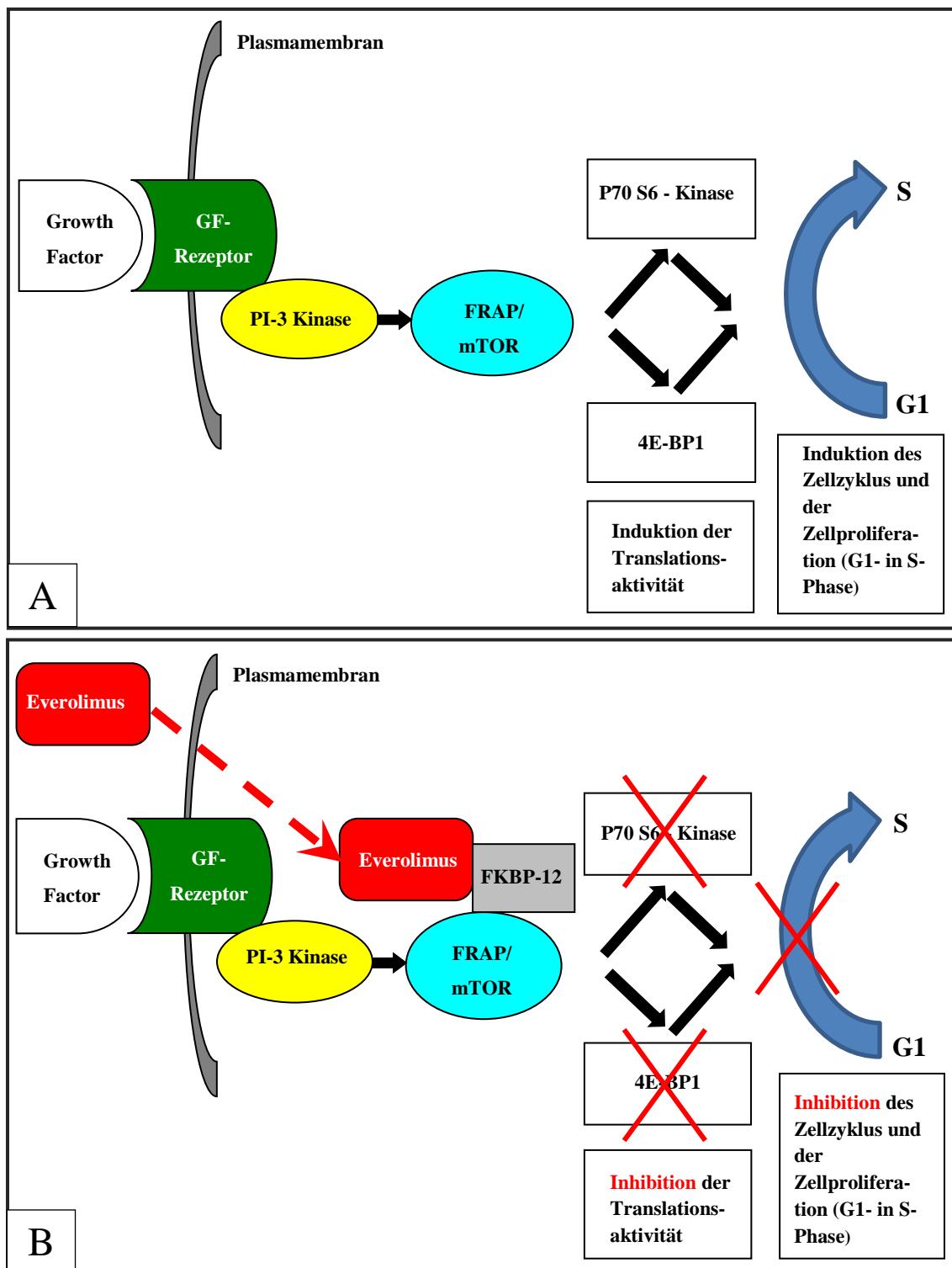


Abbildung 1.2 (A und B): Vereinfachte Darstellung des molekularen Wirkungsmechanismus von Everolimus (erstellt nach Manger 2004, Nashan 2002).

Bild A zeigt den physiologischen Mechanismus der Zellproliferation. Bild B zeigt die Hemmung des Proliferationssignals durch Everolimus mittels Inhibition der P70 S6-Kinase und anschließendem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase.

Abkürzungen: GF = Growth factor; PI-3-Kinase = Proliferation Inhibitor-3-Kinase; FKBP-12 = FK506-bindendes-Protein-12; FRAP = FKBP-Rapamycin-assoziertes Protein; mTOR = mammalian target of rapamycin; 4E-BP = elongation-factor-4E-bindenden Protein.

Durch die Inaktivierung der mTOR (FRAP)-Kinase inhibiert Everolimus, im Gegensatz zu den CNI, die Wachstumsfaktor-getriggerte Zellproliferation. Es wurde gezeigt, dass Everolimus nicht nur die Wachstumsfaktor-stimulierte Lymphozytenproliferation hemmt (Schuler et al. 1997; Böhler et al. 1998), sondern auch die Proliferation der nicht-hämatopoetischen Zellen, wie beispielsweise der Mesangial-Zellen (Kim et al. 2004). Zudem wird im Zusammenhang mit dem Rapamycin-Derivat von einer Hemmung des Gefäß-Remodelings berichtet (Schuurman et al. 1999) sowie von einer Induktion der Apoptose in aktivierte Tubuluszellen bei der Niere (Lutz et al. 2003).

1.4 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe

Die Arbeitsgruppe unter Leitung von PD Dr. med. S. Hirt hat sich mit dem Thema der chronischen Abstoßung nach allogener LTx auseinandergesetzt und hat die allogen-abhängigen sowie allogen-unabhängigen Einflussfaktoren auf die chronische Abstoßung untersucht. Als Transplantationsmodell wurde ein der klinischen Situation nahes, allogenes Inzuchtmmodell der Ratte ($F344[RT]^{lvi}$ -Ratten>WKY[RTl]^l) gewählt, in welchem eine orthotope, linksseitige LTx durchgeführt wurde. In mehreren, verschieden aufgebauten Versuchsreihen konnten Hirt et al. (1998, 1999, 2003) in diesem Modell wichtige Zusammenhänge sowohl bezüglich der Wirkung der Immunsuppressiva auf die akute und chronische Abstoßung als auch bezüglich des Behandlungszeitpunktes aufzeigen:

Die allogen transplantierten Ratten zeigten ohne jegliche Therapie am postoperativen Tag 14 (POD= postoperative day) nach LTx eine moderate bis schwere akute Abstoßung mit hochgradiger lymphozytärer Bronchiolitis, welche in einer chronischen Transplantatabstoßung mit BO und vaskulärer Sklerose endete.

Behandelte man die allogen transplantierten Ratten nach LTx mit einer konventionellen Triple-Immunsuppression (CsA, Azathioprin und Prednisolon), so entwickelten die Tiere in dieser Versuchsreihe weder eine akute noch eine chronische Abstoßung. Hinsichtlich des Behandlungszeitpunktes zeigte Hirt et al. (1998, 1999), dass die frühe akute Abstoßung den bedeutendsten Einflussfaktor auf die Entwicklung einer chronischen Abstoßung darstellt. Dazu führte er zwei weitere Versuchsreihen durch:

1. In dem ersten Versuch wurden die Tiere zu einem frühen Zeitpunkt (POD 9-11) mit einer konventionellen Abstoßungsbehandlung mittels drei konsekutiver, hochdosierter Kortison-Boli behandelt. Durch diese frühe Kortisongabe konnte die akute Inflammation reduziert und somit der chronische Verlauf abgeschwächt werden.
2. In einem zweiten Ansatz erhielten die Tiere die gleiche Kortisontherapie, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt (POD 14-16), an welchem sich die akute Abstoßung gerade an ihrem Zenit befand. Dabei war zwar eine Rückbildung des

histologischen Grades der akuten Transplantatabstoßung möglich, jedoch war die inflammatorische Schädigung des Transplantates bereits so weit fortgeschritten, dass bei progredienter Destruktion ein irreversibler Transplantatverlust resultierte.

Aus den Ergebnissen der beiden Versuchsansätze wird deutlich, dass der Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes bei einer akuten Abstoßung erheblichen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Abstoßung nimmt. Im Rattenmodell zeigten die Tiere, bei welchen die akute Abstoßung zu einem späteren Zeitpunkt behandelt wurde, die gleiche Transplantatdestruktion wie die unbehandelten Ratten. Lediglich bei konsequenter Suppression des akuten Abstoßungsgeschehens unmittelbar nach LTx konnte die Ausbildung der chronischen Transplantatabstoßung abgeschwächt werden. Auch in der klinischen Situation wird eine Abstoßungsbehandlung nach LTx erst bei Auftreten klinischer Symptome und nach Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen initiiert und damit gemäß Hirt et al. zu spät behandelt. Falls eine Suppression der inflammatorischen Reaktion erst zum Zeitpunkt eines bereits fortgeschrittenen akuten Abstoßungsgeschehens erfolgt, dann lässt sich zwar das Ausmaß der akuten Transplantatabstoßung supprimieren, jedoch hat die perivaskuläre und peribronchiale Infiltration durch aktivierte mononukleäre Entzündungszellen bereits eingesetzt und damit zu einer beträchtlichen Destruktion des Gefäßendothels sowie des Bronchialepithels geführt. Hirt et al. zeigte, dass der konsekutiv einsetzende, überschiessende Reparaturprozess nicht mehr zu einer restutio ad integrum führen wird, sondern in einer Transplantatvernarbung mit dem histologischen Bild einer BO, einer vaskulären Sklerose sowie einer interstitiellen Fibrosierung resultiert (Hirt et al. 1998; Hirt et al. 1999).

1.5 Studiendesign und –ziel

Die Studie baut auf den bereits vorliegenden tierexperimentellen Ergebnissen von Hirt et al. (1999; 1998) auf und wird wie die vorhergehenden Versuche in einem Modell der unilateralen LTx der Inzuchtratte durchgeführt. Die Ergebnisse von Hirt et al.

unterstreichen die Notwendigkeit einer effektiven Therapie der akuten Abstoßung nach LTx, um die chronische Rejektion zu vermeiden. Mit der bislang im klinischen Alltag etablierten Mehrfach-Immunsuppression ist es bislang nicht möglich die inflammatorische Reaktion bei einer akuten/subakuten Abstoßungsreaktion so effizient zu supprimieren, dass chronisch-irreversible, strukturelle Transplantatschäden verhindert werden. Diese derzeit schlechten klinischen Ergebnisse hinsichtlich des Transplantatüberlebens und die teils schweren Nebenwirkungen der gängigen immunsuppressiven Medikamente verstärken die Nachfrage nach neueren Immunsuppressiva mit anderem Wirkungsmechanismus. Der mTOR-Inhibitor Everolimus steht im Zentrum unserer Untersuchungen, da er einen anderen Angriffspunkt als die konventionellen Immunsuppressiva besitzt. Er zeigt einen antiproliferativen Effekt, indem er auf direktem Wege die Wachstumsfaktor-gesteuerte Zellproliferation der immunmodulierenden T-Zellen inhibiert. Ziel dieser Studie ist es zu zeigen, welchen Einfluss das relativ neue Immunsuppressivum Everolimus auf die chronische Abstoßung nimmt, wenn es ab dem POD 14 gegeben wird.

Everolimus wurde am POD 14 appliziert, zu einem Zeitpunkt, an dem sich die akute Abstoßung gerade an ihrem Zenit befand. Dieser Behandlungszeitpunkt wurde gewählt, da diese Studie primär den Einfluss von Everolimus auf den Verlauf der chronischen Abstoßung und weniger den therapeutischen Effekt auf die akute Abstoßung untersuchen soll. Die medikamentöse Intervention erfolgt zur Zeit der maximalen Ausprägung der akuten Abstoßung, um diese möglicherweise derart zu beeinflussen, dass die chronische Abstoßung vermindert oder verzögert werden kann. Auch in der humanen Lunge wird die akute Abstoßung meist erst dann therapiert, wenn der Patient bereits Symptome zeigt und das Abstoßungsgeschehen histologisch moderat ausgeprägt ist, da derzeit immer noch eine Problematik in der Früherkennung der akuten Abstoßung besteht (Belperio et al. 2009). Da die akute Abstoßung nicht homogen, sondern fleckenhaft im Lungengewebe auftritt, sind die für die Primärdiagnostik wichtigen transbronchialen Lungenbiopsien oft unergiebig und unsicher (Belperio et al. 2009). Aus diesem Grund geht man derzeit davon aus, dass viele akute Abstoßungsreaktionen im klinischen Alltag unerkannt bleiben (Martinu et al. 2010). So wurde in der vorliegenden Arbeit der Beginn der Immunsuppression auf den Zenit der akuten Abstoßung (A3-A4) gelegt. Damit war es möglich, Akkumulationen akuter

Abstoßungsreaktionen, schwer verlaufende oder rezidivierende Verläufe der humanen akuten Abstoßung zu simulieren. Bei der gewählten therapeutischen Dosis von Everolimus nach LTx hat sich die vorliegende Studie an den Erfahrungen orientiert, die bei Nierentransplantationen im Rattenmodell sowie in allogenen Versuchen bei Herztransplantationen gemacht wurden (Schuler et al. 1997; Schuurman et al. 1997). Die therapeutische Breite bei Everolimus liegt zwischen 0.5 und 5 mg/kg/Tag, jedoch treten bei kontinuierlich hohen Dosen vermehrt Nebenwirkungen, insbesondere ein Gewichtsverlust im Rattenmodell, auf (Schuurman et al. 1997; Hausen et al. 1999; Hausen et al. 2000). Aus diesem Grund und basierend auf den Erfahrungen von Hausen et al. (1999; 2000) wurde Everolimus in dem vorliegenden Versuchsaufbau mit einer Dosis von 2.5 mg/kg/Tag appliziert.

Um die Wirkung von Everolimus auf die Ausbildung der chronischen Abstoßung untersuchen zu können, wurden die Lungen in bestimmten Zeitintervallen (POD 20, 30, 60 und 100) histologisch gefärbt und der Ausprägungsgrad gemäß den Kriterien der ISHLT bestimmt. Auf diese Weise ließ sich der Effekt von Everolimus auf den Verlauf der akuten und insbesondere der chronischen Abstoßung über die Zeit verfolgen. Da auch das Zusammenspiel der immunmodulierenden Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der chronischen Abstoßung spielt, wurde der antiproliferative Effekt des Medikamentes auf die Infiltration von Immunzellen ins Gewebe untersucht. Dazu wurde mittels immunhistochemischen Methoden die Expression von ED1 (Makrophagen-Marker), CD11a und CD18 (Leukozyten-Marker) im Lungengewebe bestimmt. Um den Einfluss von Everolimus auf die Endothelzellen des Transplantats und das Geschehen der vaskulären Sklerose darzustellen, erfolgte zudem eine immunhistochemische Anfärbung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selektin, welche von dem Gefäßendothel exprimiert werden.

Aus den obigen Ausführungen ergibt sich folgende Fragestellung: Hat der ab POD 14 nach LTx verabreichte mTOR-Inhibitor Everolimus Einfluss auf die chronische Abstoßung, und wenn ja, welcher Art? Ist der Behandlungszeitpunkt sowie die immunsuppressive Dosis ausreichend um die chronische Abstoßung zu verzögern, abzumildern oder gar vollständig zu inhibieren?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermodell

Zur Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit wurde das Modell der linksseitigen orthotopen Lungentransplantation (LTx) in der Ratte gewählt. Für die allogene Transplantation diente der Wistar-Kyoto-Rattenstamm (WKY[RTI]¹-Ratten) als Empfänger und der Fischer-Rattenstamm (F344[RT]^{lv1}-Ratten) als Spender. Für die syngenen Transplantationen wurden WKY[RTI]¹-Ratten als Spender- und Empfängertiere herangezogen. Die Untersuchungen konzentrierten sich neben der Beobachtung des gesundheitlichen Verlaufes der transplantierten Tiere auf histologische und immunhistologische Auswertungen.

Für die Versuche wurden männliche Inzuchtratten der Firma Charles River verwendet. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt 8-9 Wochen alt und wogen ca. 200-300g. Ungefähr gleich schwere Tiere wurden als Versuchspaares gewählt. Die Haltung der Tiere erfolgte in den zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg unter konventionellen Umweltbedingungen (22°C Raumtemperatur, 50-60% Luftfeuchtigkeit, normaler Tag-/Nachtrhythmus). Es wurden maximal 5 Tiere/Käfig in offenen Euro-Typ IV-Polycarbonatkäfigen (595x380x200mm; Käfignutzfläche: 1820 cm²) gehalten, welche mit normaler Kleintiereinstreu mit Weichholzgranulat (Fa. SSniff GmbH) ausgestattet waren. Die Käfige wurden einmal pro Woche gewechselt und mit 80 °C heißem Wasser gereinigt. Die Fütterung der Tiere erfolgt ad libitum mit Standard-Diäten für Laborratten (Fa. SSniff GmbH, Haltungsfutter V1535). Leitungswasser stand den Tieren aus Tränkeflaschen unbegrenzt zur Verfügung. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere circa zwei Wochen an die Haltungsbedingungen adaptiert.

Für die Durchführung der Versuche wurde ein Tierschutzantrag gestellt und von der Regierung der Oberpfalz am 24.07.2009 unter dem Aktenzeichen 54-2532.1-05/09 genehmigt.

2.2 Narkose, Beatmung und Transplantation

Die Tierversuche für die vorliegende Arbeit wurden von Frau Eva Lesser sowie von Frau Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi an der Universität Regensburg durchgeführt. Im Folgenden wird eine detaillierte Beschreibung der Narkose, Beatmung und des Transplantationsablaufs gegeben. Eine inhaltlich ebenso ausführliche Darstellung des Operationsablaufes ist der Habilitationsschrift von PD Dr. Stephan Hirt zu entnehmen, welcher die Vorversuche an der Universität Kiel durchgeführt hat (Hirt; Hirt et al. 1999; Hirt et al. 1998).

Sämtliche chirurgische Eingriffe, wie auch das Töten der Tiere erfolgten in tiefer Narkose. Die Spender- und Empfängeroperationen wurden unter hygienisch sauberen, jedoch nicht sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1 Narkose und Beatmung

Die Spender- und Empfängertiere wurden präoperativ gewogen und im abdominalen und thorakalen Bereich rasiert und desinfiziert. Die Spenderratten erhielten subkutan eine Dreifachnarkose aus Medetomidin (150 µg/kg KG) (Domitor, Pfizer, Karlsruhe), Midazolam (2 mg/kg KG) (Midazolam-ratiopharm 15 mg/3 ml, Ratiopharm, Ulm) und Fentanyl (5 µg/kg KG) (Delta Select 0,1 mg/2 ml). Hierbei wurde neben der narkotischen auch eine gute analgetische Wirkung erzielt.

Die Empfängertiere erhielten unter einer kurzen Isofluran-Rauschnarkose (Flow 0,8-2 L/min) eine Injektion des in der Tiermedizin verwendeten Narkotikums Chloralhydrat (300 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) sowie ein zentral wirksames Opiat (Buprenorphin 0,05-0,1 mg/kg KG s.c. alle 12h). Chloralhydrat bietet für diese Art der Operation den

Vorteil, dass es neben der narkotischen Komponente eine atemdepressive Wirkung besitzt, da das Tier intraoperativ (unter Beatmung) weniger selbständig mitatmet. Anschließend wurden die Ratten mittels eines 16G-Abbkath-Katheters endotracheal intubiert und an eine Isofluran-Inhalationsnarkose (Baxter, Unterschleißheim) mit einem Gasfluss von 0,8-1,5 L/min angeschlossen. Während der gesamten Operationsdauer erfolgte eine maschinelle Beatmung der Tiere (Havard Apparatus Modell 683) mit 100%igem Sauerstoff bei einer Atemzugfrequenz von 40-50/min und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml. Zur Erhaltung der weiteren Narkose mit Isofluran wurde ein Gasfluss von 1,5 L/min eingestellt. Während der chirurgischen Manipulation am Brustkorb wurden die narkotisierten Ratten zur Reduktion der bronchialen Sekretion und zum Schutz der vagalen Inhibition mit 0,2 mg/kg KG Atropinsulfat (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) intramuskulär prämediziert.

2.2.2 Spenderoperation

Die Tiere wurden wie oben beschrieben narkotisiert und in dorsaler Lage befestigt. Nachdem ihre Bauchdecke mittels eines medianen Laparotomieschnitts eröffnet wurde, erfolgte über die untere Hohlvene eine Vollheparinisierung durch Injektion von 1500 Einheiten/kg KG Heparin -Natrium 25000 (Ratiopharm, Ulm) (siehe Abbildung 2.1). Anschließend wurde der Thorax eröffnet und über den rechten Ventrikel eine Perfusionskanüle in die A. pulmonalis eingebracht, über welche eine Perfusion der Lunge mit 4°C kalter modifizierter Euro-Collinslösung (10 ml) (EC, Fresenius Pharma, Gräfeling) mit Zusatz von 1,25 µg Prostaglandin (Ilomedin 20µg/ml, Bayer AG, Leverkusen) erfolgte. Das Prostaglandin wirkte unterstützend durch einen vasodilatativen und einen antithromobogenen Effekt. Nach Beendigung der Perfusion wurden beide Lungen entnommen und die linke Lunge bis zur Implantation in 4°C kalter modifizierter Euro-Collins-Lösung gelagert. Die Ischämiezeit betrug eine Stunde. Eine weiße Farbe und ein niedriges Gewicht der Lunge gaben Hinweis auf eine gute Perfusion des Organs. Lungen mit rotfleckigen Gewebe und erhöhtem Gewicht ließen auf ein interstitielles Ödem oder eine verminderte Perfusion schließen und wurden nicht zur Transplantation zugelassen. Die mitperfundierten rechten Lungen gelangten als

Kontrollgewebe und zum Ausschluss von immanen Infektionen des Spendertieres zur histologischen Aufarbeitung. Das Spendertier starb mit Beginn der Lungenperfusion schmerzfrei in tiefer Narkose. Die Dauer des Eingriffes betrug etwa 5 Minuten.

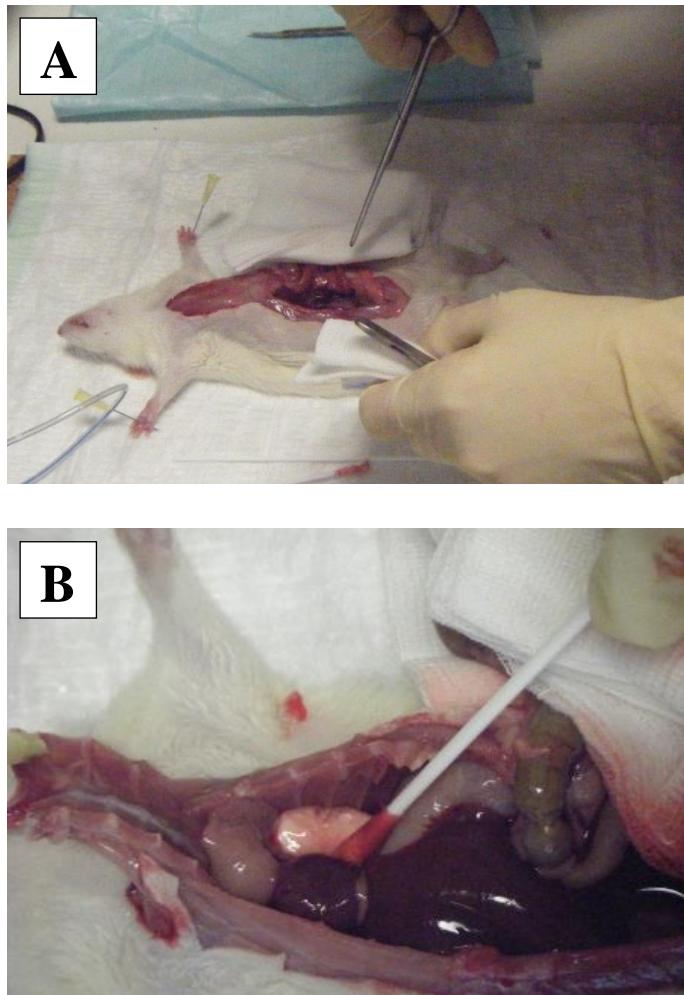


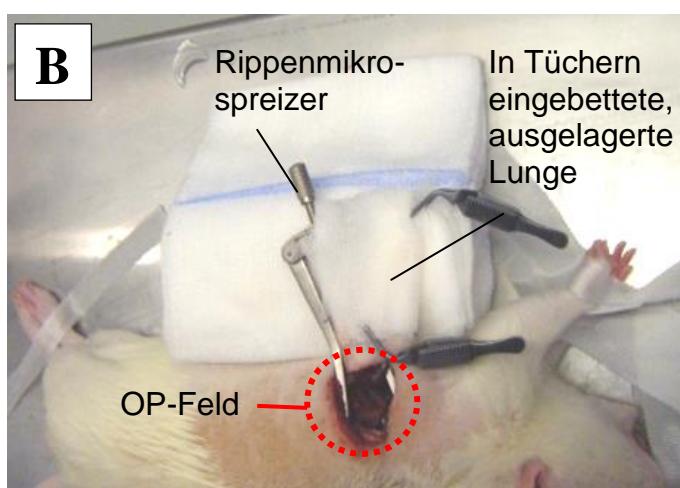
Abbildung 2.1: Spenderoperation.

Abbildung A zeigt das Spendertier narkotisiert und in dorsaler Lage fixiert. Es ist die bereits durchgeführte mediale Laparotomie der Bauchdecke dargestellt. In Abbildung B ist der Thorax des Tieres eröffnet. Die Lunge soll im nächsten Schritt vorsichtig mit dem Tupfer nach außen verlagert werden, um anschließend Bronchus und Gefäße darstellen und freipräparieren zu können.

2.2.3 Empfängeroperation

Die Narkose der Empfängertiere wurde wie oben erläutert durchgeführt. Nach der Desinfektion des Operationsbereiches wurde das Tier linksseitig im dritten oder vierten Intercostalraum thorakotomiert und anschließend das Operationsfeld durch einen Rippen-Mikrospreizer (Fa. Aesculap, Tuttlingen) geöffnet. Nach Verlagerung der linken Lunge aus dem Thorax nach extrakorporal, erfolgten die weiteren Schritte der OP unter einem speziellen Operationsmikroskop (Fa. Wild M 650, 16-fache Vergrößerung). Die ausgelagerte, linke Lunge wurde zwischen zwei Tupfern gebettet und in Tücher eingewickelt. Nun wurden der linksseitige Hauptbronchus sowie die Arteria bzw. Vena pulmonalis freipräpariert. Der Bronchus wurde mit einer zentralen Ligatur okkludiert und die vaskulären Strukturen mit einer zentral im Hilus platzierten Klemme abgesetzt. Bei den Gefäßen wie auch beim Bronchus war man darauf bedacht möglichst lange Stümpfe zu belassen, so dass die Absetzung der Strukturen weit peripher erfolgte. Unter Schonung neuronaler Strukturen (N. phrenicus, N. vagus) wurde die linke Lunge explantiert. Nach Entnahme der linken Empfängerlunge erfolgte die Implantation der linken Spenderlunge. Zuvor wurden die ebenfalls lang belassenen Stümpfe der Gefäße und des Bronchus der Spenderlunge auf die passende Länge gekürzt. Die Pulmonalvenenstümpfe von Spender- und Empfängerlunge wurden mittels End-zu-End-Anastomose mit Prolene 10.0 BV6 (Fa. Ethicon, Norderstedt) fortlaufend genäht. In gleicher Technik und mit identischem Nahtmaterial wurden auch die Pulmonalarterienstümpfe miteinander anastomosiert. Es folgte die Öffnung der Gefäßklemme und somit die Reperfusion des bis dahin ischämischen Lungengewebes. Anschließend wurde die End-zu-End-Anastomose des Spender- und Empfängerbronchus mittels fortlaufender Technik mit Prolene 9.0 BV4 (Fa. Ethicon, Norderstedt) genäht. Es erfolgte zunächst lediglich die Naht der Bronchushinterwand um die Empfängerlunge durch die offene Anastomose mittels Kanüle atelektasefrei zu blähen. Im nächsten Schritt wurde die bronchiale Anastomose fertig gestellt und die zentrale Ligatur des Empfängerbronchus gelöst. Die darauf folgende Wasserprobe diente zur Kontrolle und Sicherstellung der Anastomosendichtigkeit. Nach Einlegen einer Thoraxdrainage (Aboocath 16G, Abbot-Diagnostics, Wiesbaden) und nochmaligen Blähen der Lunge wurde der Thorax mit Prolene 4.0 SH1 (Fa. Ethicon,

Norderstedt) in vier Schichten verschlossen. Sobald ausreichende Spontanatmung und der Kornealreflex festzustellen war, wurde das Tier von der Beatmung getrennt und erst bei Vorhandensein sicherer Spontanatmung extubiert. Die Dauer des Eingriffes betrug 60 Minuten. Im Folgenden sind drei Ausschnitte der Empfängeroperation dargestellt (Abbildung 2.2 A-C).



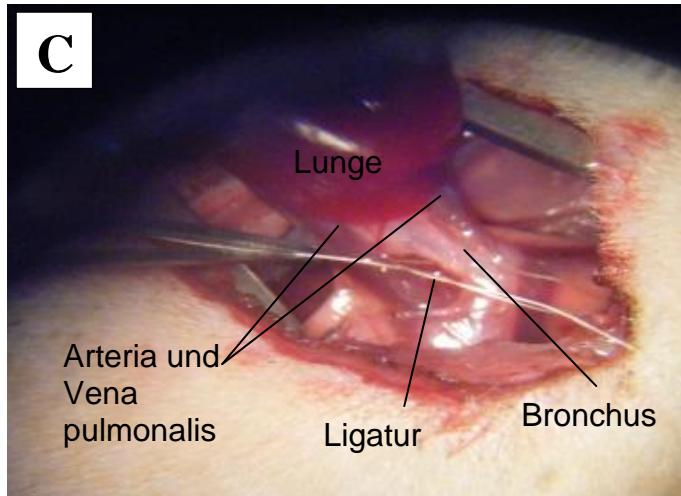


Abbildung 2.2 (A-C): Empfängeroperation.

In Abbildung A ist das Empfängertier in linksseitiger Lage fixiert und eine zusammengerollte Mullbinde wurde zur optimalen Lagerung untergelegt. Der linke Thorakalbereich wurde rasiert und das Tier mittels eines 16G-Abbokath-Katheters endotracheal intubiert. Über den Katheter ist das Tier an eine Isofluran-Inhalationsnarkose mit einem Gasfluss von 0,8-1,5 l/min angeschlossen (nicht abgebildet). In Abbildung B sieht man die linke Lunge nach extrakorporal verlagert, wo sie in Tüchern eingebettet und mit Klemmen fixiert ist. Ein Rippenmikrospreizer hält das OP-Feld offen. Abbildung C stellt die Sicht durch das Operationsmikroskop auf das OP-Gebiet dar und zeigt die freipräparierte Arteria und Vena pulmonalis sowie den mit einer Ligatur umschlungenen linken Hauptbronchus. Alle pulmonalen Strukturen sind noch mit der ausgelagerten linken Lunge konnektiert.

2.3 Postoperativer Verlauf

Nach erfolgreicher Transplantation blieben die Tiere noch für einige Stunden unter permanenter Beobachtung und wurden zunächst einzeln in den Käfigen gehalten. Ab dem POD 3 konnten die Tiere in ihrer jeweiligen Versuchsgruppe zu zweit oder dritt in jeweils einem Käfig untergebracht werden. Zur Behandlung und Prophylaxe postoperativer Schmerzen erfolgte alle 12 Stunden eine obligate Analgesie über 3-6 Tage mit dem zentral wirksamen Buprenorphin 0,05-0,1 mg/kg KG subkutan (s.c.) (Temgesic, Essex Pharma, England). Ab dem POD 3 hatten sich fast alle Ratten vollständig vom Operationsstress erholt. Der Gesundheitsstatus wurde täglich überprüft. Die Hautklammern wurden bei per primam erfolgter Wundheilung am POD 7 entfernt.

Die Applikationsweise der Versuchsmedikamente richtete sich nach dem jeweiligen Immunsuppressivum: Methylprednisolon wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten per injectionem in das Abdomen intraperitoneal (i.p.) gegeben, während Everolimus intragastral (i.g.) per Schlundsonde verabreicht wurde. Um den Applikationsprozess (insbesondere intragastral) zu erleichtern, wurden die Tiere vor der Medikamentengabe mit einer Sevofluran-Inhalationsnarkose für kurze Zeit (2-3 Minuten) sediert. Vor jeder Applikation wurden die Tiere einzeln gewogen um die Medikamentendosis zu ermitteln und um einen möglichen medikamenteninduzierten Gewichtsverlust zu erkennen.

Da sich die Diagnose der BO sowie der vaskulären Sklerose ausschließlich auf die Histologie stützt, war die Tötung der Tiere in diesem Kleintiermodell obligat. Serielle transbronchiale oder offene Lungenbiopsien waren hier im postoperativen Verlauf nicht möglich. Eine bronchioalveolare Lavage (BAL) wurde nicht durchgeführt, da eine BAL beim Modell einer unilateralen LTx obsolet ist. Auch auf Röntgenaufnahmen wurde verzichtet, da die Beurteilung der Lunge lediglich in einer Ebene und durch die Herzüberlagerung nur in peripheren Bereichen möglich gewesen wäre. Die Tiere kamen am Versuchsende unter Isofluran-Inhalationsnarkose durch Ausbluten ad exitum.

2.4 Versuchsgruppen

Für diese Arbeit wurden insgesamt drei Versuchsgruppen untersucht, welche in enger Anlehnung an die klinische Situation konzipiert wurden. In jeder Gruppe wurden sowohl allogene ($F344[RTI]^1 > WKY[RTI]^1$) als auch syngene ($WKY[RTI]^{l/l} > WKY[RTI]^1$) linksseitige LTx durchgeführt. Von den allogen transplantierten Tieren wurden am POD 20, 30, 60, 100 jeweils fünf Tiere und bei den syngen transplantierten Ratten am POD 100 insgesamt fünf Tiere getötet. Linke und rechte Lungen aller toten Tiere gelangten zur histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung. Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 2.1 die im Nachfolgenden beschriebenen Versuchsgruppe I-III aufgeführt.

Neben den drei Versuchsgruppen hat man die linken und rechten Lungen einer sogenannten **Ausgangsgruppe** untersucht. Dabei handelt es sich um Lungen, welche

nicht transplantiert sondern lediglich explantiert und mit Euro-Collins-Lösung gespült wurden und als Referenzgruppe für physiologische, gesunde Lungen ohne Transplantationsschädigung dienten. In dieser Gruppe wurden ebenfalls 5 Tiere an den entsprechenden PODs getötet und histologisch sowie immunhistochemisch aufgearbeitet.

Gruppe I= 0-Kontrolle

Es wurde bei 30 WKY[RTI]¹-Ratten eine linksseitige LTx durchgeführt. Eine postoperative Immunsuppression wurde nicht appliziert. Je 5 Tiere wurden am POD 5, 15, 30, 60 und 100 nach allogener LTx sowie 5 syngen transplantierte Tiere am POD 100 getötet.

Gruppe II = MP-Kontrolle

Es erfolgte in dieser Gruppe bei 25 Tieren eine linksseitige LTx. Eine initiale postoperative Immunsuppression wurde nicht appliziert. Zum Zeitpunkt des Zenits der akuten Abstoßung erhielten die Tiere an den POD 14, 15, 16 eine Bolustherapie mit Methylprednisolon (MP) (Urbason[®], Hoechst AG, Frankfurt) mit täglich jeweils 10 mg/kg KG mittels intraperitonealer Injektion. An den POD 20, 30, 60 und 100 wurden je 5 Tiere nach allogener LTx und am Tag 100 die 5 syngen transplantierten Tiere getötet.

Gruppe III= RAD-Gruppe

Bei 25 WKY[RTI]¹-Ratten wurde eine linksseitige LTx durchgeführt. Am POD 14, 15 und 16 erhielten die Ratten eine Bolustherapie mit MP wie in Gruppe II. Zudem wurde allen Tieren zum Zeitpunkt des Zenits der akuten Abstoßung ab dem POD 14 bis POD 100 eine Immunsuppression mit 2,5 mg/kg KG RAD/Everolimus (RAD 001, Novartis Pharma[®], Basel, Schweiz) intragastral (i.g.) per Schlundsonde verabreicht. Je 5 allogen transplantierte Tiere wurden an den POD 20, 30, 60 und 100 sowie die 5 syngen transplantierten Ratten am Tag 100 getötet.

<i>Gruppe</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
	<i>0-Kontrolle</i>	<i>MP-Kontrolle</i>	<i>RAD-Gruppe</i>
<i>IS</i>	<i>keine</i>	<i>MP (10mg/kg</i>	<i>MP (10mg/kg</i>
		<i>an POD 14,15,16)</i>	<i>an POD 14,15,16)</i>
			<i>+ RAD (i.g. 2,5mg/kg</i>
			<i>tgl. ab POD 14 bis 100)</i>
<i>F344>WKY</i>	<i>POD 5</i>		
<i>F344>WKY</i>		<i>POD 15</i>	
<i>F344>WKY</i>		<i>POD 20</i>	<i>POD 20</i>
<i>F344>WKY</i>	<i>POD 30</i>	<i>POD 30</i>	<i>POD 30</i>
<i>F344>WKY</i>	<i>POD 60</i>	<i>POD 60</i>	<i>POD 60</i>
<i>F344>WKY</i>	<i>POD 100</i>	<i>POD 100</i>	<i>POD 100</i>
<i>WKY>WKY</i>	<i>POD 100</i>	<i>POD 100</i>	<i>POD 100</i>

Tabelle 2.1: Einteilung der Versuchsgruppen I-III.

Angabe in der Dosierung in der täglichen (tgl.) Verabreichung. In der jeweiligen Transplantationskombination (Spendertier>Empfängertier) sind die Tötungszeiten von je 5 Tieren an den entsprechenden postoperativen Tagen (POD) angegeben.

Abkürzungen: i.g. = intragastral; IS = Immunsuppression; MP = Methylprednisolon

Die oben genannten Tötungszeitpunkte wurden in den jeweiligen Versuchsgruppen entsprechend unserer Fragestellung gewählt. Bei Versuchsgruppe I (ohne Immunsuppression) wurden die Tötungszeitpunkten auf die POD 15, 30, 60, 100 gelegt um die Gewebsveränderungen am Zeitpunkt der akuten Abstoßung (POD 15), ihre Steigerung oder Rückbildung (POD 30) sowie die Entwicklung während der chronischen Abstoßung (POD 60 und POD 100) zu erfassen. In Gruppe II erfolgte die MP-Applikation genau zum Zeitpunkt der maximalen akuten Abstoßungsreaktion (POD 14, 15 und 16) um einen möglichen therapeutischen Erfolg der Kortisontherapie zu

erkennen und zu beurteilen. Zusätzlich zur MP-Gabe wurde in Gruppe III die medikamentöse Therapie mit Everolimus am Zenit der akuten Abstoßung ab POD 14 begonnen und bis POD 100 fortgeführt. Hier sollte der Effekt der beiden antiinflammatorisch wirksamen Medikamente auf die initiale, akute Phase untersucht werden. In diesen Gruppen wurden daher je fünf Tiere am POD 20 statt am POD 15 getötet. In den Versuchsgruppen II und III wurde nicht nur der therapeutische Effekt der Medikamente auf die initiale akute Entzündungsphase per se untersucht, sondern auch der Einfluss der akuten Abstoßungsreaktion auf die spätere Entwicklung einer chronischen Abstoßung. Die syngen transplantierten Ratten wurden erst am Versuchsende (POD 100) getötet und dienten als Kontrollen hinsichtlich der Entwicklung einer chronischen Abstoßung, da in ihren Lungen keinerlei Abstoßungsreaktion erwartet wurde.

2.5 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Zum geplanten Versuchsende wurden die Tiere getötet, gewogen und anschließend seziert. Es wurden sowohl die transplantierte linke als auch die rechte Lunge entnommen und makroskopisch im Hinblick auf Färbung, Größe und Konsistenz beurteilt. Nach der Spülung in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl-Lösung) wurden die Transplantate in mehrere Teile geschnitten. Nach dem Schneiden erfolgte bei einem Teil die Fixierung mit Paraformaldehyd (4%) und die Einbettung in Paraffin. Der zweite Teil wurde dagegen in TissueTek® (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und unmittelbar darauf bei -196°C in Flüssigstickstoff eingefroren, worin er bis zur immunhistologischen Aufarbeitung gelagert wurde.

2.6 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Mit einem Gefrier- (Mikrotom-Kryostat HM 500 OM, Microm, Walldorf) und Paraffin-Mikrotom (Leica, Rotationsmikrotom, RM 2145) wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 6µm und Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5µm hergestellt, entsprechend vorbereitet und für weitere Analysen (siehe unten) verwendet.

2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Vor der HE-Färbung wurden die Paraffinschnitte zum Entparaffinieren zunächst für 2-5 Minuten in Xylol gegeben. Daraufhin wurden die Schnitte zur Rehydratisierung für 3 Minuten in einer in 10% Schritten absteigenden Ethanolreihe (100% bis 30%) gewaschen und anschließend in Aqua dest. gelegt. Nach Färbung mit filtriertem Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) über 1 Minute wurden die Präparate für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser geblättert und in destilliertem Wasser kurz gespült. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin G für ca. 3 Minuten (ad 200 ml Aqua destillata: 1 g Eosin G, 50 µl Essigsäure) (Merck, Darmstadt), wonach die Präparate für 30 Sekunden zunächst zügig in fließendem Leitungswasser und dann kurz in destilliertem Wasser gespült wurden. Es folgte die 2-malige Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol für je 3 Minuten und schließlich die blasenfreie Einbettung in Eukitt J86 (Kindler, Freiburg).

2.6.2 Masson-Goldner-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst mit Weigerts Eisenhämatoxylin für 1-2 Minuten gefärbt und anschließend für 10-15 Minuten in fließendem Wasser gespült. Nach der Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin erfolgte die Spülung der Präparate mit 1%iger Essigsäure. Es folgte die Inkubation der Schnitte in Molybdatophosphorsäure-Orange für wenige Minuten bis das Bindegewebe völlig entfärbt war. Die Schnitte wurden mit 1%iger Essiglösung gespült und für 5 Minuten mit Lichtgrün gegengefärbt. Nach erneutem Auswaschen mit 1%iger Essigsäure (5 Minuten) wurden die Präparate in möglichst kurzer Zeit in absolutem Isopropanol entwässert. Schließlich wurden die Präparate mit Xylol behandelt und eingebettet. Die verschiedenen Färbelösungen sowie die Herstellung der Lösungsansätze sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Die Masson-Goldner Färbung ist eine sogenannte Trichromfärbung, bei der durch den kombinierten Einsatz von Azophloxin, Orange G und Lichtgrün Muskelfasern, Kollagenfasern und Fibrin selektiv dargestellt werden können. Bei dieser differenzierten Anfärbung der Bindegewebskomponenten imponieren die Zellkerne blauschwarz, das Zytoplasma rot, das Kollagen grün und die Muskulatur hellrot.

<i>Färbelösung</i>	<i>Ansatz</i>
Masson-Goldner	0.2 Ponceau de Xyliidine, 0.1 g Säurefuchsin in 300 ml Aqua dest. (kurz kochen), Zugabe von 0.6 ml Eisessig, Filtration
Azophloxin-Lösung	0.5 Azophloxin in 100 ml Aqua dest. (mit 0.2 ml Eisessig versetzt)
Ponceau-Säurefuchsin-	88ml 0.2%ige Essigsäure mit 7ml Masson-Lsg und 2ml
Azophloxin	Azophloxinlsg.
Molybdatophosphor-	3-5g Woflramatophosphorsäure, 2g Orange in 100ml Aqua dest.
Säure-Orange	
Lichtgrün	0.1-0.2g Lichtgrün SF in 100ml Aqua dest. (mit 0.2ml Eisessig versetzt)

Tabelle 2.2: Ansätze der Färbelösungen. Abkürzungen: Lsg = Lösung; dest. = destillata (Quelle vom 09.11.2011: <http://www.aeisner.de/methoden/farb36.html>).

2.6.3 Immunperoxydasefärbung

Nach initialer Fixierung der Kryostatschnitte für 10-20 Minuten in unverdünntem Aceton wurden sie 3-malig für jeweils 5 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (kurz: PBS, engl: *phosphate buffered saline*) gespült. Zum Blocken der endogenen Peroxydase-Aktivität wurden die Präparate mit 100 µl Ratten-Normalserum (1:20 mit PBS verdünnt) für 20 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen des Serums konnte dann der jeweilige Primärantikörper (Maus-anti-Ratte) (Tabelle 2.3) (100 µl/Schnitt) aufgebracht werden. Dieser hat sich spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe gebunden. Die Präparate wurden erneut für 1 Stunde inkubiert und anschließend 3-malig für jeweils 5 Minuten in PBS-Lösung gespült. Im nächsten Schritt erfolgte das Auftragen des Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörpers (Dako P260, Dako, Hamburg), der im Verhältnis 1:20 mit PBS/Ratten-Normalserum verdünnt wurde sowie das Inkubieren der Schnitte für 30 Minuten. Durch das Auftragen des Brückenantikörpers mit gebundenem Peroxidase-Markermolekül gelang es, die Antigen-Antikörperbindungsstellen und somit die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen. Nach 3-maliger Spülung für jeweils 5 Minuten in PBS wurde 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Sigma-Aldrich-Chemicals, Deisenhofen) als Substrat (200 µl/Schnitt) aufgebracht, welches zur Intensivierung der Antigen-Antikörperbindung diente. Der Inkubation von 10-20 Minuten in einer abgedunkelten Umgebung schloss sich die Spülung der Präparate mit reichlich Leitungswasser über 10 Minuten sowie die HE-Färbung (siehe Abschnitt 2.6.1) an. Von allen Schnitten wurde unter Weglassen des Primärantikörpers eine Negativkontrolle angelegt, um nicht spezifisch auf den Primärantikörper zurückführende Effekte als Referenz zu erfassen.

Bei der oben beschriebenen immunhistologischen Färbetechnik handelt es sich um ein indirektes 2-Schritt-Verfahren, bei welchem im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (AK) aufgebracht wird, der an das gesuchte Antigen-Epitop bindet. Im zweiten Schritt erfolgt die Auftragung des Brücken-AK, der sich gegen den Primär-AK richtet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Substratzugabe löst das in dieser Studie verwendete Enzym Immunperoxydase eine Farbentstehung mit Hilfe einer

Enzym-Substrat-Reaktion aus. Eine anschauliche Darstellung der indirekten 2-Schritt-Methode ist unter Abbildung 2.3 zu finden.

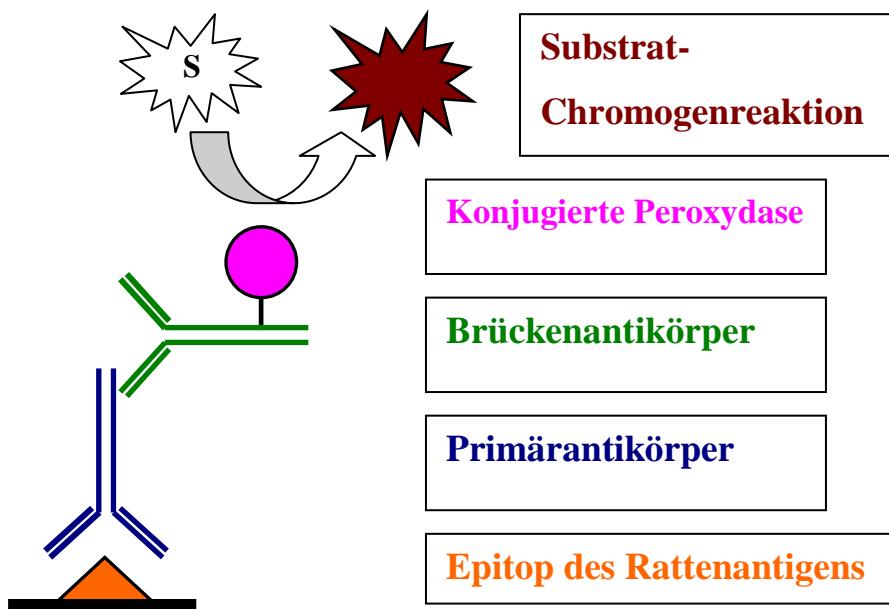


Abbildung 2.3: Indirekte 2-Schritt-Methode.

Der unkonjugierte Primärantikörper (Maus-anti-Ratte) bindet an ein Epitop des Rattenantigens. Anschließend wird ein zweiter enzymgekoppelter Brücken-Antikörper (AK) (Kaninchen-anti-Maus-AK), der gegen das Fc-Fragment des Primär-AK gerichtet ist, aufgetragen. Es folgt die Substrat-Chromogenreaktion mit 3,3- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid als Substrat (S).

Primär-Antikörper		Rezeptor/Ligand	Verdünnung	Bezugsquelle
ED1, CD68	<i>Maus-anti</i>	<i>kein Ligand (Oberflä-</i>	1:40	Serotec Ltd.,
	<i>Ratte</i>	<i>chenmarker</i>		Düsseldorf
CD11a	<i>Maus-anti</i>	<i>CD54</i>	1:80	BD-PharMingen
	<i>Ratte</i>			Heidelberg
CD18	<i>Maus-anti</i>	<i>CD11a, CD11b,</i>	1:80	BD-PharMingen,
	<i>Ratte</i>	<i>CD11c</i>		Heidelberg
ICAM-1	<i>Maus-anti</i>	<i>LFA-1</i>	1:80	BD-PharMingen,
	<i>Ratte</i>			Heidelberg
P-Selektin	<i>Maus-anti</i>	<i>CD162</i>	1:80	BD-PharMingen,
	<i>Ratte</i>			Heidelberg

Tabelle 2.3: Übersicht zu Primärantikörpern.

Verdünnung mit PBS+ 1%iger Bovine-Serum-Albumin (BSA)-Lösung (Sigma-Aldrich).

2.7 Auswertung der konventionellen Histologie

2.7.1 Histologischer Aufbau der Rattenlunge

Nachdem die Lungenschnitte nach oben genannten Techniken mit Hämatoxylin-Eosin bzw. Masson-Goldner angefärbt wurden, konnte die Auswertung der konventionellen Histologie erfolgen. Um die Pathologien und Abstoßungsreaktionen der transplantierten Lungen als solche erkennen und abgrenzen zu können, wird der histologische Aufbau einer gesunden Rattenlunge im Folgenden beschrieben.

Atemwege

In den histologischen Präparaten der 0-Kontrolle (siehe Abbildung 3.1) lassen sich verschiedene Anschnitte unterschiedlicher Luftwegsabschnitte verzeichnen. Der konduktive Anteil des Respirationstraktes beginnt initial mit den Segmentbronchien, die ihre Fortsetzung in mehreren Generationen von Bronchien (Kaliber bis 1mm abwärts) finden, welche sich in Bronchioli (Kaliber <1mm) und schließlich in Bronchioli terminales aufzweigen (Lüllmann-Rauch 2006). Aus den letzten Bronchioli terminales geht der respiratorische Abschnitt der Luftwege hervor, bestehend aus Bronchioli respiratorii, welche sich zum Duktus alveolares und zu den Sacculi alveolares, den Vorräumen der Alveolen, verzügeln (Lüllmann-Rauch 2006).

Da sich die ISHLT-Klassifikation primär auf die pathologischen Veränderungen an den kleineren Bronchioli stützt, wird ihr Wandaufbau (von innen nach außen) im Folgenden erläutert (gemäß Welsch und Deller 2010). Die innerste Schicht dieser terminalen Luftwege wird von einer aus Lamina epithelialis und Lamina propria bestehenden Schleimhaut (Tunica mucosa) gebildet und umhüllt ein sternförmiges Lumen. Die Epithelschicht (Lamina epithelialis) ist mit einreihigem zylindrischen bis kubischen Flimmerepithel mit basal liegenden Zellkernen ausgekleidet (respiratorisches Epithel). Es kommen zilienfreie Clara-Zellen vor, Becherzellen fehlen jedoch. Die bindegewebige Lamina propria ist reich an längs verlaufenden elastischen Fasern und kann freie Zellen der Abwehr enthalten (u.U. Lymphozyten, Makrophagen). Außen aufliegend folgt ein kontinuierlicher Ring aus glatter Muskulatur mit scherengitterartig angeordneten Muskelzellen. Das sich anschließende peribronchiale Bindegewebe ist mit den elastischen Strukturen der umliegenden Alveolenwände und Bindegewebsszepten verbunden wodurch ein radiärer Zug entsteht, welcher die Bronchiolen offen hält (Welsch und Deller 2010).

Ein Stützgerüst aus Knorpel und Drüsen ist bei den Bronchioli im Gegensatz zu den größeren Bronchien nicht vorhanden. Die Bronchioli respiratorii sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre Wände von Alveolenöffnungen durchsetzt sind (Lüllmann-Rauch 2006). Die Alveolen mit ihren ca. 5-8 µm dicken Wänden tragen neben einem dichtmaschigen Kapillarnetz des kleinen Kreislaufes zwei Zelltypen in ihrem beidseits angeordneten Alveolarepithel (Lüllmann-Rauch 2006). Die Pneumozyten Typ I besitzen

einen dünnen, großflächigen Zellkörper, der sich über die Kapillaren streckt; die Surfactant-produzierenden Pneumozyten Typ II hingegen haben eine kubische Zellform (Sobotta und Welsch 2005; Lüllmann-Rauch 2006).

Blutgefäße

Die Lunge ist an beide Körperkreisläufe angeschlossen. Sie besitzt Vasa publica für den kleinen Körperkreislauf, welche Äste der A. pulmonalis und Vv. pulmonales darstellen und den Hauptteil der intrapulmonalen Blutgefäße bilden. Die Vasa privata (Rr. Bronchiales und Vv. bronchiales) sind Teil des großen Kreislaufes und dienen der Versorgung des Bronchial- und Gefäßbaumes sowie der Pleura. Zwischen beiden Perfusionswegen bestehen Anastomosen (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Äste der A. pulmonalis verlaufen bis in die Peripherie zusammen mit den Aufteilungen des Bronchialbaumes, wohingegen die peripheren Zweige der Vv. pulmonales zunächst unabhängig von den Arterien in den interlobulären und – segmentalen Bindegewebssepten anzutreffen sind und erst weit proximal in das peribronchiale Bindegewebe eintreten (Lüllmann-Rauch 2006). Die histologischen Komponenten aller Gefäßwände sind (von innen nach außen) die aus Endothel und subendothelialer Schicht bestehende Tunica Intima (Intima), die aus glatter Muskulatur bestehende Tunica media (Media) und die bindegewebige Tunica Adventitia (Adventitia) mit kollagenen und elastischen Fasern (Welsch und Sobotta op. 2003) (siehe Abbildung 2.4). Beim Endothel handelt es sich um einschichtiges, lückenloses Plattenepithel aus polygonalen, flachen Zellen, die einer Basallamina aufsitzen und durch ihre Tight junctions die entscheidende Barriere zwischen Intra- und Extravasalraum bilden (Welsch und Sobotta op. 2003). Zwischen Intima und Media bzw. Media und Adventitia kann als Grenze eine elastische Lamelle liegen (Membrana elastica interna bzw. externa) (Welsch und Sobotta op. 2003). Die wichtigsten Unterschiede im Wandaufbau der arteriellen und venösen Gefäße bestehen im Aufbau der Media: Arterien haben meist eine dicke Media mit ausgeprägter Muskelschicht, während Venen eine dünneren, muskelärmeren Media besitzen (Kühnel 2002). Zudem ist die venöse Wand insgesamt dünner und weist eine weniger deutliche

Schichtengliederung auf, ihr Lumen ist in den Schnitten meistens nicht kreisrund offen, sondern zeigt gering kollabierte Züge. Arteriolen haben laut morphologischer Definition lediglich eine zirkuläre Muskelschicht im Vergleich zu den größeren Arterien (Junqueira und Carneiro 2005).

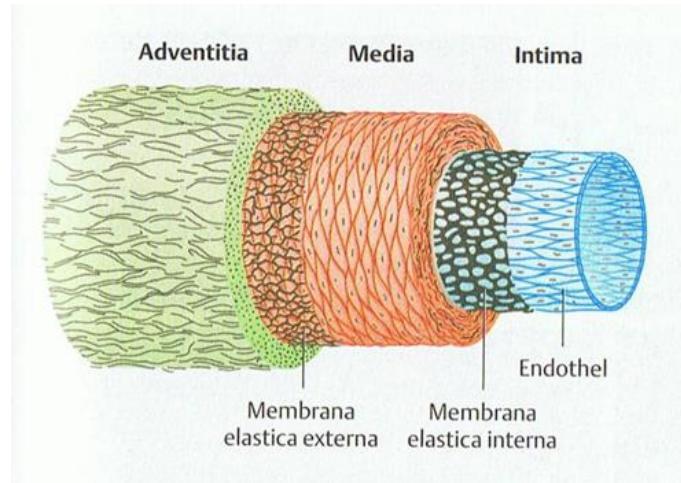


Abbildung 2.4: Wandaufbau einer Arterie (muskulärer Typ) (gemäß Lüllmann-Rauch 2003).

Intima (blau). Media (rot). Adventitia (grün). Elastische Membranen und Fasern (schwarz).

2.7.2 Akute und chronische Abstoßung

Von den physiologisch aufgebauten Rattenlungen sind die transplantierten Lungen der Tiere zu unterscheiden, welche von akuter bzw. chronischer Abstoßung betroffen sind. Die HE-gefärbten Schnitte wurden gemäß den von der ISHLT in einer „Working Formulation“ aufgestellten und von Hirt et al. modifizierten Kriterien für die akute und chronische Abstoßung klassifiziert (Yousem et al. 1996; Hirt 2003). Voraussetzung für die histologische Beurteilung ist der Ausschluss einer Infektion wie auch einer Aspiration, welche zu histologisch ähnlichen Veränderungen führen könnte. Der Infektionsausschluss erfolgte durch die Beurteilung der Präparate der nativen rechten Lungen.

Die **akute zelluläre Abstoßung** (AR= acute rejection) wurde entsprechend dem Ausmaß der perivaskulären und interstitiellen mononukleären Infiltration in 5 Schweregrade eingeteilt (A= akute vaskuläre Abstoßung; Schweregrade: A0 – A4). Zusätzlich wurde auch das Ausmaß einer begleitenden lymphozytären Bronchitis/Bronchiolitis beurteilt (B= akute bronchiale Abstoßung, Schweregrade: B0 – B4) (Tabelle 2.4). Während die perivaskulären Infiltrate (Lymphozyten, Monozyten, Plasmazellen) den wesentlichen Faktor zur Beurteilung des Schweregrades der akuten Transplantatabstoßung der Lunge darstellen, kann eine begleitende lymphozytäre Bronchiolitis jedoch einen potentiell ursächlichen Faktor im Hinblick auf die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans (BO) im weiteren Verlauf darstellen (Yousem 1993).

Die **chronische Transplantatabstoßung** (CR= chronic rejection) ist histologisch durch das Auftreten einer BO sowie einer vaskulären Sklerose gekennzeichnet. Dabei tritt eine progrediente subepitheliale/-endotheliale sowie intraluminäre Proliferation von Fibroblasten auf, was zu einer Destruktion der Bronchial- bzw. Gefäßwände und Okklusion der Lumina führt. Diese Veränderungen weisen im Hinblick auf Ausprägung und Lokalisation eine inhomogene Verteilung auf und sind vorwiegend in den kleinen bronchialen bzw. vaskulären Strukturen zu finden, können aber auch gleichzeitig die größeren Bronchien bzw. Gefäße betreffen. In Abhängigkeit vom gleichzeitigen Auftreten oder Fehlen von mononukleären Infiltraten (Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen) bezeichnet man das Geschehen als aktiv oder inaktiv, im Folgenden mit den Abkürzungen „a“ (aktiv) und „b“ (inaktiv) gekennzeichnet. Die destruktiven Vorgänge in der Lunge weisen Ähnlichkeiten mit den histologischen Gewebeveränderungen bei der chronischen Abstoßung anderer allogener Organtransplantate wie Herz, Leber oder Niere auf. Der Unterschied besteht darin, dass nach LTx primär die bronchialen Strukturen betroffen sind und dies der Faktor ist, der das Überleben der Patienten im Wesentlichen beeinflusst. Die Fibrosierung schreitet im Verlauf des chronischen Geschehens weiter fort und greift auf das Parenchym über.

Entsprechend den Kriterien der ISHLT werden die Veränderungen, welche im Rahmen der chronischen Abstoßung an Atemwegen und vaskulären Strukturen auftreten,

histologisch als C (C=chronische bronchiale Abstoßung) und D (D=chronisch vaskuläre Abstoßung) klassifiziert (Yousem et al. 1996).

Des Weiteren wird in der Beurteilung der BO (= „C“) histologisch zwischen einer aktiven (Ca) und einer inaktiven Form (Cb) differenziert. Die initiale Phase weist eine hohe Entzündungsaktivität auf und es treten ausgeprägte peri- und intrabronchiale Infiltrationen mit mononukleären Zellen auf, was zu einem progredienten Epithelschaden führt. Dies führt im Verlauf zu einer fibrotischen Umwandlung der Bronchial- und Bindegewebsstrukturen mit letztendlicher Ausbildung einer Narbe. In der finalen inaktiven Phase ist kein signifikantes submukosales oder peribronchiales Inflammationsgeschehen mehr nachweisbar.

Die als „D“ klassifizierte chronische vaskuläre Abstoßung der allogenen LTx zeigt sich zunächst in dem Auftreten einer fibrointimalen Verdickung der Gefäße, welche letztendlich auch zu einer Fibrosierung der Gefäßwand mit konsekutiver Vernarbung und kompletter Okklusion der vaskulären Strukturen führt. In Abhängigkeit von einer begleitenden medialen intimalen oder subendothelialen mononukleären Infiltration sind auch beim vaskulären Geschehen ein aktives (Da) sowie ein inaktives Stadium (Db) differenzierbar.

Bezugnehmend auf die Kriterien der ISHLT zur Beurteilung der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge haben wir die Ausprägung der histologischen Veränderungen der an den Atemwegen (C) und an den vaskulären Strukturen (D) mit steigender Destruktion in die Schwergrade C0 – C4 sowie D0 – D4 eingeteilt (Tabelle 2.5). In diese modifizierte Klassifizierung wurde auch der zunehmende fibrotische Umbau des Interstitiums bis hin zur kompletten Vernarbung des Transplantates einbezogen.

<i>akute Abstoßung</i>	<i>Grad</i>	<i>vaskuläre Veränderungen „A“</i>	<i>bronchiale Veränderungen „B“</i>
keine	0	keine Infiltration	keine Infiltration
Minimal	1	vereinzelte mononukleäre Infiltrate im Parenchym, perivaskulärer Saum von 2 – 3 Lymphozytenringen	vereinzelte submuköse mononukleäre Infiltrate
Mild	2	vermehrte parenchymatöse und perivaskuläre, z. T. subendotheliale Infiltration mononukleärer Zellen, zumeist in Verbindung mit einer lymphozytären Bronchiolitis	Bronchien sind zirkumferentiell von mononukleären Zellen umgeben, vereinzelte Eosinophile in der Submukosa; z.T. Epithelzellnekrosen
Moderat	3	dichte perivaskuläre mononukleäre Infiltrate („cuffing“) in Verbindung mit Endotheliasis, Infiltration der Alveolarsepten und des alveolären Lumens mit inflammatorischen Zellen	dichtes Band mononukleärer Zellen, in der Submukosa, Epithelzellnekrosen, Migration von Lymphozyten in das Bronchiallumen
Schwer	4	diffuse perivaskuläre und interstitielle Infiltration mit mononukleären Zellen, Schädigung der Alveolarpneumozyten mit intraalveolärer Infiltration / Blutung / Nekrose, Parenchymnekrose, nekrotisierende Vaskulitis	dichte Infiltrate aktiverter mononukleärer Zellen in den Bronchialwänden, epitheliale Ulzerationen, Dissoziation des Epithels von der Basalmembran, Epithelzellnekrosen, fibrinopurulentes intralaveoläres Exudat mit Neutrophilen

Tabelle 2.4: Histologische Klassifikation des Schweregrades der akuten Abstoßung nach LTx.

Die Tabelle basiert auf der „Working Formulation“ der International Society for Heart and Lung Transplantation (Yousem et al. 1996, Habilitationsschrift von S. Hirt 2003).

<i>chronische Abstoßung</i>	<i>Grad</i>	<i>bronchiale Veränderungen „C“</i>	<i>vaskuläre Veränderungen „D“</i>
keine	0	keine bronchiale Destruktion	keine vaskuläre Destruktion
Minimal	1	Okklusion vereinzelter kleiner Bronchien, beginnende Destruktion der Bronchialwände, noch residuale peribronchiale Infiltrationsaktivität	Okklusion vereinzelter kleiner Gefäße, beginnende Destruktion der Gefäßwände, noch residuale perivaskuläre Infiltrationsaktivität
Mild	2	Destruktion von mehr als 25% der kleinen Bronchien, nur noch vereinzelte Infiltrationsaktivität, beginnende interstitielle Fibrosierung	Destruktion von mehr als 25% der kleinen vaskulären Strukturen, nur noch vereinzelte Infiltrationsaktivität, beginnende interstitielle Fibrosierung
Moderat	3	Destruktion von mehr als 50% der kleinen Bronchien, beginnende Destruktion größerer bronchialer Strukturen, keine Infiltrationsaktivität mehr, fortgeschrittene interstitielle Fibrosierung / beginnende Vernarbung	Destruktion von mehr als 50% der kleinen vaskulären Strukturen, beginnende Destruktion größerer vaskulärer Strukturen, keine Infiltrationsaktivität mehr, fortgeschrittene interstitielle Fibrosierung / beginnende Vernarbung
Schwer	4	komplette Vernarbung des Transplantates, anatomische Strukturen nur noch rudimentär erkennbar	komplette Vernarbung des Transplantates, anatomische Strukturen nur noch rudimentär erkennbar

Tabelle 2.5: Histologische Klassifizierung des Schweregrades der chronischen Abstoßung nach LTx.

Modifiziert durch S. Hirt nach den Kriterien der International Society for Heart and Lung Transplantation (Yousem et al. 1996, Habilitationsschrift von S. Hirt 2003).

2.8 Auswertung der Immunhistologie

Zusätzlich zu der Auswertung der konventionellen Histologie (HE, Masson-Goldner) erfolgte die Beurteilung der immunhistochemisch angefärbten Rattenlungen. Dabei wurden spezifische Antikörper (ED1, CD11a, CD18, ICAM-1, P-Selektin) auf das Lungengewebe aufgetragen um das Ausmaß der Entzündungsreaktion quantitativ zu erfassen. Die immunhistologischen Schnitte wurden anhand der spezifischen Antikörperfärbungen bei 1000-facher (mit Immersionsöl) bzw. 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Jena) ausgewertet. Zunächst erfolgte stets die Beurteilung der Negativkontrolle und nur bei fehlender Hintergrundaktivität wurde mit der Auszählung des entsprechenden Präparates begonnen. In der linken sowie in der nativen rechten Lunge jeden Präparates wurden die positiv angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld in jeweils 4 bzw. 5 verschiedenen Feldern ausgezählt. Aus diesen Werten wurde jeweils ein Mittelwert für die linke bzw. rechte Lunge jeden Tieres gebildet.

2.8.1 Makrophagenmarker ED1

Die Quantifizierung der im Lungengewebe präsenten Makrophagen erfolgte durch das Auftragen spezifischer ED1-Antikörper (ED: Ektodermal dysplasia (antibody)) auf die Gewebeschnitte. Für den Nachweis von Alveolarmakrophagen wurde ein monoklonaler Ratten-anti-ED1-Antikörper (homologes Antigen zu humanen CD68) verwendet, welcher an sein Epitop im Zytoplasma der Zellen bindet (Dijkstra et al. 1985). Die mononukleären Phagozyten stellen sich bei Adhäsion des Antikörpers bräunlich dar (siehe Abbildung 2.5 bzw. Abbildung 2.6). Es wurden je Präparat bei 1000-facher Vergrößerung in 5 für das Interstitium repräsentativen Gesichtsfeldern ohne Anschnitte größerer Gefäße oder Bronchien die ED1- positiven Zellen gezählt und hieraus wurde der Mittelwert für die linke bzw. rechte Lunge des Versuchstieres gebildet. Es wurden nur intakte Zellen in der Schnittebene gezählt. Die Differenzen aus den Werten der linken und der rechten Lunge wurden für die statistische Auswertung verwendet.

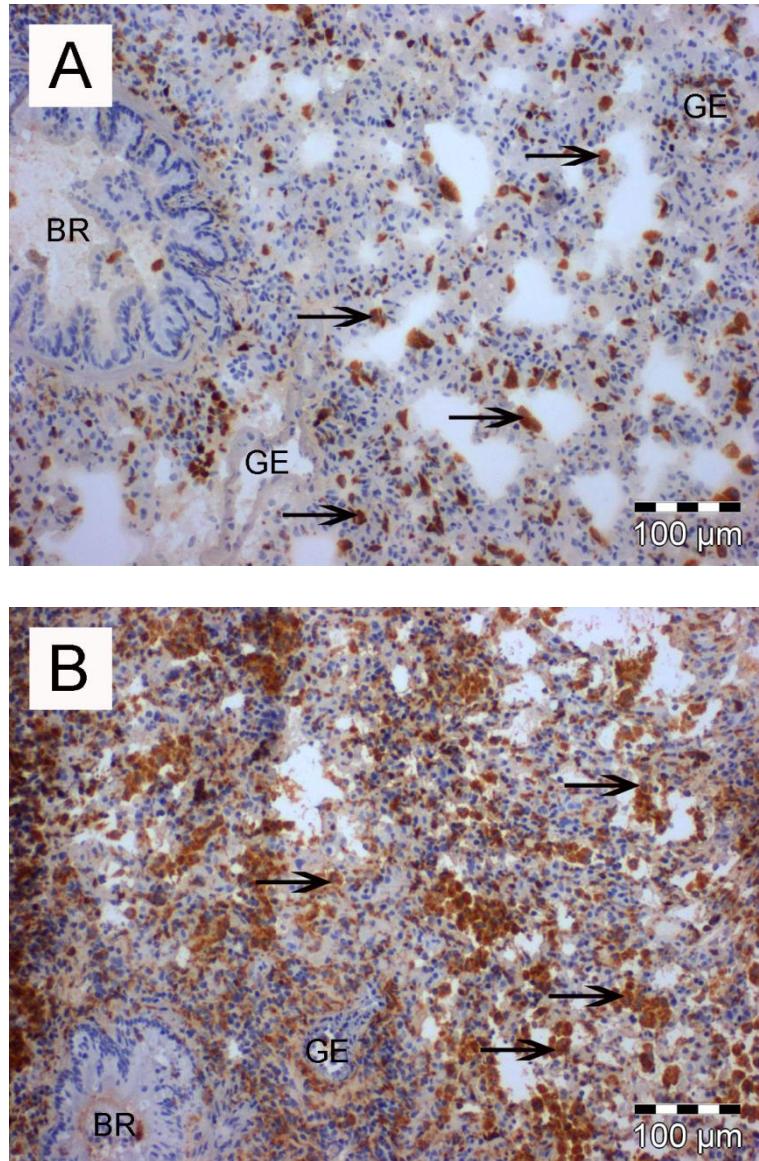


Abbildung 2.5: Beispiel für eine ED1-Färbung.

Präparat A zeigt eine unbehandelte rechte Lunge. Die bräunlich angefärbten ED1-positiven Zellen (Pfeile) finden sich in homogener Verteilung in den Alveolen und den Bronchiolen. Präparat B zeigt eine allogen transplantierte Lunge am Tag 20 nach MP-Behandlung am POD 14, 15 und 16. Am linken unteren Bildrand sind ein Bronchiolus (BR) und ein Gefäß (GE) abgebildet. Im verdichteten Parenchym ist trotz der vermehrten Hintergrundaktivität eine deutliche Vermehrung der ED1-positiven Makrophagen erkennbar.

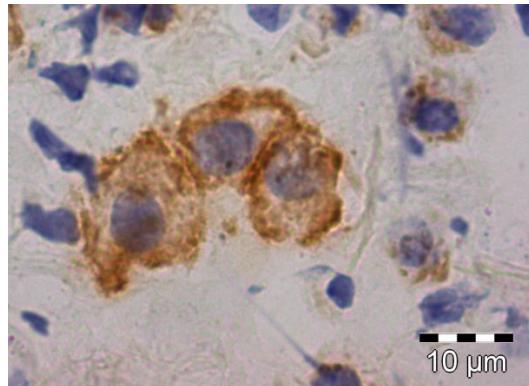


Abbildung 2.6: Beispiel für ED1-positive Makrophagen in der linken Lunge der RAD-Gruppe (POD 20, 1000fache Vergrößerung). In der Bildmitte sind drei aktivierte, bräunlich angefärbte ED1-positive Makrophagen abgebildet.

2.8.2 CD11a und CD18

CD11a und CD18 (CD: cluster of differentiation) werden als Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von interstitiellen Leukozyten exprimiert und stellen sich bei Bindung an den aufgebrachten Antikörper bräunlich dar (siehe Abbildung 2.7 und Abbildung 2.8) (Hirt et al. 1999). Die Auszählung der CD11a- sowie der CD18-positiven Zellen erfolgte wie oben beschrieben bei 1000-facher Vergrößerung in 5 repräsentativen Gesichtsfeldern je Präparat. Hieraus wurde der Mittelwert für die linke bzw. rechte Lunge des jeweiligen Versuchstieres gebildet. Es wurden nur diejenigen CD11a/CD18-positiven Zellen gezählt, bei welchen Zytoplasma und Nukleus zumindest teilweise angeschnitten wurden. Es wurden nur Areale ohne größere Bronchus- bzw. Gefäßanschnitte ausgewertet. Für die statistische Analyse wurden die Differenzen aus den Werten der linken und rechten Lunge verwendet.

2.8.3 ICAM-1 und P-Selektin

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und P-Selektin werden auf den Membranen von vaskulären Endothelzellen exprimiert. P-Selektin sowie ICAM-1 binden im Rahmen der körpereigenen Immunantwort an ihrem jeweiligen vom Leukozyten exprimierten Ligand und fördern somit deren Adhäsion am Endothel. Es kommt zum sogenannten „Rolling-Phänomen“ mit Diapedese und Migration der Leukozyten durch das Endothel und ihrem initialen Wirken am Entzündungsherd (Wood et al. 2006). Nach Anfärben mit dem jeweiligen Antikörper in den immunhistochemischen Schnitten stellen sich ICAM-1- und P-Selektin- positive Endothelzellen in Gefäßen bräunlich dar (siehe Abbildung 2.9 und Abbildung 2.10). Anstelle einer numerischen Zählung wurde hier bei 100-facher Vergrößerung der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Gefäßschnitte im Verhältnis zur Gesamtzahl der Gefäßquerschnitte pro Gesichtsfeld beurteilt und in einer Skala von 1 – 4 graduiert (Grad 1: 25%, Grad 2: 25% – 50%, Grad 3: 50% – 75%, Grad 4 > 75% der Gefäßquerschnitte betroffen). Die Zählung erfolgte für die linke wie auch für die rechte Lunge in vier bis fünf Gesichtsfeldern je Präparat und hieraus erfolgte die Bildung des Mittelwertes für die linke bzw. rechte Lunge des Versuchstieres. Die Differenzen der linken und rechten Lunge wurden für die statistische Analyse verwendet.

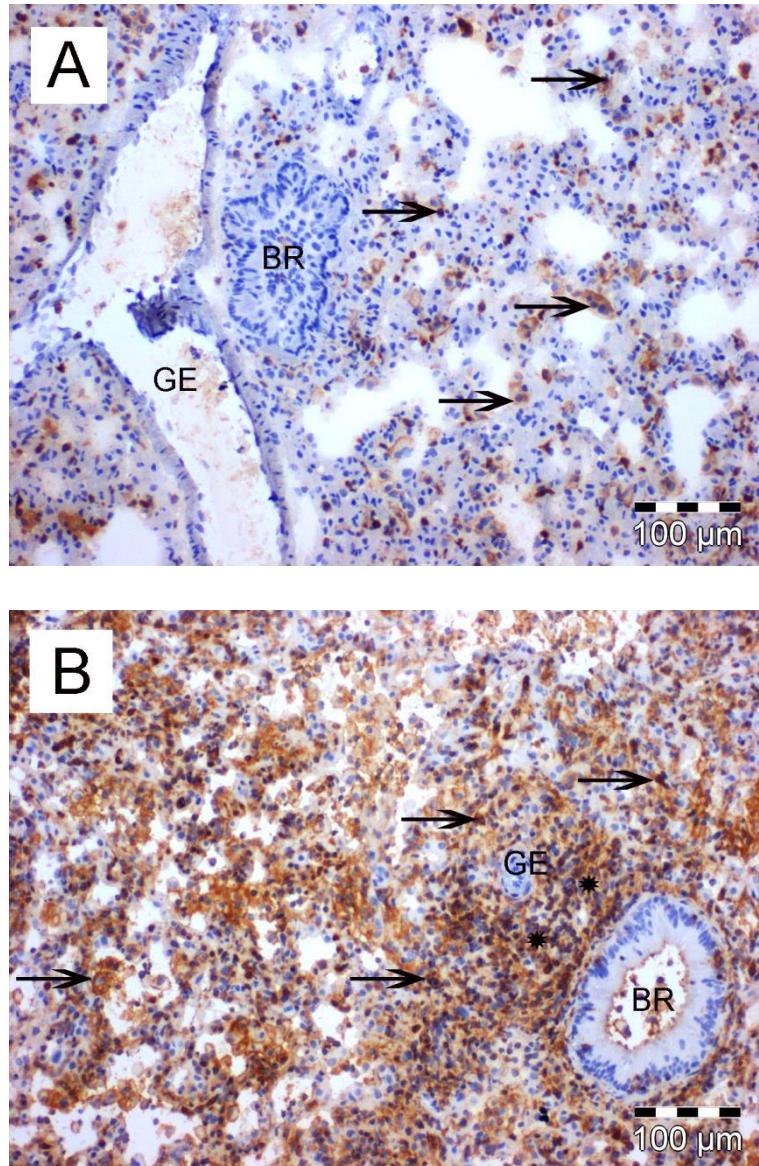


Abbildung 2.7: Beispiel für eine CD11a-Färbung.

Präparat A zeigt eine unbehandelte rechte Lunge. Die CD11a-positiven Zellen befinden sich um größere Gefäße (GE) und Bronchioli (BR) sowie in homogener Verteilung im Parenchym. Präparat B zeigt eine allogen transplantierte Lunge am Tag 20 nach MP-Behandlung am POD 14, 15 und 16. Es ist eine deutliche Zunahme der CD11a-positiven Zellen (Pfeile) im Vergleich mit der Kontrolllunge erkennbar. Die Auszählung der CD11a-positiven Zellen wird jedoch durch die vermehrte Hintergrundaktivität erschwert. Das Gefäß (GE) und der Bronchiolus (BR) im rechten unteren Bildabschnitt sind von einem dichten Saum mononukleärer Entzündungszellen („cuffing“) umgeben (Sternchen).

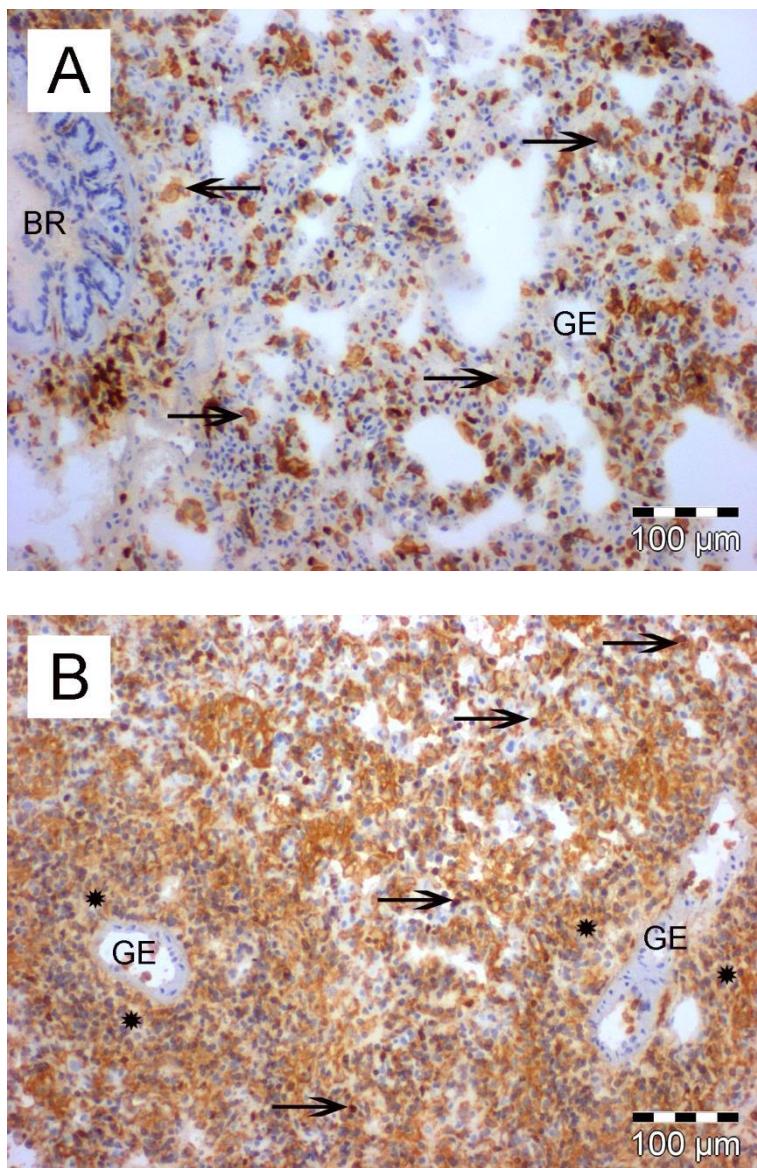


Abbildung 2.8: Beispiel für eine CD18-Färbung.

Präparat A zeigt eine unbehandelte rechte Lunge. Die im gesamten Organgewebe verteilten CD18-positiven Zellen (Pfeile) heben sich durch ihre bräunliche Färbung gut vom Lungenparenchym ab. Im linken Bildausschnitt befindet sich ein Bronchiolus (BR) und in der rechten Bildmitte ein Gefäß (GE). Präparat B zeigt eine allogen transplantierte Lunge der MP-Gruppe am Tag 20. Die vermehrte Hintergrundaktivität lässt das Gewebe in seiner Gesamtheit braun erscheinen und erschwert die Abgrenzung einzelner CD18-positiver Zellen. In dem verdichtenen Parenchym liegen zwei venöse Gefäße (GE) auf der rechten bzw. linken Bildseite, welche von einem dichten Saum von mononukleären Infiltrationszellen umringt sind (Sternchen).

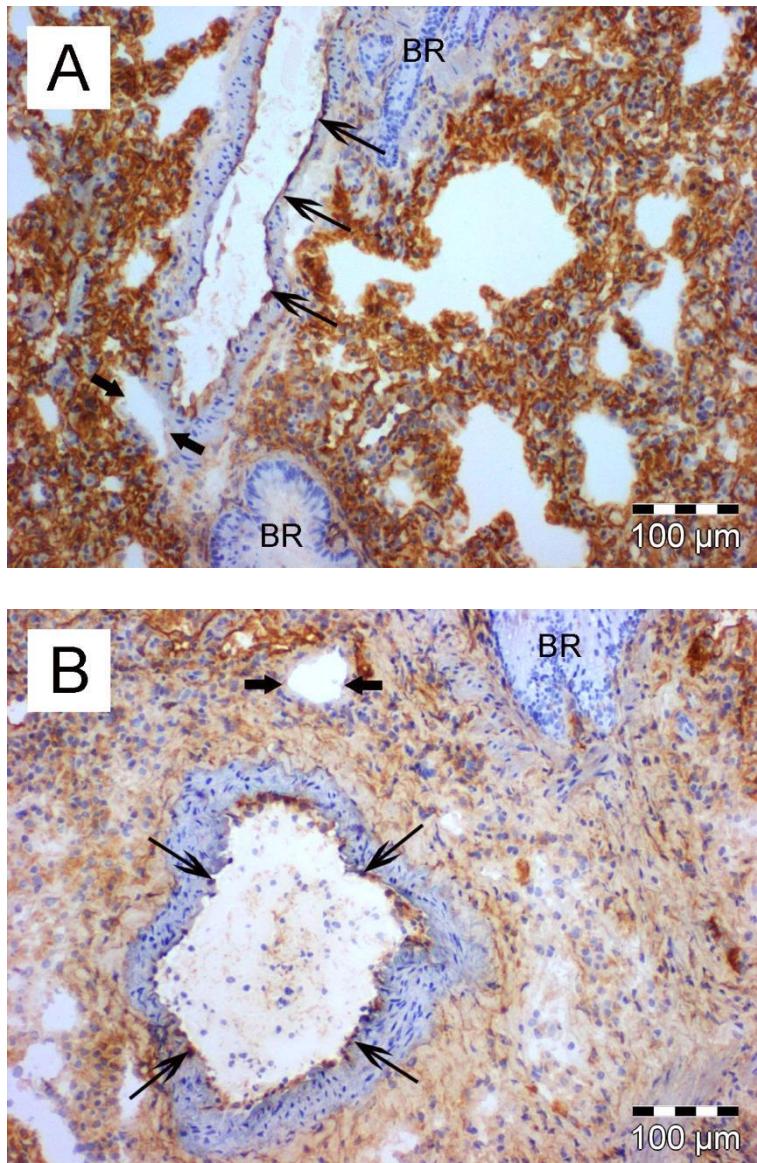


Abbildung 2.9: Beispiel für eine ICAM-1-Färbung.

Präparat A zeigt eine unbehandelte rechte Lunge. Der histologische Ausschnitt bildet am oberen und unteren Bildrand eine Bronchiole (BR) ab. In der Bildmitte befindet sich ein venöses Gefäß mit ICAM-1-positiven Endothelzellen in der Gefäßwand (lange Pfeile) und benachbart links unten ist eine kleinere Vene zu sehen mit ICAM-1-negativen Endothelzellen (kleine Pfeile). Das Präparat B zeigt eine allogen transplantierte Lunge aus einem Tier der MP-Gruppe (Bolustherapie an den POD 14, 15 und 16). Die langen Pfeile markieren das große arterielle Gefäß in der Bildmitte mit ICAM-1-positiven Endothelzellen, die kleinen Pfeile zeigen auf die darüber liegende Vene mit ICAM-1-negativen Endothelzellen. Im rechten oberen Bildrand ist ein Bronchiolus (BR) angeschnitten.

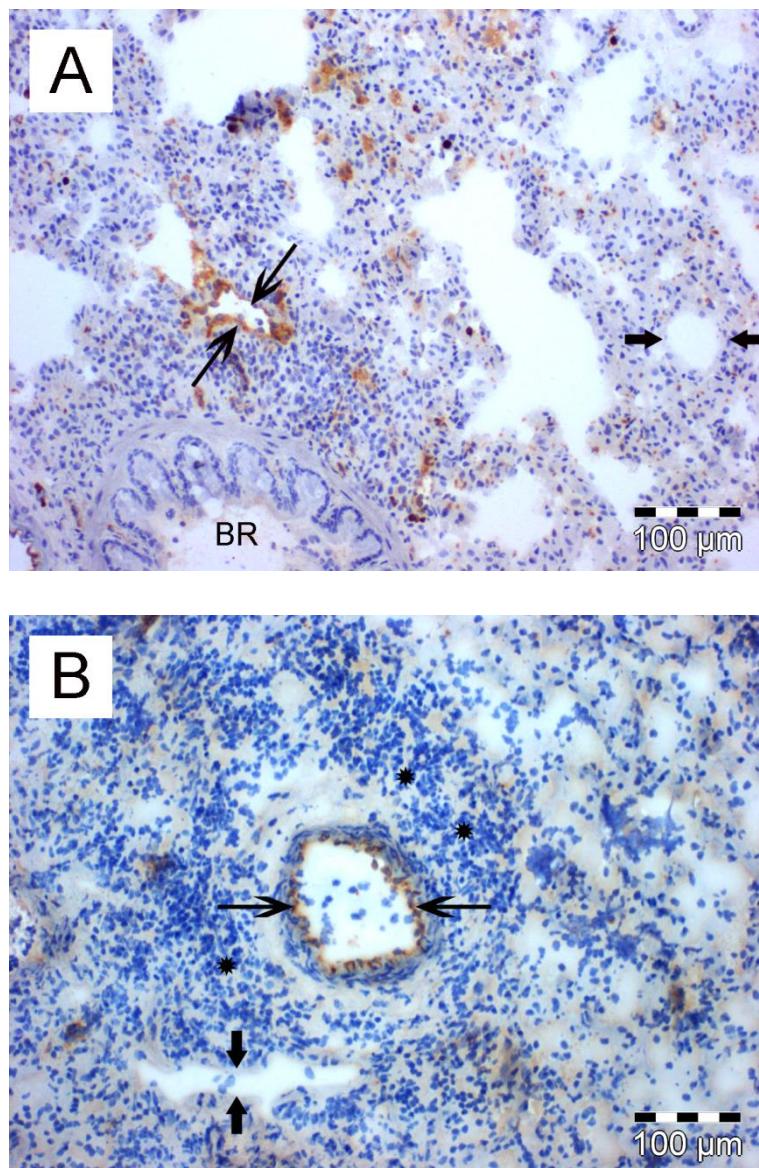


Abbildung 2.10: Beispiel für eine P-Selektin-Färbung.

Präparat A zeigt eine unbehandelte rechte Lunge. Im histologischen Präparat ist im mittleren Bildausschnitt eine Vene abgebildet, deren Gefäßwand P-Selektin-positive Endothelzellen (lange Pfeile) trägt. Im rechten Bilddrittel liegt ein kleines venöses Gefäß mit P-Selektin-negativen Endothelzellen (kleine Pfeile). Präparat B zeigt eine allogen transplantierte Lunge am Tag 20 nach RAD-Behandlung von POD 14 bis 100. Das Parenchym ist verdichtet. In der Bildmitte liegt ein arterielles Gefäß mit P-Selektin-positiven Endothelzellen (Pfeile), das von einem dichten Saum von Entzündungszellen umgeben ist (Cuffing) (Sternchen). Links im Bild, unterhalb der P-Selektin-positiven Arterie, befindet sich ein P-Selektin-negatives venöses Gefäß (kleine Pfeile).

2.9 Statistische Auswertungen

Jedes histologische Präparat wurde gemäß den von Hirt et al. modifizierten Kriterien der ISHLT in Hinblick auf den Schweregrad der akuten und chronischen Transplantatabstoßung klassifiziert (ISHLT-Score) (Yousem et al. 1996; Hirt 2003). Eine Gruppe mit fünf Tieren wurde jeweils zu einem gleichen Zeitpunkt getötet und der Mittelwert und die Standardabweichung für jedes Tier gebildet. Aufgrund der geringen Anzahl an Werten wurde keine statistische Analyse zum Vergleich der einzelnen Ergebnisse des ISHLT-Scores angewandt.

Zur Auswertung der Ergebnisse der Immunhistologie wurden die numerischen Werte (ED1, CD11a, CD18) bzw. die semiquantitative Expression von ICAM-1 und P-Selektin pro Gesichtsfeld vier- bzw. fünfmal für das jeweilige Adhäsionsmolekül bestimmt und jeweils ein Mittelwert mit Standardabweichung für die transplantierte linke wie auch die native rechte Lunge jeden Tieres gebildet. Die native rechte Lunge wurde jeweils als Qualitätskontrolle zum Ausschluss einer Infektion verwendet. Von den Mittelwerten der 5 Tiere wurde für jeden Untersuchungstag (POD 15 bzw. 20, 30, 60, 100) jeweils erneut ein Gruppenmittelwert mit Standardabweichung für linke und rechte Lunge berechnet und daraus die Differenz gebildet. Unabhängig von Gruppeneinteilung und dem Untersuchungszeitraum ergaben sich für alle rechten Lungen ähnliche immunhistologische Ergebnisse, sodass der Wert als interner Standard verwendet werden konnte. Für die statistischen Analysen wurden jeweils die Differenzen aus den Mittelwerten der rechten und linken Lunge herangezogen. Da diese Differenzwerte unabhängige, nicht-parametrische Daten darstellen, wurde der Kruskal-Wallis-Test für die Auswertung herangezogen. Anschließend erfolgte die Anwendung der Bonferroni-Korrektur. Die gesamte statistische Analyse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 15.0 und SigmaStat 3.01 (SPSS Inc. Chicago, Illinois) unter Anleitung von Herrn Dr. med. Claudius Diez durchgeführt. Als signifikant wurden Differenzwerte erachtet, deren p-Wert unter 0,05 lag.

3 ERGEBNISSE

Im Ergebnissesteil soll näher auf die histologisch-pathologischen Veränderungen der Rattenlungen im postoperativen Verlauf eingegangen werden. Um die krankhaften Umbauprozesse des Lungengewebes im Rahmen der Abstoßung verstehen und abgrenzen zu können, ist es nötig, den histologischen Aufbau einer gesunden Rattenlunge zu kennen (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.7.1).

3.1 Ergebnisse der konventionellen Histologie

3.1.1 0-Kontrolle

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der **rechten** Lungen der Kontrollgruppen in den HE-gefärbten Schnitten wurden keine pathologischen Veränderungen festgestellt. Das Parenchym war unauffällig. Die bronchialen sowie vaskulären Strukturen zeigten eine intakte Struktur und waren frei von Rundzellinfiltraten (Abbildung 3.1). Das respiratorische Epithel der Bronchioli mit den basal liegenden Zellkernen verlief in regelmäßiger, wellenförmiger Struktur um das Lumen und haftete fest auf der darunterliegenden Lamina propria. Die zirkulär angeordnete glatte Muskelschicht zeigte sich kontinuierlich ohne jegliche Unterbrechungen. Die arteriellen Strukturen zeigten ein unbeschädigtes, einschichtiges Plattenendothel mit länglichen Kernen und eine kontinuierliche kräftige Muskularis unter der bindegewebigen Adventitia. Die venösen Gefäße waren regelhaft gebaut mit schmaler Wanddicke und muskelfaserarmer, dünner Muskelschicht. Singulär waren auch einzelne Herde von lymphatischem Gewebe, das sogenannte BALT (bronchus-associated lymphatic tissue) in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut zu finden. Nur in vereinzelten Präparaten traten geringgradig ausgeprägte Inflammationszeichen auf. Auch die linken sowie rechten Lungen der

syngen transplantierten Tiere der 0-Gruppe zeigten keinerlei histologische Auffälligkeiten.

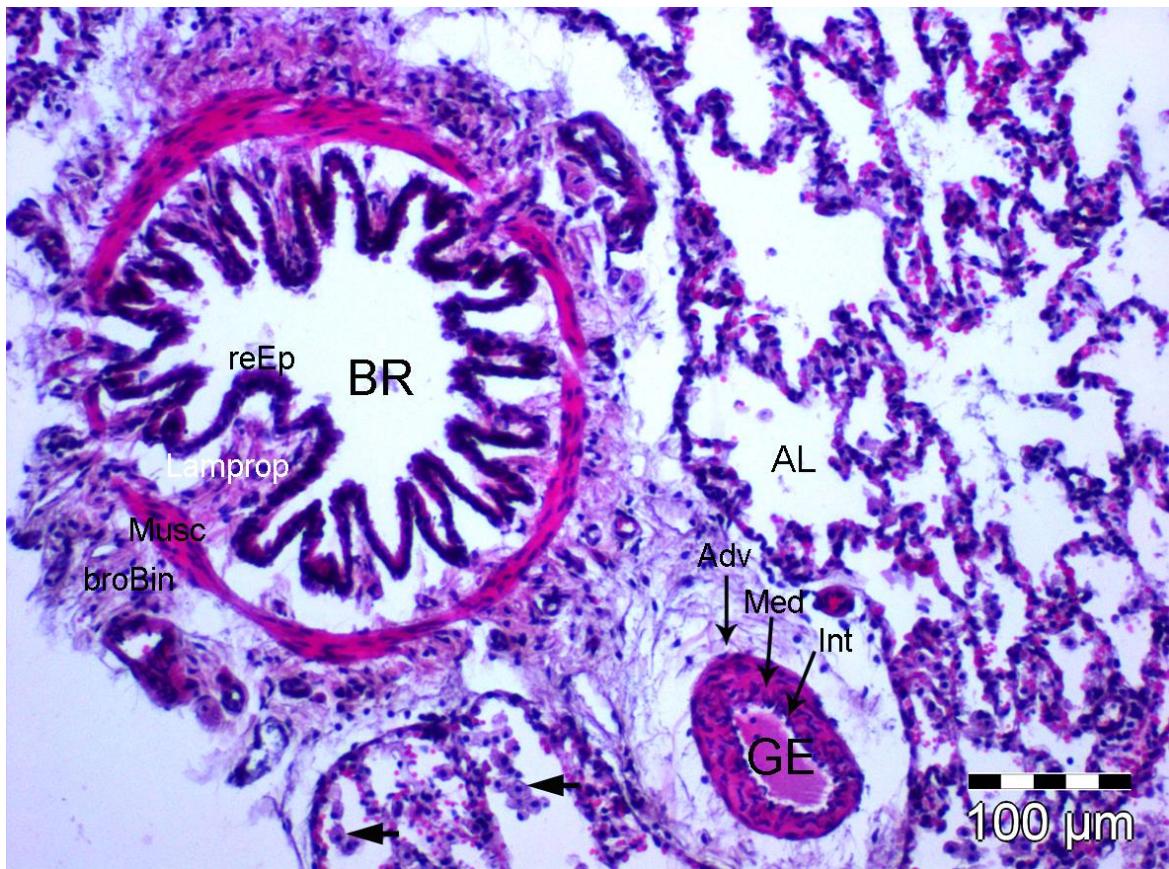


Abbildung 3.1: Ausschnitt aus einer rechten unveränderten Lunge; HE-Färbung; 100fache Vergrößerung.

Der Bronchiolus (BR) besitzt ein sternförmiges Lumen, das von einem respiratorischen Epithel (reEp) umhüllt wird. Es folgt die bindegewebige Lamina propria (Lamprop), sowie die aus glatten Muskelzellen bestehende, zirkulär verlaufende Tunica muscularis (Musc). Peribronchiales Bindegewebebettet den Bronchiolus in das umgebende Lungenparenchym ein. Rechts neben dem Bronchiolus befindet sich ein arterielles Gefäß (GE). Es besitzt als innerste Schicht die Tunica intima (Int), die aus einem einschichtigen Epithel mit flachen Endothelzellen besteht, deren Zellkerne sich in das Lumen vorwölben. Die aufliegende breite Tunica media (Med) enthält dicht gepackte glatte Muskelzellen, die zirkulär angeordnet sind. Die stäbchenförmige und mitunter geschlängelte Form der Zellkerne der glatten Muskulatur lässt sich in diesem Gefäßquerschnitt gut erkennen. Die außen gelegene bindegewebige Adventitia (Adv) dient dem Einbau der Arterie in seine Umgebung. Das Lungenparenchym besteht vorrangig aus Alveolen (AL) mit dünnen Alveolarsepten und infiltrat- sowie ödemfreien Lumina. Als Vertreter des unspezifischen Abwehrsystems der Lunge können Alveolarmakrophagen (kleine Pfeile) hämatogen in die Alveolarsepten einwandern und intraalveolär auftreten.

Am **POD 15** nach allogener Lungentransplantation (LTx) zeigte sich in den linken Lungen der 0-Gruppe eine milde bis ausgeprägte perivaskuläre wie auch peribronchiale Inflammationsreaktion mit Infiltraten aus mononukleären Entzündungszellen (siehe Abbildung 3.2). Im Parenchym hatte sich ein interstitielles Ödem entwickelt. Die Auswertung einer Lunge war aufgrund der schlechten Qualität des Organgewebes nicht möglich. Zirkulär um die Gefäße waren deutliche Infiltrationen („cuffing“) erkennbar, welche sich zum Teil bis in die Alveolarsepten ausgedehnt hatten.

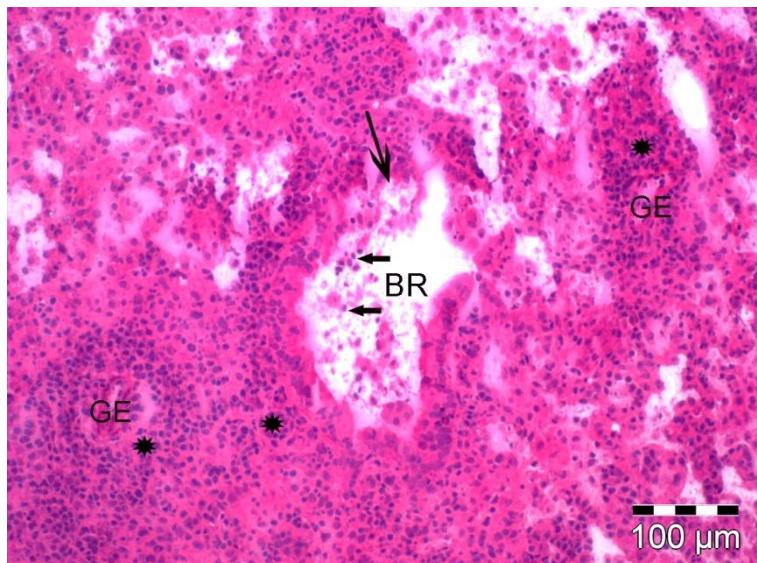


Abbildung 3.2: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge am POD 15 ohne medikamentöse Therapie. HE-Färbung.

Es ist eine moderate akute Abstoßung zu sehen mit ausgeprägter peribronchialer und -vaskulärer Infiltration mononukleärer Zellen (Sternchen). Die Wände der beiden Gefäße (GE) sind bereits leicht verdickt und zeigen eine beginnende Okklusion. Die Entzündungszellen haben die Tunica muscularis des Bronchus (BR) durchbrochen und sind in das Lumen eingewandert (kleine Pfeile). Kennzeichnend für dieses Stadium der akuten Abstoßung sind die destruktiven Veränderungen des Bronchus mit epithelialen Ulzerationen und Dissoziation des Epithels von der Basalmembran (großer Pfeil). Interstitiell finden sich diffuse Infiltrate.

An einigen Stellen der Gefäßwand war die Muskularis durchbrochen und teilweise bereits zerstört. In drei von vier Lungen waren die Lymphozyten bis in die Gefäßlumina vorgedrungen. Eine der allogen transplantierten Lungen wies eine schwach vaskuläre Abstoßungsreaktion (A1) mit geringgradiger, perivaskulärer Infiltration und vielen freien Lumina auf. Drei der vier Transplantate zeigten massive, mehrschichtige peribronchiale Infiltrationen mit Durchbrechung der Lamina muscularis mucosae der kleinen Bronchien und erheblicher Infiltration der Submukosa. Vereinzelt waren intraluminäre, lymphozytäre Zellen zu sehen.

Am **POD 30** nach allogener LTx konnte eine deutlich vermehrte mononukleäre Infiltration um die Gefäße festgestellt werden. Vereinzelt war eine deutliche Hyperplasie der arteriellen Gefäßwände parallel zu einer subendothelialen Zellinfiltration zu verzeichnen. Es kam stellenweise zum vollständigen Durchbruch der Gefäßwand mit Rundzellinfiltration im Gefäßinneren (siehe Abbildung 3.3). Kleinere Gefäße waren teilweise vollständig von infiltrierten Lymphozyten und proliferierenden Fibroblasten okkludiert. Diese Obliteration betraf 25%-50% der kleinen Gefäße und entsprach damit dem Bild einer chronischen Abstoßung mit beginnender vaskulärer Destruktion (erhebliche Destruktion, vaskuläre Obliteration). Die kleinen Bronchien waren größtenteils destruiert und zeigten eine geringe peribronchiale Infiltration. Bei größeren Bronchien hingegen war eine massive peribronchiale Infiltration mit Durchwanderung der Muskularis und erheblicher Inflammation der Submukosa sichtbar. Die bronchialen Epithelzellen waren zum Teil hochgradig metaplastisch verändert und destruiert, was sich durch eine Ablösung der Zellen von der Basalmembran bzw. Lamina propria zeigte. Insgesamt waren mehr als 50% der kleinen Bronchien zerstört und zeigten somit eine chronisch bronchiale Abstoßung vom ISHLT-C-Grad 2-3 (siehe Abbildung 3.15).

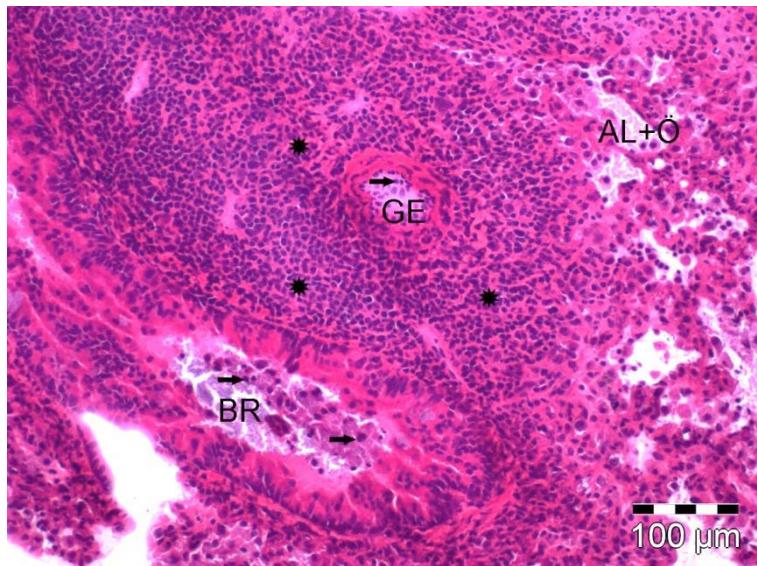


Abbildung 3.3: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge am POD 30 ohne medikamentöse Therapie. HE-Färbung.

Der Ausschnitt zeigt eine sehr ausgeprägte perivaskuläre Infiltration mononukleärer Zellen („cuffing“) (Sternchen) um eine kleine Arterie (GE). Die Rundzellen haben die Gefäßwand durchbrochen und sind intraluminal eingewandert (kleine Pfeile im Gefäßlumen). Der Bronchiolus (BR) ist von einem weniger dichten Band von Entzündungszellen umgeben. Jedoch haben die Rundzellen bereits die Tunica muscularis durchwandert (Migration) und sind in das Bronchiallumen vorgedrungen (kleine Pfeile im Bronchioluslumen). Interstitiell zeigt sich eine diffuse Durchsetzung mit Entzündungsinfiltraten sowie ödematös veränderte Alveolen (AL+Ö).

Am **POD 60** fanden sich fast keine interstitiellen, perivaskulären und peribronchialen Infiltrationen mehr, was auf eine Regression des akuten Abstoßungsgeschehens schließen ließ. Allein in einer der fünf Lungen wiesen die bronchialen und vaskulären Strukturen noch ausgeprägte Inflammationszeichen im Sinne einer perivaskulären Infiltration auf (ISHLT –A 2.5 und –B 2). So konnte man in vier der fünf Präparate aufgrund des Mangels an peribronchialen und –vaskulären Infiltraten von einer inaktiven BO (Cb) bzw. einem inaktiven vaskulären Geschehen (Db) sprechen. In einem der Tiere war jedoch noch ein aktives, inflammatorisches Geschehen mit Rundzellherden nachweisbar (Ca bzw. Da).

Über 50% der kleinen Gefäße und Bronchien waren destruiert. Obwohl ein Teil der größeren Strukturen noch offene Lumina hatte, zeichnete sich bereits eine progrediente vaskuläre und bronchiale Destruktion ab. Interstitiell fand man eine deutliche bindegewebig-fibrotische Gewebetransformation vor, wobei noch keine ubiquitäre Bindegewebsnarbe zu verzeichnen war. Vaskuläre Sklerose und BO dominierten das Bild in allen allogenen Transplantaten (siehe Abbildung 3.4).

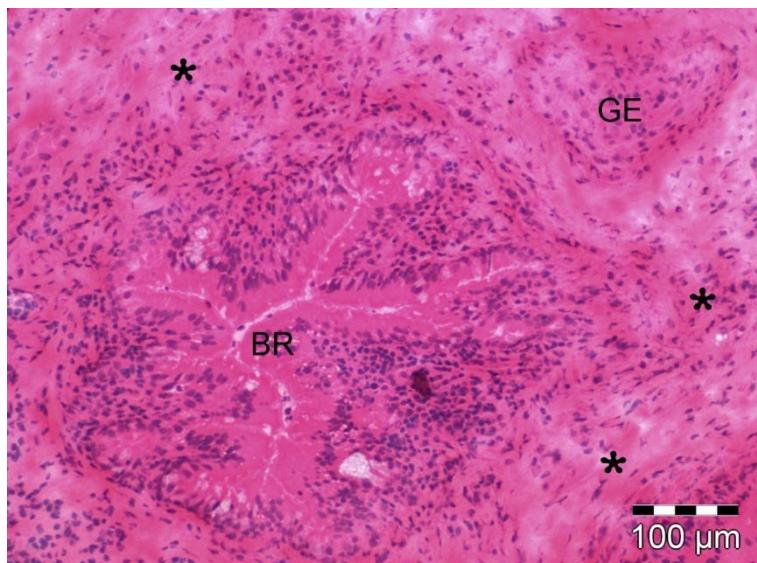


Abbildung 3.4: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge am POD 60 ohne medikamentöse Therapie. HE-Färbung.

Das histologische Bild zeigt einen deutlichen Rückgang der akuten Abstoßungsreaktion mit fehlenden peribronchialen und –vaskulären Infiltrationen. Es sind bereits erhebliche degenerative Umbauprozesse an bronchialen sowie vaskulären Strukturen zu sehen sowie eine Fibrosierung/beginnende Vernarbung des Interstitiums (Sternchen). Das Gefäß (GE) im rechten oberen Bildausschnitt ebenso wie der Bronchus (BR) in der Bildmitte sind bereits okkludiert. Residuale Rundzellansammlungen sind lediglich noch in der Submukosa und im Lumen des Bronchus sichtbar.

100 Tage nach der Transplantation war der größte Teil aller Lungengewebe bindegewebig vernarbt und bereits makroskopisch fiel die massive Schrumpfung der transplantierten allogenen Lungen auf den Objektträgern auf. Von der Okklusion und Degeneration des Lumens waren neben den Bronchiolen nun auch die größeren Bronchien betroffen. Bei den kleineren sowie größeren Gefäßen kam es durch den fibrotischen Umbauprozess zu vernarbten, verdickten Gefäßwänden und konsekutiv zu einem vollständigen Verschluss der Lumina. In der histologischen Betrachtung stellte sich der Endzustand der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge mit massiver vaskulärer Sklerose und BO mit ISHLT-Score – C 3.1 und – D 2.9 dar (siehe Abbildung 3.5 und Abbildung 3.15).

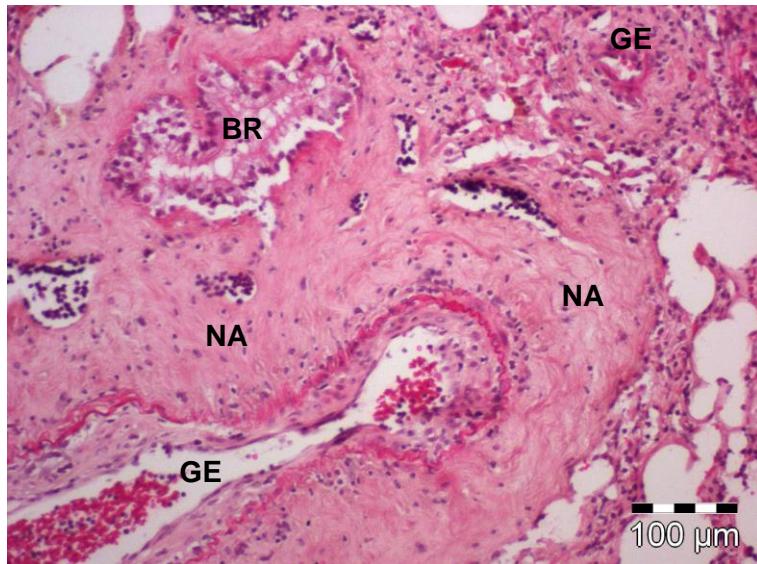


Abbildung 3.5: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge am POD 100 ohne medikamentöse Therapie. HE-Färbung.

In der lichtoptischen Untersuchung ist eine massive Vernarbung und Destruktion der kleineren und größeren vaskulären (GE) und bronchialen Strukturen (BR) zu erkennen. Die Lumina der größeren und kleineren Gefäße (GE) und Bronchioli (BR) sind vollständig okkludiert oder nur noch residual geöffnet. Das Interstitium ist weitgehend vernarbt (NA) und normale Lungenstrukturen sind kaum mehr aufzufinden.

3.1.2 MP-Kontrolle

Die nativen **rechten** Lungen zeigten in 21 von 25 Schnitten ein physiologisches, unauffälliges Lungengewebe, mit Ausnahme von vier der 25 Tiere. In den Lungen von zwei Tieren am POD 60 sowie zwei Ratten am POD 100 waren vereinzelt Stellen mit geringer perivaskulärer Infiltration zu beobachten. Pathologische Befunde auf bronchialer oder interstitieller Ebene waren in keiner der rechten Lungen der Versuchstiere nachweisbar. Die rechten, syngen transplantierten Lungen wiesen am POD 100 weder ein Anzeichen einer Infektion noch einer Abstoßungsreaktion auf.

In den am **POD 20** untersuchten allogenen linken Lungen der Methylprednisolon-Gruppe (MP-Gruppe) fand sich histologisch eine erhöhte perivaskuläre sowie peribronchiale Infiltrationsaktivität mit starker Infiltration des Interstitiums (siehe Abbildung 3.6). Die perivaskuläre Infiltration zeigte mehrschichtige Reihen mononukleärer Entzündungszellen („cuffing“), welche stellenweise die Muskularis durchbrochen hatten. Aufgrund dieses akuten, milden bis moderaten vaskulären Abstoßungsgeschehens wurde jedes der Tiere mit einem ISHLT-A-Grad zwischen 2 und 3 bewertet (siehe Abbildung 3.14). Die kleinen Bronchien von vier der fünf Tiere waren ebenfalls von einem mehrschichtigen Infiltrationssaum umgeben, wobei die mononukleären Zellen bis zur Submukosa vorgedrungen waren. Lediglich in einer Lunge wurde die peribronchiale Infiltration in einer deutlich schwächeren Ausprägung vorgefunden (ISHLT – B 1). Parallel zu dem akuten Abstoßungsphänomen fanden sich in drei von fünf transplantierten Lungen bereits Anzeichen einer beginnenden chronischen Abstoßungsreaktion. In einem dieser Präparate war die Obliteration von etwa einem Viertel der kleineren vaskulären und bronchialen Strukturen erkennbar (ISHLT – C 1, – D 1), in den beiden anderen waren sogar etwa 50% der kleinen Gefäße und Bronchien von den chronisch-destruktiven Prozessen betroffen. Zudem ließ sich eine beginnende Fibrosierung der parenchymatösen Strukturen nachweisen.

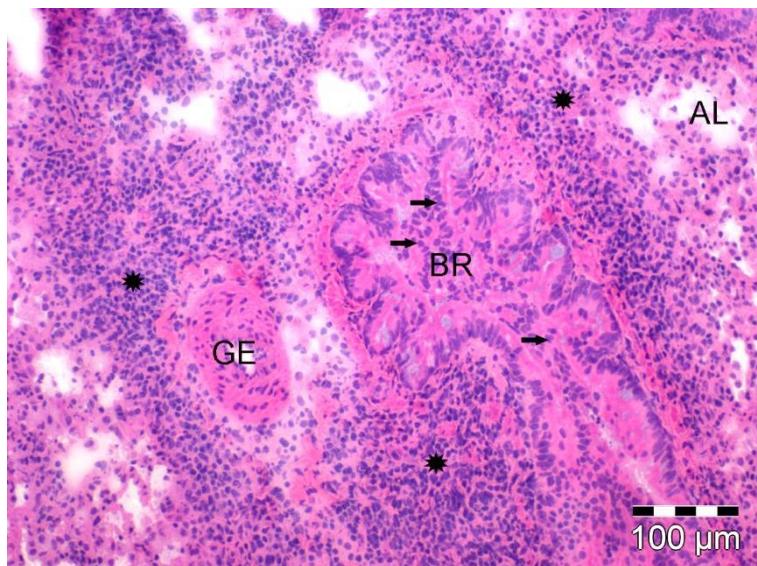


Abbildung 3.6: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge der MP-Gruppe; POD 20; HE-Färbung.

Das Lungengewebe zeigt eine schwere akute Abstoßungsreaktion mit mehrreihigen Rundzellinfiltraten (Sternchen) um Bronchus (BR) und Gefäß (GE). Bei der Arterie finden sich Zeichen einer Vaskulitis mit verdickten Gefäßwänden, subendothelialer Infiltration mononukleärer Entzündungszellen (Endotheliitis) und beginnender Okklusion des Lumens. Die Wandschichten und das Lumen des Bronchus sind derart massiv von Entzündungsinfiltraten durchsetzt, dass der Bronchus bereits völlig okkludiert ist. Dies entspricht dem histologischen Bild einer aktiven obliterativen Bronchiolitis. Das Interstitium zeigt diffuse leukozytäre Infiltrationen.

Am **POD 30** nach der Transplantation zeigte sich in den allogenen linken Lungen eine Reduktion der Infiltrationsaktivität auf vaskulärer sowie bronchialer Ebene, jedoch war sie ubiquitär noch deutlich nachweisbar. Insbesondere im Bereich der kleinen Gefäße traten eine vermehrte mehrschichtige, perivaskuläre Monozyteninfiltration sowie eine Verdickung der arteriellen Gefäßwände auf. Hinsichtlich ihrer Struktur waren die Gefäße noch intakt. Vergleichbar mit POD 20 erfolgte eine Okklusion und konsekutiv eine Destruktion von über 50% der kleinen Gefäße. In allen Lungen fanden sich mehrschichtige, peribronchiale Infiltrate mit submukös eingewanderten Entzündungszellen. Circa 50% der kleinen Bronchien waren obliteriert, somit waren die bronchiale und die vaskuläre Ebene vom Abstoßungsgeschehen etwa gleichermaßen

stark betroffen. Im Parenchym war eine beginnende und teilweise bereits ausgeprägte Fibrosierung zu erkennen, welche sich histologisch durch die regelmäßige, strukturierte Anordnung der Bindegewebsfibroblasten zeigte. Damit war bereits am POD 30 das Bild einer moderaten chronischen Abstoßung im Sinne einer vaskulären Sklerose und einer BO zu sehen.

60 Tage nach der Transplantation zeigte sich eine starke Rückläufigkeit des akuten Geschehens und es waren kaum noch akute Infiltrationen um vaskuläre und bronchiale Strukturen nachweisbar. In allen allogenen Lungen dominierte das Bild der chronischen Abstoßung mit einer massiven interstitiellen Fibrose und teilweiser Vernarbung des Präparates. Nur noch wenige Areale mit normalem Lungengewebe waren zwischen dem fibrotischen Parenchym auffindbar. Es kam zur Okklusion des größten Teils der kleineren bis mittelgroßen Gefäße, welche aufgrund erheblicher Sklerosierungen und Wandverdickungen nur noch schwer von der Umgebung abgrenzbar waren. Die kleineren bronchialen Strukturen waren gleichermaßen von Destruktionen und Epithelablösungen betroffen und eine Trennung ihrer Wandstrukturen war aufgrund des fibrotischen Vernarbungsprozesses kaum noch möglich (siehe Abbildung 3.7). Die größeren vaskulären und bronchialen Strukturen ließen sich verhältnismäßig gut im Parenchym erkennen und ihre Lumina waren größtenteils noch offen. Damit bestand am POD 60 bereits eine massive chronische Abstoßung in den transplantierten Lungen.

Am **POD 100** fand sich eine massive Destruktion des Organgewebes mit kompletter Vernarbung des Interstitiums (siehe Abbildung 3.8). Makroskopisch war bereits ein verkleinerter und verdichteter Lungengewebsquerschnitt auf den Objektträgern hinweisend auf die Narbenbildung. Lichtoptisch konnte keine Infiltrationsaktivität mehr nachgewiesen werden. Die Gefäße waren okkludiert und sklerosiert ebenso wie die kleineren und mittelgroßen Bronchien. Lediglich größere bronchiale Strukturen zeigten noch ein offenes Lumen. Das Endstadium des chronischen Abstoßungsgeschehens der allogenen Lungen war mit der BO, der vaskulären Sklerose und der Vernarbung des

Interstitiums erreicht (ISHLT-A: 0.0 / -B: 0.0 / -C: 3.6/ -D: 3.6) (siehe Abbildung 3.15).

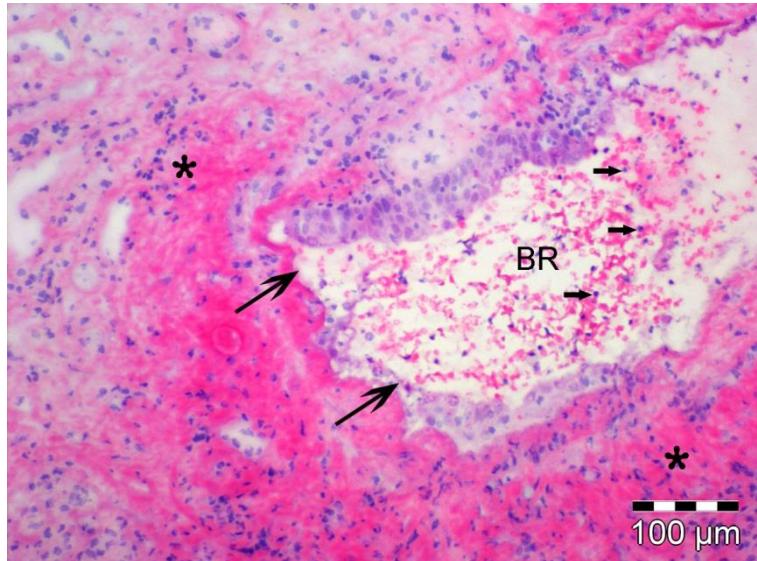


Abbildung 3.7: Ausschnitt aus einer linken, allogen transplantierten Lunge der MP-Gruppe am POD 60; HE-Färbung.

Es ist ein Bronchiolus mit deutlichen Destruktionszeichen wie Epithelablösungen und -nekrosen (lange Pfeile) abgebildet. Peribronchial zeigen sich Fibrosierungen (Sternchen) mit einem deutlichen Rückgang der Rundzellinfiltrate. Lediglich intraluminal sind noch Entzündungszellen zu sehen (kleine Pfeile).

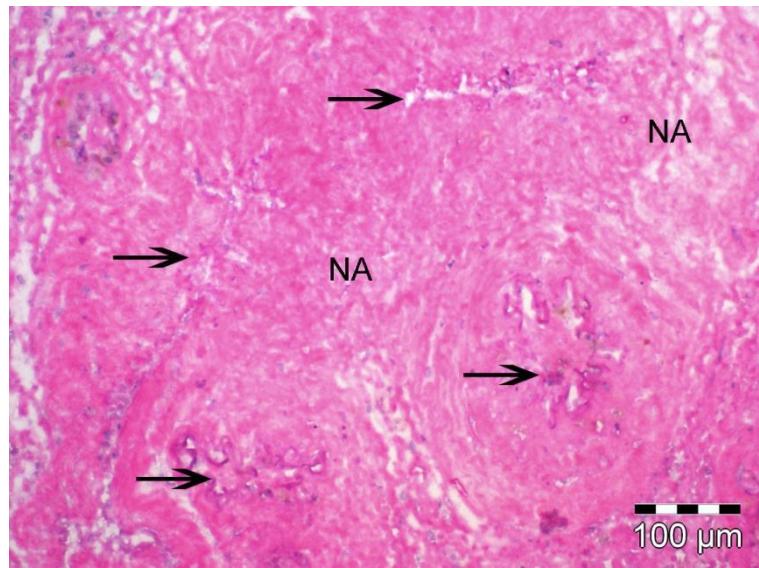


Abbildung 3.8: Ausschnitt einer linken, allogen transplantierten Lunge der MP-Gruppe am POD 100; HE-Färbung.

Das Transplantat zeigt eine ubiquitäre Vernarbung (NA) mit völligem Verlust von funktionellem Lungengewebe und stellt damit den maximalen Grad chronischer Abstoßung dar. Lediglich die angedeuteten Lumina lassen noch auf ehemalige bronchiale oder vaskuläre Strukturen schließen (Pfeile).

3.1.3 RAD-Gruppe

In nahezu allen nativen **rechten** Lungen waren keine Zeichen einer akuten sowie chronischen Transplantatabstoßung nachweisbar. Lediglich in den Lungen von drei Ratten – von einem Tier am POD 20 und von zwei Tieren am POD 100 - wurde ein verdichtetes, infiltriertes Parenchym und teilweise perivaskuläre Infiltrate beobachtet. Diese strukturellen, histologischen Veränderungen waren möglicherweise die Folge einer interstitiellen Pneumonie. Bei den syngen transplantierten Lungen fand sich 100 Tage nach dem Eingriff bis auf eine Ausnahme ein völlig unauffälliges Organgewebe. Bei einem Tier wurden histologische Auffälligkeiten in Form von peribronchialen und perivaskulären Infiltraten in der linken Lunge und Gefäßinfiltrationen in der rechten Lunge beobachtet. Als Besonderheit fand sich in nahezu der Hälfte der rechten und syngen transplantierten Lungen ein vermehrtes Auftreten von schaumartig veränderten Alveolarmakrophagen in den Alveolarräumen, welche zum Teil von isolierten Lymphozyten sowie einer diskreten Vergrößerung der Alveolarsepten begleitet wurden (siehe Abbildung 3.9).

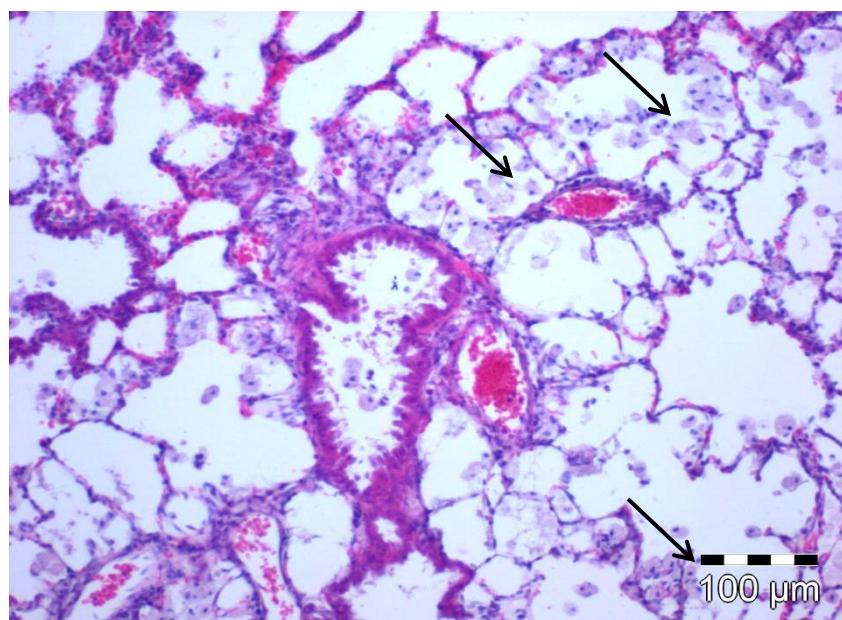


Abbildung 3.9: Ausschnitt aus einer linken, syngen transplantierten Lunge der RAD-Gruppe am POD 100; HE-Färbung. In der Abbildung sind Alveolen mit Anhäufungen von schaumartig aussehenden Alveolarmakrophagen (Pfeile) in den Alveolarräumen zu sehen.

20 Tage nach allogener LTx und damit 6 Tage nach Beginn der Everolimusapplikation dominierte die akute Abstoßung deutlich das histologische Bild in den Lungenschnitten. Es fand sich eine ausgeprägte interstitielle Infiltration mit Penetration der Entzündungszellen in die Alveolarräume. Perivaskulär zeigten sich massive Rundzellherde mit mehr als drei Zellschichten („cuffing“) und subendotheliale Infiltrationen (Endothelialitis) der kleineren, teilweise auch der größeren Gefäße (ISHLT –A 2,8). Im Rahmen eines bereits beginnenden chronischen Destruktionsprozesses kam es zu einer geringen fibrotisch-strukturellen Organisation des perivaskulären Bindegewebes sowie zur Okklusion einiger kleiner Gefäße; größere vaskuläre Strukturen besaßen dagegen noch offene Lumina (ISHLT –D 1). Bei den bronchialen Strukturen waren ebenfalls akute peribronchiale Infiltrationen zu erkennen mit Durchbrechung der Muscularis, Penetration der Entzündungszellen ins Lumen, Epithelablösungen sowie starke Nekrosezeichen (siehe Abbildung 3.10). Im Vergleich dazu wurde bei den Bronchien eine deutlich schwerere Schädigung festgestellt als bei den Gefäßen (ISHLT –B 3,2, siehe Abbildung 3.14). Der größte Teil der kleineren Bronchien war okkludiert bzw. nur noch residual geöffnet und schwer von der Umgebung abgrenzbar, während die größeren Strukturen meist noch ein offenes Lumen besaßen. Anders als bei den Gefäßen wurden auf bronchialer Ebene keinerlei Zeichen einer chronischen Abstoßung festgestellt (ISHLT –C 0). In der Übersicht bestanden eine massive akute Abstoßungsreaktion mit ausgeprägter BO mit moderatem Cuffing sowie eine Endothelialitis mit beginnender vaskulärer Sklerose.

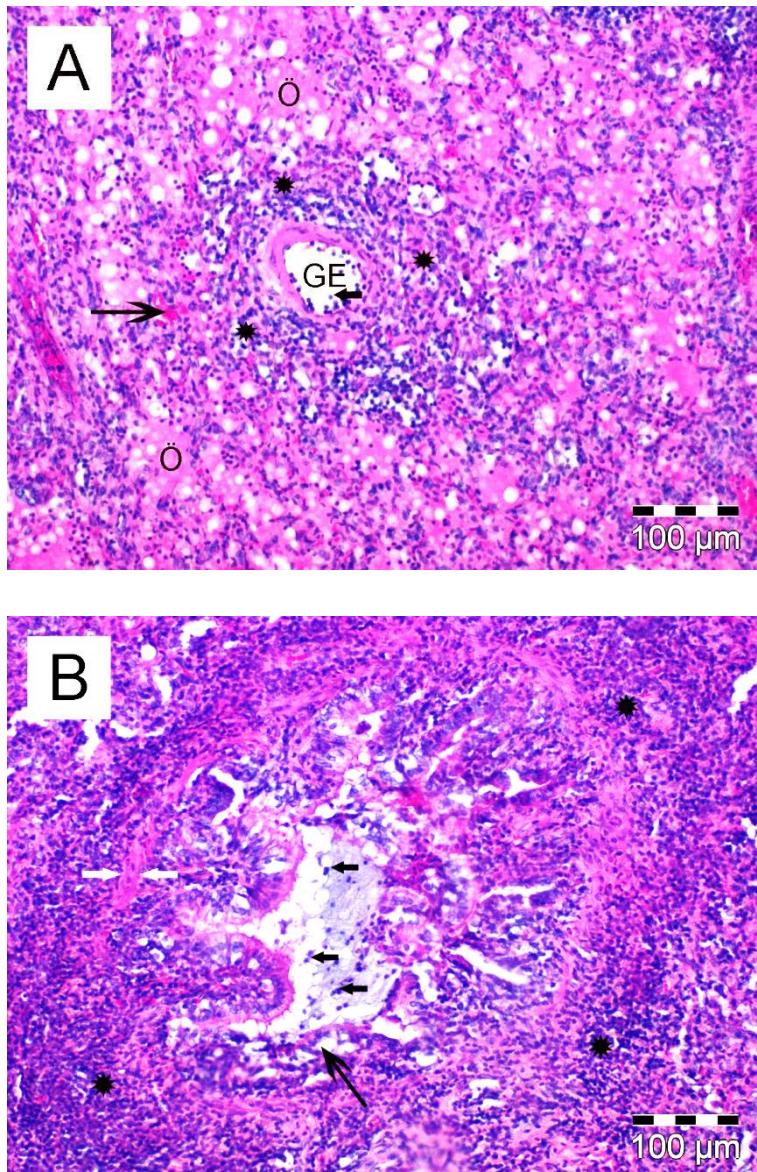


Abbildung 3.10: Ausschnitte aus zwei linken, allogen transplantierten Lungen der RAD-Gruppe; POD 20; HE-Färbung.

Die beiden histologischen Bilder tragen Zeichen einer schweren akuten Abstoßung. Bild A zeigt ein arterielles Gefäß (GE) mit ausgeprägten mehrreihigen Rundzellinfiltraten (Sternchen), welche die Wandschichten durchbrochen und intraluminal eingewandert sind (kleiner Pfeil). Interstitiell finden sich intraalveolare Ödeme (Ö) und Einblutungen (Pfeil). Bild B zeigt die maximale Infiltration eines Bronchiolus mit dichtem, mehrreihigem Rundzellsaum (Sternchen), Migration der Entzündungszellen durch die Muscularis (markiert durch zwei weiße Pfeile) bis ins Lumen (kurze schwarze Pfeile) sowie Epithelablösungen (langer Pfeil).

Am **POD 30** kam es zu einer deutlichen Regression der akuten Abstoßungsreaktion im Vergleich zum POD 20 mit einer fortschreitenden Entwicklung des chronischen Abstoßungsgeschehens. Die perivaskulären Infiltrationen waren durchaus vorhanden, jedoch mit geringerer Ausprägung und deutlich in Richtung Interstitium zurückweichender Entzündungsaktivität. Es zeigten sich eine zunehmende Fibrosierung um kleinere und größere Gefäße sowie eine Okklusion der kleineren vaskulären Strukturen, wohingegen mittelgroße bis größere Gefäße zum Teil noch offene Lumina hatten. Auf bronchialer Ebene erwies sich die Beurteilung als schwierig. In drei der fünf Lungenschnitte waren kaum noch kleinere bronchiale Strukturen angeschnitten oder bereits derart destruiert, dass eine Unterscheidung vom umliegenden Gewebe schwer möglich erschien. Um die größeren Bronchien wurden einerseits moderate Rundzellinfiltrationen mit Durchbrechung der Muskularis und subepithelialer Infiltration, andererseits auch eine sehr geringe peribronchiale Entzündungsaktivität beobachtet. Zudem fand sich bei den größeren Strukturen eine fortgeschrittene peribronchiale Fibrosierung, mäßige bis fortgeschrittene Destruktion und Epithelablösungen mit zum Teil noch offenen Lumina. Die kleineren Bronchien waren zu 25% bis 50% okkludiert bzw. nur noch residual geöffnet. Interstitiell war in einigen Präparaten eine deutliche Abnahme der Entzündungszellen im Parenchym sichtbar, in anderen hingegen wurde eine noch stark ausgeprägte diffuse Infiltration beobachtet. Insgesamt stellte der POD 30 einen histologischen „Übergangsbereich“ der allogenen Lungen dar, mit perivaskulären/ -bronchialen Infiltraten sowie parallel bestehender, beginnender vaskulärer Sklerose und BO (siehe Abbildung 3.11). Dieses Nebeneinander von akutem und chronischem Abstoßungsgeschehen ergab die histologische Klassifikation der Lungen mit dem ISHLT-Score –A 1,8/ –D 2,2 und –B 2,125/ –C 3,125 (siehe Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

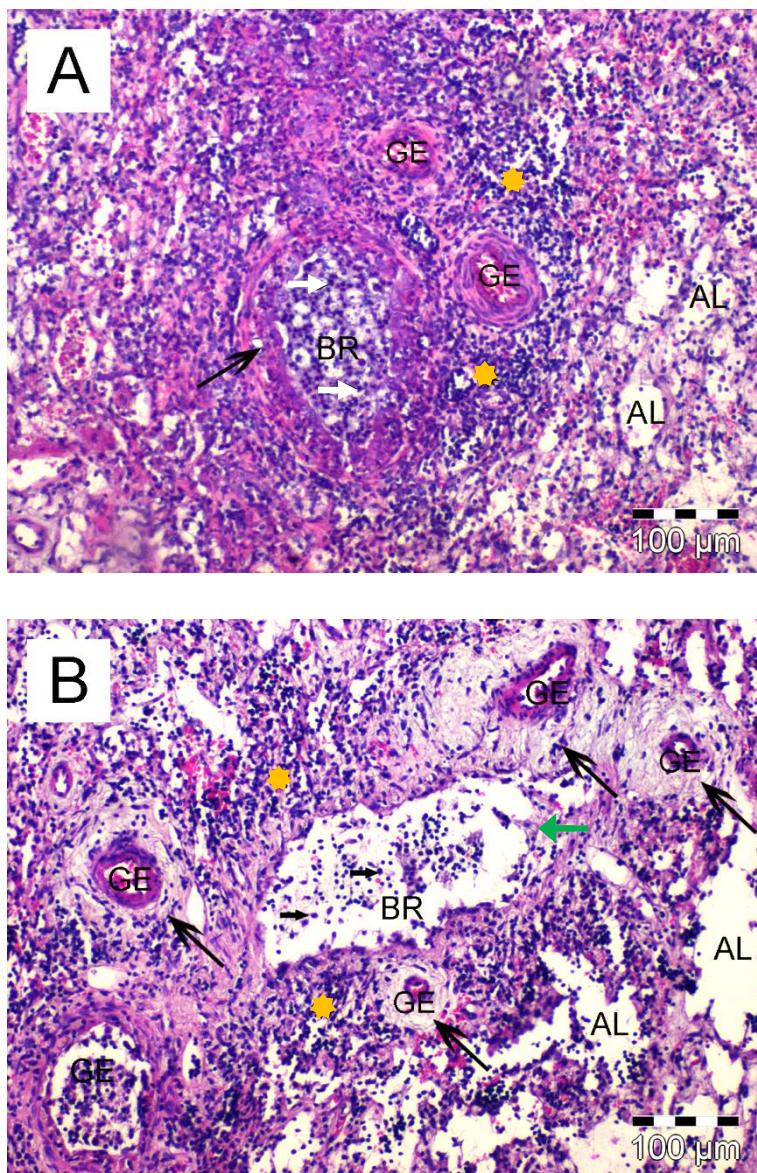


Abbildung 3.11: Ausschnitte aus zwei linken, allogen transplantierten Lungen der RAD-Gruppe am POD 30; HE-Färbung.

Die beiden Abbildungen weisen auf das histologische „Mischbild“ am POD 30 hin. In Bild A finden sich im Zuge des akuten Abstoßungsgeschehens ausgeprägte perivaskuläre sowie –bronchiale Infiltrate (orange Sternchen) um die beiden Gefäße (GE) und den Bronchiolus (BR) sowie Epithelablösungen (langer Pfeil) und intraalveolare (AL) bzw. intraluminäre (kurze weiße Pfeile) Entzündungszellen. Abbildung B stellt die fortschreitende chronische Abstoßung mit beginnender Fibrosierung (lange Pfeile) um Gefäße (GE) und Bronchien (BR) mit Epithelnekrosen (grüner Pfeil) dar. Die peribronchialen Rundzellinfiltrate (orange Sternchen) zeigen eine deutliche Regression Richtung Interstitium mit verminderter Infiltration in den Alveolen (AL). Intraluminale Entzündungszellen (kleine Pfeile) im Bronchus bleiben residual erhalten.

Am **POD 60** nach allogener Transplantation war eine starke Tendenz zur chronischen Abstoßung erkennbar. Vereinzelt waren auf vaskulärer Ebene perivaskuläre Rundzellherde kleinerer und mittelgroßer Gefäße zu sehen. Insgesamt dominierte das chronische Abstoßungsgeschehen mit Okklusion von circa 50% der kleinen Gefäße sowie zirkumferentieller Organisation des Bindegewebes um die zum Teil noch offenen mittelgroßen bis großen Gefäßstrukturen. Auch peribronchiale Infiltrationen waren stark rückläufig und traten meist nur singulär um mittelgroße bis größere Bronchien auf. Die kleineren bronchialen Strukturen waren von einer derart ausgeprägten Okklusion und Destruktion betroffen, dass sie in den Lungenschnitten kaum noch auffindbar waren (siehe Abbildung 3.12). Die mittelgroßen und großen Bronchien hatten teilweise noch offene Lumina, aber sie zeigten eine Aufhebung ihrer Wandschichten und ausgeprägte Epithelablösungen bzw. –nekrosen. Im Vergleich zu den vaskulären Strukturen waren die Bronchioli deutlich stärker vom chronischen Abstoßungsgeschehen betroffen. Im Interstitium fand sich im Gegensatz zu den bronchialen und vaskulären Strukturen häufig noch eine relativ ausgeprägte, diffuse Infiltration. Auffällig am POD 60 waren die vielen Anschnitte von Lymphgefäßen mit intraluminären Entzündungszellen. Histologisch zeigte sich eine schwere Destruktion der bronchialen Strukturen im Sinne einer BO mit fortgeschritten vaskulärer Sklerose bei geringer peribronchialer und – vaskulärer Infiltration (ISHLT –A 1,5/ –D 3 und ISHLT –B 1,5/ –C 3,4) (siehe Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

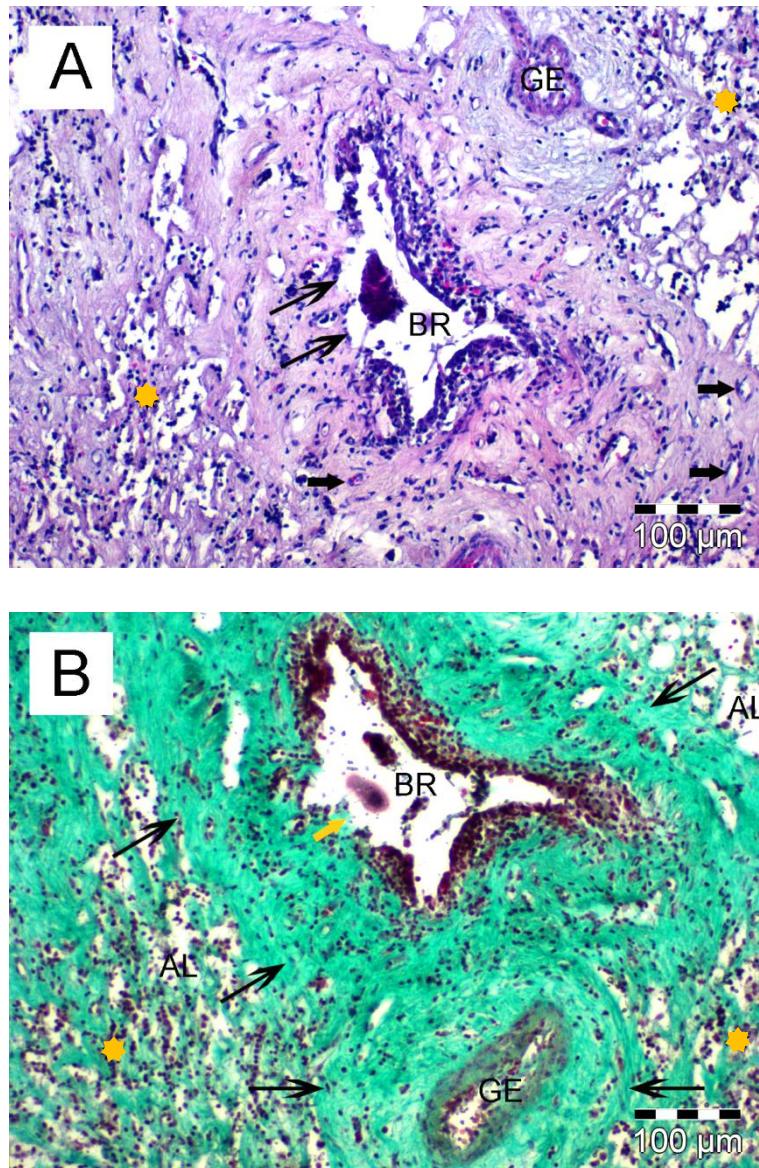


Abbildung 3.12: Ausschnitte aus zwei linken, allogen transplantierten Lungen der RAD-Gruppe am POD 60; HE-Färbung (A) sowie Masson-Goldner-Färbung (B).

In beiden Abbildungen dominiert das chronische Abstoßungsgeschehen mit ausgeprägten Fibrosierungen (lange Pfeile) um Gefäße (GE) und Bronchien (BR). Die interstitiellen Infiltrationen (orange Sternchen) sind sowohl in Abbildung A als auch B deutlich rückläufig. Im Bild A sind die kleineren Gefäße fast vollständig okkludiert (kleine Pfeile) und noch kaum als solche erkennbar. Mit Hilfe der Masson-Goldner-Färbung im Bild B wird selektiv Fibrin und Kollagen angefärbt, das in histologischen Schnitten grünlich imponiert und den ausgeprägten Fibrosierungsgrad verdeutlicht. Der kleine orange Pfeil (Abb. B) weist auf den vollständigen Untergang des bronchialen Epithels und dessen Ersatz durch Kollagen hin.

Am **POD 100** wies die makroskopisch sichtbare massive Schrumpfung und Verdichtung der allogenen Lungen bereits auf die ausgeprägte Vernarbung der Atmungsorgane hin. Im Interstitium fand sich in beinahe allen Präparaten eine starke Fibrosierung mit gleichförmig-paralleler Bindegewebsstruktur und fehlender Infiltrationsaktivität. Diese massive Bindegewebsneubildung stellt sich besonders deutlich in der Masson-Goldner-Färbung dar, die diese Gewebskomponente spezifisch grünlich anfärbt. Kleinere Gefäße waren in 3/5 der Lungen zu über 75% okkludiert und lediglich größere vaskuläre Strukturen zeigten vereinzelt noch offene Lumina bei sehr stark ausgeprägten perivaskulären Fibrosierungen, Endothelnekrosen und vaskulärer Sklerose. Lediglich in zwei der fünf Präparate wurden noch perivaskuläre Infiltrationen und eine interstitielle Entzündungsaktivität festgestellt (ISHLT –A 1). Auch die chronisch bronchiale Destruktion hatte am POD 100 ihr Maximum erreicht und es waren aufgrund der vernarbenden, destruktiven Prozesse kaum noch kleinere und mittlere Bronchien auffindbar bzw. nur noch schwer von der Umgebung abgrenzbar. Die größeren bronchialen Strukturen zeigten semi-okkludierte bis völlig okklidierte Lumina und fortgeschrittene Epithelablösungen mit intraluminal gelegenen nekrotischen Zellabschilferungen. Bei zwei der fünf Lungen wurden singulär noch peribronchiale Rundzellansammlungen bei teilweise offenlumigen Bronchien beobachtet (ISHLT –B 1,33). Wie am POD 60 waren häufig Lymphozytenanschnitte im Gewebe vorzufinden. Das vorherrschende histologische Bild einer BO, einer vaskulären Sklerose und einer interstitiellen Vernarbung spiegelten den Höhepunkt der chronischen Abstoßung der allogenen linken Lungen wieder (ISHLT –C 3,7 und ISHLT –D 3,4) (siehe Abbildung 3.13 und Abbildung 3.15).

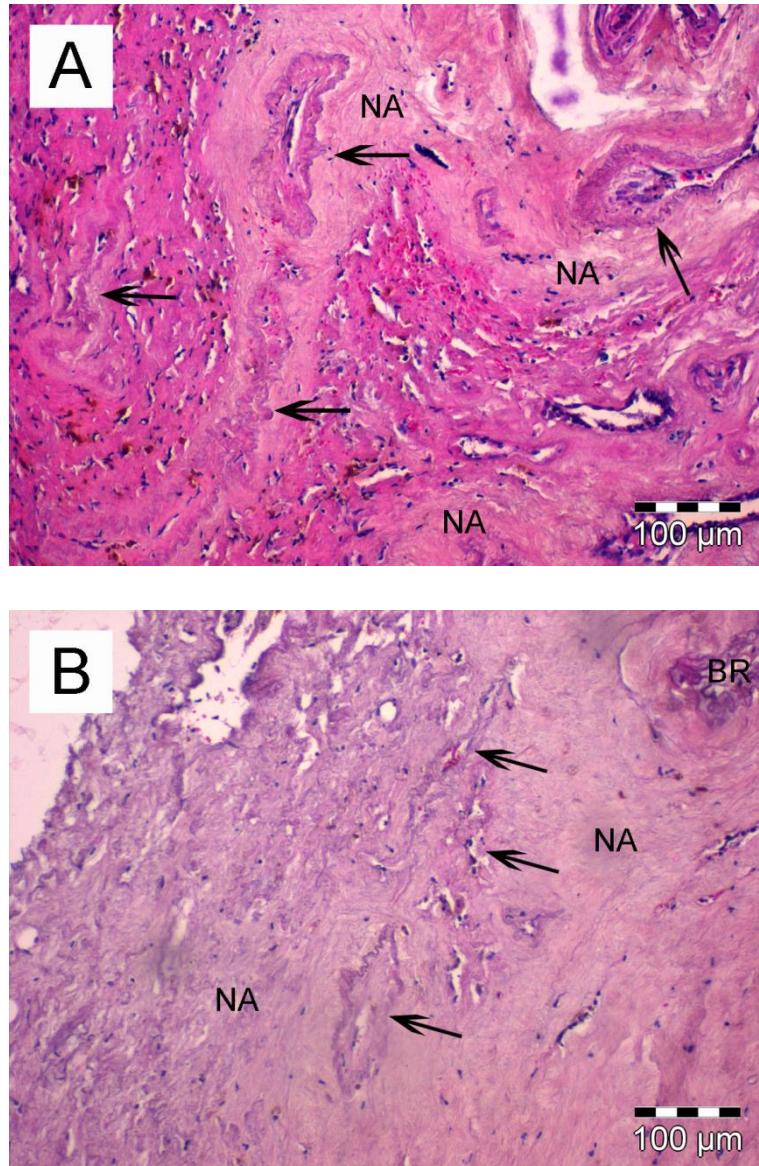


Abbildung 3.13: Ausschnitt aus zwei linken, allogen transplantierten Lungen am POD 100; HE-Färbung.

In den beiden Lungen ist das Endstadium der chronischen Abstoßung, die vollständige Vernarbung des Transplantats (NA) mit Bronchiolitis obliterans und vaskulärer Sklerose zu sehen. Die Pfeile deuten noch auf die Lumina residualer vaskulärer und bronchialer Strukturen hin, wobei eine Differenzierung zwischen Bronchiolus und Gefäß kaum mehr möglich ist.

Im Folgenden ist die graphische Darstellung des akuten und chronischen Abstoßungsgrades gemäß ISHLT der allogenen Lungen aller drei Versuchsgruppen abgebildet (Abbildung 3.14, Abbildung 3.15). Als Resultat ergab sich, dass in keiner der Gruppen weder mit noch ohne medikamentöse Therapie die Ausbildung der chronischen Abstoßung mit BO und vaskulärer Sklerose verhindert oder verzögert werden konnte.

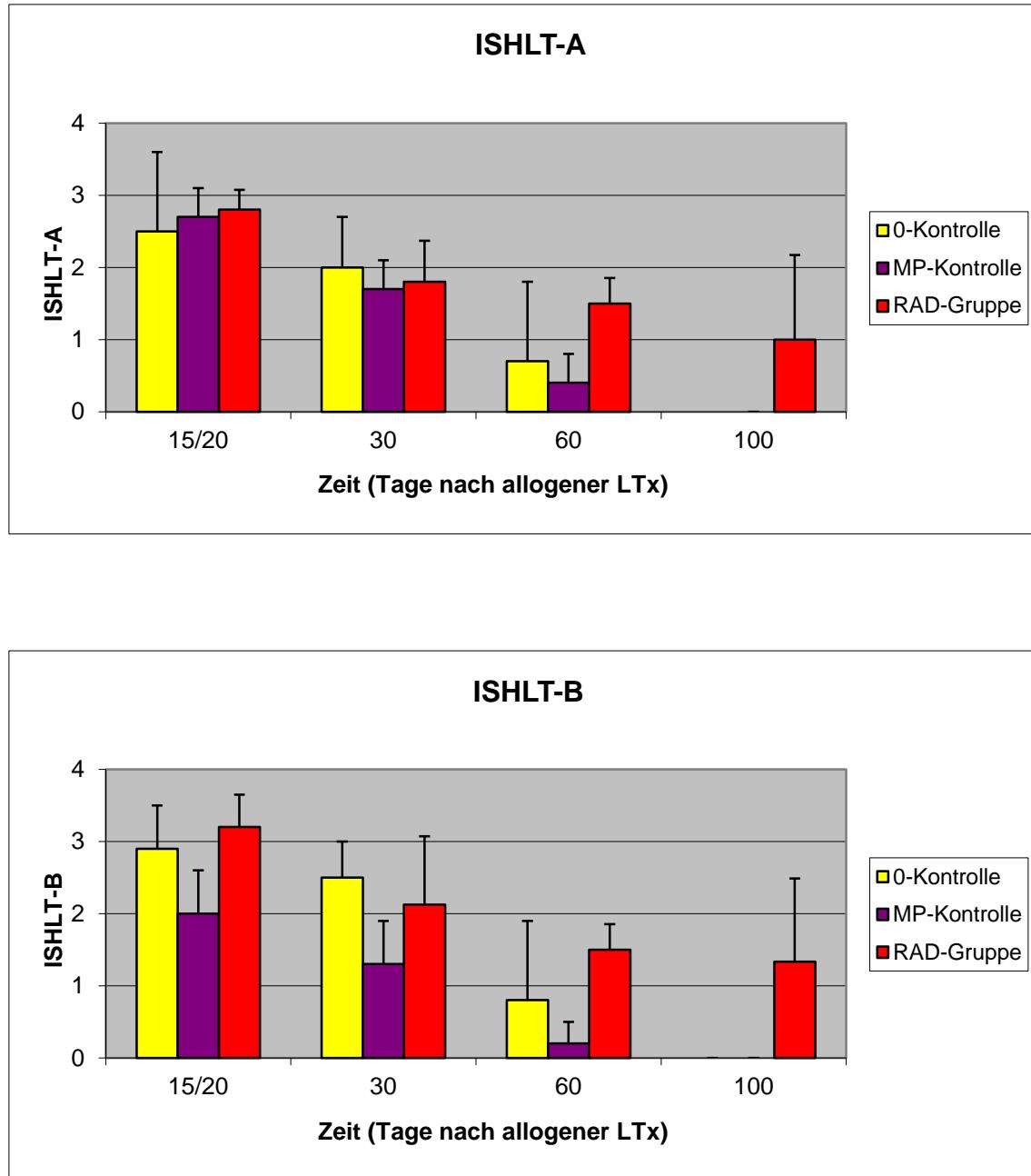


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der ISHLT-Klassifizierung der akuten Abstoßung.

ISHLT-A stellt den Grad der vaskulären akuten Abstoßung, ISHLT-B den Grad der bronchialen akuten Abstoßung dar. Das Maximum wird bei allen Gruppen am Tag 15/20 nach LTx erreicht. Ab Tag 60 zeigten sich in der 0-Kontrolle sowie MP-Gruppe deutlich geringere Zeichen akuter Abstoßung. In den Lungen der RAD-Gruppe ist die inflammatorische Rejektion dagegen bis Tag 100 präsent. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 5 Tieren je Gruppe. Näheres siehe Text.

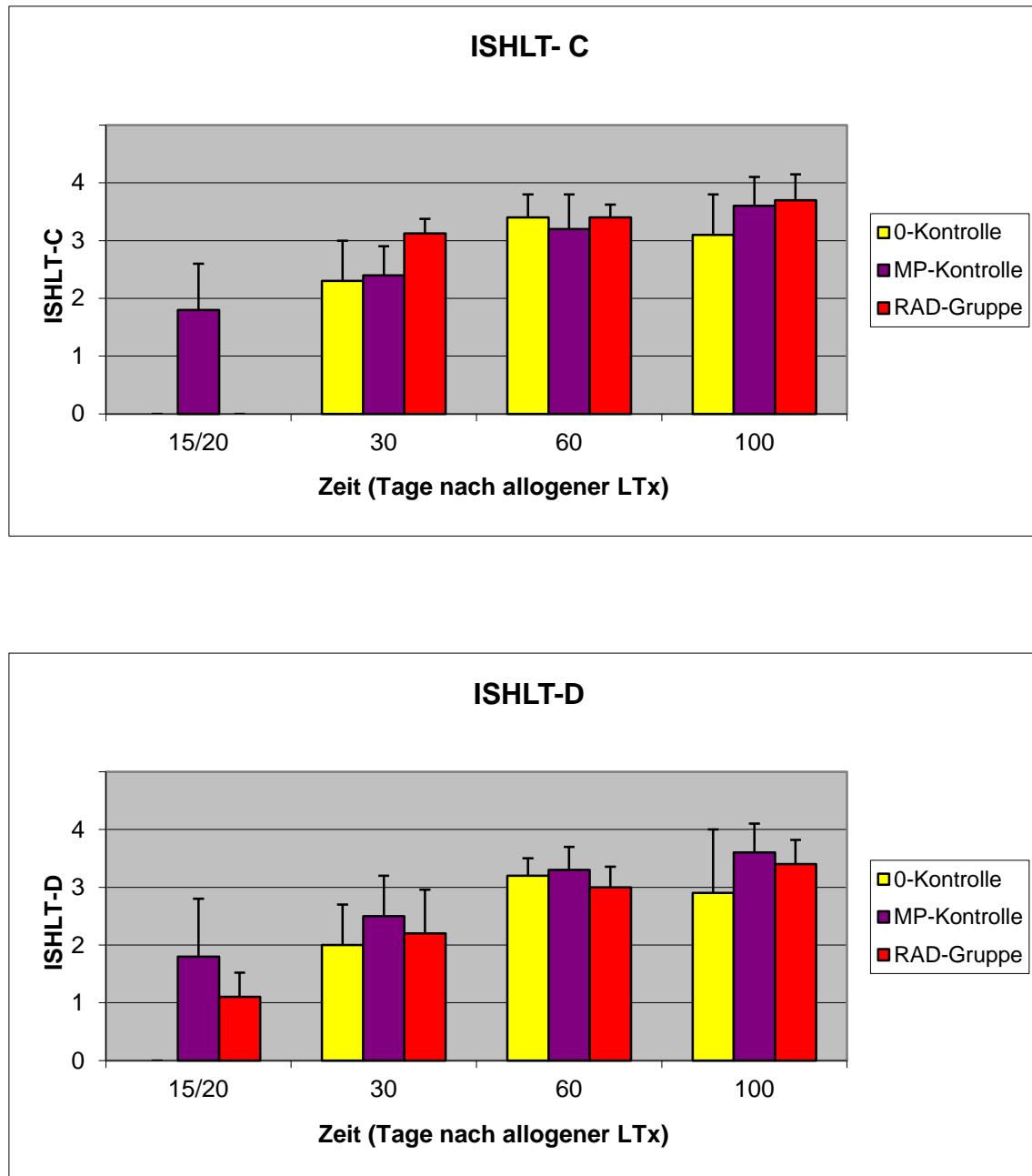


Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der ISHLT- Klassifizierung der chronischen Abstoßung.

ISHLT- C stellt den Grad der bronchialen chronischen Abstoßung, ISHLT- D den Grad der vaskulären chronischen Abstoßung dar. Das Maximum der chronischen Abstoßung wird in der MP- sowie RAD- Gruppe am Tag 100 erreicht, in der 0-Kontrolle am Tag 60. Bereits am Tag 30 zeigten sich in allen drei Gruppen deutliche Zeichen des chronischen Abstoßungsgeschehens. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 5 Tieren je Gruppe. Näheres siehe Text.

3.2 Ergebnisse der Immunhistologie

3.2.1 Expression des Makrophagenmarkers ED1

Rechte Lungen

In der Abbildung 3.16A wurde die Anzahl der positiv gefärbten Makrophagen in den rechten Lungen der 0-Kontrolle, der MP-Gruppe sowie der RAD-Gruppe aufgetragen. Die Expression von ED1 in den nativen rechten Lungen der 0-Kontrolle und der MP-Gruppe zeigte sich unabhängig vom postoperativen Zeitpunkt niedrig gegenüber dem Ausgangsmaterial und ohne signifikante Differenzen untereinander wie auch im Vergleich zu den rechten Lungen der syngen transplantierten Lungen. Das Ausgangsmaterial bezeichnet die nicht-transplantierten Lungen von F344[RT1]^{IVL}-Ratten, welche nach Perfusion mit modifizierter Euro-Collins-Lösung ohne relevante Ischämiezeit aufgearbeitet wurden. Die Werte der 0-Gruppe und der MP-Gruppe wiesen im gegenseitigen Vergleich minimale Unterschiede auf. Über den gesamten Untersuchungszeitraum lagen die Werte im Mittel bei 18.6 ± 0.6 für die 0-Kontrolle und bei 19.7 ± 0.5 für die MP-Gruppe. Dies entsprach den Werten der entsprechenden rechten Organe der syngen transplantierten Tiere (0-Kontrolle: 18.7 ± 1.6 und MP-Gruppe: 18.2 ± 1.5). Betrachtet man die rechten Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere untereinander, so zeigte die ED1-Expression über den Untersuchungszeitraum keine signifikanten Veränderungen. Die Anzahl der ED1-positiven Zellen der RAD-Gruppe lag über 100 Tage im Mittel bei 11.7 ± 1.6 sowie bei den rechten, syngen transplantierten Lungen bei 11.12 ± 3.4 , und damit um 37% bzw. 41% signifikant unter den Werten der 0-Kontrolle bzw. MP-Gruppe (MP vs RAD POD 20: $p<0.001$; POD 30: $p=0.008$).

Linke Lungen

0-Kontrolle

Die Anzahl der ED1-positiven Zellen der linken allogen transplantierten Lungen der 0-Kontrolle nahm initial am POD 5 versus dem Ausgangswert signifikant ($p<0.05$) zu. Im weiteren Verlauf wurde an POD 15 und 30 eine signifikant vermehrte Expression von ED1 beobachtet verglichen mit POD 5 (POD 5 vs POD 15: $p<0.001$; POD 5 vs POD 30: $p<0.001$). Das Maximum der Expression zeigte sich am POD 30, wobei zwischen den Werten von POD 15 und POD 30 keine signifikanten Unterschiede bestanden ($p<0.05$). Bezogen auf das Ausgangsmaterial waren die ED1-positiven Zellen am POD 15 und 30 um Faktor 2.0 bzw. Faktor 2.1 signifikant erhöht. Der weitere postoperative Verlauf ab POD 30 bis 100 wurde nicht in die Analyse miteinbezogen, da die Infiltration von Entzündungszellen ins Lungengewebe nur in der akuten Phase nach LTx als ein Maß für die Entstehung einer akuten Abstoßung herangezogen werden kann. Bei den syngen transplantierten linken Lungen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden rechten syngen Lungen feststellen. In den allogenen linken Lungen wurde zu jedem Zeitpunkt (POD 5, 15, 30) des postoperativen Verlaufes signifikant mehr ED1 exprimiert als in den korrespondierenden rechten Lungen der gleichen Tiere. In Abbildung 3.16C wurde die Differenz aus linker und rechter Lunge aufgetragen um die reaktive Mehrproduktion von positiven ED1-Zellen der linken Lunge im Vergleich zur rechten Lunge darzustellen.

MP-Gruppe

Nach MP-Gabe wurde die ED1-Expression der allogenen Lungen der MP-Gruppe erstmals am POD 20 untersucht. Vier Tage nach der Bolustherapie wurden in den linken Lungen der MP-Gruppe eine geringere Anzahl inflammatorischer Zellen nachgewiesen als in der 0-Kontrolle. Vom POD 20 auf POD 30 kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg ($p>0.05$) positiver Zellen in den linken Lungen der MP-Gruppe, jedoch wurde an beiden PODs weniger ED1 exprimiert als in der 0-Kontrolle (siehe Abbildung 3.16B). In den syngen transplantierten linken Lungen wurden vergleichbar viele Zellen gezählt als in den syngen transplantierten rechten Lungen wie auch in der

0-Kontrolle. Die ED1-Expression in den allogenen Lungen nach LTx der MP-Gruppe war über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höher als in den nativen rechten Lungen.

RAD-Gruppe

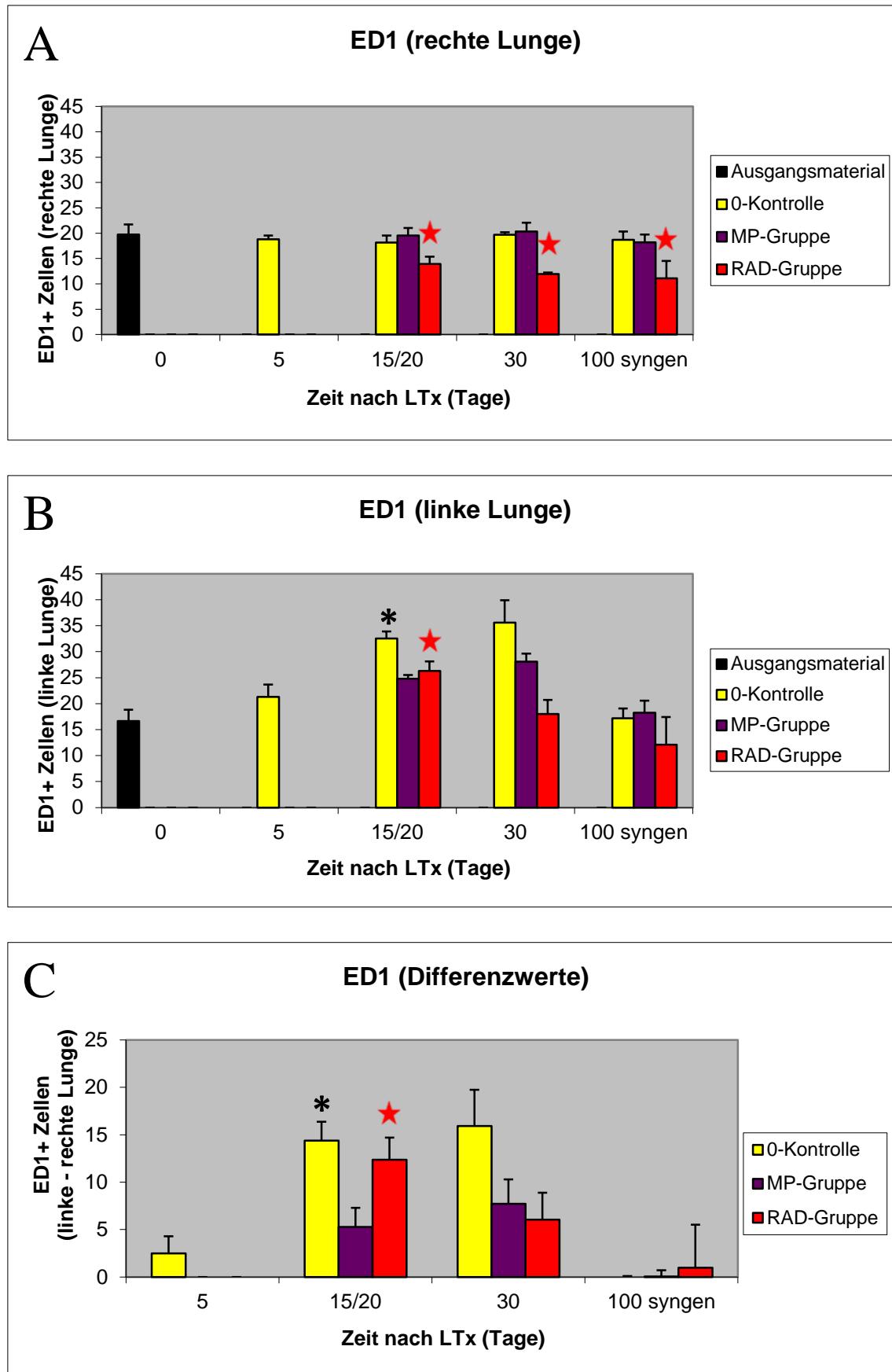
In der RAD-Gruppe erfolgte die Untersuchung der ED1-positiven Zellen ebenso wie in der MP-Gruppe 20 Tage nach LTx. Die Anzahl der ED1 positiven Zellen in den allogenen Lungen (Differenzwerte) war zu diesem Zeitpunkt gegenüber der MP-Gruppe signifikant erhöht ($p<0.001$), lag aber deutlich unter den Werten der 0-Kontrolle. Im weiteren Verlauf bis POD 30 kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion der ED1-Expression in den allogenen Lungen von im Durchschnitt 26.3 (POD 20) auf 18 (POD 30) pro Gesichtsfeld (POD 20 vs 30: $p=0.065$), so dass die Zellzahl der RAD-Gruppe sowohl 49% unter der 0-Kontrolle als auch 36% unter der MP-Gruppe lag (siehe Abbildung 3.16B). Hinsichtlich der linken syngen transplantierten Lungen am POD 100 wurde ebenfalls eine verminderte ED1-Bildung im Vergleich zur 0-Kontrolle sowie MP-Gruppe festgestellt. Während des postoperativen Verlaufes (POD 20, POD 30) wurden in den linken allogenen Lungen der RAD-Gruppe signifikant mehr ED1 exprimiert als in den entsprechenden rechten Lungen der gleichen Tiere (POD 20: $p<0.001$; POD 30: $p=0.016$).

Abbildung 3.16 (siehe nachfolgende Seite): Expression von ED1-positiven Makrophagen.

Darstellung der ED1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in den nativen rechten Lungen (A) und in den linken allogen transplantierten Lungen (B). Die Grafik C stellt die Differenzwerte der linken Lunge abzüglich der rechten Lunge dar, um so die absolute Anzahl ED1-positiver Zellen und damit die Mehrproduktion der Entzündungszellen der linken Lunge zu erhalten. Das Ausgangsmaterial entspricht den zu transplantierenden Lungen mit Perfusion. Statistik:

* (Sternchen schwarz): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der 0-Kontrolle zum vorhergehenden POD

★ (roter Stern): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zwischen RAD vs. MP-Gruppe am gleichen POD



3.2.2 Expression von CD11a

Rechte Lungen

Die CD11a-Expression in den Gewebeschnitten der nativen rechten Lungen der 0-Kontrolle sowie der MP-Gruppe zeigte über den gesamten postoperativen Verlauf stabile Werte ohne signifikante Differenzen untereinander sowie im gegenseitigen Vergleich (siehe Abbildung 3.17A). Die Werte lagen über die Zeit im Mittel bei 26.9 ± 1.1 für die 0-Kontrolle und bei 25.6 ± 1.9 für die MP-Gruppe. Die nativen rechten transplantierten Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur 0-Kontrolle und MP-Gruppe eine signifikant reduzierte Expression an CD11a-positiven Leukozyten an allen untersuchten PODs (MP vs RAD: $p < 0.001$). Mit im Mittel 8.1 ± 2.6 Leukozyten pro Gesichtsfeld waren die Werte um das 3.3fache gegenüber der 0-Gruppe bzw. 3.2fache gegenüber den entsprechenden Lungen der MP-Gruppe vermindert. Die CD11a-Expression der rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere der RAD-Gruppe lagen im Mittel bei 9.08 ± 0.6 am POD 100 und waren somit gegenüber den korrespondierenden Lungen der beiden anderen Gruppen signifikant reduziert (RAD vs MP und RAD vs 0-Kontrolle: $p < 0.001$).

Linke Lungen

0-Kontrolle

In den allogen transplantierten Lungen der 0-Kontrolle nahm die Anzahl der CD11a-positiven Zellen am POD 5 um den Faktor 1.7 gegenüber dem Ausgangsmaterial signifikant zu ($p < 0.05$) (siehe Abbildung 3.17B). Im weiteren postoperativen Verlauf zeigte sich eine hoch signifikante Expression von CD11a am POD 15 und 30 im Vergleich zu POD 5 ($p = 0.006$ bzw. $p = 0.001$). Das Maximum an CD11a positiven Zellen wurde am POD 30 erreicht, wobei sich der Unterschied zu POD 15 als nicht signifikant zeigte (POD 15: 57.3 vs. POD 30: 58.24 CD11a-positive Zellen/Gesichtsfeld). Zwischen den linken und rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, was auch graphisch anhand des sehr geringen Differenzwertes der syngen Lungen (linke Lunge

abzüglich rechter Lunge) von 0.1 erahnt werden kann (siehe Abbildung 3.17C). Während des gesamten postoperativen Verlaufes wurden in den linken allogen transplantierten Lungen der 0-Gruppe signifikant mehr CD11a exprimiert als in den korrespondierenden rechten Lungen der gleichen Tiere, wie die positiven Differenzbeträge über den gesamten Zeitraum in Abbildung 3.17C erahnen lassen.

MP-Gruppe

Die CD11a-Expression der linken Lungen der MP-Gruppe nach LTx zeigte am POD 20 einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu dem Ausgangsmaterial (nicht transplantierte, perfundierte Lungen), lag jedoch unter den Werten der 0-Kontrolle (siehe Abbildung 3.17B). Das Erreichen des Maximums der CD11a- Infiltration erfolgte in der MP-Gruppe am POD 30 mit einer signifikant erhöhten Anzahl positiv gefärbter Zellen im Vergleich zu POD 20 ($p=0.001$). Die erhöhte CD11a-Expremierung im Vergleich zur RAD-Gruppe am POD 30 war zudem signifikant (RAD vs MP am POD 30: $p=0.002$). Bei den linken syngenen Lungen wurden vergleichbar viele Zellen gezählt als in den rechten syngenen Transplantaten als auch in der 0-Kontrolle. Der direkte Vergleich der allogenen linken Lungen mit den nativen rechten Lungen der gleichen Tiere zeigte während des gesamten postoperativen Verlaufes eine signifikant erhöhte CD11a-Expression in den linken Lungen (siehe Abbildung 3.17C).

RAD-Gruppe

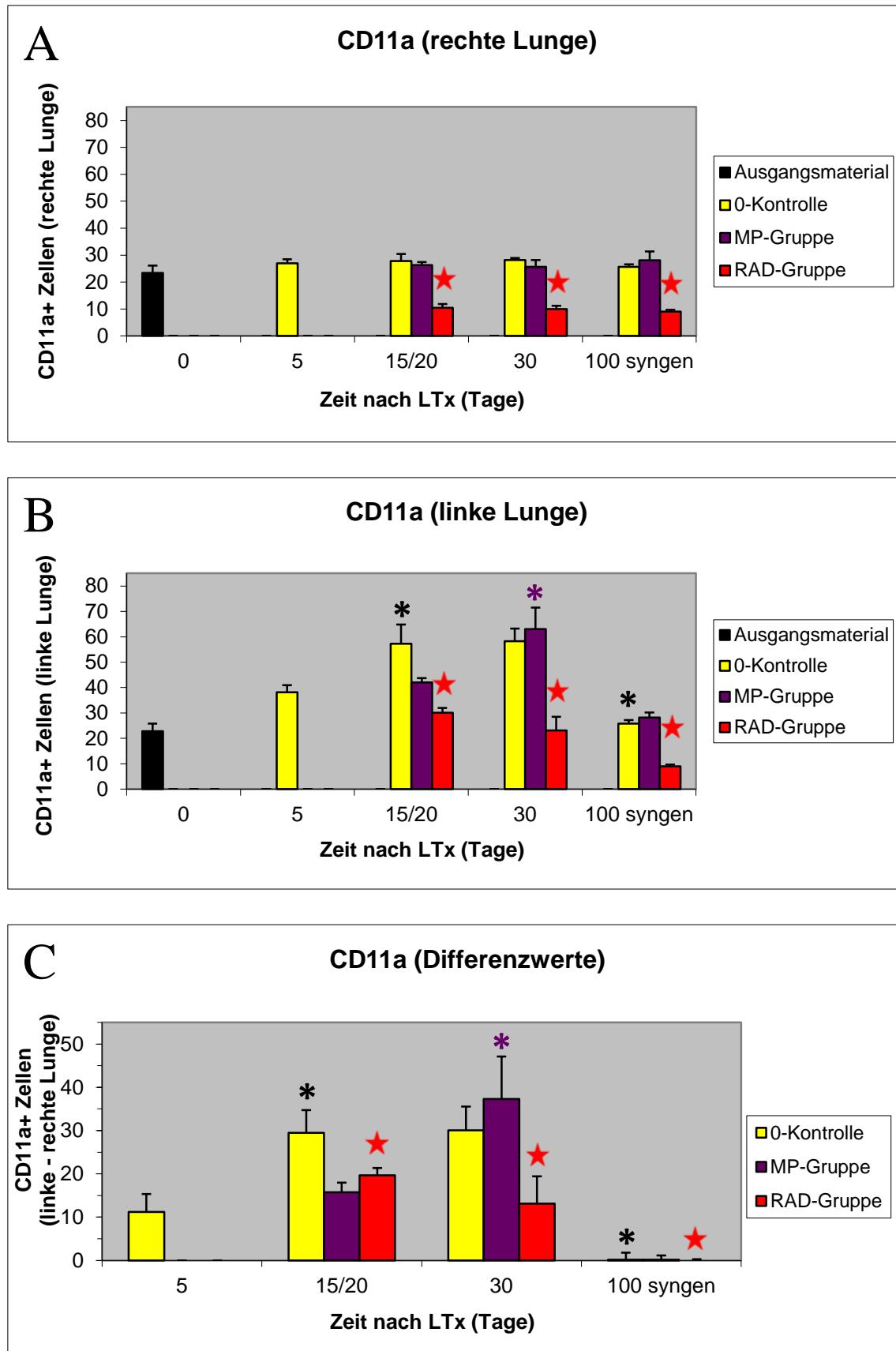
Die Auszählung der CD11a positiven Zellen erfolgte wie bei der MP-Gruppe erst ab POD 20, da die Everolimus-Immunsuppression erst ab dem POD 14 appliziert wurde. Sechs Tage nach der Medikamentenapplikation kam es zu einem maximalen Anstieg der CD11a-Expression in den allogenen linken Lungen der RAD-Gruppe, wobei 0.5fach bzw. 0.7fach geringere Werte im Vergleich zur 0-Kontrolle bzw. zur MP-Gruppe erreicht wurden (siehe Abbildung 3.17B). Der Unterschied zur MP-Kontrolle war signifikant (RAD vs MP am POD 20: $p=0.0014$). Anschließend fand sich eine 23.3%ige, nicht signifikante Reduktion der CD11a-Expression von POD 20

(30.12 CD11a+-Leukozyten/Gesichtsfeld) auf POD 30 (23.11 CD11a+-Leukozyten/Gesichtsfeld) (siehe Abbildung 3.17B). Die syngen transplantierten linken Lungen der Everolimus-Gruppe am POD 100 wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den syngen transplantierten rechten Lungen der korrespondierenden Tiere auf, jedoch zeigten sie eine signifikant verminderte CD11a- Bildung im Vergleich zu den linken syngenen Werten der 0-Kontrolle sowie der MP-Gruppe (RAD vs MP und RAD vs 0-Kontrolle: $p=0.044$). Zu allen untersuchten postoperativen Zeitpunkten fanden sich in den allogenen Lungen signifikant mehr CD11a-positive Zellen als in den nativen rechten Lungen der gleichen Tiere (POD 20: $p<0.01$; POD 30: $p=0.008$) (siehe Abbildung 3.17C).

Abbildung 3.17 (siehe nachfolgende Seite): Expression von CD11a-positiven Leukozyten.

Darstellung der CD11a-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in den nativen rechten Lungen (A) und in den linken allogen transplantierten Lungen (B). Die Grafik C stellt die Differenzwerte der linken Lunge abzüglich der rechten Lunge dar, um so die absolute Anzahl CD11a-positiver Zellen und damit die Mehrproduktion der Entzündungszellen der linken Lunge zu erhalten. Das Ausgangsmaterial entspricht den zu transplantierenden Lungen mit Perfusion. Statistik:

- * (Sternchen schwarz): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der 0-Kontrolle zum vorhergehenden POD
- * (lila Sternchen): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der MP-Gruppe zum vorhergehenden POD
- ★ (roter Stern): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zwischen RAD vs. MP-Gruppe des gleichen POD



3.2.3 Expression von CD18

Rechte Lungen

In Abbildung 3.18A zeigen die nativen rechten Lungen der 0-Kontrolle sowie der MP-Gruppe eine stabile CD18-Expression mit geringer Streubreite über den gesamten Untersuchungszeitraum. Vom POD 20 bis 100 lagen die Werte im Mittel bei 32.6 ± 2.6 für die 0-Kontrolle und bei 30.57 ± 1.05 für die MP-Gruppe, so dass die beiden Gruppen nur geringe Unterschiede untereinander und im gegenseitigen Vergleich aufwiesen. Das entsprach den Werten der rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere der 0- und MP-Gruppe (0-Kontrolle: 30.44 ± 1.6 ; MP-Kontrolle: 29.68 ± 3.9). Dem Verhalten der 0-Kontrolle und MP-Gruppe folgend, zeigte die RAD-Gruppe nur geringe nicht signifikante Abweichungen untereinander an den einzelnen PODs. Jedoch wies die RAD-Gruppe an allen PODs eine signifikante Reduktion der CD18-Expression gegenüber der 0-Gruppe sowie MP-Gruppe auf (MP vs RAD am POD 20 und POD 30: $p<0.001$). Die Werte befanden sich im Mittel bei 13.45 ± 3.6 und waren so um den Faktor 2.27 bzw. 2.26 signifikant im Vergleich zur 0- bzw. MP-Gruppe erniedrigt. Bei den rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere lag der Wert im Mittel bei 13.2 ± 1.39 und wies damit im Vergleich zu den linken syngen transplantierten Lungen keine signifikanten Differenzen auf (siehe Abbildung 3.18C).

Linke Lungen

0-Kontrolle

Bei den allogen transplantierten Lungen der 0-Kontrolle kam es ab dem POD 5 zu einer signifikant vermehrten Expression CD18-positiver Leukozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten ($p<0.05$) (siehe Abbildung 3.18B). Am POD 15 wurde mit einer um den Faktor 2.7 signifikant erhöhten CD18-Expression gegenüber dem POD 5 das Maximum erreicht (POD 5 vs POD 15: $p<0.01$). Anschließend folgte am POD 30 eine nicht signifikante Reduktion der CD18-positiven Zellen um 4.4%, wobei die Zellzahl immer noch um das 2.7 fache gegenüber dem POD 5 erhöht war. Zwischen den syngen transplantierten linken und rechten Lungen dieser Tiere am POD 100 konnten keine

signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 3.18C). Der Vergleich von Abbildung 3.18A mit Abbildung 3.18B veranschaulicht, dass sich zu allen Zeitpunkten des postoperativen Verlaufes in den allogenen Lungen signifikant mehr CD18-positive Leukozyten als in den nativen rechten Lungen gleicher Tiere fanden.

MP-Gruppe

In der MP-Gruppe fand sich am POD 20 nach LTx ein Anstieg der CD18-Expression in den allogenen linken Lungen der MP-Gruppe um den Faktor 2.6 gegenüber dem Ausgangsmaterial (siehe Abbildung 3.18B). Am POD 30 erreichte die CD18-Expression ihr Maximum mit 1.1fach erhöhten Werten gegenüber der unbehandelten 0-Kontrolle am POD 5. Der Anstieg der CD18 positiven Zellen der MP-Gruppe zwischen POD 20 (27.2 CD18+-gefärzte Zellen/Gesichtsfeld) und 30 (33.36 CD18+-gefärzte Zellen/Gesichtsfeld) war nicht signifikant (POD 20 vs POD 30: $p>0.05$). Während des gesamten Untersuchungszeitraums war die Anzahl CD18-positiver Zellen gegenüber der 0-Kontrolle erniedrigt, am POD 20 um den Faktor 1.0 bzw. am POD 30 um das 1.1fache. Wie in Abbildung 3.18C ersichtlich ist, bestanden zwischen den syngen transplantierten rechten und linken Lungen der MP-Gruppe keine signifikanten Unterschiede am POD 100. Die Expression von CD18 in den linken allogen transplantierten Lungen war zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant gegenüber den nativen rechten Lungen erhöht.

RAD-Gruppe

Nach Gabe von Everolimus ab POD 14 zeigte die RAD-Gruppe am POD 20 einen maximalen Anstieg der CD18-Infiltration in den linken allogenen Lungen (siehe Abbildung 3.18B). Zehn Tage später folgte eine signifikante Reduktion der CD18-positiven Leukozyten um 22% (POD 20: 45.56 bzw. POD 30: 35,56 CD18-positive Leukozyten/Gesichtsfeld) (POD 20 vs POD 30: $p<0.001$) (siehe Abbildung 3.18B). Der Anteil an CD18-positiven Zellen der linken Lungen der RAD-Gruppe war am POD 20 nicht signifikant, am POD 30 jedoch signifikant gegenüber der MP-Gruppe bzw.

0-Kontrolle reduziert (RAD vs MP am POD 20: $p>0.05$; RAD vs MP am POD 30: $p<0.011$) (Abbildung 3.18B). Der Unterschied zur 0-Kontrolle betrug 39% am POD 20 bzw. 50% am POD 30 und zur MP-Gruppe 23% (POD 20) bzw. 44% (POD 30). Die CD18- Infiltration der linken, syngen transplantierten Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere war um den Faktor 2.0 nicht signifikant gegenüber den linken, syngen transplantierten Lungen der 0-Kontrolle und MP-Gruppe erniedrigt. Die Differenz aus den linken syngen transplantierten Lungen und den entsprechenden nativen rechten Lungen der RAD-Gruppe zeigte einen geringen, nicht signifikanten Differenzwert von 1.28 (siehe Abbildung 3.18C). Während des gesamten postoperativen Verlaufes war die Expression von CD18 in den allogen transplantierten linken Lungen signifikant gegenüber den entsprechenden rechten unbehandelten Lungen erhöht.

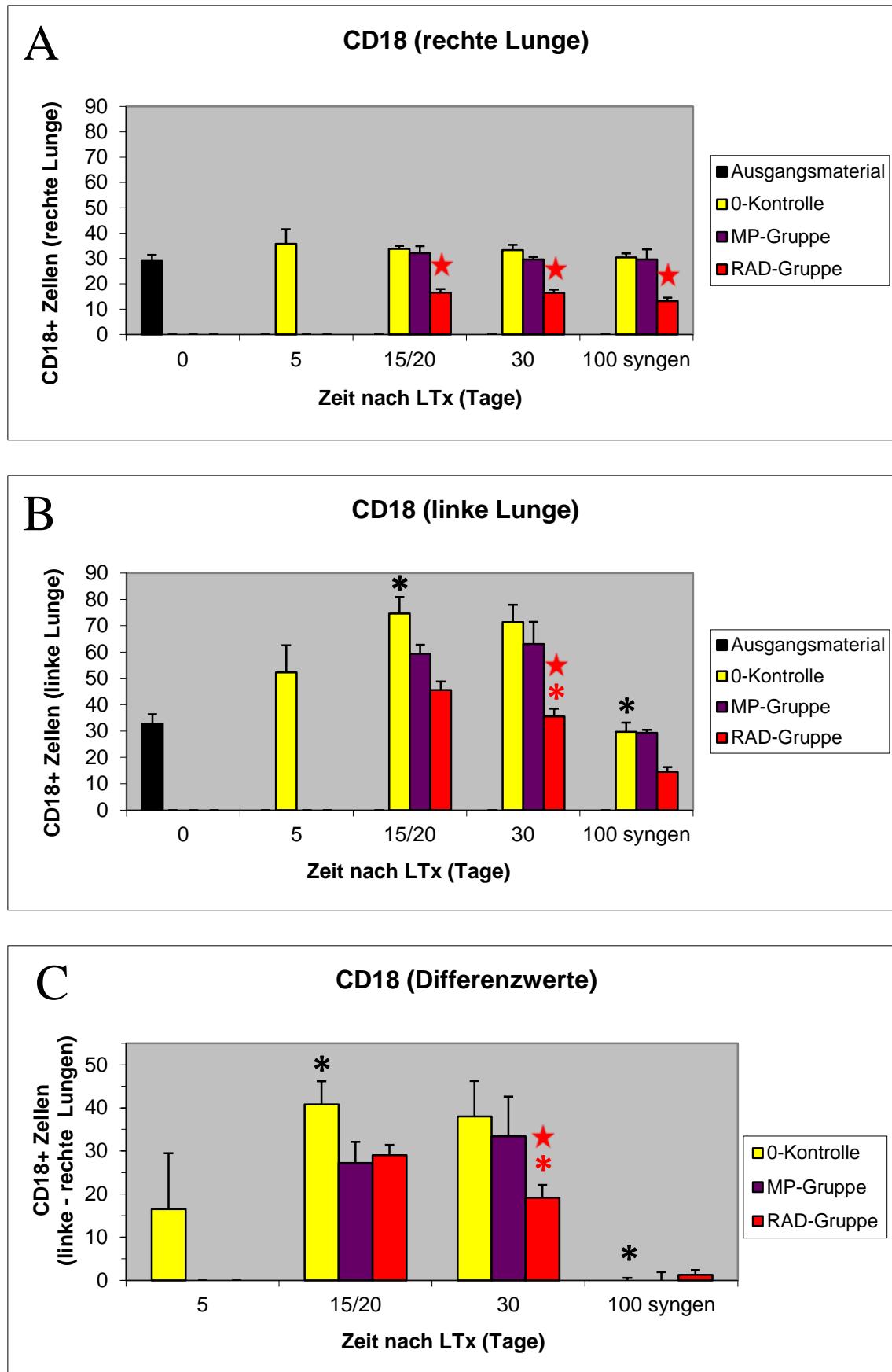
Abbildung 3.18 (siehe nachfolgende Seite): Expression von CD18-positiven Leukozyten.

Darstellung der CD18-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in den nativen rechten Lungen (A) und in den linken allogen transplantierten Lungen (B). Die Grafik C stellt die Differenzwerte der linken Lunge abzüglich der rechten Lunge dar, umso die absolute Anzahl CD18-positiver Zellen und damit die Mehrproduktion der Entzündungszellen der linken Lunge zu erhalten. Das Ausgangsmaterial entspricht den zu transplantierenden Lungen mit Perfusion. Statistik:

* (Sternchen schwarz): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der 0-Kontrolle zum vorhergehenden POD

* (rotes Sternchen): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der RAD-Gruppe zum vorhergehenden POD

★ (roter Stern): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zwischen RAD vs. MP-Gruppe des gleichen POD



3.2.4 Expression von ICAM-1

Rechte Lungen

Das vaskuläre Endothel der nativen rechten Lungen der 0-Kontrolle zeigte eine stabile ICAM-1-Expression und wies bis auf eine signifikante Differenz zwischen POD 5 versus POD 30 (POD 5 vs POD 30; $p<0.05$) keine signifikanten Unterschiede untereinander auf (siehe Abbildung 3.19A). Über die Zeit lag der prozentuale Anteil ICAM-1-positiver Gefäße der allogenen Lungen der 0-Kontrolle im Mittel bei Grad 2.3 ± 0.14 (Einteilung von Grad 1-4 vgl. 2.8.3) bzw. bei Grad 2.25 ± 0.25 bei den rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere. Die rechten Lungen der MP-Gruppe wiesen ebenfalls über den gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede untereinander sowie zur 0-Kontrolle auf. Der Anteil positiv gefärbter Gefäßanschnitte der allogenen Lungen nach LTx der MP-Gruppe lag im Mittel bei Grad 2.3 ± 0.1 sowie bei 2.2 ± 0.1 bei den rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere. In den rechten Lungen der mit Everolimus behandelten Ratten wurden während des postoperativen Verlaufes keine signifikanten Änderungen untereinander festgestellt. Von POD 20 bis POD 100 lag der Grad von ICAM-1 gefärbten Gefäßanschnitten bei im Mittel 0.8 ± 0.2 . Dieser Grad wich vom Wert der rechten syngen Lungen ab (Grad: 0.4 ± 0.3), da von den 5 Gewebeschnitten lediglich zwei Lungen auswertbar waren. Im Vergleich zur 0-Kontrolle bzw. zur MP-Gruppe wies die RAD-Gruppe am POD 20 und 30 eine verminderte vaskuläre ICAM-1 Produktion um etwa 66% auf (siehe Abbildung 3.19A). Der Unterschied war signifikant (MP vs RAD POD 20 und 30: $p<0.001$). Es bleibt hinzuzufügen, dass die histologischen Schnitte der RAD-Gruppe qualitative Beeinträchtigungen hinsichtlich der Färbung aufwiesen, so dass die Ergebnisse dieser Gruppe nur eine begrenzte Aussagekraft haben.

Linke Lungen

0-Kontrolle

In den linken allogen transplantierten Lungen der 0-Kontrolle fanden sich am POD 5 im Vergleich zu den Ausgangswerten nur gering erhöhte Werte der ICAM-1-Expression.

Von POD 5 auf POD 15 folgte jedoch eine signifikante Erhöhung der ICAM-1-Bildung um den Faktor 1.4 (POD 5 vs POD 15: $p<0.001$). Auch am POD 30 blieben die Werte unverändert hoch (POD 5 vs POD 30: Faktor 1.45), waren jedoch nur geringfügig und ohne signifikante Differenz gegenüber dem POD 15 erhöht (POD 15 vs POD 30: $p>0.05$). Wie in Abbildung 3.19 C ersichtlich, wurden zwischen den linken syngen transplantierten und den entsprechenden nativen rechten syngen Lungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($p>0.05$). An den POD 15 und 30 wurden auf dem Gefäßendothel der linken allogenen Lungen signifikant mehr ICAM-1-Moleküle exprimiert als auf dem vaskulären Endothel der nativen rechten Lungen (siehe Abbildung 3.19C). Die entsprechende Differenz an POD 5 und POD 100 war statistisch nicht signifikant.

MP-Gruppe

In der MP-Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der ICAM-1-Expression in den linken, allogenen Lungen am POD 20 gegenüber den Ausgangsmaterial (nicht transplantierte, perfundierte Lungen) ($p<0.001$). Dabei erreichte die MP-Gruppe mit Gradwerten von 3.6 ± 0.26 am POD 20 sein Maximum (siehe Abbildung 3.19B). Die ICAM-1-Expression in den Gefäßen der MP-Gruppe entsprach am POD 20 und 30 mit geringen, nicht signifikanten Abweichungen der ICAM-1-Expression der unbehandelten 0-Kontrolle an diesen Tagen. Der geringfügige Abfall der ICAM-1-Expression der linken, allogenen Lungen vom POD 20 auf 30 war nicht signifikant (POD 20 vs POD 30: $p>0.05$) (siehe Abbildung 3.19B). Zwischen den linken, syngen transplantierten und syngen rechten Lungen bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p>0.05$). Zu allen Zeitpunkten des postoperativen Verlaufes wurde in den allogenen linken Lungen eine signifikant höhere Expression von ICAM-1 als in den korrespondierenden nativen rechten Lungen beobachtet (siehe Abbildung 3.19C).

RAD-Gruppe

Der Anteil positiv gefärbter Gefäße der linken allogenen Lungen nach Everolimusapplikation ab POD 14 war am POD 20 um den Faktor 0.84 gegenüber den

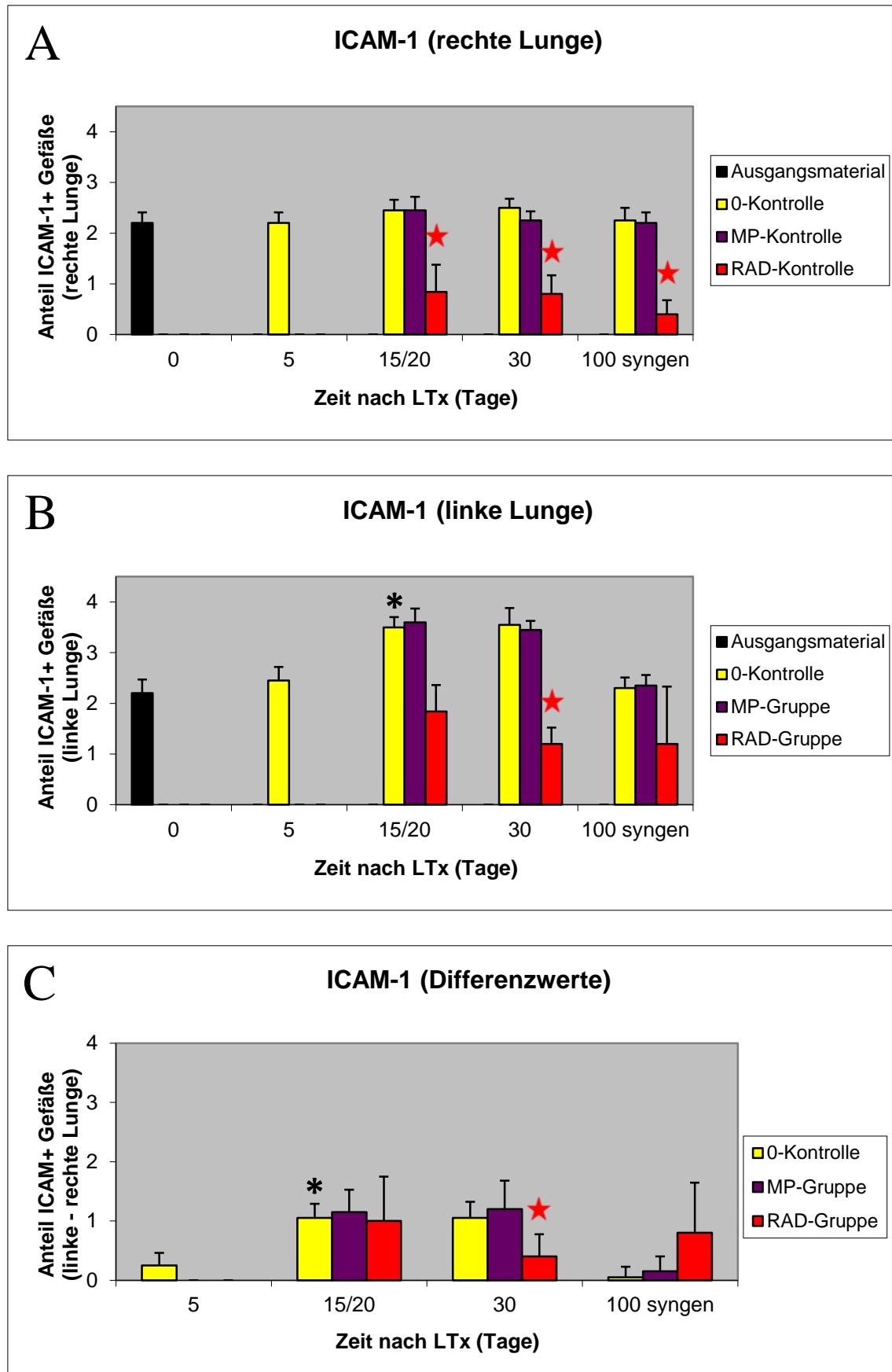
Ausgangswerten (nicht transplantierte, perfundierte Lungen) vermindert. Vom POD 20 (Grad 1.84) auf POD 30 (Grad 1.2) sank der prozentuale Anteil ICAM-1 positiver Gefäße in den linken Lungen der RAD-Gruppe weiter um 35%. Gegenüber der 0-Kontrolle bzw. der MP-Gruppe fand sich bei den Tieren der Everolimusgruppe eine insignifikant reduzierte ICAM-1-Expression am POD 20 sowie eine signifikante Reduktion von ICAM-1 von etwa 65% am POD 30 (RAD vs MP am POD 30: $p<0.05$; RAD vs MP am POD 20: $p>0.05$) (siehe Abbildung 3.19B). Die syngen transplantierten linken Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere wiesen am POD 100 gegenüber den entsprechenden syngen rechten Lungen einen erhöhten Gradwert auf. Die Aussagekraft des Mittelwertes dieser linken Lungen ist durch die Tatsache beeinträchtigt, dass für dessen Berechnung aufgrund qualitativer Mängel nur zwei anstatt der sonst üblichen fünf Präparate für die histologische Auswertung herangezogen werden konnten. Diese Abweichung zeigt sich auch anhand der vergleichsweise großen Standardabweichung (Fehlerbalken) der syngen Lungen der RAD-Gruppe am POD 100 in Abbildung 3.19C. Wie in Abbildung 3.19C zudem ersichtlich wird, exprimierte das vaskuläre Endothel der linken allogenen Lungen zu allen Untersuchungszeitpunkten mehr ICAM-1 als das Gefäßendothel der nativen rechten Lungen (POD 20: signifikant mit $p=0.017$; POD 30: nicht signifikant).

Abbildung 3.19 (siehe nachfolgende Seite): Expression von ICAM-1-positiven Gefäßen.

Darstellung der ICAM-1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in den nativen rechten Lungen (A) und in den linken allogen transplantierten Lungen (B). Die Grafik C stellt die Differenzwerte der linken Lunge abzüglich der rechten Lunge dar, um so die absolute Anzahl ICAM-1-positiver Gefäße und damit die Mehrproduktion der Gefäßmarker der linken Lunge zu erhalten. Das Ausgangsmaterial entspricht den zu transplantierenden Lungen mit Perfusion. Statistik:

* (Sternchen schwarz): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der 0-Kontrolle zum vorhergehenden POD

★ (roter Stern): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zwischen RAD vs. MP-Gruppe des gleichen POD



3.2.5 Expression von P-Selektin

Rechte Lungen

Die P-Selektin Expression in den rechten nativen Lungen der 0-Kontrolle zeigte am POD 5 einen um den Faktor 1.3 erhöhten Anteil P-Selektin positiver Gefäße gegenüber den Ausgangswerten (nicht transplantierte, perfundierte Lungen). Allerdings fand sich im weiteren Verlauf eine Reduktion der P-Selektin-Expression um 8.3% vom POD 5 auf POD 15 und um 26.8% auf POD 30 (siehe Abbildung 3.20A). Während des gesamten Untersuchungszeitraums war der Anteil an P-Selektin positiver Gefäße der 0-Kontrolle niedrig und lag im Mittel bei Grad 1.6 ± 0.3 , was bedeutet dass weniger als 50% aller Gefäße pro Gesichtsfeld positiv gefärbt waren. Das traf auch auf die rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere der 0-Kontrolle zu (Grad 1.75 ± 0.25). Die rechten Lungen der MP-Gruppe zeigten ähnlich niedrige Werte mit einem Gradwert von im Mittel 1.4 ± 0.1 und 1.55 ± 0.3 bei den rechten Lungen der syngen transplantierten Tiere. Nach Everolimusgabe lagen die Gradwerte über die Zeit im Mittel bei 0.6 ± 0.1 bei den nativen rechten Lungen bzw. bei 0.68 ± 0.2 bei den rechten syngenen Lungen, so dass im Mittel weniger als $\frac{1}{4}$ der Gefäße positiv waren. Damit zeigte die RAD-Gruppe gegenüber der 0-Kontrolle bzw. MP-Gruppe eine signifikante Reduktion von 58% bzw. 54% (MP vs. RAD am POD 20: $p<0.001$ und am POD 30: $p=0.006$) (siehe Abbildung 3.20A)

Linke Lungen

0-Kontrolle

In den linken allogen transplantierten Lungen der unbehandelten 0-Kontrolle exprimierte das Gefäßendothel am POD 5 signifikant mehr P-Selektin gegenüber den Ausgangswerten (Faktor 1.7) ($p<0.05$). An den weiteren Untersuchungszeitpunkten fand sich eine kontinuierliche signifikante Reduktion der P-Selektin-positiven Gefäße bis POD 30 (POD 5 vs POD 20: Faktor 0.9; POD 5 vs POD 30: Faktor 0.7) (siehe Abbildung 3.20B). Der Gradwert der linken allogenen Lungen der 0-Kontrolle am POD 30 war gegenüber POD 20 signifikant um 20% reduziert (POD 20 vs POD 30: $p<0.05$).

Zwischen den syngen transplantierten linken Lungen und den entsprechenden rechten Lungen am POD 100 bestanden keine signifikanten Unterschiede. Während des gesamten postoperativen Zeitraumes wurde in den linken allogenen Lungen mehr ICAM-1 auf dem vaskulären Endothel exprimiert als in den korrespondierenden nativen rechten Lungen, was sich anhand der positiven Gradwerte in der Darstellung der Differenzwerte erahnen lässt (Abbildung 3.20C).

MP-Gruppe

Bei den Tieren nach MP-Applikation kam es zunächst zu einer minimalen Reduktion der P-Selektin-Expression in den allogenen Lungen am POD 20 im Vergleich zu der unbehandelten 0-Kontrolle am POD 5 um den Faktor 0.87 (siehe Abbildung 3.20B). Vom POD 20 auf POD 30 fand sich eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der P-Selektin-Bildung von Grad 2.5 (POD 20) auf Grad 2.56 (POD 30) um 2.4 % (POD 20 vs POD 30: $p>0.05$). Im Vergleich mit den unbehandelten Tieren der 0-Kontrolle zeigte die MP-Gruppe ähnlich hohe Werte am POD 20 und wies am POD 30 sogar um den Faktor 1.2 erhöhte Gradwerte auf. Der Unterschied zwischen den linken syngenen und den entsprechenden rechten Lungen nach LTx mit einem Differenzwert von 0.1 war nicht signifikant (Abbildung 3.20C). Die Abbildung 3.20C zeigt, dass zu den jeweiligen Zeitpunkten des postoperativen Verlaufes in den allogenen linken Lungen eine signifikant höhere Expression von P-Selektin als in den korrespondierenden nativen rechten Lungen gemessen wurde.

RAD-Gruppe

Das Gefäßendothel der allogenen linken Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere exprimierte am POD 20 um den Faktor 0.9 weniger P-Selektin als die Lungen der Ausgangstiere. Die RAD-Gruppe zeigte am POD 20 und 30 einen nahezu ähnlich hohen Anteil P-Selektin-positiver Gefäße, wobei die P-Selektin-Expression am POD 30 gegenüber POD 20 um 12% nicht signifikant reduziert war (POD 20 vs POD 30: $p>0.05$). Im Vergleich mit der 0-Kontrolle bzw. MP-Gruppe fanden sich am POD 20

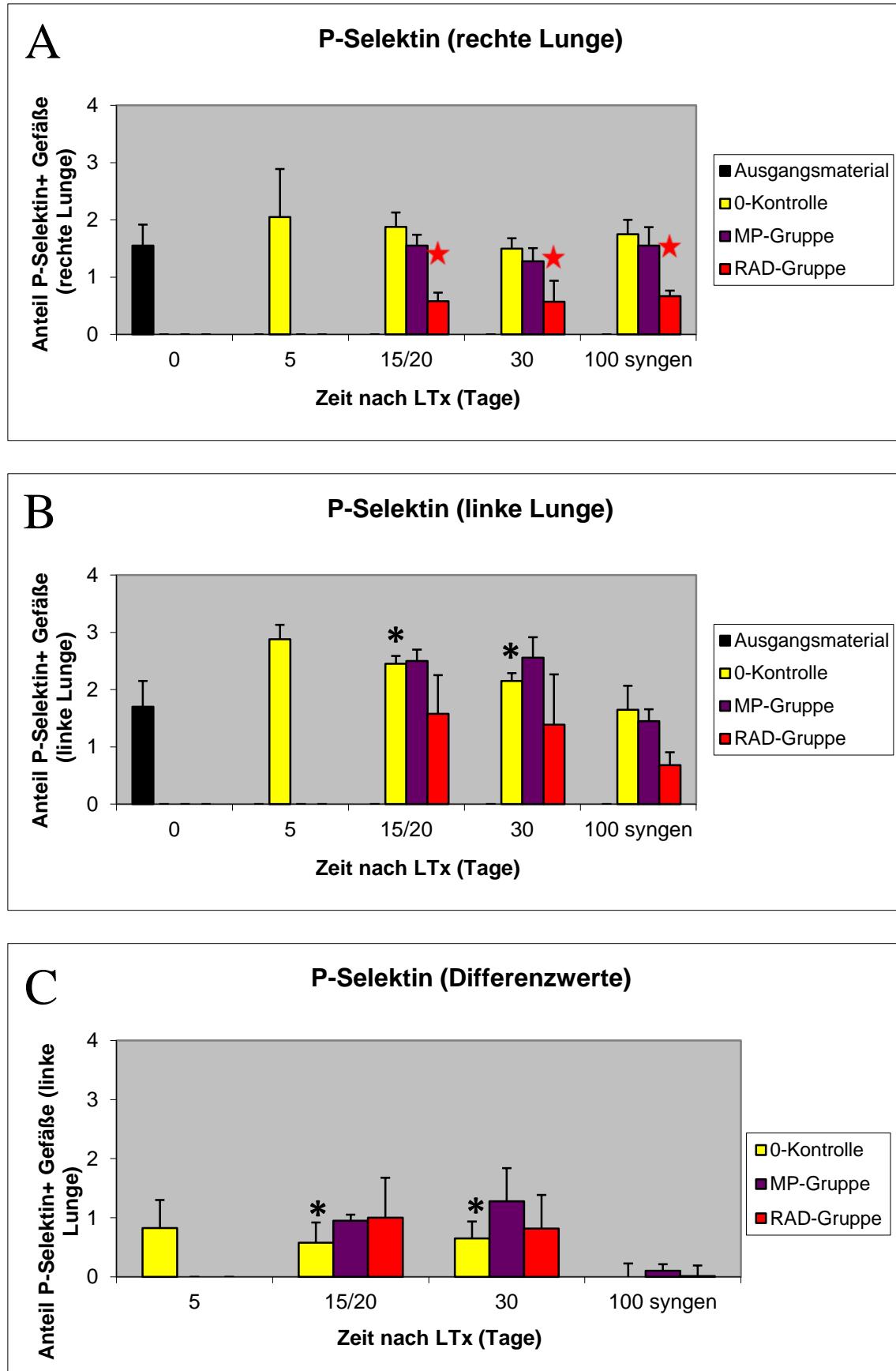
eine um etwa 37% reduzierte und am POD 30 eine um etwa 35% bzw. 46% reduzierte P-Selektin-Expression in der Everolimus-Gruppe, welche nicht signifikant waren (RAD vs MP am POD 20 und POD 30: $p>0.05$) (siehe Abbildung 3.20B). Bei den linken syngen transplantierten Lungen und den korrespondierenden rechten Lungen fand man keine signifikanten Differenzen am POD 100 ($p>0.05$). Während des gesamten Untersuchungszeitraumes exprimierten die allogen transplantierten linken Lungen der mit Everolimus behandelten Tiere mehr P-Selektin als die nativen rechten Lungen (POD 20: signifikant mit $p=0.012$; POD 30: nicht signifikant) (siehe Abbildung 3.20C).

Abbildung 3.20 (siehe nachfolgende Seite): Expression von P-Selektin-positiven Gefäßen.

Darstellung der P-Selektin-positiven Gefäße pro Gesichtsfeld in den nativen rechten Lungen (A) und in den linken allogen transplantierten Lungen (B). Die Grafik C stellt die Differenzwerte der linken Lunge abzüglich der rechten Lunge dar, um so die absolute Anzahl P-Selektin-positiver Zellen und damit die Mehrproduktion der Gefäßmarker der linken Lunge zu erhalten. Das Ausgangsmaterial entspricht den zu transplantierenden Lungen mit Perfusion. Statistik:

* (Sternchen schwarz): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) der 0-Kontrolle zum vorhergehenden POD

★ (roter Stern): signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zwischen RAD vs. MP-Gruppe des gleichen POD



4 DISKUSSION

In den letzten 25 Jahren wurde die Lungentransplantation (LTx) zur Therapie der Wahl für Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium. Doch trotz des verbesserten Kurzzeitüberlebens ist das Langzeitüberleben durch die Entwicklung einer chronischen Abstoßung in Form einer Bronchiolitis obliterans (BO) eingeschränkt (Hachem 2009). Nach dem ersten Jahr nach LTx wird das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) für mehr als 25% der Todesfälle als ursächlich angesehen (Christie et al. 2008). Aufgrund der unzureichenden Wirkung auf die BO und den zahlreichen Nebenwirkungen werden derzeit Alternativen zu den klassischen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Tacrolimus oder Steroiden gesucht (Koch 2009). Eine erst seit einigen Jahren bekannte Gruppe der Immunsuppressiva sind die Proliferationssignal-Inhibitoren wie Everolimus und Sirolimus.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der m-TOR-Inhibitor Everolimus in dem Rattenmodell ab dem POD 14 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Lymphozyten (Marker: CD11a, CD18), zu einer insignifikanten Verminderung der Makrophagen (Marker: ED1) sowie zu einer signifikant verminderten Aktivität des vaskulären Endothels (Marker: ICAM-1) in der Phase der akuten Abstoßung führte. Jedoch konnte das Hauptproblem nach LTx, die Ausbildung einer chronischen Abstoßung in Form eines BOS in unserem Rattenmodell durch die Everolimusgabe nicht verhindert werden. Bis heute konnte die Ausbildung und das Fortschreiten der BO mit keiner immunsuppressiven Therapie verhindert werden.

Einige experimentelle Studien befassen sich mit der Entstehung der BO nach LTx, wobei die Schwierigkeit oftmals in der Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Tiermodelle zu finden ist. Unser Modell der allogenen, orthotopen LTx in der Inzuchtratte von Fischer (F344)- auf Wistar-Kyoto- (WKY) Ratten ist ein Tiermodell, das aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der Entstehung der BO liefert (von Süßkind-Schwendi et al. 2012). Es wurden bereits einige Versuchsmodelle konzipiert um die chronische Abstoßung *in vivo* zu erforschen. Ein verbreitetes Rattenmodell, auf das

auch Hertz et al. 1993 zurückgriff, verpflanzt Trachealringe von Spendertieren in die Subkutis von Empfängerratten (Hertz et al. 1993). Trotz der technisch einfachen Durchführbarkeit, ist dieses Modell zur Erforschung der BO in vielen Punkten ungeeignet (Jungraithmayr et al. 2010). Zum einen unterliegen die Trachealsegmente einer schweren initialen Ischämie, welche die einsetzende Immunantwort beeinflusst, zum anderen werden die Trachealspangen lediglich über Diffusion aus dem umliegenden Gewebe und nicht über die Gefäße ernährt. Ebenso fehlt der physiologische Prozess der Atmung in diesem Modell. Auf die Differenzierung zwischen großen und kleinen Atemwegen wird zudem verzichtet, wodurch die Tatsache, dass sich die BO vor allem in den kleinen Atemwegen abspielt, unberücksichtigt bleibt. In anderen Versuchsmodellen erfolgte eine orthotope End-zu-End-Anastomose des Trachealtransplantats (Genden et al. 2002) oder eine direkte heterotope Verpflanzung der Trachea in das Lungenparenchym des Spendertiers (Sato et al. 2008). Jedoch zeigen diese Studien ähnliche Schwachpunkte auf wie das oben angeführte Modell der heterotopen Trachealtransplantation. Die vorliegende Studie orientiert sich am Versuchsaufbau von Matsumura Y et al. (1995), welcher ein Rattenmodell wählte, das nur eine schwach immungenetische Inkompatibilität hinsichtlich des MHC-I-Komplexes aufwies und somit der immungenetischen Situation einer Organtransplantation beim Menschen ähnelte (Kuypers und Vanrenterghem 2002). In dem LTx – Modell von Matsumura Y et al. werden Lungen von F334 – Spenderratten auf WKY – Empfängertiere ($F334 \rightarrow WKY$) und umgekehrt ($WKY \rightarrow F334$) transplantiert. Es zeigte sich, dass die $F334 \rightarrow WKY$ -Gruppe ohne immunsuppressive Therapie eine akute Abstoßungsreaktion von 51-100% bis zum 21. POD entwickelte, welche von POD 49 bis 100 in eine chronische Transplantatabstoßung überging. Die $WKY \rightarrow F334$ -Tiere entwickelten lediglich eine kurzzeitige akute Abstoßung mit spontaner Rückbildung ab Tag 21 nach LTx und ohne chronisches Transplantatgeschehen, so dass dieses Modell für Analyse der chronischen Abstoßungsreaktion als ungeeignet erschien (Kuypers und Vanrenterghem 2002). Die von Matsumura Y et al. und unserer Arbeitsgruppe gewählte $F334 \rightarrow WKY$ -Rattenkombination zeigte sich bezüglich der Nachteile den oben genannten Modellen überlegen und eignete sich sehr gut um den Verlauf der akuten und chronischen Abstoßung zu verfolgen (von Süßkind-Schwendi et al. 2012). Die bereits

angesprochene Problematik der Frühdiagnostik der akuten Abstoßung im klinischen Alltag wurde durch dieses Modell erfolgreich umgangen, da das Abstoßungsgeschehen von Beginn an durch die histologischen Schnitte des gesamten Lungengewebes untersucht werden konnte.

Bei der Auswertung der Histologie berief sich diese Studie auf die von Hirt et al. angewendete „Working Formulation“ der ISHLT aus dem Jahre 1999, welche eine überarbeitete und modifizierte Version der ursprünglichen ISHLT-Klassifikation von Yousem et al. (1996) darstellt (Hirt et al. 1999; Hirt 2003; Yousem et al. 1996). Gemäß der Einteilung von Hirt et al. (1999) wird zwischen akuter und chronischer Abstoßung der Gefäße und Bronchien differenziert (siehe 2.7 im Abschnitt Material und Methoden). Die Klassifikation erfolgte in die akut vaskuläre (A) und bronchiale (B) sowie in die chronische vaskuläre (D) und bronchiale (C) Abstoßung, welche in die Abstoßungsgrade 0 bis 4 eingeteilt wurden (Abstoßungsgrade: 0: keine; 1: milde; 2: moderate; 3: schwere; 4: völlige). Es ist anzumerken, dass dieses histologische Klassifikationssystem im Jahre 2007 erneut von der ISHLT überarbeitet und ein aktuelles histologisches Beurteilungsschema erstellt wurde (Stewart et al. 2007; Hachem 2009). Gemäß der neuen Klassifikation von 2007 verzichtet die ISHLT auf die Einteilung in Abstoßungsgrade bei der chronisch vaskulären und chronisch bronchialen Abstoßung, stattdessen wird bei der chronischen Abstoßung nur noch zwischen Nichtvorhanden- und Vorhandensein einer BO (C0 bzw. C1) bzw. einer vaskulären Sklerose (D0 bzw. D1) unterschieden. Die Einteilung der vaskulären akuten Abstoßung (A0 – A4) wurde unverändert in die neue Klassifikation übernommen. Bei der bronchialen AR, der sog. lymphozytären Bronchiolitis, erfolgte die Revision in die Kategorien B0 (keine BO), B1R (low grade BO: früher (1996): B1 und B2), B2R (high grade BO; früher (1996): B3 und B4) sowie BX (nicht auswertbar). Zur besseren Übersicht ist das neue Klassifikationssystem im Folgenden aufgeführt (Tabelle 4.1). In der Publikation von Hachem et al. (2009) wird deklariert, dass die lymphozytäre Bronchiolitis einen ebenso hohen Risikofaktor für die Entwicklung der BO darstellt wie die akute Abstoßung, so dass die Ergänzung des Faktors „lymphozytäre Bronchiolitis“ in der neuen ISHLT – Klassifikation postuliert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde

jedoch auf das modifizierte Beurteilungsschema von Hirt et al. (1999) zurückgegriffen, da diese Ergebnisse somit unmittelbar mit den vorausgegangenen Auswertungen und Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe sowie mit Studien anderer Autoren verglichen werden konnten.

A. Akute Abstoßung	A0	Keine	Normales Parenchym ohne perivaskuläre Infiltration
	A1	Minimal	Vereinzelte Infiltrate, 2-3- Zellreihen dick
	A2	Mild	Zahlreiche Infiltrate, Endothelialitis
	A3	Moderat	Dichte Infiltrate, Endothelialitis, Ausbreitung ins Interstitium
	A4	Schwer	Diffuse Infiltrate, deutlicher Alveolarschaden, Nekrose
B. Lymphozytäre Bronchiolitis	B0	Keine	Keine bronchioläre Entzündung
	B1R	Low grade	Mononukleäre Infiltration der Submukosa, keine Epithelverletzung
	B2R	High grade	Infiltration der Submukosa, Epitheliale Infiltration und Nekrose
	BX		Nicht beurteilbar
C. Obliterative Bronchiolitis (BO)	C0	Nicht vorhanden	Keine Zeichen einer BO
	C1	Vorhanden	Fibrose der Submukosa, Obliteration der bronchialen Lumina
D. Vaskuläre Sklerose	D0	Nicht vorhanden	Keine Zeichen einer vaskulären Sklerose
	D1	Vorhanden	Zeichen einer vaskulären Sklerose

Tabelle 4.1: Neu überarbeitete Klassifikation und Gradeinteilung der Abstoßung nach LTx gemäß ISHLT 2007 (Stewart et al. 2007; Hachem 2009).

Auf die histologische Auswertung der Kontrollgruppe (keine Immunsuppression) gemäß den Kriterien von Hirt et al. (1999) soll nun im Folgenden näher eingegangen werden. Die linken allogenen Rattenlungen zeigten am POD 15 und 30 eine maximale akute Abstoßungsreaktion auf vaskulärer und bronchialer Ebene, wobei beide Strukturen bereits Anzeichen der chronischen Abstoßung aufwiesen (ISHLT-C Grad 2-3). Am POD 30 kam es zu einer deutlichen Vaskulitis mit subendothelialer und intraluminaler Zellinfiltration und zu einer massiven lymphozytären Bronchiolitis mit peribronchialer Infiltration und Durchwanderung der Rundzellen bis in die Submukosa. Ab dem POD 60 dominierte das chronische Geschehen und ging am POD 100 in die völlige fibrotische Vernarbung des Lungengewebes mit BO und vaskulärer Sklerose über. Immunhistochemisch zeigte sich bis POD 30 eine signifikant vermehrte Expression von ED1 und CD11a sowie CD18, welche die ausgeprägte Makrophagen-(ED1) und Leukozyteninfiltration (CD11a/CD18) im Gewebe verdeutlichte. Eine maximale Aktivierung der Endothelzellen bis POD 30 ließ sich an erhöhter Zunahme des Anteils ICAM-1 bzw. P-Selektin-positiver Gefäße feststellen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Matsumura Y et al. (1995) überein. Auch hier kam es am POD 21 zu einer maximalen akuten Abstoßung, welche einige Zeit persistierte und zwischen POD 49 und 100 nach LTx in einem chronischen Abstoßungsgeschehen mit interstitieller bzw. peribronchialer Fibrose, Vaskulitis sowie intimaler Hyperplasie endete (Kuypers und Vanrenterghem 2002). Bis zum POD 100 überlebten alle transplantierten Tiere unserer Studie ohne klinische Anzeichen einer eingeschränkten Lungenfunktion zu zeigen. Die syngen transplantierten Tiere sowie die nicht-transplantierten rechten Lungen der allogenen Tiere zeigten kein akutes Abstoßungsgeschehen und damit auch keine chronische Transplantatvernarbung. Folglich ist die Entwicklung des akuten Abstoßungsgeschehens als Reaktion auf die durchgeführte allogene LTx zu werten.

Anhand des histologischen Verlaufes unserer Versuchsgruppen lässt sich die bekannte These vorausgehender Arbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie anderer Autoren bestätigen, dass die akute Abstoßung ein Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Abstoßung sein kann. Sharples et al. (2002) weist darauf hin, dass

besonders rezidivierende und schwere Verläufe sowie spätauftretende Episoden der akuten Abstoßung das Risiko für die Entstehung einer BO erhöhen (Sharples et al. 2002). Eine lymphozytäre Bronchiolitis/Bronchitis wird ebenso als bedeutender Risikofaktor betrachtet (Hachem 2009). Als Kofaktoren werden auch nichtimmunologische Ursachen wie virale Infektionen (Community respiratory virus, Zytomegalievirus), Pilzinfektionen (Aspergillus-Kolonisation), gastroösophagealer Reflux, primäres Transplantatversagen oder längere Ischämiezeit gesehen (Todd und Palmer 2011; Hachem 2009) (siehe Abbildung 4.1). Verglichen mit anderen Organtransplantationen ist die Inzidenz der akuten Abstoßung nach LTx deutlich erhöht (Hausen et Morris, 1999). Gründe dafür könnten in der Größe der Lunge oder in dem weitverzweigten intrinsischen Abwehrsystem der Lunge liegen, das durch den Austausch mit exogenen Einflüssen sowie irritativen Erregern über die Atemwege ständig aktiviert wird (Trulock 1997). Des Weiteren gilt die Diagnostik der akuten Abstoßung im klinischen Alltag als schwierig, so dass die immunsuppressive Therapie häufig erst zu einem späten Zeitpunkt erfolgt, an welchem das akute Geschehen bereits das Maximum erreicht hat.

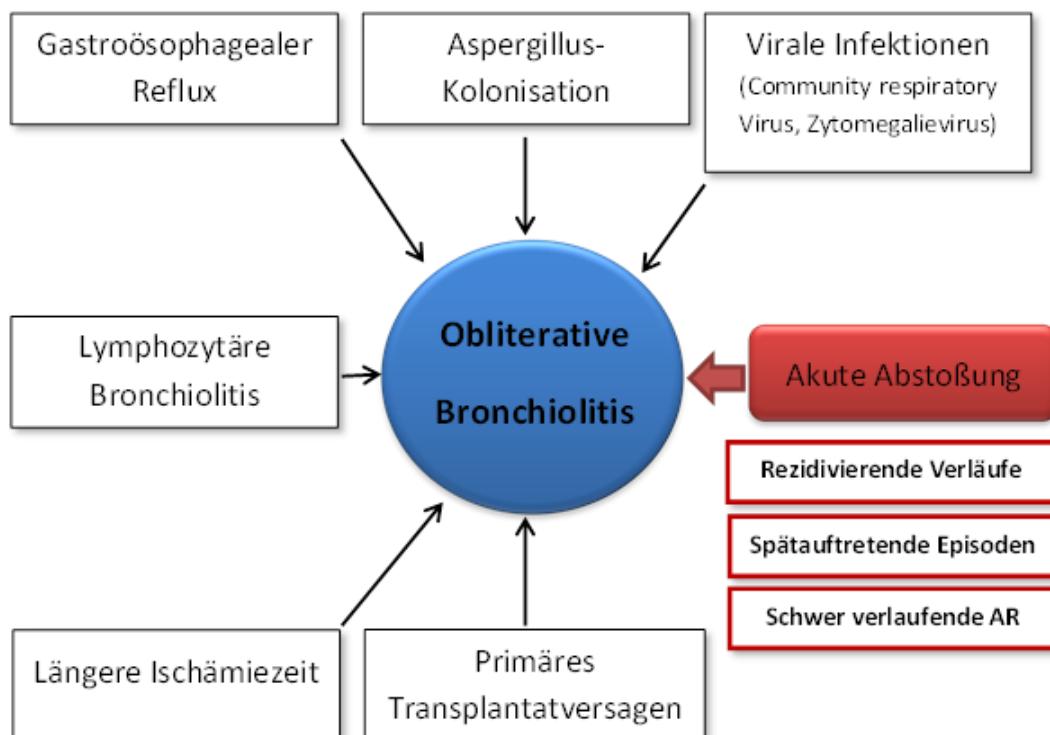


Abbildung 4.1: Risikofaktoren für die Entstehung einer obliterativen Bronchiolitis, erstellt anhand den Studien von Todd et al. (2011) und Hachem et al. (2009). Abkürzung: AR=Akute Abstoßung.

Für die Behandlung der akuten Abstoßung stellen Kortikosteroide immer noch den Eckpunkt der medikamentösen Therapie dar (Hachem 2009). In vielen Kliniken wird die akute Abstoßung mit einer intravenösen Bolus-Gabe von Kortikosteroiden für 3 Tage (Methylprednisolon, 10mg/kg/Tag, i.v.) behandelt (Snell und Westall 2007).

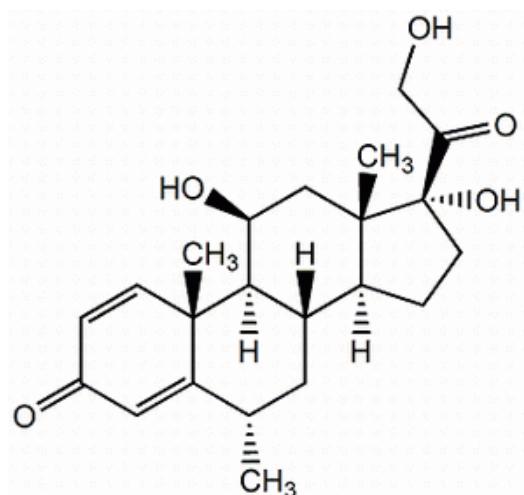


Abbildung 4.2: Strukturformel von Methylprednisolon (6-alpha-Methylprednisolon) (Kaiser et al. 2002).

Die Verabreichung von Glukokortikoiden in Form hochdosierter intravenöser „Puls“- bzw. „Bolusinjektionen“ von Methylprednisolon (MP) zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen wurde von Samuel Kountz und Kollegen, einer amerikanischen Forschergruppe aus San Francisco, eingeführt, welche die Experimente zuerst an Hunden und anschließend bei nierentransplantierten Patienten anwendeten (Kountz et al. 1975). Steroide haben eine immunsuppressive und antiphlogistische Wirkung, welche sich insbesondere gegen Leukozyten, Makrophagen sowie Endothelzellen richtet. Sie hemmen die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und Makrophagen sowie deren Zytokinproduktion (Land 2006). Zudem fördern sie die T-Zellapoptose und inhibieren die Induktion proinflammatorischer Enzyme (Kollagenasen, Phospholipase A2, u.a.) (Umland et al. 2002). Das Gefäßendothel zeigt nach ihrer Gabe eine verminderte Expression von

Zellinteraktionsmoleküle (ICAM-1) (Umland et al. 2002). Ihre Wirkung entfalten sie im Zellinneren über einen Glucokortikoidrezzeptor. Nach der Bindung an ihren Rezeptor transloziert der Steroid-Rezeptor-Komplex in den Zellkern, wo die Transkription der Zielgene inhibiert wird (Krukemeyer und Lison 2006). Dadurch resultiert u.a. eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin 1-6, 8, 11, 12, 16, TNF- α und INF- γ auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene (Land 2006). Gleichzeitig wird die Transkription anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10 und TGF- β) hochreguliert (Galon et al. 2002). Übersicht über die Wirkung von Glucokortikoiden gibt Tabelle 4.2.

<i>Wirkung der Glucokorticoide</i>	<i>Beispiele</i>
Hemmung der Zytokinsynthese	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Interleukin 1 - 6, 8, 11, 12, 16 ➤ IFN-γ, TNF-alpha ➤ Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Hemmung der Induktion proinflammatorischer Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Kollagenasen ➤ Phospholipase A2 ➤ Zyklooxygenase-2
Hemmung der Expression von Zellinteraktionsmolekülen	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Selektine (z.B. P-Selektin) ➤ Interzelluläres Adhäisionsmolekül-1 (ICAM-1)
Beschleunigter Abbau von Mediatoren	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bradykinine ➤ Tachykinine
Hochregulation von anti-inflammatorischen Enzymen	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Interleukin-10 ➤ IGF-β

Tabelle 4.2: Auszug über die Wirkung der Glukokortikoide mit Beispielen (Übersicht in Sapsolsky et al. 2000; Umland et al. 2002; Galon et al. 2002).

Der histologische Schwellenwert, bei welchem die postoperative Gabe von Kortikosteroiden trotz fehlender Symptomatik empfohlen wird, wurde auf den Abstoßungsgrad A2 (mäßige Abstoßung) festgelegt (Hachem 2009). Aufgrund der schwierigen Diagnostik der akuten Abstoßung erfolgt die immunsuppressive Therapie jedoch meist erst bei Ausprägung klinischer Symptome und damit zu einem Zeitpunkt, an welchem das akute Geschehen histologisch bereits mild bis moderat (A2 - A3) ausgeprägt ist. In der vorliegenden Studie wurde ein Modell entwickelt, das einen Bezug zum klinischen Alltag darstellt, da die Gabe von MP (bzw. Everolimus) ebenfalls bei bereits bestehender akuter Abstoßungsreaktion erfolgte. Anders als in der Klinik, erfolgte die Applikation im Modell erst am maximalen Ausprägungsgrad (A3-A4) des akuten Geschehens, nämlich am POD 14. Mit MP-Gabe am Grad A3-A4 lassen sich jedoch die Akkumulation vieler akuter Abstoßungsreaktionen sowie klinische Situationen mit schwer verlaufenden und rezidivierenden akuten Abstoßungsprozessen simulieren. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Gabe von MP am Zenit der akuten Abstoßung keinen Einfluss auf ihre Entstehung nimmt. Aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe im gleichen Rattenmodell ist bekannt, dass die Bolusgabe von hochdosierten Kortikosteroiden in der Anfangsphase der akuten Abstoßung Einfluss auf den akuten inflammatorischen Prozess nimmt und konsekutiv zu einer Verzögerung des chronischen Verlaufes führen kann (Hirt et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit hatte die Gabe von MP am Maximum des akuten Geschehens neben der fehlenden Wirkung auf die akute Abstoßungsreaktion auch keinen Einfluss auf die Entstehung der chronischen Abstoßung. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass der Zeitpunkt der MP-Applikation von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung einer chronischen Abstoßung ist. Betrachtet man den Einfluss von MP auf die immunmodulierenden Zellen, so stellt man fest, dass die Anzahl der infiltrierten Leukozyten (CD11a bzw. CD18) bzw. Makrophagen (ED1) gegenüber den Werten der unbehandelten Kontrolle (0-Kontrolle) nur gering vermindert waren. Von POD 20 auf 30 zeigte die MP-Gruppe einen signifikanten Anstieg der Leukozyten (CD11a) sowie eine nicht signifikante Zunahme der Makrophagen (ED1) und ähnelt damit im Verhalten der 0-Kontrolle. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass MP eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt, jedoch die alleinige Bolusgabe von MP nicht ausreicht die inflammatorische Zellinfiltration in der späten Phase der akuten

Abstoßung ausreichend zu supprimieren. Der positive gefärbte Anteil des Gefäßendothels (Marker: ICAM-1 bzw. P-Selektin) der MP-Gruppe weist ebenfalls nur geringe, nicht signifikant erniedrigte Differenzen zur unbehandelten 0-Kontrolle auf und zeigt ähnliche Werte an POD 20 und 30. Am POD 60 und 100 kristallisierte sich deutlich heraus, dass die Ausbildung der chronischen Abstoßung in der MP-Gruppe ebenso wenig wie in der 0-Kontrolle verhindert werden konnte. Aus den vorangegangen Ergebnissen können wir schließen, dass durch die MP-Gabe am Zenit der akuten Abstoßung eine gering verminderte inflammatorische bronchiale Reaktion resultierte, das Lungengewebe jedoch bereits soweit vorgeschädigt war, dass eine chronische Abstoßung nicht verhindert werden konnte.

Damit bestätigt unsere Studie einerseits, dass der frühzeitigen Therapie der akuten Abstoßung in der initialen Phase eine wichtige Bedeutung zukommt, um die chronische Abstoßung zu verhindern oder abzumildern. Andererseits zeigen wir, dass eine zu einem späteren Zeitpunkt mit Kortikosteroiden behandelte akute Abstoßung effektiv vermindert werden kann, diese jedoch bereits so weit fortgeschritten ist, dass die Inflammation persistiert und einen Risikofaktor für die Entstehung der chronischen Abstoßung darstellt. Eine Option würde neben der frühen postoperativen MP-Applikation die prä- oder intraoperative Gabe von Kortikosteroiden darstellen. Gemäß Land et al. (2006) gibt es vier Indikationen, bei denen Kortikosteroide bei der klinischen Organtransplantation eingesetzt werden können: intraoperativ in Form von i.v. Bolusinjektionen, postoperativ im Sinne einer oralen Basistherapie (Induktion-/Erhaltungstherapie), bei akuter Abstoßung als i.v. Puls-Injektion sowie bei chronischer Transplantatdysfunktion als i.v. oder orale Gabe. Die Aussagen zum präoperativen Einsatz von Kortison sind widersprüchlich (Park et al. 2001). Die präoperative Gabe wurde oft in Zusammenhang mit postoperativen Insuffizienzen der Bronchusnaht gebracht und somit vermieden. Park et al. (2001) zeigte allerdings anhand 73 lungentransplantierten Patienten, von welchen 26 präoperativ Kortikosteroide und 47 keine Steroidtherapie erhielten, dass die präoperative Gabe von Steroiden das postoperative Outcome nicht beeinflusst. Die präoperative Gabe von Kortisonpräparaten führte zu keiner erhöhten Rate an insuffizienten Bronchusnähten, nahm jedoch auch keinen Einfluss auf die akute Abstoßung oder BO. Lediglich die Rate an bronchialen Stenosen war signifikant reduziert.

Auch der längere postoperative Einsatz von MP muss kritisch betrachtet werden, da Kortison mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen assoziiert ist. Neben Hypertonie, Hyperlipidämie, Glukoseintoleranz, Osteoporose, Katarakt, Glaukom sowie Gewichtszunahme sind in der Transplantationsmedizin vor allem die bereits erwähnten durch Kortikosteroide bedingten Anastomoseninsuffizienzen gefürchtet, so dass die therapeutische Konsequenz aus einem frühzeitigen und ausschleichenden Absetzen der Kortikosteroide besteht (Walker et al. 2009). Aus diesem Grund beschäftigt sich die aktuelle klinische Forschung auf dem Gebiet der Immunsuppression intensiv mit der Erprobung steroidfreier bzw. -armer Protokolle (Land 2006). Mit der Verfügbarkeit neuerer Immunsuppressiva rückt dieses Ziel des frühzeitigen Steroidausschleichens wieder in das transplantationsmedizinische Interesse. Der m-TOR-Inhibitor Everolimus könnte eine Alternative zu der postoperativen Steroidtherapie nach LTx darstellen.

Everolimus, ein neu entwickeltes Immunsuppressivum von Novartis, ist ein makrozyklisches Lakton, welches die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation von Lymphozyten und mesenchymalen Zellen inhibiert (Nashan 2002; Schuler et al. 1997). Es unterbricht damit die Signalübertragung zwischen IL-2 und der klonalen Expansion der T-Zellen (Manger 2004, Hentges et al. 2001; Sehgal 2003). Everolimus wird bereits erfolgreich in der Herzchirurgie zur Hemmung der Proliferation der Myointima und der allogenen Vaskulopathie bei herztransplantierten Patienten eingesetzt (Salminen et al. 2000; Eisen et al. 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der m-TOR-Inhibitor in der Lage sein könnte, den fibroproliferativen Prozess und die BO auch in Empfängerungen von lungentransplantierten Patienten zu unterdrücken. Einige Studien haben sich in den letzten Jahren mit dem Wirkungsspektrum des relativ „jungen“ Immunsuppressivums beschäftigt. In einem Tiermodell von Simler et al. (2002) konnte RAD die Kollagenablagerung bei einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose reduzieren (Simler et al. 2002). Weitere Studien im Bereich der Herz- und Gefäßchirurgie wiesen nach, dass durch den Einsatz von RAD-beschichteten Stents das Wachstum von Neointima im Stent sowie die Restenose nach koronarer Angioplastik in Tieren sowie Menschen verhindert werden konnte (Farb et al. 2002; Grube und Bülfeld 2002). Azzola et al. (2004) zeigte in einer experimentellen Arbeit,

dass Everolimus ein potenter Inhibitor der Proliferation von humanen Lungenfibroblasten *in vitro* ist (Azzola et al. 2004). Dabei konnte eine Reduktion der Fibroblastenproliferation von letztendlich 50% erreicht werden bei Everolimus-Konzentrationen, die unter den im Klinikalltag erreichten Konzentrationen lagen. Andere Immunsuppressiva wie Ciclosporin A, FK506 oder Azathioprin zeigten bei Azzola et al. erst bei höheren Dosen eine relevante antiproliferative Wirkung. In einer experimentellen Studie von Van der Poel et al. 2003 wird des Weiteren von einem antikarzinogenen Effekt von Rapamycin ausgegangen bei dem die SMAD Signalkaskade eine wichtige Rolle spielen soll (van der Poel et al. 2003). Es gab bislang jedoch keine aussagekräftige, dem klinischen Alltag nahe Studie, welche die Wirkung von einer Kombinationstherapie aus Everolimus mit Kortikosteroid-Boli auf die chronische Abstoßung nach LTx *in vivo* untersucht hat.

Everolimus wird durch das von zahlreichen Medikamenten beanspruchte Zytochrom-P450-3A4 (CYP3A4) der Leber metabolisiert, wobei sich zahlreiche potenzielle Interaktionen mit anderen Medikamenten ergeben können (Kawahara et al. 2011). Eine in mehreren experimentellen Studien dokumentierte Wechselwirkung ist der Synergismus zwischen Everolimus und dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (Hausen et al. 1999; Schuurman et al. 1997), welcher ebenfalls über den metabolischen Zytochrom-P450-3A4-Pathway ausgeschieden wird (Kawahara et al. 2011). Die Kombination aus CsA und Everolimus zeigte bisher sowohl im Modell der LTx als auch in klinischen Studien zu Herz - und Nierentransplantationen eine exzellente immunsuppressive Wirkung. In einem Schweinemodell zur chronischen Abstoßung nach LTx konnte Salminen et al. (2000) zeigen, dass durch eine Triple-Immunsuppression aus Steroiden, Cyclosporin A und Everolimus die Epitheldestruktion sowie die Obliteration der bronchialen Lumina bei der BO verhindert werden konnte (Salminen et al. 2000). Im Gegensatz zu dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A zeigte Everolimus bislang keine nephrotoxische Wirkung, in Kombination mit Cyclosporin A kam es jedoch zu einer Erhöhung des Kreatinininspiegels (Snell et al. 2006). Aufgrund des synergistischen Effekts ist die zusätzliche Gabe von Everolimus zu Cyclosporin A und Steroiden bereits für Nieren- und Herztransplantationen zugelassen (Koch 2009). Durch seine geringe Nephrotoxizität könnte Everolimus auch eine Alternative zu einem klassischen Calcineurin-Inhibitor darstellen.

Die Gabe von Everolimus ist aber auch mit Nebenwirkungen verbunden, auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll (siehe Abbildung 4.3). In einer internationalen, randomisierten Doppelblindstudie von Snell et al. (2006), in welcher die Wirkung von Everolimus mit Azathioprin nach LTx verglichen wurde, fiel das häufigere Auftreten von Hyperlipidämie (Triglyzeridämie, Cholesterinämie) im Zusammenhang mit Everolimus auf (Snell et al. 2006). Dies entspricht den Erfahrungen hinsichtlich der Everolimusgabe nach Herz- und Nierentransplantationen (Koch 2009; Vítko et al. 2004). Jedoch lässt sich die Hyperlipidämie mittels einer lipidsenkenden Therapie steuern (Kovarik et al. 2002). Des Weiteren wird im Zusammenhang mit Everolimus von Hämoglobin-Abfall, Thrombozytopenie sowie einer leichten Proteinurie berichtet (Budde et al. 2011). Everolimus kann auch gastrointestinale Nebenwirkungen mit Diarrhoeen (Budde et al. 2011) sowie Wundheilungsstörungen verursachen (Dandel et al. 2010). Snell et al. (2006) berichtet von einem vermehrten Auftreten von bakterieller Pneumonie sowie Pilzinfektionen (Snell et al. 2006). In wenigen Fällen soll die Kombination von Everolimus mit einem Calcineurin-Inhibitor das Auftreten eines hämolytisch-urämischen Syndroms nach LTx begünstigt haben (Lovric et al. 2011).

Auch in dem vorliegenden Versuch wurden Nebenwirkungen beobachtet. Bei einigen Tieren mit niedrigerem Anfangsgewicht kam es durch die Everolimustherapie zu einer deutlichen Gewichtsreduktion. Diese Auffälligkeit wurde in einer weiterführenden Studie unserer Arbeitsgruppe berücksichtigt (von Süßkind-Schwendi et al. 2012) und die Gewichtsverläufe vor, während und nach der Everolimusgabe aufgezeichnet. Es bestätigte sich ein deutlicher Gewichtsverlust bei Tieren mit niedrigem Ausgangsgewicht (< 250g), die zum Teil zum Tod der Tiere führte. Tiere mit erhöhtem Ausgangsgewicht überlebten die LTx und zeigten nach einem initialen Gewichtsverlust eine Erholungstendenz. Deblon et al. (2011) beobachtete bei einer Dauertherapie mit m-TOR-Inhibitoren ebenfalls einen Gewichtsverlust im Rattenmodell, welchen er mit einer verminderten Nahrungsaufnahme der Tiere begründete. Er beobachtete zudem eine Glucoseintoleranz, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie bei den Ratten (Deblon et al. 2011). In unserer Studie wurden keine regelmäßigen Kontrollen der Nahrungszufuhr der Ratten durchgeführt. Wir vermuten basierend auf Deblon et al. (2011), dass eine Behandlung mit m-TOR-Inhibitoren bei Ratten mit erhöhtem

Ausgangsgewicht einen Verlust an Körperfettmasse induzieren kann. Identische Beobachtungen nach gleicher Everolimus-Dosierung (2,5 mg/kg/Tag) machte auch Hausen et al. (1999; 2000). In seinem Versuchsaufbau erfolgte erst durch eine zeitverzögerte Gabe von Everolimus (plus Cyclosporin) eine Erholungstendenz der Tiere mit verbesserter Fellpflege, erhöhter Aktivität sowie ein Sistieren der Diarrhoe. Schlussfolgernd kann in unserer Studie nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei gezielter und abgestimmter Dosierung von Everolimus Nebenwirkungen auftreten. Die bei Hausen et al. (1999; 2000) eingetretenen Nebenwirkungen im Rattenmodell der akuten Abstoßung traten bei gemessenen Everolimus - Talspiegeln von 16-27 µg/L auf (Hausen et al. 1999; Hausen et al. 2000), ein Bereich der weit über dem im klinisch gemessenen Blutspiegelwerten von 6-12 µg/L liegt (Snell et al. 2006). Ein Blutabnahme zur Bestimmung der Talspiegel von Everolimus erfolgte in unseren Versuchen nicht, doch vermuten wir ähnlich hohe Spiegel wie Hausen et al. (1999; 2000), da er die identische Everolimusdosis wie in der vorliegenden Studie verwendete (2.5mg/kg/Tag).

Neben der Gewichtsabnahme wurden in unserem Modell auch histologische pulmonale Veränderungen festgestellt. In der histologischen Auswertung wurde bei etwa der Hälfte der Tiere eine Anhäufung von schaumartig veränderten Alveolarmakrophagen in den Alveolarräumen der rechten und syngen transplantierten Lungen gesehen. Die Alveolarmakrophagen traten zum Teil begleitet von isolierten Lymphozyten sowie einer diskreten Vergrößerung der Alveolarsepten auf. Das Vorkommen derartig veränderter Alveolarmakrophagen in den Lungen von Everolimus-behandelten Patienten wurde bereits in Einzelfällen nach Nieren- sowie Herztransplantation beschrieben (Otton et al. 2009; Ponticelli et al. 2011). Expósito et al. (2008) berichtete über das Auftreten eines nicht-infektiösen pulmonalen Syndroms unter Everolimusgabe bei zwei herztransplantierten Patienten. Histologisch zeigte sich in der transbronchialen Biopsie eine interstitielle organisierte Pneumonitis mit fibrinösen intraalveolären Exsudaten, fibrotischen Anteilen und Lymphozyteninfiltraten, jedoch keine schaumartig imponierenden Alveolarmakrophagen wie in unserer Studie (Expósito et al. 2008). In den Fallberichten von Expósito konnten keine erhöhten Entzündungsparameter nachgewiesen werden und die Patienten sprachen nicht auf eine Breitbandantibiose an. Erst bei Absetzen von Everolimus besserte sich der Zustand der Patienten klinisch sowie radiologisch, was auf eine pulmonale Toxizität von Everolimus schließen ließ. In

dem vorliegenden Rattenmodell können daher bei einer Dauertherapie mit einer Everolimusdosis von 2,5mg/kg/Tag keine pulmonalen Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Tiere außer den histologischen Auffälligkeiten keinerlei spezifische Krankheitssymptome zeigten.

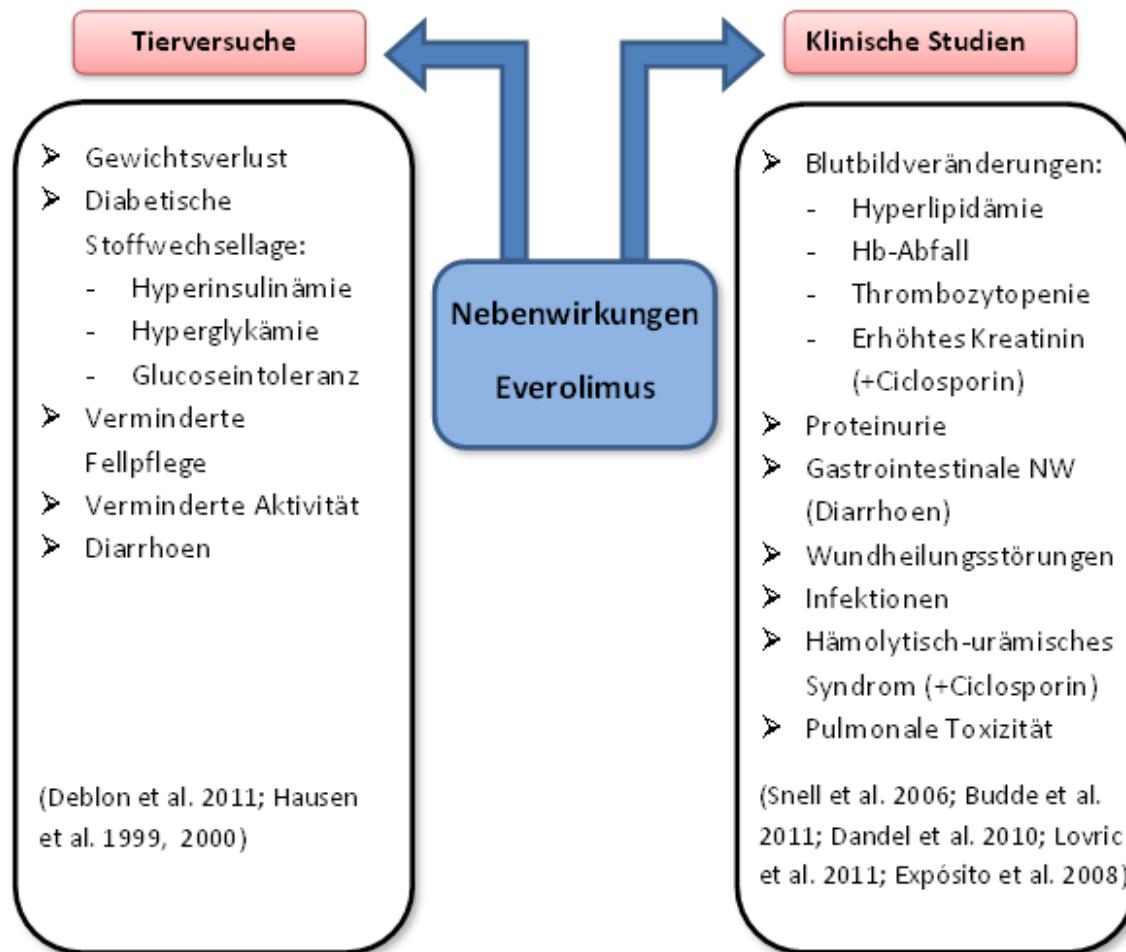


Abbildung 4.3: Überblick über das Nebenwirkungsprofil von Everolimus (Auszug) erstellt anhand aktueller Studienlage (siehe Abbildung und Text); NW= Nebenwirkungen, Hb= Hämoglobin.

Bislang gibt es im Bereich der LTx keine Studie, welche *in vivo* den Effekt von Everolimus in Kombination mit Kortikosteroid-Boli auf die Abstoßungsreaktion nach LTx untersucht. Die vorliegende Studie dient dazu, den Effekt des m-TOR-Inhibitors auf die chronische Abstoßung darzustellen, so dass Everolimus zum Zeitpunkt der

maximalen akuten Abstoßung, am POD 14, gegeben wurde (Gruppe III). Histologisch bewirkte die Kombination aus Everolimus und MP einen signifikanten Rückgang des akuten Geschehens am POD 30 im Vergleich zu der MP-Gruppe bzw. 0-Kontrolle. Dies war zum einen an der verminderten perivaskuläre sowie peribronchialen Entzündungsreaktion am POD 30 (ISHLT-Score A: 2,8 [POD 20] vs. 1,8 [POD 30] bzw. B: 3,2 [POD 20] vs 2,1 [POD 30]) zu sehen, zum anderen kam es zu einer Reduktion der Anzahl der Entzündungszellen. Bereits sechs Tage nach Gabe des m-TOR-Inhibitors war die Anzahl der Lymphozyten deutlich gegenüber der MP-und 0-Kontrolle verringert (CD11a: signifikanter Abfall bzw. CD18: insignifikanter Abfall). Auch die Endothelaktivität (ICAM-1) zeigte sich in der Everolimusgruppe am POD 30 signifikant gegenüber der MP-Gruppe und 0-Kontrolle vermindert. Die Expression des Makrophagenmarkers ED1 war in der Everolimusgruppe am POD 20 initial vergleichbar mit der MP-Gruppe nahm jedoch im Verlauf von POD 20 auf 30 nicht signifikant ab und lag damit unter den Werten der MP-Gruppe bzw. 0-Kontrolle. Auch bei den Lymphozytenmarkern CD11a und CD18 kam es am POD 30 zu einer Reduktion der Leukozytenzahl, welche signifikant gegenüber der MP-Gruppe bzw. 0-Kontrolle vermindert waren. Die Aktivität des vaskulären Endothels war in der Everolimusgruppe am POD 30 um 35% (ICAM-1) bzw. 12% (P-Selektin) erniedrigt verglichen mit POD 20. Auch in der Studie von Zou et al. (1999) über den Effekt von SDZ-Rad (0,5mg/kg/d) auf die chronische Abstoßung nach Nierentransplantation konnte nach einem Zeitraum von 24 Wochen unter anderem ein Rückgang der infiltrierten Makrophagen, Lymphozyten sowie eine verringerte Expression von ICAM-1 beobachtet werden (Zou et al. 1999). Everolimus zeigt somit einen antiproliferativen sowie anti-inflammatoryischen Effekt sowohl auf die Makrophagen, Lymphozyten sowie auch auf das vaskuläre Endothel in der Phase der akuten Abstoßung. Die Anzahl der inflammatorischen Zellen (Makrophagen/Lymphozyten) und die Aktivität des Gefäßendothels in den rechten Lungen der Everolimus-Gruppe waren über den gesamten Zeitraum gegenüber der MP-Gruppe und 0-Kontrolle erniedrigt, was für eine generalisierte, antiproliferative Wirkung des m-TOR-Inhibitors spricht.

Jedoch konnte Everolimus trotz der anti-inflammatoryischen Wirkung in der akuten Phase die chronische Abstoßung nicht verhindern. Bereits am POD 60 nach LTx zeigte sich eine Okklusion von 50% der kleineren Gefäße. Die bronchialen Strukturen waren

nur noch vereinzelt als solche erkennbar. Am POD 100 hatte das chronische Abstoßungsgeschehen sein Maximum erreicht und es fand sich eine ausgeprägte interstitielle fibrotische Vernarbung mit perivaskulärer und –bronchialer Fibrose, vaskulärer Sklerose mit Endothelnekrosen sowie einer BO. Mit zunehmender Vernarbung gingen auch die inflammatorischen Marker (ED1, CD18/CD11a, ICAM-1, P-Selektin) auf eine Minimum zurück.

Es zeigte sich also, dass die Gabe von Everolimus am Zenit der akuten Abstoßung keinen Einfluss auf den Verlauf der chronischen Abstoßung nimmt. Hat der Prozess der akuten Abstoßung einmal eingesetzt, kann die chronische Abstoßung nicht mehr verhindert werden. Besonders die am POD 20 in allen drei Gruppen erhöhte Anzahl der CD11a-positiven Leukozyten könnte eine mögliche Rolle in der Entstehung der BO spielen. CD11a, eine Untereinheit des LFA-1 (leukocyte function-associated antigen), ist ein Adhäsionsmolekül an der Leukozytenoberfläche, das eine bedeutende Rolle bei der alloimmunen Immunantwort einnimmt (Springer 1990). Es ist bei der Unterstützung der T-Helferzellfunktion, der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sowie natürlicher Killerzellen und bei der zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt (Springer 1990; Shier et al. 1996). Morikawa et al. (2001) konnte in seiner Studie zeigen, dass ein monoklonaler Antikörper gegen CD11a (Anti-LFA-1 mAB) das Potential hat, sowohl die akute Abstoßungsreaktion zu vermindern als auch die BO zu verzögern (Morikawa et al. 2001). Es lässt sich vermuten, dass eine Erhöhung von CD11a in der akuten Abstoßungsphase eine Kaskade zur Entwicklung der chronischen Abstoßung anregt. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist lediglich, dass das CD11a – Molekül mit einer Tyrosinkinase verbunden ist, welche über die Aktivierung von Phospholipase-C-Gamma-1 zu einer Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium führt (Kanner et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Everolimus-Applikation am POD 14 zwar eine Verminderung CD11a-positiver Leukozyten am POD 30 erreicht werden, vermutlich hat aber die vorausgegangene Erhöhung der CD11a-Moleküle (POD 20) bereits die Kaskade eines chronischen fibroobliterativen Prozesses initiiert, welche sich konsekutiv nicht mehr inhibieren lässt.

Nun stellt sich die Frage, ob eine frühere Gabe von Everolimus, d. h. bereits vor Ausprägung der akuten Abstoßung, einen Effekt auf den Verlauf der chronischen Abstoßung haben könnte. Bezuglich dieser Fragestellung wurden in unserer Arbeitsgruppe unter der Leitung von Frau Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi weitere Versuchsreihen durchgeführt. Everolimus wurde in der gleichen Dosis (2,5mg/kg/d) zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich am POD 0, 7 und 14 bis POD 60 appliziert. Von Süßkind-Schwendi et al. (2012) konnte zeigen, dass weder die frühe Gabe (POD 7 bis 60) noch die spätere Gabe (POD 14 bis 60) Einfluss auf das Fortschreiten der chronischen Abstoßung hatten. Lediglich die Applikation des m-TOR-Inhibitors unmittelbar nach LTx (POD 0 bis 60) konnte das Fortschreiten der BO und vaskulären Sklerose inhibieren. Diese Ergebnisse führen vor Augen, welchen bedeutenden Einfluss der Zeitpunkt der Everolimusapplikation auf den postoperativen Verlauf nimmt.

5 AUSBLICK

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die Gabe des m-TOR-Inhibitors Everolimus durchaus antiproliferative Wirkung auf immunmodulierende Zellen und Fibroblasten zeigte, jedoch langfristig die fibroproliferative Entwicklung einer BO nicht verhindern konnte. Eine höhere Dosis des m-TOR-Inhibitors ist keine Option, da die Toxizität die therapeutische Wirksamkeit limitiert. Eine weitere Möglichkeit stellt der frühzeitige Einsatz von Everolimus nach LTx dar, was in den nachfolgenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde. Von Süßkind-Schwendi et al. (2012) konnte zeigen, dass die unmittelbare postoperative Gabe von Everolimus nach LTx (POD 0-60) das Potenzial hat, die chronische Abstoßung mit einer BO zu inhibieren. In welchem Maß sich diese *in vivo* Ergebnisse auf die klinische Situation übertragen lassen, kann nicht beantwortet werden. Jedoch stellt die frühzeitige Gabe eines m-TOR-Inhibitors beispielsweise im Rahmen einer Triple-Immunsuppression einen vielversprechenden Ansatz dar. Einige Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Frühtherapie mit m-TOR-Inhibitoren nach soliden Organtransplantationen wie Herz-, Lunge-, Niere oder Leber mit vermehrten Wundheilungsstörungen und Nahtinsuffizienzen verbunden sein könnte (Kuppahally et al. 2006, Valente et al. 2003, Groetzner et al. 2004). Kuppahally et al. (2006) zeigte bei herztransplantierten Patienten einen signifikant erhöhten Anteil an Wundheilungsstörungen, Pleura- und Perikardergüssen nach postoperativem Einsatz des m-TOR-Inhibitors Sirolimus als nach immunsuppressiver Therapie mit MMF. Basierend auf seinen Ergebnissen empfiehlt er einen verspäteten Einsatz von m-TOR-Inhibitoren im postoperativen Verlauf nach Abschluss der Wundheilung (Kuppahally et al. 2006). Eine alternative Einsatzmöglichkeit von Everolimus wäre die Kombination mit einer nicht-medikamentösen Therapie der akuten und chronischen Abstoßung nach LTx. Ein Beispiel hierfür wäre die Kombination von Rapamycin mit der extrakorporalen Photophorese, ein seit 1970 etabliertes Verfahren der Photochemotherapie, das bei Leukozyten mittels UVA-Licht (320-400 nm Wellenlänge) und Psoralen (8-Methoxypsoralen) eine Apoptose auslösen kann (Parrish et al. 1974).

Die Gabe von Everolimus in Kombination mit anderen Immunsuppressiva sowie alternativen Verfahren sollte jedoch in weiteren Studien erprobt werden um eine ausreichende Immunsuppression mit geringer Toxizität erreichen zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Für Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium stellt die Lungentransplantation (LTx) oftmals die letzte Therapiemöglichkeit dar. Während das Kurzzeitüberleben der Patienten kaum eingeschränkt ist, überleben nur 56% der lungentransplantierten Patienten das fünfte und nur 26% der Patienten das zehnte postoperative Jahr. Hauptursache für die hohen Mortalitätsraten nach LTx ist die Ausbildung einer chronischen Abstoßung in Form eines Bronchiolitis obliterans Syndroms, dessen Intensität vor allem von dem Schweregrad und der Häufigkeit der vorausgegangenen akuten Abstoßung abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des erst vor einigen Jahren entdeckten m-TOR-Inhibitors Everolimus, welcher die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation von T-Zellen hemmt, auf die chronische Abstoßung untersucht. Dazu wurden in einem an die klinische Situation angelehnten, schwach allogenen Inzuchtmödell ($F344[RT1]^{lV} > WKY[RT1]^l$) der Ratte eine orthotope linksseitige LTx durchgeführt. Die Ratten wurden in drei Gruppen unterteilt, die Gruppe I erhielt keine Immunsuppression, die Gruppe II erhielt MP (10mg/kg i.p.) als Bolus an POD 14 bis 16 und die Gruppe III erhielt Everolimus (2.5mg/kg i.g) kontinuierlich ab POD 14 bis POD 100 zusammen mit MP wie in Gruppe II. Die Tiere in Gruppe II und III erhielten die Immunsuppressiva erst ab POD 14, das heißt nach Ausbildung einer akuten Transplantatabstoßung, so dass der Effekt von Everolimus und MP auf die chronische Abstoßung untersucht werden konnte. Am POD 20, 30, 60 und 100 wurden die Lungen geschnitten, gefärbt und die histologischen Präparate hinsichtlich der Ausprägung der akuten und chronischen Abstoßung ausgewertet. In der ersten Gruppe ohne jegliche immunsuppressive Therapie entwickelte sich in den ersten 14 Tagen eine akute Abstoßungsreaktion, die sich am POD 100 zu dem Vollbild einer chronischen Abstoßung mit obliterativer Bronchiolitis und vaskulärer Sklerose ausgebildet hat. Die zweite Gruppe unter MP verhielt sich ähnlich zu der ersten Gruppe. Die Everolimus-Gruppe (III) zeigte am POD 30 eine signifikant verminderte Anzahl der infiltrierten Lymphozyten (CD11a, CD18), eine insignifikante Reduktion der

Makrophagen (ED1) und einen signifikant verminderen Anteil des aktivierte Endothels (ICAM-1) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Jedoch konnte der chronische Verlauf mit Ausbildung einer Bronchiolitis obliterans nicht verhindert werden. In allen drei Studiengruppen nach allogener LTx zeigte sich nach 100 Tagen die maximale Ausprägung der chronischen Abstoßung mit obliterativer Bronchiolitis und vaskulärer Sklerose. Damit konnte Everolimus - anders als in den Studienergebnissen nach Herz- oder Nierentransplantation - den Verlauf der chronischen Abstoßung nach LTx nicht verzögern oder verhindern.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Åberg, F.; Isoniemi, H.; Höckerstedt, K. (2011): Long-term results of liver transplantation. In: *Scand J Surg* 100 (1), S. 14–21.
2. Atkins, Michael B.; Yasothan, Uma; Kirkpatrick, Peter (2009): Everolimus. In: *Nat Rev Drug Discov* 8 (7), S. 535–536.
3. Azzola, Andrea; Havryk, Adrian; Chhajed, Prashant; Hostettler, Katrin; Black, Judith; Johnson, Peter et al. (2004): Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. In: *Transplantation* 77 (2), S. 275–280.
4. Belperio, John A.; Weigt, S. Samuel; Fishbein, Michael C.; Lynch, Joseph P. (2009): Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. In: *Proc Am Thorac Soc* 6 (1), S. 108–121.
5. Benfield, J. R.; Wain, J. C. (2000): The history of lung transplantation. In: *Chest Surg. Clin. N. Am* 10 (1), S. 189-99, xi.
6. Böhler, T.; Waiser, J.; Budde, K.; Lichter, S.; Jauho, A.; Fritzsche, L. et al. (1998): The in vivo effect of rapamycin derivative SDZ RAD on lymphocyte proliferation. In: *Transplant. Proc* 30 (5), S. 2195–2197.
7. Borro, J. M.; Solé, A.; La Torre, M. de; Pastor, A.; Tarazona, V. (2005): Steroid withdrawal in lung transplant recipients. In: *Transplant. Proc* 37 (9), S. 3991–3993.
8. Budde, Klemens; Becker, Thomas; Arns, Wolfgang; Sommerer, Claudia; Reinke, Petra; Eisenberger, Ute et al. (2011): Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. In: *Lancet* 377 (9768), S. 837–847.
9. Chapman, J. R.; Valantine, H.; Albanell, J.; Arns, W. A.; Campistol, J. M.; Eisen, H. et al. (2007): Proliferation signal inhibitors in transplantation:

- questions at the cutting edge of everolimus therapy. In: *Transplant. Proc* 39 (10), S. 2937–2950.
10. Christie, Jason D.; Edwards, Leah B.; Aurora, Paul; Dobbels, Fabienne; Kirk, Richard; Rahmel, Axel O. et al. (2008): Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report--2008. In: *J. Heart Lung Transplant* 27 (9), S. 957–969.
 11. Dalton, M. L. (1995): The first lung transplantation. In: *Ann. Thorac. Surg* 60 (5), S. 1437–1438.
 12. Dandel, Michael; Lehmkuhl, Hans Brendan; Knosalla, Christoph; Hetzer, Roland (2010): Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. In: *Transpl. Immunol* 23 (3), S. 93–103.
 13. Davis, R. D.; Pasque, M. K. (1995): Pulmonary transplantation. In: *Ann. Surg* 221 (1), S. 14–28.
 14. Deblon, N.; Bourgoin, L.; Veyrat-Durebex, C.; Peyrou, M.; Vinciguerra, M.; Caillon, A. et al. (2011): Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. In: *Br. J. Pharmacol.*
 15. Dijkstra, C. D.; Döpp, E. A.; Joling, P.; Kraal, G. (1985): The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. In: *Immunology* 54 (3), S. 589–599.
 16. Eisen, Howard J.; Tuzcu, E. Murat; Dorent, Richard; Kobashigawa, Jon; Mancini, Donna; Valantine-von Kaeppeler, Hannah A. et al. (2003): Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. In: *N. Engl. J. Med* 349 (9), S. 847–858.
 17. Estenne, Marc; Hertz, Marshall I. (2002): Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 166 (4), S. 440–444.

-
18. Expósito, Victor; Prada, Jose A. Vázquez de; Gómez-Román, Jose J.; González-Vilchez, Francisco; Llano-Cardenal, Miguel; García-Camarero, Tamara et al. (2008): Everolimus-related pulmonary toxicity in heart transplant recipients. In: *J. Heart Lung Transplant* 27 (7), S. 797–800.
 19. Farb, Andrew; John, Michael; Acampado, Eduardo; Kolodgie, Frank D.; Prescott, Margaret Forney; Virmani, Renu (2002): Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. In: *Circulation* 106 (18), S. 2379–2384.
 20. Galon, Jerome; Franchimont, Denis; Hiroi, Naoki; Frey, Gregory; Boettner, Antje; Ehrhart-Bornstein, Monika et al. (2002): Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. In: *FASEB J* 16 (1), S. 61–71.
 21. Genden, Eric M.; Boros, Peter; Liu, Jianhua; Bromberg, Jonathan S.; Mayer, Lloyd (2002): Orthotopic tracheal transplantation in the murine model. In: *Transplantation* 73 (9), S. 1420–1425.
 22. Gomez, C.; Reynaud-Gaubert, M. (2010): Résultats à long terme de la greffe pulmonaire. In: *Rev Pneumol Clin* 67 (1), S. 64–73.
 23. Groetzner, Jan; Kur, Felix; Spelsberg, Fritz; Behr, Jurgen; Frey, Lorenz; Bittmann, Iris et al. (2004): Airway anastomosis complications in de novo lung transplantation with sirolimus-based immunosuppression. In: *J. Heart Lung Transplant* 23 (5), S. 632–638.
 24. Grube, Eberhard; Bülfesfeld, Lutz (2002): Initial experience with paclitaxel-coated stents. In: *J Interv Cardiol* 15 (6), S. 471–475.
 25. Hachem, Ramsey R. (2009): Lung allograft rejection: diagnosis and management. In: *Curr Opin Organ Transplant* 14 (5), S. 477–482.
 26. Hashiani, Amir Almasi; Rajaeefard, Abdolreza; Hasanzadeh, Jafar; Kakaei, Farzad; Behbahan, Afshin Ghalehgolab; Nikeghbalian, Saman et al. (2010): Ten-year graft survival of deceased-donor kidney transplantation: a single-center experience. In: *Ren Fail* 32 (4), S. 440–447.
 27. Hausen, B.; Boeke, K.; Berry, G. J.; Christians, U.; Schüler, W.; Morris, R. E. (2000): Successful treatment of acute, ongoing rat lung allograft rejection with

- the novel immunosuppressant SDZ-RAD. In: Ann. Thorac. Surg 69 (3), S. 904–909.
28. Hausen, B.; Boeke, K.; Berry, G. J.; Segarra, I. T.; Christians, U.; Morris, R. E. (1999): Suppression of acute rejection in allogeneic rat lung transplantation: a study of the efficacy and pharmacokinetics of rapamycin derivative (SDZ RAD) used alone and in combination with a microemulsion formulation of cyclosporine. In: J. Heart Lung Transplant 18 (2), S. 150–159.
29. Hentges, K. E.; Sirry, B.; Gingeras, A. C.; Sarbassov, D.; Sonenberg, N.; Sabatini, D.; Peterson, A. S. (2001): FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98 (24), S. 13796–13801.
30. Hertz, M. I.; Jessurun, J.; King, M. B.; Savik, S. K.; Murray, J. J. (1993): Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. In: Am. J. Pathol 142 (6), S. 1945–1951.
31. Hirt, S. W.; You, X. M.; Möller, F.; Boeke, K.; Ernst, M.; Starke, M. et al. (1998): Early treatment of acute rejection prevents chronic rejection in a rat model of allogenic left lung transplantation. In: Transplant. Proc 30 (4), S. 1005–1006.
32. Hirt, S. W.; You, X. M.; Möller, F.; Boeke, K.; Starke, M.; Spranger, U.; Wottge, H. U. (1999): Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: implication of acute rejection and the time point of treatment. In: J. Heart Lung Transplant 18 (6), S. 542–548.
33. Hirt, Stephan W. (2003): Tierexperimentelle Untersuchungen zur Rolle spezifischer und unspezifischer Einflussfaktoren bei der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge. Univ., Habil.-Schr.--Kiel, 2003.
34. Hussar, D. A. (2000): New drugs of 1999. In: J Am Pharm Assoc (Wash) 40 (2), S. 181-221; quiz 323-7.
35. Jungraithmayr, W.; Vogt, P.; Inci, I.; Hillinger, S.; Arni, S.; Korom, S.; Weder, W. (2010): A model of chronic lung allograft rejection in the rat. In: Eur. Respir. J 35 (6), S. 1354–1363.

-
36. Junqueira, Luiz Carlos Uchôa; Carneiro, José (2005): Histologie. Mit 17 Tabellen ; [neue Approbationsordnung]. 6., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. Hg. v. Manfred Gratzl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
 37. Kaiser, Hanns; Kley, Hans Kuno; Andus, Tilo (Hg.) (2002): Cortisontherapie. Corticoide in Klinik und Praxis ; 48 Tabellen. 11., neu bearb. Stuttgart ; New York: Thieme.
 38. Kanner, S. B.; Grosmaire, L. S.; Ledbetter, J. A.; Damle, N. K. (1993): Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90 (15), S. 7099–7103.
 39. Kawahara, Toshiyasu; Asthana, Sonal; Kneteman, Norman M. (2011): m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation? In: J. Hepatol 55 (6), S. 1441–1451.
 40. Kessler, Michèle; Jay, Nicolas; Molle, Rachel; Guillemain, Francis (2006): Excess risk of cancer in renal transplant patients. In: Transpl. Int 19 (11), S. 908–914.
 41. Kim, Myoung Soo; Park, Jehyun; Ha, Hunjoo; Kim, Yu Seun; Kang, Shin-Wook; Jeong, Hyeyon Joo et al. (2004): Rapamycin inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen, but not fibronectin, synthesis in rat mesangial cells. In: Yonsei Med. J 45 (6), S. 1121–1126.
 42. Kirby, T. J.; Mehta, A. (1992): Lung transplantation: state of the art. In: Appl Cardiopulm Pathophysiol 4 (4), S. 263–271.
 43. Knoop, C.; Haverich, A.; Fischer, S. (2004): Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. In: Eur. Respir. J 23 (1), S. 159–171.
 44. Koch, Martina (2009): Everolimus in liver and lung transplantation. In: Drugs Today 45 (1), S. 11–20.
 45. Kountz, S. L.; Rao, T. K.; Butt, K. H. (1975): The efficacy of bolus doses of intravenous methylprednisolone (MPIV) in the treatment of acute renal allograft rejection. In: Transplant. Proc 7 (1), S. 73–77.

46. Kovarik, John M.; Kaplan, Bruce; Tedesco Silva, Hélio; Kahan, Barry D.; Dantal, Jacque; Vitko, Stefan et al. (2002): Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. In: *Transplantation* 73 (6), S. 920–925.
47. Krukemeyer, Manfred; Lison, Arno E. (2006): *Transplantationsmedizin. Ein leitfaden für den praktiker.* Berlin ;, New York: W. de Gruyter.
48. Kühnel, Wolfgang (2002): *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.* 11., komplett überarb. und erg. Stuttgart: Thieme.
49. Kuppahally, S.; Al-Khaldi, A.; Weisshaar, D.; Valentine, H. A.; Oyer, P.; Robbins, R. C.; Hunt, S. A. (2006): Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. In: *Am. J. Transplant* 6 (5 Pt 1), S. 986–992.
50. Kuypers, Dirk R. J.; Vanrenterghem, Y. C. (2002): Tailoring immunosuppressive therapy. In: *Nephrol. Dial. Transplant* 17 (12), S. 2051–2054.
51. Land, Walter Gottlieb (2006): *Immunsuppressive Therapie.* Stuttgart: Thieme.
52. Lovric, Svjetlana; Kielstein, Jan T.; Kayser, Daniel; Bröcker, Verena; Becker, Jan U.; Hiss, Marcus et al. (2011): Combination of everolimus with calcineurin inhibitor medication resulted in post-transplant haemolytic uraemic syndrome in lung transplant recipients--a case series. In: *Nephrol. Dial. Transplant* 26 (9), S. 3032–3038.
53. Lüllmann-Rauch, Renate (2003): *Histologie. Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen.* Stuttgart [u.a.]: Thieme.
54. Lüllmann-Rauch, Renate (2006): *Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen.* 2., komplett überarb. Stuttgart: Thieme.
55. Lutz, Jens; Zou, Hequn; Liu, Shanying; Antus, Balazs; Heemann, Uwe (2003): Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. In: *Transplantation* 76 (3), S. 508–515.
56. Manger, Bernhard (2004): *Ciclosporin in der Rheumatologie.* Stuttgart: Thieme.

-
57. Maron, Martin S.; Kalsmith, Benjamin M.; Udelson, James E.; Li, Wenjun; DeNofrio, David (2010): Survival after cardiac transplantation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circ Heart Fail* 3 (5), S. 574–579.
 58. Martinu, Tereza; Howell, David N.; Palmer, Scott M. (2010): Acute cellular rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. In: *Semin Respir Crit Care Med* 31 (2), S. 179–188.
 59. Matsumura Y; Marchevsky A.; Zuo XJ; Kass RM; Matloff JM; Jordan SC. (1995): Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. In: *Transplantation* 59 (11), S. 1509–1517.
 60. Meyers, B. F.; Lynch, J.; Trulock, E. P.; Guthrie, T. J.; Cooper, J. D.; Patterson, G. A. (1999): Lung transplantation: a decade of experience. In: *Ann. Surg* 230 (3), S. 362-70; discussion 370-1.
 61. Morikawa, M.; Brazelton, T. R.; Berry, G. J.; Morris, R. E. (2001): Prolonged inhibition of obliterative airway disease in murine tracheal allografts by brief treatment with anti-leukocyte function-associated antigen-1 (CD11a) monoclonal antibody. In: *Transplantation* 71 (11), S. 1616–1621.
 62. Nashan, Björn (2002): Review of the proliferation inhibitor everolimus. In: *Expert Opin Investig Drugs* 11 (12), S. 1845–1857. Online verfügbar unter <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1517/13543784.11.12.1845>.
 63. Otton, James; Hayward, Christopher S.; Keogh, Anne M.; Glanville, Allan R.; Macdonald, Peter S. (2009): Everolimus-associated pneumonitis in 3 heart transplant recipients. In: *J. Heart Lung Transplant* 28 (1), S. 104–106.
 64. Park, S. J.; Nguyen, D. Q.; Savik, K.; Hertz, M. I.; Bolman, R. M. (2001): Pre-transplant corticosteroid use and outcome in lung transplantation. In: *J. Heart Lung Transplant* 20 (3), S. 304–309.
 65. Parrish, J. A.; Fitzpatrick, T. B.; Tanenbaum, L.; Pathak, M. A. (1974): Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. In: *N. Engl. J. Med* 291 (23), S. 1207–1211.

66. Ponticelli, Claudio; Salvadori, Maurizio; Scolari, Maria Piera; Citterio, Franco; Rigotti, Paolo; Veneziano, Antonella; Bartezaghi, Marta (2011): Everolimus and minimization of cyclosporine in renal transplantation: 24-month follow-up of the EVEREST study. In: *Transplantation* 91 (10), S. e72–3.
67. Reichart, Bruno; Bittmann, Iris (Hg.) (1995): Lungentransplantationen. Bern [u.a.]: Huber.
68. Sacks, S. H. (1999): Rapamycin on trial. In: *Nephrol. Dial. Transplant* 14 (9), S. 2087–2089.
69. Salminen, U. S.; Maasilta, P. K.; Taskinen, E. I.; Alho, H. S.; Ikonen, T. S.; Harjula, A. L. (2000): Prevention of small airway obliteration in a swine heterotopic lung allograft model. In: *J. Heart Lung Transplant* 19 (2), S. 193–206.
70. Sandhu, Lakhbir; Sandroussi, Charbel; Guba, Markus; Selzner, Markus; Ghanekar, Anand; Cattral, Mark S. et al. (2011): Live donor versus deceased donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Comparable survival and recurrence. In: *Liver Transpl.*
71. Santillán-Doherty, Patricio; Jasso-Victoria, Rogelio; Olmos-Zúñiga, Raúl; Sotres-Vega, Avelina; Argote-Greene, Luis Marcelo; Escalante-Tattersfield, Tomás; Villalba-Caloca, Jaime (2005): Trasplante de pulmón. In: *Rev. Invest. Clin* 57 (2), S. 350–357.
72. Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Munck, A. U. (2000): How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. In: *Endocr. Rev* 21 (1), S. 55–89.
73. Sato, M.; Liu, M.; Anraku, M.; Ogura, T.; D'Cruz, G.; Alman, B. A. et al. (2008): Allograft airway fibrosis in the pulmonary milieu: a disorder of tissue remodeling. In: *Am. J. Transplant* 8 (3), S. 517–528.
74. Saunders, R. N.; Metcalfe, M. S.; Nicholson, M. L. (2001): Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. In: *Kidney Int* 59 (1), S. 3–16.

-
75. Schreiber, S. L.; Liu, J.; Albers, M. W.; Karmacharya, R.; Koh, E.; Martin, P. K. et al. (1991): Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways. In: *Transplant. Proc.* 23 (6), S. 2839–2844.
76. Schuler, W.; Sedrani, R.; Cottens, S.; Häberlin, B.; Schulz, M.; Schuurman, H. J. et al. (1997): SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. In: *Transplantation* 64 (1), S. 36–42.
77. Schuurman, H. J.; Cottens, S.; Fuchs, S.; Joergensen, J.; Meerloo, T.; Sedrani, R. et al. (1997): SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. In: *Transplantation* 64 (1), S. 32–35.
78. Schuurman, H. J.; Pally, C.; Weckbecker, G.; Schuler, W.; Bruns, C. (1999): SDZ RAD inhibits cold ischemia-induced vascular remodeling. In: *Transplant. Proc.* 31 (1-2), S. 1024–1025.
79. Sehgal, S. N. (2003): Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. In: *Transplant. Proc.* 35 (3 Suppl), S. 7S-14S.
80. Sharples, Linda D.; McNeil, Keith; Stewart, Susan; Wallwork, John (2002): Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. In: *J. Heart Lung Transplant* 21 (2), S. 271–281.
81. Shier, P.; Otulakowski, G.; Ngo, K.; Panakos, J.; Chourmouzis, E.; Christjansen, L. et al. (1996): Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the beta2 integrin leukocyte function-associated antigen-1. In: *J. Immunol* 157 (12), S. 5375–5386.
82. Simler, N. R.; Howell, D. C. J.; Marshall, R. P.; Goldsack, N. R.; Hasleton, P. S.; Laurent, G. J. et al. (2002): The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. In: *Eur. Respir. J* 19 (6), S. 1124–1127.
83. Snell, G. I.; Valentine, V. G.; Vitulo, P.; Glanville, A. R.; McGiffin, D. C.; Loyd, J. E. et al. (2006): Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial. In: *Am. J. Transplant* 6 (1), S. 169–177.

84. Snell, Gregory I.; Westall, Glen P. (2007): Immunosuppression for lung transplantation: evidence to date. In: Drugs 67 (11), S. 1531–1539.
85. Sobotta, Johannes; Welsch, Ulrich (2005): Atlas Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; 15 Tabellen. 7. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
86. Springer, T. A. (1990): Adhesion receptors of the immune system. In: Nature 346 (6283), S. 425–434.
87. Stewart, Susan; Fishbein, Michael C.; Snell, Gregory I.; Berry, Gerald J.; Boehler, Annette; Burke, Margaret M. et al. (2007): Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. In: J. Heart Lung Transplant 26 (12), S. 1229–1242.
88. Süßkind-Schwendi, M. von; Ruemmele, P.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2012): Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. In: Experimental lung research 38 (3), S. 111–123.
89. Todd, Jamie L.; Palmer, Scott M. (2011): Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. In: Chest 140 (2), S. 502–508.
90. Toronto Lung Transplant Group (1986): Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. In: N. Engl. J. Med 314 (18), S. 1140–1145.
91. Trulock, E. P. (1993): Management of lung transplant rejection. In: Chest 103 (5), S. 1566–1576.
92. Trulock, E. P. (1997): Lung transplantation. In: Am. J. Respir. Crit. Care Med 155 (3), S. 789–818.
93. Trulock, Elbert P.; Edwards, Leah B.; Taylor, David O.; Boucek, Mark M.; Keck, Berkeley M.; Hertz, Marshall I. (2006): Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report--2006. In: J. Heart Lung Transplant 25 (8), S. 880–892.

-
94. Umland, Shelby P.; Schleimer, Robert P.; Johnston, Sebastian L. (2002): Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. In: *Pulm Pharmacol Ther* 15 (1), S. 35–50.
 95. Valente, John F.; Hricik, Donald; Weigel, Kelly; Seaman, David; Knauss, Thomas; Siegel, Christopher T. et al. (2003): Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. In: *Am. J. Transplant* 3 (9), S. 1128–1134.
 96. van der Poel, H. G.; Hanrahan, C.; Zhong, H.; Simons, J. W. (2003): Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. In: *Urol. Res* 30 (6), S. 380–386.
 97. Vilella-Bach, M.; Nuzzi, P.; Fang, Y.; Chen, J. (1999): The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. In: *J. Biol. Chem* 274 (7), S. 4266–4272.
 98. Vítko, Stefan; Margreiter, Raimund; Weimar, Willem; Dantal, Jacques; Viljoen, Hendrik G.; Li, Yulan et al. (2004): Everolimus (Certican) 12-month safety and efficacy versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant recipients. In: *Transplantation* 78 (10), S. 1532–1540.
 99. Walker, Jennifer K.; Alloway, Rita R.; Roy-Chaudhury, Prabir; Mogilishetty, Gautham; Cardi, Michael A.; Weimert, Nicole A. et al. (2009): A prospective trial of a steroid-free/calcineurin inhibitor minimization regimen in human leukocyte antigen (HLA)-identical live donor renal transplantation. In: *Transplantation* 87 (3), S. 408–414.
 100. Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (Hg.) (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
 101. Welsch, Ulrich; Sobotta, Johannes (op. 2003): Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. München: Urban & Fischer.
 102. Wood, Steven C.; Bushar, Grace; Tesfamariam, Belay (2006): Inhibition of mammalian target of rapamycin modulates expression of adhesion molecules in endothelial cells. In: *Toxicol. Lett* 165 (3), S. 242–249.

103. Yousem, S. A. (1993): Lymphocytic bronchitis/bronchiolitis in lung allograft recipients. In: Am. J. Surg. Pathol 17 (5), S. 491–496.
104. Yousem, S. A.; Berry, G. J.; Cagle, P. T.; Chamberlain, D.; Husain, A. N.; Hruban, R. H. et al. (1996): Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. In: J. Heart Lung Transplant 15 (1 Pt 1), S. 1–15.
105. Zou, H.; Bai, J.; Lai, D. (1999): [Efficacy of 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin in preventing chronic renal allograft rejection in rats]. In: Zhonghua Nei Ke Za Zhi 38 (12), S. 810–813.

8 ANHANG

8.1 Messwerte

Im Folgenden sind alle histologischen Messwerte dieser Studie tabellarisch aufgeführt, welche als Grundlagenmaterial zur Erstellung der abgebildeten Grafiken in der vorliegenden Arbeit dienten. Bezüglich der Ermittlung der einzelnen Daten siehe den Abschnitt Material und Methoden (Kapitel 2).

Tabelle 8.1 A – C: Auswertung der Grade der akuten und chronischen Abstoßung gemäß ISHLT der 0-Kontrolle (A), der MP-Gruppe (Gruppe II) (B) sowie der RAD-Gruppe (Gruppe III) (C).

A	ISHLT-Klassifikation der Gruppe I (0-Kontrolle)				
Linke Lunge	Tier	A	B	C	D
Tag 5	FW1- 23	0	0,5	0	0
	FW1- 24	0	0	0	0
	FW1- 25	0	1	0	0
	FW1- 26	0	0	0	0
	FW1- 27	0	0	0	0
	Mittelwert	0	0,3	0	0
	STABW	0	0,4	0	0
Tag 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FW1- 19	2,5	2	0	0
	FW1- 20	1	3	0	0
	FW1- 21	3,5	3,5	0	0
	FW1- 22	3	3	0	0
	Mittelwert	2,5	2,9	0	0
	STABW	1,1	0,6	0	0
Tag 30	FW1- 13	3	2	1,5	1
	FW1- 14	2	3	2	2
	FW1- 15	2	2	3	3
	FW1- 16	1	2,5	3	2
	FW1- 17	2	3	2	2
	Mittelwert	2	2,5	2,3	2
	STABW	0,7	0,5	0,7	0,7
Tag 60	FW1- 07	0	0	3,5	3,5
	FW1- 08	1	2	3,5	3
	FW1- 09	2,5	2	3	3
	FW1- 11	0	0	4	3,5
	FW1- 12	0	0	3	3
	Mittelwert	0,7	0,8	3,4	3,2
	STABW	1,1	1,1	0,4	0,3
Tag 100	FW1- 02	0	0	3,5	3,5
	FW1- 03	0	0	2	1
	FW1- 04	0	0	3	3
	FW1- 06	0	0	3	3
	FW1- 10	0	0	4	4
	Mittelwert	0	0	3,1	2,9
	STABW	0	0	0,7	1,1
Tag 100 SYN	WW1- 01	0	0	0	0
	WW1- 03	0	0	0	0
	WW1- 04	0	0	0	0
	WW1- 05	0	0	0	0
	WW1- 07	0	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0	0
	STABW	0	0	0	0

B ISHLT-Klassifikation der Gruppe II (MP-Gruppe)		A	B	C	D
Linke Lunge	Tier				
Tag 20	FW1- 47	3	2,5	2	1,5
	FW1- 68	3	2,5	1	1
	FW1- 69	2,5	1	n.a.	n.a.
	FW1- 70	2	2	2,5	3
	FW1- 71	3	2	n.a.	n.a.
	Mittelwert	2,7	2	1,8	1,8
	STABW	0,4	0,6	0,8	1
Tag 30	FW1- 38	1	1	2	3
	FW1- 39	2	n.a.	n.a.	1,5
	FW1- 40	2	1	3	3
	FW1- 41	2	2	2	2
	FW1- 42	1,5	n.a.	2,5	3
	Mittelwert	1,7	1,3	2,4	2,5
	STABW	0,4	0,6	0,5	0,7
Tag 60	FW1- 33	0,5	0,5	3,5	3,5
	FW1- 34	0,5	0	3	3
	FW1- 35	0	0,5	4	4
	FW1- 36	1	0	3	3
	FW1- 37	0	0	2,5	3
	Mittelwert	0,4	0,2	3,2	3,3
	STABW	0,4	0,3	0,6	0,4
Tag 100	FW1- 28	0	0	3	3
	FW1- 29	0	0	4	4
	FW1- 30	0	0	4	4
	FW1- 31	0	0	3	3
	FW1- 32	0	0	4	4
	Mittelwert	0	0	3,6	3,6
	STABW	0	0	0,5	0,5
Tag 100 SYN	WW1- 08	0	0	0	0
	WW1- 09	0	0	0	0
	WW1- 10	0	0	0	0
	WW1- 11	0	0	0	0
	WW1- 12	0	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0	0
	STABW	0	0	0	0

C ISHLT-Klassifikation der Gruppe III (RAD-Gruppe)					
Linke Lunge	Tier	A	B	C	D
Tag 20	FW1- 220	2,5	3	n.a.	1
	FW1- 221	3	3	0	0,5
	FW1- 222	3	4	0	1
	FW1- 223	3	3	0	1,5
	FW1- 224	2,5	3	0	1,5
	Mittelwert	2,8	3,2	0	1,1
	STABW	0,3	0,4	0	0,4
Tag 30	FW1- 205	1	1,5	3	2,5
	FW1- 206	2	1,5	3	2
	FW1- 207	2	2	3,5	3
	FW1- 208	2,5	3,5	n.a.	1
	FW1- 209	1,5	n.a.	3	2,5
	Mittelwert	1,8	2,1	3,1	2,2
	STABW	0,6	0,9	0,3	0,8
Tag 60	FW1- 215	1,5	1,5	3,5	3
	FW1- 216	2	2	3,5	2,5
	FW1- 217	1,5	1,5	3,5	3
	FW1- 218	1,5	1,5	3	3,5
	FW1- 219	1	1	3,5	3
	Mittelwert	1,5	1,5	3,4	3
	STABW	0,4	0,4	0,2	0,4
Tag 100	FW1- 210	0,5	n.a.	4	3,5
	FW1- 211	2	2	3	3
	FW1- 212	0	n.a.	4	3,5
	FW1- 213	2,5	2	3,5	3
	FW1- 214	0	0	4	4
	Mittelwert	1	1,3	3,7	3,4
	STABW	1,2	1,2	0,4	0,4
Tag 100 SYN	WW1- 50	0	0	0	0
	WW1- 51	2	0,5	0	0
	WW1- 52	0	0	0	0
	WW1- 53	0	0	0	0
	WW1- 54	0	0	0	0
	Mittelwert	0,4	0,1	0	0
	STABW	0,9	0,2	0	0

Tabelle 8.2 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe I (0-Kontrolle) für die Marker ED1 (A), CD11a (B), CD18 (C), ICAM-1 (D) und P-Selektin (E)

Gruppe I: ED1										Gruppe I: ED1										
A	Rechte Lunge	Tier				Mittelwert einzeln		Stabw		Linke Lunge				Tier				Mittelwert einzeln		Stabw
		1	2	3	4	5				POD 5	FW1- 23	FW1- 24	FW1- 25	FW1- 26	FW1- 27	FW1- 28	FW1- 29	FW1- 30	FW1- 31	
POD 5	FW1- 23	17	22	17	16	20	18,4	2,5099801		POD 5	FW1- 23	22	22	20	23	18	21	21	21	2
	FW1- 24	18	17	22	23	16	19,2	3,1144823			FW1- 24	24	25	19	21	22	22	22	22	2,3874673
	FW1- 25	13	17	20	24	20	18,8	4,0866633			FW1- 25	22	20	17	16	18	18	18	18	2,4083189
	FW1- 26	14	18	19	20	18	17,8	2,2803509			FW1- 26	23	20	18	21	17	19,8	19,8	19,8	2,3874673
	FW1- 27	16	18	22	20	23	19,8	2,8635642			FW1- 27	24	25	28	24	23	24,8	24,8	24,8	1,9235384
	Messergebnisse				18,8	0,761577					Messergebnisse				21,28	2,381596				
POD 15	FW1- 18	15	16	18	17	14	16	1,5811388		POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FW1- 19	17	14	18	21	24	18,8	3,8340579			FW1- 19	30	35	32	28	33	31,6	31,6	31,6	2,7018512
	FW1- 20	19	18	21	16	14	17,6	2,7018512			FW1- 20	34	38	29	32	34	33,4	33,4	33,4	3,2863353
	FW1- 21	18	17	23	21	19	19,6	2,4083189			FW1- 21	31	34	28	36	27	31,2	31,2	31,2	3,8340579
	FW1- 22	17	20	18	17	22	18,8	2,1679483			FW1- 22	34	35	40	31	30	34	34	34	3,9370039
	Messergebnisse				18,16	1,402854					Messergebnisse				32,55	1,360147				
POD 30	FW1- 13	18	17	24	22	20	20,2	2,8635642		POD 30	FW1- 13	37	42	40	41	40	40	40	40	1,8708287
	FW1- 14	19	23	18	17	20	19,4	2,3021729			FW1- 14	30	32	33	28	34	31,4	31,4	31,4	2,4083189
	FW1- 15	21	17	20	18	22	19,6	2,0736441			FW1- 15	33	37	40	42	38	38	38	38	3,391165
	FW1- 16	20	18	17	24	16	19	3,1622777			FW1- 16	30	28	29	32	34	30,6	30,6	30,6	2,4083189
	FW1- 17	17	19	25	20	20	20,2	2,9498762			FW1- 17	42	38	40	33	37	38	38	38	3,391165
	Messergebnisse				19,68	0,521536					Messergebnisse				35,6	4,28719				
POD 60	FW1- 07	16	15	18	17	17	16,6	1,1401754		POD 60	FW1- 07	27	24	20	28	27	25,2	25,2	25,2	3,2710854
	FW1- 08	17	20	22	21	18	19,6	2,0736441			FW1- 08	34	30	33	38	27	32,4	32,4	32,4	4,1593269
	FW1- 09	21	18	24	23	20	21,2	2,3874673			FW1- 09	30	28	27	32	26	28,6	28,6	28,6	2,4083189
	FW1- 11	17	14	16	18	21	17,2	2,5884358			FW1- 11	30	32	28	27	30	29,4	29,4	29,4	1,9493589
	FW1- 12	14	18	22	17	18	17,8	2,8635642			FW1- 12	30	24	26	27	27	26,8	26,8	26,8	2,1679483
	Messergebnisse				18,48	1,889974					Messergebnisse				28,48	2,729835				
POD 100	FW1- 02	17	16	20	18	18	17,8	1,4832397		POD 100	FW1- 02	27	28	32	31	29	29,4	29,4	29,4	2,0736441
	FW1- 03	18	16	18	22	20	18,8	2,2803509			FW1- 03	29	30	34	32	34	31,8	31,8	31,8	2,2803509
	FW1- 04	19	20	16	18	15	17,6	2,0736441			FW1- 04	27	28	30	31	29	29	29	29	1,5811388
	FW1- 06	18	17	21	14	17	17,4	2,5099801			FW1- 06	32	31	29	36	34	32,4	32,4	32,4	2,7018512
	FW1- 10	21	19	17	18	15	18	2,2360688			FW1- 10	34	37	36	40	38	37	37	37	2,2360688
	Messergebnisse				17,92	0,54037					Messergebnisse				31,92	3,19875				
POD 100	WW1- 01	18	17	15	19	19	17,6	1,6733201		POD 100	WW1- 01	16	14	18	20	21	17,8	17,8	17,8	2,8635642
SYN	WW1- 03	23	20	21	19	18	20,2	1,9235384			WW1- 03	22	24	17	18	18	19,6	19,6	19,6	3,2093613
	WW1- 04	17	18	14	16	18	16,6	1,6733201			WW1- 04	16	17	14	15	15	15,4	15,4	15,4	1,1401754
	WW1- 05	23	22	19	20	18	20,4	2,0736441			WW1- 05	17	14	18	21	20	18	18	18	2,7386128
	WW1- 07	18	19	18	17	21	18,6	1,51665751			WW1- 07	14	13	16	15	17	15	15	15	1,5811388
	Messergebnisse				18,68	1,640732					Messergebnisse				17,16	1,925617				

B										Gruppe I: CD11a									
Rechte Lunge	Tier	Mittelwert einzeln					Linke Lunge	Tier	Mittelwert einzeln					Stabw					
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5						
POD 5	FW1- 23	25	27	32	28	24	27,2	3,1144823	POD 5	FW1- 23	34	41	43	38	39	39	3,391165		
	FW1- 24	28	25	20	24	30	25,4	3,8470768		FW1- 24	43	38	46	44	35	41,2	4,5497253		
	FW1- 25	28	30	27	26	30	28,2	1,7888544		FW1- 25	40	37	38	24	32	34,2	6,4187226		
	FW1- 26	28	30	24	23	22	25,4	3,4351128		FW1- 26	42	41	38	34	44	39,8	3,8987177		
	FW1- 27	29	28	24	30	32	28,6	2,9864794		FW1- 27	34	36	38	35	39	36,4	2,0736441		
	Messergebnisse										Messergebnisse					38,12	2,802142		
POD 15	FW1- 18	24	26	25	34	30	27,8	4,1472883	POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
	FW1- 19	23	24	18	26	28	23,8	3,76882887		FW1- 19	47	38	50	56	57	49,6	7,7006493		
	FW1- 20	24	27	33	32	29	29	3,6742346		FW1- 20	54	50	47	58	60	53,8	5,4037024		
	FW1- 21	30	34	32	28	31	31	2,2360668		FW1- 21	68	70	69	58	71	67,2	5,2630789		
	FW1- 22	33	28	30	24	23	27,6	4,1593269		FW1- 22	58	47	60	63	65	58,6	7,0213959		
	Messergebnisse										Messergebnisse					57,3	7,555131		
POD 30	FW1- 13	27	28	24	33	27	27,8	3,2710854	POD 30	FW1- 13	68	70	60	64	60	64,4	4,5607017		
	FW1- 14	26	24	30	31	31	28,4	3,2093613		FW1- 14	58	48	47	60	53	53,2	5,8051701		
	FW1- 15	30	34	26	28	27	29	3,1622777		FW1- 15	59	64	63	49	58	58,6	5,9413803		
	FW1- 16	23	24	25	33	30	27	4,3011626		FW1- 16	66	64	58	67	53	61,6	5,9413803		
	FW1- 17	33	28	31	26	25	28,6	3,3615473		FW1- 17	58	50	47	60	52	53,4	5,4589376		
	Messergebnisse										Messergebnisse					58,24	4,954594		
POD 60	FW1- 07	17	24	16	28	27	22,4	5,5946403	POD 60	FW1- 07	34	32	27	34	44	34,2	6,1806149		
	FW1- 08	28	24	32	26	27	27,4	2,9864794		FW1- 08	41	43	50	38	36	41,6	5,4129474		
	FW1- 09	20	23	30	31	27	26,2	4,6583259		FW1- 09	30	34	38	42	44	37,6	5,7271284		
	FW1- 11	24	27	30	34	24	27,8	4,2661458		FW1- 11	41	51	52	38	35	43,4	7,7006493		
	FW1- 12	30	28	24	24	29	27	2,8284271		FW1- 12	53	47	38	39	45	44,4	6,1481705		
	Messergebnisse										Messergebnisse					40,24	4,260047		
POD 100	FW1- 02	27	24	26	30	31	27,6	2,8809721	POD 100	FW1- 02	41	44	50	38	34	41,4	6,0063004		
	FW1- 03	28	20	25	24	27	24,8	3,1144823		FW1- 03	53	48	38	42	44	45	5,7445626		
	FW1- 04	26	21	18	24	25	22,8	3,2710854		FW1- 04	37	44	45	35	37	39,6	4,5607017		
	FW1- 06	28	27	25	30	24	26,8	2,3874673		FW1- 06	38	37	42	35	34	37,2	3,1144823		
	FW1- 10	27	25	24	25	28	25,8	1,6431677		FW1- 10	33	35	37	41	37	36,6	2,9864794		
	Messergebnisse										Messergebnisse					39,96	3,409985		
SYN	WW1- 01	22	26	21	24	29	24,4	3,2093613	POD 100	WW1- 01	27	24	30	32	28	28,2	3,0331502		
	WW1- 03	27	32	28	25	22	26,8	3,7013511		SYN	24	23	30	28	25,6	3,2093613			
	WW1- 04	27	28	29	23	25	26,4	2,4083189		WW1- 04	23	21	28	27	26	25	2,9154759		
	WW1- 05	29	28	23	22	24	25,2	3,1144823		WW1- 05	27	26	20	29	25,6	3,3615473			
	WW1- 07	20	24	30	28	26	25,6	3,8470768		WW1- 07	27	28	24	20	24,6	3,1304952			
	Messergebnisse										Messergebnisse					25,8	1,407125		

Gruppe I: CD 18																	
C	Rechte Lunge	Tier	Mittelwert einzeln					Linke Lunge	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw	
			1	2	3	4	5										
POD 5	FW1- 23	36	32	33	31	33	33	1,8708287	POD 5	FW1- 23	47	48	33	36	37	40,2	6,8337398
	FW1- 24	43	35	27	30	38	34,6	6,3482281		FW1- 24	44	47	55	48	44	47,6	4,5055521
	FW1- 25	42	50	32	40	46	42	6,78233		FW1- 25	49	46	58	41	47	48,2	6,2209324
	FW1- 26	35	44	46	38	42	41	4,472136		FW1- 26	68	57	54	47	70	59,2	9,679876
	FW1- 27	32	27	28	30	24	28,2	3,0331502		FW1- 27	56	68	70	66	71	66,2	6,0166436
	Messergebnisse										Messergebnisse					52,28	10,32143
POD 15	FW1- 18	24	31	36	37	34	32,4	5,2249402	POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	FW1- 19	33	38	37	36	32	35,2	2,53884368		FW1- 19	86	76	68	87	88	81	8,7177979
	FW1- 20	33	35	41	36	27	34,4	5,07937		FW1- 20	82	74	85	77	74	78,4	4,929503
	FW1- 21	34	34	37	40	27	34,4	4,8270074		FW1- 21	69	77	72	68	74	72	3,6742346
	FW1- 22	34	31	27	34	38	32,8	4,0365633		FW1- 22	68	77	74	57	60	67,2	8,6329162
	Messergebnisse										Messergebnisse					74,65	6,242596
POD 30	FW1- 13	35	40	28	27	33	32,6	5,3197744	POD 30	FW1- 13	77	80	67	88	73	77	7,8421936
	FW1- 14	41	43	36	31	34	37	4,9497475		FW1- 14	54	58	66	60	70	61,6	6,3874878
	FW1- 15	35	40	27	32	30	32,8	4,9689095		FW1- 15	72	67	79	71	66	71	5,1478151
	FW1- 16	33	27	41	32	30	32,6	5,2249402		FW1- 16	77	80	81	67	84	77,8	6,5345237
	FW1- 17	33	32	32	27	35	31,8	2,9495762		FW1- 17	71	74	75	67	60	69,4	6,1073726
	Messergebnisse										Messergebnisse					71,36	6,567191
POD 60	FW1- 07	29	24	27	32	27	27,8	2,9495762	POD 60	FW1- 07	47	52	54	60	48	52,2	5,2153619
	FW1- 08	24	32	40	23	33	30,4	7,0213959		FW1- 08	48	54	63	64	56	57	6,6332496
	FW1- 09	37	32	28	30	31	31,6	3,3615473		FW1- 09	60	64	58	47	54	56,6	6,465292
	FW1- 11	32	28	37	30	31	31,6	3,3615473		FW1- 11	40	44	52	54	47	47,4	5,7271284
	FW1- 12	28	33	30	24	29	28,8	3,2710854		FW1- 12	42	45	47	36	51	44,2	5,6302753
	Messergebnisse										Messergebnisse					51,48	5,631341
POD 100	FW1- 02	27	24	26	30	31	27,6	2,8809721	POD 100	FW1- 02	28	40	32	34	28	32,4	4,9799598
	FW1- 03	27	30	31	34	32	30,8	2,53884358		FW1- 03	30	42	47	38	50	41,4	7,8612976
	FW1- 04	27	32	34	26	24	28,6	4,2190046		FW1- 04	37	41	38	44	43	40,6	3,0495901
	FW1- 06	31	34	28	30	35	31,6	2,8809721		FW1- 06	51	54	60	48	39	50,4	7,7653075
	FW1- 10	30	27	40	26	30	30,6	5,5497748		FW1- 10	47	41	38	36	43	41	4,3011626
	Messergebnisse										Messergebnisse					41,16	6,37401
SYN	WW1- 01	32	34	28	26	33	30,6	3,4351128	POD 100	WW1- 01	38	24	36	32	30	32	5,4772256
	WW1- 03	24	25	31	34	27	28,2	4,2071368	SYN	WW1- 03	27	24	28	31	33	28,6	3,5071356
	WW1- 04	27	28	30	32	31	29,6	2,0736441		WW1- 04	20	27	26	22	24	23,8	2,8635642
	WW1- 05	28	30	34	31	35	31,6	2,8809721		WW1- 05	34	37	32	28	29	32	3,6742346
	WW1- 07	36	33	30	35	27	32,2	3,7013511		WW1- 07	30	34	36	27	32	31,8	3,4928498
	Messergebnisse										Messergebnisse					29,64	3,570434

D										Gruppe I: ICAM-1					
Rechte Lunge	Tier	Linke Lunge				Tier				Mittelwert einzeln				Stabw	
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
POD 5	FW1- 23	2	2	2	3	2,25	0,5	POD 5	FW1- 23	2	3	2	3	2,5	
	FW1- 24	2	2	2	2	2	0		FW1- 24	3	3	2	2	2,5	
	FW1- 25	2	2	3	3	2,5	0,5773503		FW1- 25	3	3	2	3	2,75	
	FW1- 26	2	2	2	3	2,25	0,5		FW1- 26	2	2	n.a.	n.a.	0,5	
	FW1- 27	2	2	2	2	2	0		FW1- 27	2	2	3	3	2,5	
		Messergebnisse				2,2	0,209165		Messergebnisse				2,45	0,273861	
POD 15	FW1- 18	2	3	3	2	2,5	0,5773503	POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	FW1- 19	2	3	3	3	2,75	0,5		FW1- 19	4	4	3	3	3,5	
	FW1- 20	3	2	2	3	2,5	0,5773503		FW1- 20	3	4	4	4	3,75	
	FW1- 21	3	2	2	2	2,25	0,5		FW1- 21	3	3	4	4	3,5	
	FW1- 22	2	2	2	3	2,25	0,5		FW1- 22	3	3	3	4	3,25	
		Messergebnisse				2,45	0,209165		Messergebnisse				3,5	0,204124	
POD 30	FW1- 13	2	2	3	3	2,5	0,5773503	POD 30	FW1- 13	3	3	4	4	3,5	
	FW1- 14	3	3	2	3	2,75	0,5		FW1- 14	4	4	4	3	3,75	
	FW1- 15	2	2	3	3	2,5	0,5773503		FW1- 15	4	4	4	4	4	
	FW1- 16	2	2	3	3	2,5	0,5773503		FW1- 16	4	3	3	3	3,25	
	FW1- 17	2	2	3	2	2,25	0,5		FW1- 17	4	3	3	3	3,25	
		Messergebnisse				2,5	0,176777		Messergebnisse				3,55	0,32596	
POD 60	FW1- 07	2	2	2	3	2,25	0,5	POD 60	FW1- 07	3	3	2	2	2,5	
	FW1- 08	2	2	3	2	2,25	0,5		FW1- 08	4	3	2	2	2,75	
	FW1- 09	3	2	2	2	2,25	0,5		FW1- 09	2	2	3	3	2,25	
	FW1- 11	2	3	2	2	2,25	0,5		FW1- 11	3	3	2	2	2,75	
	FW1- 12	2	3	2	2	2,25	0,5		FW1- 12	3	3	2	2	2,5	
		Messergebnisse				2,25	0		Messergebnisse				2,55	0,209165	
POD 100	FW1- 02	2	2	3	3	2,5	0,5773503	POD 100	FW1- 02	3	3	2	3	2,75	
	FW1- 03	2	2	2	2	2	0		FW1- 03	3	2	2	2	2,25	
	FW1- 04	2	2	3	3	2,5	0,5773503		FW1- 04	3	4	3	3	3,25	
	FW1- 06	2	2	2	2	2	0		FW1- 06	3	3	3	3	3	
	FW1- 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		FW1- 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		Messergebnisse				2,25	0,288675		Messergebnisse				2,55	0,209165	
SYN	WW1- 01	2	2	2	2	2	0	POD 100	WW1- 01	2	2	2	2	0,5	
	WW1- 03	2	2	3	2	2,25	0,5		WW1- 03	3	3	2	2	2,5	
	WW1- 04	2	3	3	2	2,5	0,5773503		WW1- 04	2	3	2	2	2,25	
	WW1- 05	2	3	3	2	2,5	0,5773503		WW1- 05	2	3	3	3	2,5	
	WW1- 07	2	2	2	2	2	0		WW1- 07	2	2	3	3	2,25	
		Messergebnisse				2,25	0,25		Messergebnisse				2,3	0,209165	

E Gruppe I: P-Selektin																			
Rechte Lunge	Tier	Linke Lunge				Mittelwert einzeln				Stabw									
		1	2	3	4	1	2	3	4										
POD 5	FW1- 23	2	1	2	2	1,75	0,5	POD 5	FW1- 23	3	3	3	3	3	3	3	3	0	
	FW1- 24	2	2	2	2	2	0		FW1- 24	3	3	2	2	2,5	0,5773503				
	FW1- 25	2	1	1	2	1,5	0,5773503		FW1- 25	3	3	3	3	3	3	3	3	0	
	FW1- 26	4	4	3	3	3,5	0,5773503		FW1- 26	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	FW1- 27	1	1	2	2	1,5	0,5773503		FW1- 27	3	3	3	3	3	3	3	3	0	
	Messergebnisse 2,05					0,83666			Messergebnisse 2,875				0,25						
POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	POD 15	FW1- 18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	FW1- 19	2	2	1	1	1,5	0,5773503		FW1- 19	3	3	2	2	2	2,5	0,5773503			
	FW1- 20	2	2	2	2	2	0		FW1- 20	2	2	3	3	3	2,5	0,5773503			
	FW1- 21	2	2	2	2	2	0		FW1- 21	2	2	3	3	3	2,5	0,5773503			
	FW1- 22	2	2	2	2	2	0		FW1- 22	2	2	2	3	2,25	0,5				
	Messergebnisse 1,875					0,25			Messergebnisse 2,4375				0,125						
POD 30	FW1- 13	2	2	1	1	1,5	0,5773503	POD 30	FW1- 13	2	2	2	3	2,25	0,5				
	FW1- 14	1	1	2	2	1,5	0,5773503		FW1- 14	2	2	2	2	2	0				
	FW1- 15	2	1	2	2	1,75	0,5		FW1- 15	2	2	2	2	2	0				
	FW1- 16	1	2	2	1	1,5	0,5773503		FW1- 16	2	2	3	3	2,25	0,5				
	FW1- 17	1	1	1	2	1,25	0,5		FW1- 17	2	2	2	3	2,25	0,5				
	Messergebnisse 1,5					0,176777			Messergebnisse 2,15				0,136931						
POD 60	FW1- 07	2	2	2	1	1,75	0,5	POD 60	FW1- 07	1	1	2	2	2,25	0,5				
	FW1- 08	2	1	1	2	1,5	0,5773503		FW1- 08	3	2	2	2	2,25	0,5				
	FW1- 09	1	2	1	1	1,25	0,5		FW1- 09	1	1	1	1	1	0				
	FW1- 11	1	1	2	1	1,25	0,5		FW1- 11	2	1	1	1	1,25	0,5				
	FW1- 12	0	0	1	1	0,5	0,5773503		FW1- 12	1	2	2	2	1,75	0,5				
	Messergebnisse 1,25					0,467707			Messergebnisse 1,55				0,480885						
POD 100	FW1- 02	2	1	2	2	1,75	0,5	POD 100	FW1- 02	2	2	2	2	2	0				
	FW1- 03	1	2	2	2	1,75	0,5		FW1- 03	2	3	2	2	2,5	0,5773503				
	FW1- 04	2	1	1	1	1,25	0,5		FW1- 04	2	2	3	2	2,25	0,5				
	FW1- 06	1	1	2	2	1,5	0,5773503		FW1- 06	2	3	3	3	2,5	0,5773503				
	FW1- 10	1	1	1	1	1	0		FW1- 10	1	1	2	2	1,5	0,5773503				
	Messergebnisse 1,45					0,32596			Messergebnisse 2,15				0,41833						
SYN	WW1- 01	2	2	2	2	2	0	SYN	WW1- 01	2	2	1	1	1,5	0,5773503				
	WW1- 03	1	2	2	2	1,75	0,5		WW1- 03	1	1	1	1	1	0				
	WW1- 04	1	2	2	1	1,5	0,5773503		WW1- 04	2	2	2	2	2	0				
	WW1- 05	2	2	2	2	2	0		WW1- 05	2	2	2	2	2	0				
	WW1- 07	2	2	1	1	1,5	0,5773503		WW1- 07	2	2	1	1,75	0,5					
	Messergebnisse 1,75					0,25			Messergebnisse 2,15				0,41833						

Tabelle 8.3 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe II (MP-Gruppe) für die Marker ED1

(A), CD11a (B), CD18 (C), ICAM-1 (D) und P-Selektin (E)

Gruppe II: ED1										Gruppe III: ED2										
A	Rechte Lunge					Linke Lunge					Rechte Lunge					Linke Lunge				
	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert	einzel			Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert	einzel	Stabw	
POD 20	FW1-47	28	22	19	18	21,8	3.8987177		POD 20	FW1-47	20	24	22	28	26	24	3.1622777			
	FW1-68	18	19	20	22	19	19,6	1,5165751		FW1-68	27	18	28	23	26	24,4	4.0373258			
	FW1-69	16	19	19	16	18	17,6	1,5165751		FW1-69	22	27	22	26	29	25,2	3.1144823			
	FW1-70	19	17	21	18	23	19,6	2.4083189		FW1-70	24	24	25	29	27	25,8	2.1679483			
	FW1-71	17	20	19	18	21	19	1,5811388		FW1-71	29	28	26	18	22	24,6	4.5607017			
		Messergebnisse					19,52	1,513935			Messergebnisse					24,8	0,707107			
POD 30	FW1-38	26	25	30	15	20	23,2	5,8051701		POD 30	FW1-38	26	25	28	27	28	26,8	1.3038405		
	FW1-39	21	20	21	18	20	20	1,2247449		FW1-39	23	29	28	30	26	27,2	2.7748874			
	FW1-40	19	18	23	20	20	20	1,8708287		FW1-40	28	29	27	27	34	29	2.9154759			
	FW1-41	22	19	20	21	18	20	1,5811388		FW1-41	26	32	28	34	32	30,4	3.2863353			
	FW1-42	19	17	22	17	18	18,6	2.0736441		FW1-42	26	28	30	29	22	27	3.1622777			
		Messergebnisse					20,36	1,699412			Messergebnisse					28,08	1,565886			
POD 60	FW1-33	20	21	18	24	20	20,6	2.1908902		POD 60	FW1-33	25	28	26	27	27	26,6	1.1401754		
	FW1-34	21	20	21	18	20	20	1,2247449		FW1-34	27	26	27	27	31	27,6	1.9493589			
	FW1-35	19	18	23	20	20	20	1,8708287		FW1-35	22	27	23	n.a.	n.a.	24	2.6457513			
	FW1-36	22	19	20	21	18	20	1,5811388		FW1-36	31	26	30	27	35	29,8	3.5637059			
	FW1-37	19	17	22	17	18	18,6	2.0736441		FW1-37	29	21	34	21	21	25,2	6.0166436			
		Messergebnisse					19,84	0,740277			Messergebnisse					26,64	2,233383			
POD 100	FW1-28	16	20	20	21	25	20,4	3.2093613		POD 100	FW1-28	18	18	26	23	23	21,6	3.5071356		
	FW1-29	21	20	21	20	17	19,8	1,6431677		FW1-29	21	18	24	17	14	18,8	3.8340579			
	FW1-30	17	19	18	22	19	19	1,8708287		FW1-30	26	21	16	25	17	21	4.5276926			
	FW1-31	20	19	19	16	18	18,4	1,5165751		FW1-31	24	27	23	23	28	25	2.3452079			
	FW1-32	18	22	15	19	16	18	2.7386128		FW1-32	0	0	0	0	0	0	0	2.3452079		
		Messergebnisse					19,12	0,985901			Messergebnisse					17,28	9,912215			
POD 100	WW1-8	16	17	16	24	21	18,8	3.5637059		POD 100	WW1-8	21	21	20	22	17	20,2	1.9235384		
	WW1-9	17	15	13	17	16	15,6	1,6733201		WW1-9	12	16	13	18	14	14,6	2.4083189			
	WW1-10	18	21	19	20	20	19,6	1,1401754		WW1-10	18	17	21	20	21	19,4	1.8165902			
	WW1-11	16	20	18	15	22	18,2	2.8635642		WW1-11	19	20	22	17	16	18,8	2.3874673			
	WW1-12	18	19	17	21	19	18,8	1,4832397		WW1-12	18	18	23	19	22	20	2.3452079			
		Messergebnisse					18,2	1,536229			Messergebnisse					18,25	2,302173			

Gruppe II: CD 11a										Gruppe II: CD 11b							
Rechte Lunge	Tier					Linke Lunge					Mittelwert einzeln					Stabw	
	1	2	3	4	5	Mittelwert	einzel	1	2	3	4	5	Mittelwert	einzel			
POD 20	FW1-47	30	25	31	25	28	27,8	2,7748874	POD 20	FW1-47	43	30	39	55	51	43,6	9,8893883
	FW1-68	26	26	27	28	29	27,2	1,3038405		FW1-68	36	43	40	43	37	39,8	3,2710854
	FW1-69	21	24	26	27	30	25,6	3,3615473		FW1-69	40	50	44	31	44	41,8	7,0142712
	FW1-70	29	29	25	27	20	26	3,7416574		FW1-70	40	55	43	33	35	41,2	8,6717934
	FW1-71	20	27	26	25	27	25	2,9154759		FW1-71	60	38	31	47	43	43,8	10,848963
	Messergebnisse					26,32	1,154123			Messergebnisse					42,04	1,681666	
POD 30	FW1-38	20	31	24	31	27	26,6	4,7222876	POD 30	FW1-38	69	61	74	72	67	68,6	5,0299105
	FW1-39	29	27	19	30	17	24,4	5,9833101		FW1-39	50	60	53	47	54	52,8	4,8628646
	FW1-40	23	30	28	39	23	28,6	6,5802736		FW1-40	50	53	60	61	54	55,6	4,7222876
	FW1-41	18	25	23	24	20	22	2,9154759		FW1-41	85	64	71	72	71	72,6	7,6354437
	FW1-42	26	30	28	30	20	26,8	4,1472883		FW1-42	50	64	75	54	84	65,4	14,2056333
	Messergebnisse					25,68	2,540079			Messergebnisse					63	8,48646	
POD 60	FW1-33	25	30	31	22	28	27,2	3,7013511	POD 60	FW1-33	23	40	22	35	27	29,4	7,8294317
	FW1-34	19	19	23	26	28	23	4,0620192		FW1-34	23	27	22	18	21	22,2	3,2710854
	FW1-35	20	21	21	16	18	19,2	2,16779483		FW1-35	0	0	0	0	0	0	0
	FW1-36	22	18	16	23	20	19,8	2,8635642		FW1-36	22	27	26	26	28	25,8	2,2803509
	FW1-37	20	28	30	21	28	25,4	4,5607017		FW1-37	18	28	30	29	25	26	4,8476799
	Messergebnisse					22,92	3,465833			Messergebnisse					20,68	11,83774	
POD 100	FW1-28	18	29	23	27	30	25,4	4,929503	POD 100	FW1-28	21	12	11	10	12	13,2	4,4384682
	FW1-29	17	22	26	20	22	21,4	3,2863353		FW1-29	0	0	0	0	0	0	0
	FW1-30	31	28	38	35	38	34	4,4158804		FW1-30	16	18	20	15	21	18	2,5495098
	FW1-31	20	21	30	31	26	25,6	5,0299105		FW1-31	21	17	30	22	16	21,2	5,5407581
	FW1-32	24	35	39	24	32	30,8	6,6858059		FW1-32	0	0	0	0	0	0	0
	Messergebnisse					27,44	4,958629			Messergebnisse					10,48	9,981583	
POD 100	WW1-8	28	26	29	36	37	31,2	4,9699095	POD 100	WW1-8	36	27	29	26	33	30,2	4,2071368
SYN	WW1-9	23	24	27	21	22	23,4	2,3021729		WW1-9	24	25	28	27	22	25,2	2,3874673
WW1-10	27	36	26	36	30	31	4,7958315		WW1-10	33	27	35	26	26	29,4	4,2778499	
WW1-11	25	31	25	32	28	28,2	3,2710854		WW1-11	32	25	26	24	31	27,6	3,6469165	
WW1-12	27	23	28	30	26	26,8	2,5884358		WW1-12	27	29	30	30	28	28,8	1,3038405	
	Messergebnisse					28,12	3,232955			Messergebnisse					28,24	1,946279	

C										Gruppe II: CD 18									
Rechte Lunge	Tier	Linke Lunge					Tier					Mittelwert einzeln					Stabw		
		1	2	3	4	5	Mittelwert	einzeln	1	2	3	4	5	Mittelwert	einzeln				
POD 20	FW1-47	30	40	30	29	45	34,8	7,2594766	POD 20	FW1-47	58	68	62	63	60	62,2	3,7682887		
	FW1-68	32	28	25	32	25	28,4	3,5071356		FW1-68	55	60	58	60	70	60,6	5,6391489		
	FW1-69	37	28	35	34	35	33,8	3,4205263		FW1-69	60	70	69	50	54	60,6	8,8769364		
	FW1-70	45	36	28	35	25	33,8	7,7910205		FW1-70	47	46	50	70	53	53,2	9,7826377		
	FW1-71	26	29	28	33	32	29,6	2,8809721		FW1-71	53	58	65	58	65	59,8	5,1672043		
		Messergebnisse					32,08	2,872629			Messergebnisse					59,28	3,508846		
POD 30	FW1-38	23	29	32	34	26	28,8	4,4384682	POD 30	FW1-38	69	61	74	72	67	68,6	5,0299105		
	FW1-39	29	28	32	27	35	30,2	3,2710854		FW1-39	50	60	53	47	54	52,8	4,8682646		
	FW1-40	30	31	28	32	34	31	2,236068		FW1-40	50	53	60	61	54	55,6	4,72222876		
	FW1-41	27	32	30	31	27	29,4	2,3021729		FW1-41	85	64	71	72	71	72,6	7,6354437		
	FW1-42	32	30	28	23	31	28,8	3,5637059		FW1-42	50	64	75	54	84	65,4	14,2056333		
		Messergebnisse					29,64	0,95289			Messergebnisse					63	8,48646		
POD 60	FW1-33	23	27	32	29	33	28,8	4,0249224	POD 60	FW1-33	50	53	55	46	47	50,2	3,8340579		
	FW1-34	29	34	30	36	31	32	2,9154759		FW1-34	48	50	49	41	50	47,6	3,7815341		
	FW1-35	25	31	32	28	28	28,8	2,7748874		FW1-35	45	40	49	n.a.	n.a.	44,666667	4,5092498		
	FW1-36	31	34	27	27	36	31	4,0620192		FW1-36	53	67	56	55	63	58,8	5,9329588		
	FW1-37	27	35	31	29	30	30,4	2,9664794		FW1-37	43	50	56	51	47	49,4	4,8270074		
		Messergebnisse					30,2	1,4			Messergebnisse					50,133333	5,290453		
POD 100	FW1-28	27	35	31	30	33	31,2	3,0331502	POD 100	FW1-28	42	40	41	51	52	45,2	5,8051701		
	FW1-29	31	30	30	32	29	30,4	1,1401754		FW1-29	34	0	0	0	0	6,8	15,205262		
	FW1-30	28	28	33	32	28	29,8	2,4899799		FW1-30	41	37	48	43	53	44,4	6,22289646		
	FW1-31	29	31	27	29	30	29,2	1,4832397		FW1-31	41	52	39	44	45	44,2	4,9699095		
	FW1-32	32	35	30	31	28	31,2	2,5884358		FW1-32	0	0	0	0	0	0	0		
		Messergebnisse					30,36	0,876356			Messergebnisse					28,12	22,69696		
POD 100	WW1-8	33	28	36	35	31	32,6	3,2093613	POD 100	WW1-8	27	33	32	30	28	30	2,5495098		
SYN	WW1-9	24	21	26	20	25	23,2	2,5884358		WW1-9	33	27	34	23	21	27,6	5,8137767		
	WW1-10	35	31	31	32	35	32,8	2,0493902		WW1-10	31	29	31	29	27	29,4	1,6733201		
	WW1-11	29	32	28	27	29	29	1,8708287		WW1-11	27	32	32	27	33	30,2	2,9495762		
	WW1-12	33	29	27	33	32	30,8	2,6832816		WW1-12	31	28	30	36	28	30,6	3,2863353		
		Messergebnisse					29,68	3,935988			Messergebnisse					29,3	1,178134		

Gruppe II: P-Selektin																	
E	Rechte Lunge	Tier	Mittelwert einzeln					Linke Lunge	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw	
			1	2	3	4	5										
POD 20	FW1-47	2	2	1	1	1,6	0,5477226	POD 20	FW1-47	3	3	2	2	2	2,4	0,5477226	
	FW1-68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		FW1-68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	FW1-69	3	2	2	1	1	1,8		FW1-69	3	3	3	2	3	2,8	0,4472136	
	FW1-70	2	1	1	1	2	1,4	0,5477226	FW1-70	2	2	2	3	3	2,4	0,5477226	
	FW1-71	2	2	1	1	1	1,4	0,5477226	FW1-71	3	3	2	2	2	2,4	0,5477226	
	Messergebnisse					1,55	0,191485								2,5	0,2	
POD 30	FW1-38	1	1	2	3	1	1,6	0,8944272	POD 30	FW1-38	2	2	2	3	2	2,2	0,4472136
	FW1-39	1	1	1	1	1	1	0		FW1-39	3	3	3	2	2	2,8	0,4472136
	FW1-40	2	2	1	1	1	1,4	0,5477226		FW1-40	2	3	2	2	2	2,2	0,4472136
	FW1-41	1	1	1	2	1	1,2	0,4472136		FW1-41	3	2	2	3	3	2,6	0,5477226
	FW1-42	1	1	2	1	1	1,2	0,4472136		FW1-42	3	3	3	3	3	3	0
	Messergebnisse					1,28	0,2228035								2,56	0,357771	
POD 60	FW1-33	2	1	1	2	1	1,4	0,5477226	POD 60	FW1-33	1	1	2	2	1	1,4	0,5477226
	FW1-34	2	2	1	1	1	1,4	0,5477226		FW1-34	3	3	2	3	2	2,6	0,5477226
	FW1-35	2	1	2	2	n.a.	1,75	0,5		FW1-35	3	3	2	2	n.a.	2,5	0,5773503
	FW1-36	1	1	1	1	1	1	0		FW1-36	2	1	1	1	n.a.	1,25	0,5
	FW1-37	1	1	2	1	1	1,2	0,4472136		FW1-37	3	3	2	3	2	2,6	0,5477226
	Messergebnisse					1,35	0,278388								2,07	0,683374	
POD 100	FW1-28	1	1	1	2	n.a.	1,25	0,5	POD 100	FW1-28	1	1	2	2	n.a.	1,5	0,5773503
	FW1-29	1	1	2	2	n.a.	1,5	0,5773503		FW1-29	0	1	1	1	n.a.	0,75	0,5
	FW1-30	1	1	2	2	n.a.	1,5	0,5773503		FW1-30	2	3	2	n.a.	n.a.	2,3333333	0,5773503
	FW1-31	2	1	1	1	n.a.	1,25	0,5		FW1-31	1	3	3	2	2	2,2	0,836666
	FW1-32	3	2	2	2	n.a.	2,25	0,5		FW1-32	0	0	0	0	0	0	0
	Messergebnisse					1,55	0,410792								1,3566667	0,986689	
POD 100	WW1-8	1	2	2	1	n.a.	1,5	0,5773503	POD 100	WW1-8	2	1	1	2	n.a.	1,5	0,5773503
SYN	WW1-9	1	2	2	2	n.a.	1,75	0,5		WW1-9	2	2	1	1	n.a.	1,5	0,5773503
	WW1-10	2	2	1	2	n.a.	1,75	0,5		WW1-10	2	2	1	1	n.a.	1,75	0,5
	WW1-11	2	2	1	2	n.a.	1,75	0,5		WW1-11	1	1	2	1	n.a.	1,25	0,5
	WW1-12	1	1	1	1	n.a.	1	0		WW1-12	1	1	1	2	n.a.	1,25	0,5
	Messergebnisse					1,55	0,32596								1,45	0,209165	

Tabelle 8.4 A – E: Immunhistochemische Messdaten der Gruppe III (RAD-Gruppe) für die Marker ED1 (A), CD11a (B), CD18 (C), ICAM-1 (D) und P-Selektin (E)

Gruppe III: ED 1									
A	Rechte Lunge	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw
POD 20	FW1-220	17	16	13	16	17	15,8	1,64316777	POD 20
	FW1-221	15	12	13	16	12	13,6	1,8165902	FW1-221
	FW1-222	11	13	10	11	16	12,2	2,3874673	FW1-222
	FW1-223	14	13	14	11	13	13	1,2247449	FW1-223
	FW1-224	18	13	17	13	14	15	2,3452079	FW1-224
								Messergebnisse 13,92 1,466997	Messergebnisse 26,28 1,84716
POD 30	FW1-205	13	15	9	10	11	11,6	2,4083189	POD 30
	FW1-206	12	10	14	14	12	12,4	1,6733201	FW1-206
	FW1-207	13	12	9	9	17	12	3,3166248	FW1-207
	FW1-208	10	11	18	9	12	12	3,5355339	FW1-208
	FW1-209	10	12	13	14	10	11,8	1,7888544	FW1-209
								Messergebnisse 11,96 0,296648	Messergebnisse 18 2,737395
POD 60	FW1-215	8	11	12	13	8	10,4	2,3021729	POD 60
	FW1-216	12	16	11	13	11	12,6	2,0736441	FW1-216
	FW1-217	n.a.	FW1-217						
	FW1-218	11	11	8	9	10	9,8	1,3038405	FW1-218
	FW1-219	n.a.	FW1-219						
								Messergebnisse 10,933333 1,474223	Messergebnisse 3,64 1,872966
POD 100	FW1-210	9	8	13	7	7	8,8	2,4899799	POD 100
	FW1-211	12	13	11	10	11	11,4	1,1401754	FW1-211
	FW1-212	8	14	14	6	10	10,4	3,5777088	FW1-212
	FW1-213	12	10	9	10	11	10,4	1,1401754	FW1-213
	FW1-214	9	10	10	11	9	9,8	0,83666	FW1-214
								Messergebnisse 10,16 0,95289	Messergebnisse 1,8 1,191638
POD 100	WW1-50	9	9	4	3	6	6,2	2,7748874	POD 100
SYN	WW1-51	9	8	11	7	11	9,2	1,7888544	WW1-51
	WW1-52	16	15	13	17	13	14,8	1,7888544	WW1-52
	WW1-53	12	15	11	15	13	13,2	1,7888544	WW1-53
	WW1-54	12	11	13	12	13	12,2	0,83666	WW1-54
								Messergebnisse 11,12 3,425201	Messergebnisse 12,08 5,339663

Gruppe III: CD 11a

B		Gruppe III: CD 11a										Gruppe IV: CD 11b									
Rechte Lunge	Tier	Mittelwert einzeln					Stabw	Linke Lunge					Tier	Mittelwert einzeln					Stabw		
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5			
POD 20	FW1-220	10	7	8	11	9	9	1,5811388	POD 20	FW1-220	28	33	29	25	39	30,8	5,4037024				
	FW1-221	9	11	7	9	12	9,6	1,9493589		FW1-221	31	27	34	29	26	29,4	3,2093613				
	FW1-222	8	12	9	11	12	10,4	1,8165902		FW1-222	29	34	28	23	33	29,4	4,3931765				
	FW1-223	10	14	12	13	14	12,6	1,6733201		FW1-223	34	36	35	31	29	33	2,9154759				
	FW1-224	12	9	11	10	12	10,8	1,3038405		FW1-224	34	24	29	27	26	28	3,8078866				
		Messergebnisse					10,48	Messergebnisse					1,3755	Messergebnisse					30,12	1,889974	
POD 30	FW1-205	11	5	9	9	9	8,6	2,1908902	POD 30	FW1-205	29	31	39	26	36	32,2	5,2630789				
	FW1-206	6	7	10	10	12	9	2,4494897		FW1-206	21	16	23	25	22	21,4	3,3615473				
	FW1-207	12	11	9	10	8	10	1,5811388		FW1-207	26	24	23	19	23	23	2,5495098				
	FW1-208	13	9	14	11	11	11,6	1,9493589		FW1-208	16	21	24	20	22	20,6	2,9664794				
	FW1-209	10	13	10	11	10	10,8	1,3038405		FW1-209	19	16	20	n.a.	18,3333333	2,0816666					
		Messergebnisse					10	Messergebnisse					1,240967	Messergebnisse					23,10667	5,354458	
POD 60	FW1-215	10	5	11	4	3	6,6	3,6469165	POD 60	FW1-215	7	7	4	9	7	6,8	1,7888544				
	FW1-216	7	5	8	14	7	8,2	3,4205263		FW1-216	12	10	12	10	12	11,2	1,0954451				
	FW1-217	10	8	7	9	7	8,2	1,3038405		FW1-217	11	9	4	10	9	8,6	2,7018512				
	FW1-218	6	5	7	8	4	6	1,5811388		FW1-218	5	4	10	4	4	5,4	2,607681				
	FW1-219	7	6	5	7	7	6,4	0,8944272		FW1-219	5	2	4	4	3	3,6	1,1401754				
		Messergebnisse					7,08	Messergebnisse					1,044988	Messergebnisse					7,12	2,927798	
POD 100	FW1-210	4	4	3	4	6	4,2	1,09544451	POD 100	FW1-210	0	0	2	1	2	1	1	1	1	1	0,836666
	FW1-211	2	7	5	4	9	5,4	2,7018512		FW1-211	3	0	2	4	6	3	2,236068				
	FW1-212	6	4	8	8	7	6,6	1,6733201		FW1-212	5	1	3	4	1	2,8	1,7888544				
	FW1-213	3	5	5	1	6	4	2		FW1-213	14	19	20	13	19	17	3,2403703				
	FW1-214	3	7	6	2	5	4,6	2,0736441		FW1-214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3416408	
		Messergebnisse					4,96	Messergebnisse					1,062073	Messergebnisse					4,76	6,956148	
POD 100	WW1-50	8	9	7	10	8	8,4	1,1401754	POD 100	WW1-50	8	8	9	7	9	8,2	0,836666				
SYN	WW1-51	11	9	10	10	7	9,4	1,5165751		WW1-51	10	9	12	10	8	9,8	1,48332397				
	WW1-52	8	7	11	7	10	8,6	1,8165902		WW1-52	11	9	7	9	10	9,2	1,48332397				
	WW1-53	8	10	12	9	11	10	1,5811388		WW1-53	7	10	9	7	10	8,6	1,5165751				
	WW1-54	11	9	6	9	10	9	1,8708287		WW1-54	8	11	10	10	8	9,4	1,3416408				
		Messergebnisse					9,08	Messergebnisse					0,641872	Messergebnisse					9,04	0,638749	

Gruppe III: CD 18

Gruppe III: CD 18										Gruppe IV: CD 19															
C	Rechte Lunge	Messergebnisse					Messergebnisse					Messergebnisse					Messergebnisse								
		Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzein	Stabw	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzein	Stabw	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzein	Stabw
POD 20	FW1-220	14	15	20	18	14	16,2	2,6832816	POD 20	FW1-220	35	44	46	38	47	42	5,2440442								
	FW1-221	14	21	13	12	13	14,6	3,6469165		FW1-221	44	35	48	38	45	42	5,3385391								
	FW1-222	18	14	18	18	14	16,4	2,1908902		FW1-222	49	56	42	41	54	48,4	6,8044103								
	FW1-223	21	19	16	18	18	18,4	1,8165902		FW1-223	44	53	40	59	44	48	7,7781746								
	FW1-224	22	16	11	17	20	17,2	4,2071368		FW1-224	60	51	55	33	38	47,4	11,458621								
	Messergebnisse					16,56	1,395708	Messergebnisse					Messergebnisse					45,56	3,269251						
POD 30	FW1-205	17	19	13	16	17	16,4	2,1908902		POD 30	FW1-205	40	35	42	46	38	40,2	4,1472883							
	FW1-206	20	18	17	19	17	18,2	1,3038405		FW1-206	33	35	30	40	32	34	3,8078866								
	FW1-207	18	17	13	20	16	16,8	2,5884358		FW1-207	34	26	40	38	41	35,8	6,0991803								
	FW1-208	15	17	18	11	12	14,6	3,0495901		FW1-208	29	37	32	27	37	32,4	4,5607017								
	FW1-209	17	19	12	12	20	16	3,8078866		FW1-209	37	28	43	32	37	35,4	5,6833089								
	Messergebnisse					16,4	1,30384	Messergebnisse					Messergebnisse					35,56	2,916848						
POD 60	FW1-215	13	11	14	19	8	13	4,0620192		POD 60	FW1-215	4	5	8	7	9	6,6	2,0736441							
	FW1-216	10	13	13	15	10	12,2	2,16779483		FW1-216	5	6	9	5	1	5,2	2,8635642								
	FW1-217	16	12	10	12	9	11,8	2,6832816		FW1-217	0	12	5	6	4	5,4	4,3358967								
	FW1-218	6	12	6	9	5	7,6	2,8809721		FW1-218	6	5	9	5	6	6,2	1,6431677								
	FW1-219	13	9	10	11	14	11,4	2,0736441		FW1-219	1	0	9	8	3	4,2	4,0865633								
	Messergebnisse					11,2	2,097618	Messergebnisse					Messergebnisse					5,52	0,933809						
POD 100	FW1-210	7	8	12	9	11	9,4	2,0736441		POD 100	FW1-210	0	5	6	0	1	2,4	2,8809721							
	FW1-211	8	10	16	15	7	11,2	4,0865633		FW1-211	7	3	10	11	4	7	3,5355339								
	FW1-212	6	7	1	5	7	5,2	2,4899799		FW1-212	1	0	0	2	2	1	1	5,07937							
	FW1-213	10	10	9	13	8	10	1,8708287		FW1-213	0	3	1	12	8	4,8	5,0695167								
	FW1-214	12	15	12	10	13	12,4	1,8165902		FW1-214	0	0	3	3	1	1,4	1,5165751								
	Messergebnisse					9,64	2,736421	Messergebnisse					Messergebnisse					3,32	2,532193						
POD 100	WW1-50	11	10	15	12	10	11,6	2,0736441		WW1-50	19	13	13	11	11	13,4	3,2863353								
	WW1-51	13	20	21	6	12	14,4	6,1886994		WW1-51	14	26	18	15	14	17,4	5,07937								
	WW1-52	11	14	12	10	12	11,8	1,4832397		WW1-52	15	11	12	13	13	13,2	1,7886544								
	WW1-53	14	13	15	18	12	14,4	2,3021729		WW1-53	16	12	15	10	13	13,2	2,3874673								
	WW1-54	12	13	15	12	17	13,8	2,16779483		WW1-54	20	11	18	16	11	15,2	4,0865633								
	Messergebnisse					13,2	1,392839	Messergebnisse					Messergebnisse					14,48	1,836301						

D Gruppe III: ICAM-1									
Rechte Lunge	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw	Linke Lunge
POD 20	FW1-220	0	1	1	0	1	0,6	0,5477226	POD 20
	FW1-221	0	1	0	0	1	0,4	0,5477226	FW1-220
	FW1-222	0	0	1	1	0	0,4	0,5477226	FW1-221
	FW1-223	1	0	2	1	2	1,2	0,836666	FW1-222
	FW1-224	2	1	2	2	1	1,6	0,5477226	FW1-223
		Messergebnisse				0,84	0,536656	0,517687	
POD 30	FW1-205	0	0	1	1	0	0,4	0,5477226	POD 30
	FW1-206	0	1	1	0	1	0,6	0,5477226	FW1-206
	FW1-207	2	1	0	1	2	1,2	0,836666	FW1-207
	FW1-208	2	2	1	1	0	1,2	0,836666	FW1-208
	FW1-209	0	1	1	0	1	0,6	0,5477226	FW1-209
		Messergebnisse				0,8	0,374166	0,316228	
POD 60	FW1-215	2	1	2	0	1	1,2	0,836666	POD 60
	FW1-216	2	1	0	1	1	1	0,7071068	FW1-215
	FW1-217	1	2	1	1	1	1,2	0,4472136	FW1-216
	FW1-218	1	0	2	1	0	0,8	0,836666	FW1-217
	FW1-219	1	0	2	1	1	1	0,7071068	FW1-218
		Messergebnisse				1,04	0,167332	0,282843	
POD 100	FW1-210	0	1	1	1	0	0,6	0,5477226	POD 100
	FW1-211	0	1	1	0	1	0,6	0,5477226	FW1-210
	FW1-212	0	1	1	1	1	0,8	0,4472136	FW1-211
	FW1-213	0	0	1	0	1	0,4	0,5477226	FW1-212
	FW1-214	0	2	1	0	0	0,6	0,8944272	FW1-213
		Messergebnisse				0,6	0,141421	0,517687	
POD 100 SYN	WW1-50	0	0	1	0	0	0,2	0,4472136	POD 100 SYN
	WW1-51	0	1	1	0	0	0,6	0,5477226	WW1-51
	WW1-52	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	WW1-52
	WW1-53	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	WW1-53
	WW1-54	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	WW1-54
		Messergebnisse				0,4	0,282843	1,2	1,131371

Gruppe III: P-Selektin														
E	Rechte Lunge	Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw					
	Linke Lunge							1	2	3	4	5	Mittelwert einzeln	Stabw
POD 20	FW1-220	1	0	1	0	1	0,6	0,5477226	FW1-220	2	3	2	2	2,2
	FW1-221	1	1	0	0	n.a.	0,5	0,5773503	FW1-221	2	2	1	2	1,8
	FW1-222	0	1	0	1	0	0,4	0,5477226	FW1-222	2	1	2	2	0,7071068
	FW1-223	0	1	0	1	1	0,6	0,5477226	FW1-223	2	1	1	2	1,4
	FW1-224	0	2	0	1	1	0,8	0,83666	FW1-224	0	1	1	0	0,5
			Messergebnisse		0,58	0,148324			Messergebnisse		1,58	0,672309		
POD 30	FW1-205	0	0	0	0	n.a.	0	0	POD 30	FW1-205	0	1	0	0,6
	FW1-206	1	1	0	0	n.a.	0,5	0,5773503	FW1-206	0	0	1	n.a.	0,3333333
	FW1-207	1	1	0	1	0	0,6	0,5477226	FW1-207	2	2	1	1	1,6
	FW1-208	0	1	1	2	1	1	0,7071068	FW1-208	2	3	2	3	2,2
	FW1-209	1	1	1	0	n.a.	0,75	0,5	FW1-209	3	2	3	2	2,2
			Messergebnisse		0,57	0,370135			Messergebnisse		1,386667	0,879899		
POD 60	FW1-215	0	1	0	0	1	0,4	0,5477226	POD 60	FW1-215	0	0	0	0
	FW1-216	0	1	0	1	0	0,4	0,5477226	FW1-216	3	1	2	1	1,6
	FW1-217	1	0	0	0	0	0,2	0,4472136	FW1-217	0	1	2	1	0,8
	FW1-218	0	1	1	0	0	0,4	0,5477226	FW1-218	1	1	1	0	0,6
	FW1-219	1	1	1	1	0	0,8	0,4472136	FW1-219	3	2	1	2	1,1401754
			Messergebnisse		0,44	0,219089			Messergebnisse		0,92	0,687023		
POD 100	FW1-210	1	0	0	1	0	0,4	0,5477226	POD 100	FW1-210	3	4	3	2
	FW1-211	2	1	1	1	0	1	0,7071068	FW1-211	0	1	0	0	0,4
	FW1-212	1	1	0	0	n.a.	0,5	0,5773503	FW1-212	0	2	1	0	0,75
	FW1-213	0	0	1	1	1	0,6	0,5477226	FW1-213	2	1	1	3	1,1401754
	FW1-214	0	1	1	1	n.a.	0,75	0,5	FW1-214	0	0	0	0	0
			Messergebnisse		0,65	0,234521			Messergebnisse		1,07	1,095217		
POD 100 SYN	WW1-50	1	0	1	1	n.a.	0,75	0,5	POD 100 SYN	WW1-50	0	0	1	0
	WW1-51	1	1	0	1	1	0,8	0,4472136	WW1-51	0	1	0	1	0,4
	WW1-52	1	0	1	0	1	0,6	0,5477226	WW1-52	1	1	0	1	0,6
	WW1-53	0	0	1	1	1	0,6	0,5477226	WW1-53	2	1	1	0	0,4472136
	WW1-54	0	1	1	0	1	0,6	0,5477226	WW1-54	0	1	1	0	0,6
			Messergebnisse		0,67	0,097463			Messergebnisse		0,68	0,228035		

8.2 Publikationen und Posterpräsentationen

Die vorliegende Arbeit diente als Grundlage für mehrere Veröffentlichungen. Unten aufgeführt finden sich zunächst die Quellen für alle eingereichten Publikationen und Postervorläufe sowie im Folgenden die Publikationen und das Poster selbst. Bei den eingereichten Publikationen bin ich als gleichberechtigte Erstautorin genannt. Das angefertigte Poster wurde auf der 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Stuttgart und dem XXIII International Congress of The Transplantation Society in Vancouver vorgestellt, wobei ich den Postervortrag in Stuttgart gehalten habe (gleichberechtigte Erstautorin).

Publikationen:

von Suesskind-Schwendi M, Brunner E, Hirt SW, Diez C, Ruemmele P, Puehler T, Wottge HU Schmid C, Lehle K (2012): Supression of bronchiolitis obliterans in allogeneic rat lung transplantation- Effectiveness of everolimus. In: Experimental and toxicologic pathology; 2012 Jan 25.

Impact factor: 2011: 2,781 (© Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012).

Brunner E, Lehle K, Hirt SW, Schmid C, von Suesskind-Schwendi M (2013): Everolimus attenuated persistant acute rejection after experimental lung transplantation. In: Advances in Clinical and Experimental medicine; eingereicht Januar 2013 mit der Registriernummer 2433/13

Impact factor: 2011: 0,176.

Postervorstellung in Stuttgart (mit eigenem Postervortrag):

von Süßkind-Schwendi M, Brunner E, Hirt SW, Pühler T, Schmid C, Lehle K.:
Everolimus in the treatment of chronic lung rejection.
39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie;
14.-17. Februar 2010; Stuttgart. Poster P141.

Postervorstellung in Vancouver:

von Süßkind-Schwendi M, Brunner E, Hirt SW, Pühler T, Schmid C, Lehle K.:
Treatment of acute, ongoing rat lung allograft rejection with Everolimus –
Ineffective in long-term outcome.
XXIII International Congress of The Transplantation Society; August 15-19, 2010;
Vancouver, Canada. Poster P33_08.

Article: title, 12 words; 5,344 words (abstract to references); abstract, 253 words;

1 table, 5 figures; 32 references

TITLE: SUPPRESSION OF BRONCHIOLITIS OBLITERANS IN ALLOGENEIC RAT LUNG TRANSPLANTATION -EFFECTIVENESS OF EVEROLIMUS

Authors: Marietta von Suesskind-Schwendi^{1,*}, Elisabeth Brunner^{1,*}, Stephan W. Hirt^{1,*}, Claudio Diez², Petra Ruemmeli², Thomas Puehler³, Christof Schmid¹, Karla Lehle¹

* both authors are equally contributed

Affiliation: ¹Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, ²Institute of Pathology, University of Regensburg; Germany

Running head: Everolimus in the treatment of chronic lung rejection

Correspondence to: Dr. Marietta von Suesskind-Schwendi
phone: +49-(0)941-944 9901
fax: +49-(0)941-944 9902
e-mail: marietta.suesskind-von@klinik.uni-regensburg.de

Grant support: SH, TP were supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (No. HI-1333). MWS was founded by a grant from University of Regensburg (No. 1101-03).

ABSTRACT

Background: Chronic rejection (CR) after lung transplantation (LTx) manifests pathologically by fibrotic airway remodelling and bronchiolitis obliterans (BO). The role of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in preventing this process is poorly understood.

Methods: A rat model of left lung allograft transplantation (Fisher 344 to Wistar Kyoto) was used to analyze the effect of everolimus (2.5 mg/kg/day) on the development of CR. Drug therapy began on postoperative day (POD) 0, 7 and 14 characterizing different grade of acute rejection (AR) of the allograft before drug treatment.

Results: Non-treated recipients developed severe acute rejection (AR) and first signs of CR on POD 20 and a pronounced CR on POD 60. On POD 20, only application of everolimus from POD 0 to 60 significantly reduced acute inflammatory infiltration ($p<0.001$). Independent of treatment scheme, everolimus suppressed the development of early signs of chronic alterations (POD 20). However, neither early (POD 7-60) nor late (POD 14-60) application of everolimus affected the progression of CR (POD 60). Only its initial treatment (POD 0-60) inhibited the development of BO and vasculopathy ($p<0.001$). An additional finding was a decrease in body weight after drug application.

Conclusion: The effectiveness of everolimus after rat LTx depended on the grade of inflammation of the allograft before initiation of drug treatment. Only allografts with no or low grade AR benefit from long-term treatment with everolimus in the prevention of BO after LTx. It could be speculated that conversion to an everolimus-based immunosuppression after LTx might only be successful in patients free of BO.

253 words

Keywords: Bronchiolitis obliterans, vasculopathy, everolimus, animal model, chronic rejection

INTRODUCTION

Long-term outcome after lung transplantation (LTX) depended on the development of bronchiolitis obliterans (BO), a manifestation of chronic allograft rejection that affects more than 50% of recipients who survive the early post-transplant period (Trulock, 2007; Gourishankar and Halloran, 2002). The underlying mechanism includes repeated injury and inflammation of graft epithelial cells and subepithelial structures of small airways leading to extensive fibroproliferation due to ineffective epithelial regeneration and aberrant tissue repair resulting in partial or complete occlusion of the bronchioles (Stewart et al., 2007; Neuringer et al., 2005). Acute rejection (AR) and lymphocytic bronchiolitis are the major risk factors for chronic rejection (CR) (Hachem, 2009). In a retrospective study on 259 adult LTX recipients it was shown that already a single episode of minimal AR without recurrence or subsequent progression is a significant predictor of BO (Hachem et al., 2005). However, early diagnosis of AR is often difficult because of low sensitivity of lung biopsies including insufficient tissue collection and irregular sample collection. As a consequence, few AR episodes remained undetected and untreated. Moreover, only rejections 22 were assessed to be dangerous (Marinu et al., 2010). This aggravates an estimation of the allograft damage. This might be one reason for doubtful effectiveness of new immunosuppressive drugs after LTX. So far no treatment has reliably prevented the development or slowed the progression of BO.

The immunosuppressive and antiproliferative properties of the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor everolimus might be a promising therapeutic strategy after LTX (Nashan, 2002). Everolimus inhibited growth factor-driven lymphocyte proliferation, proliferation of nonhematopoietic cells (Nashan, 2002) and human lung fibroblasts in vitro (Azzola et al., 2004), and attenuates collagen deposition in experimental pulmonary fibrosis. The proliferation signal inhibitor effectively prevented graft rejection in rat models of allotransplantation (Schuler et al., 1997; Schuuman et al., 1997). The *in vivo* effects after LTX were shown in two different animal models. Preventive and continuous triple-drug immunosuppression (everolimus, cyclosporine, methylprednisolone) inhibited epithelial

destruction and luminal obliteration in a heterotopic swine lung allograft model (Saiminen et al., 2000). However, this model is non-physiological. The subcutaneous implantation of donor lung sections caused severe initial ischaemia, inadequate drug supply, non-physiological ventilation, missing anatomical airway structures, and short graft implantation time. The other model is a unilateral LTX rat model that benefits from a full organ transplantation allowing assessment of acute bronchial, vascular and parenchymal rejection. Only co-application of everolimus and cyclosporine prevented AR (Hausen et al., 2000). Monotherapy with everolimus had no immunosuppressive effect (Hausen et al., 1999). However, due to the usage of major histocompatibility complex (MHC)-mismatched strains of inbred rats this model could only be used to verify AR but not CR processes. The therapeutic range based on experiences with rat kidney and heart allograft transplantation models (Schuler et al., 1997; Schuuman et al., 1997). The effective dosage ranged between 0.5 and 5 mg/kg/day. Hausen et al. (1999; 2000) used 2.5 mg/kg/day. The effectiveness of the drug was limited by side effects such as weight loss using continuous application of high doses of everolimus (Hausen et al., 1999; Schuuman et al., 1997). In the present study, we preferred the full organ model in a non-MHC allogeneic rat model (F344-to-WKY) to verify the impact of everolimus on the development of chronic allograft rejection (Matsumura et al., 1995; Hirt et al., 1999). This study included the initial state of the allografts defining different extent of premature damage of epithelial tissue and grading of AR.

MATERIAL AND METHODS*Animals*

Male Wistar Kyoto (WKY) and Fischer (F344) rats were purchased from Charles-River (Sulzfeld, Germany; 236 ± 30 g initial body weight) and kept under conventional conditions. All animals received human care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the European Union Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (publication No. 86/609/EWG). Approval was granted by the institutional ethical committee at the University of Regensburg.

Lung transplantation and follow-up

Orthotopic left LTX was performed in a moderate allogeneic F344-to-WKY (n=51) rat strain combination and in the syngeneic WKY-to-WKY (n=20) combination (Matsumura et al., 1995; Hirt et al., 1988). Briefly, donor lungs were removed and immersed in cold saline. The recipient animals were intubated and anesthetized. A left thoracotomy was performed, and the left lung was removed (ischemia, 1 hour). The left donor lung was placed into the recipient chest and pulmonary artery, pulmonary vein as well as the bronchus was anastomosed.

The general health status of the recipients was assessed by daily weight measurement and intermittent observation of grooming behavior and feces. Individual blood levels of everolimus were determined 20 and 40 days after initiation of drug therapy (24 h after drug administration) to estimate the stability of the blood levels. Blood was taken of the tail vein (0.5 ml) and analysed by high performance liquid chromatography in the Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital Regensburg. Drug blood levels between 1 μ g/l and 24 μ g/l were measured.

Study design

Due to the difficulties to verify the degree of acute inflammation of the lung allograft in humans we selected different initiation times for our drug therapy to satisfy different acute rejection grades of the allograft. Rats in group 1 (n=15) were not treated. In group 2-4 animals received everolimus (RAD001, Novartis Pharma, Basel, Switzerland) (2.5 mg/kg body weight, intragastral). Drug treatment was in group 2 (n=15) from postoperative day (POD) 14-60, in group 3 (n=9) from POD 7-60 and in group 4 (n=12) from POD 0-60. Microemulsion formulation of Everolimus for oral administration was provided to the investigators by Novartis Pharma (Basel, Switzerland). The drug was given in a single daily dose throughout the study. Dose was based on the individual daily weight of each rat. Rats were killed on POD 20 (group 1: 9; group 2: 5; group 3: 3; group 4: 6) and POD 60 (group 1: 6; group 2: 10; group 3: 6; group 4: 6). In addition, in each group, five syngeneic transplants were performed and euthanized on POD 60. Right lungs were used as an internal control.

5

Grading of acute and chronic rejection

For histological analysis of transplant rejection right native and transplanted left lungs from recipients rats were harvested, and fixed in 5% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany). Three paraffin sections of 5 μ m were prepared and stained with hematoxylin and eosin (HE) and two sections were stained with Masson-Goldner trichrome staining (MG) for grading rejection. The acute vascular rejection (AO-A4: degree of acute vascular rejection) and acute bronchiolar rejection (B0, B1R, B2R, BX: degree of acute airway inflammation) was graded according to the working formulation of The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) (Stewart et al., 2007). For a detailed diagnosis of chronic lung rejection, the working formulation of the ISHLT was modified. C0 and D0 described lung sections with normal pulmonary parenchyma. Low grade chronic bronchiolar rejection classified allografts with first signs of intraluminal polyps of granulation tissue or loose subepithelial fibrin structures around ≥ 1 terminal bronchioles. C1/BO described dense fibrosis in the submucosa of terminal bronchioles with destruction of the smooth muscle cell layers of the airway wall. As a consequence the entire lumen could be a distorted (constrictive bronchiolitis) or completely obliterated by scar tissue. An extension of scar tissue into the peribronchiolar interstitium was possible. Accordingly, low grade chronic vascular rejection was introduced to describe an obstruction of small vessels. Histological sections presented leukocytes adhered to the endothelium as well as luminal appearance of isolated fibroblasts occluding the small vessel lumen. D1 classified distinct perivascular fibrosis/bronitimal thickening of the majority of small and medium sized vessels including an extension of perivascular fibrosis into adjacent interstitium.

Statistical analysis

Histological scoring was performed by a single investigator (blind fashion). For a statistical analysis, we used the proportion of high grade AR (ISHLT-AA, ISHLT-B2R) to compare Everolimus-treated groups vs the non-treated group (group 1). To verify chronic alterations, we compared the proportion of animals free of CR (= no CR) from group 1 vs groups 2 to 4 with first signs of CR and a manifest BO and vasculopathy. We used the test of hypothesis

6

for the difference between population proportions significance ($p<0.05$). Unpaired Mann-Whitney rank sum test was used to evaluate statistical differences of body weights. Statistical software SPSS 16.0.2 (SPSS Inc, Chicago, IL) was used. Data are presented as median and interquartile range (25th/75th percentiles). P-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Everolimus side effects

The mean group weights over time are shown in Figure 1. The weights of everolimus-treated rats were presented with the initiation of drug therapy. A fundamental problem in the usage of everolimus was a loss in weight. We approved similar observations described earlier by Hauseen et al. (1998; 2000) and Schurmann et al. (1997). Using recipients with a median (25th/75th percentile) initial weight of about 200 (180/240) g resulted in a reduction of body weight below an ethical justifiable limit and worsened state of health of the rats within 7 days after syngeneic LTx. Subsequent discontinuation of the drug increased recovery of treated animals within 10 days. Only animals with an initial weight of more than 250 g tolerated the doses of everolimus used in the present study. Therefore, the initial weights of animals from groups 2-4 were higher than in group 1 (median (25th/75th percentile); group 1, 266 (243/275) g; group 2, 289 (295/315), p<0.001; group 3, 272 (269/302), p=0.175; group 4, 273 (266/336), p=0.102). In the initial early postoperative period (2.2 ± 1.1 days post-LTx) the surgical procedure resulted in a drop in animal weights (8.6 ± 2.3%, p=0.05) in all non-treated animals. Initial everolimus treatment (group 4) significantly increased the magnitude of early weight loss (17.7 ± 4.4 % of initial body weight, p>0.05) after 6.2 ± 1.2 days post-LTx. Delayed application of everolimus (group 2 and group 3) resulted in a secondary weight loss (7.4 ± 2.2%, p=0.05, and 2.7 ± 1.2%, not significant, respectively) within 7.4 ± 5.4 and 4.2 ± 2.5 days after initiation of drug therapy. Rats from group 1 regained their initial body weight within 8.6 ± 3.0 days and increased significantly. Weight gain of everolimus-treated animals was significantly reduced. On POD 60, almost all everolimus-treated animals reached its initial weight (median (25th/75th percentile); group 1, 145 (134/155)%; group 2, 101 (97/103)%; group 3, 109 (108/112)%; group 4, 96 (93/100)% of initial weight). Nevertheless, the described weight loss did not cause any deaths. All rats survived.

The histological analysis of right lungs and syngeneic transplanted left lungs presented unexpected results on POD 60. While short-term application of everolimus did not affect lung structures, long-lasting treatment with everolimus increased in about 50% of the animals an

accumulation of foamy alveolar macrophages in alveolar spaces and partially infiltration of lymphocytes accompanied by mild widening of alveolar septa in these lungs (Figure 2).

Everolimus reduced the extent of AR and chronic alterations in the early phase after LTX

Table 1 shows the range of histology scores of acute lung rejection (acute vascular and airway rejection) of transplanted lungs from groups 1 to 4. Non-treated recipients completely rejected their allografts within 20 days postoperatively (ISHLT-A4/B2R) (Table 1, Figure 3A). At this time point, the development of chronic alterations was aggravated (Figure 4). The majority of allografts presented high grade vasculopathy and low grade chronic airway alteration. The latter was characterized by intraluminal polyps of granulation tissue in more than one terminal bronchiole or loose subepithelial fibrin structures around individual terminal bronchioles. Even in one allograft a BO was diagnosed. The immunosuppressive activity of everolimus manifested in the early phase after LTX (POD 20). While late application of everolimus (group 2) did not arrest the development of acute vascular and airway rejection, earlier application attenuated the inflammatory response (Table 1). All allograft from group 2 showed diffuse perivascular, interstitial and air-space infiltrates of mononuclear cells and granulocytes associated with a prominent diffuse alveolar damage (DA) and vasculitis (Table 1, Figure 3B). The same diagnosis of severe acute vascular rejection and high grade airway inflammation was made in two-third of the allografts from group 3 (Table 1, Figure 3C). Only few allografts were characterized by ISHLT-A2-3 and ISHLT-B1R. Initial application of everolimus (group 4) significantly reduced the extent of severe AR ($p<0.001$; each ISHLT-A and B) (Table 1, Figure 2 D). These allografts showed mild to moderate AR in association with low grade small airway inflammation (B1R). Small vessels were cuffed by dense perivascular mononuclear cell infiltrates spreading into adjacent alveolar septa. In addition, the majority of smaller and medium-sized vessels showed a prominence of subendothelial lymphocytic infiltration often associated with intimal thickening (vasulitis).

Terminal bronchioles were affected only marginally. Furthermore, treatment of transplanted rats with everolimus reduced the extent of chronic alterations diagnosed on POD 20.

Independent of the application time, everolimus attenuated the extent of a pronounced vasculopathy (Figure 4A) (group 1 vs group 4, $p = 0.001$). Furthermore, in the early phase after LTX there was no sign of chronic airway rejection or BO (Figure 4B).

Effectiveness of everolimus to prevent BO depended on the grade of AR of the allograft before drug treatment

Figures 4 and 5 presented data of chronic vascular and airway rejection on POD 60. Allogeneic LTX in the F344-to-WKY rat model without any immunosuppression ended in pronounced CR with evidence of BO and vasculopathy (Figures 4 and 5A). One-third of allografts was already completely scarred. Histological sections showed fibrointimal thickening of vessels, fibrotic structures around terminal bronchioles, and a progressive interstitial fibrosis. More than 50% of these allografts presented scattered areas with mononuclear cell infiltrates. The extent of inflammatory infiltration decreased with aggravated fibrosis. Late (group 2) application of everolimus did not improve long-term outcome (Figures 4 and 5B). As shown in Figure 4, allografts from group 1 and group 2 presented the same proportion of animals with high grade chronic vascular rejection and BO and the same proportion of animals with completely fibrotic allografts. In addition, 70% of these lungs showed persisting inflammatory infiltrations. In groups 3 and 4, a distinct amount of allografts were without BO and vasculopathy (Figure 4). One-third of allografts from group 3 was free of chronic alterations. Another third showed pronounced BO and vasculopathy associated with focal interstitial fibrosis and a persisting inflammatory cell infiltration (Figure 5C). The remaining allografts were completely scarred. Initial immunosuppression with everolimus (group 4) completely prevented the development of BO and chronic vascular rejection (each $p<0.001$) (Figure 4). However, AR persisted. A dense mononuclear cell infiltrate around small vessels and bronchioles spreading out into the adjacent perivascular and peribronchiolar alveolar septa and alveolar spaces dominated the histological sections on POD 60 (Figure 4D). In most of the allografts (67%) vasculitis was also present.

DISCUSSION

In the present study, the immunosuppressive activity of everolimus after LTX was analyzed in a rat F344-to-WKY LTX model, a relevant model to analyze the development of CR after LTX (Sato et al., 2009). Both, the effect on AR and CR depended on the grade of acute inflammation of lung allografts before drug treatment. Everolimus inhibited the development of early accumulations of fibrotic deposits. The initial application of everolimus partly reduced the extent of AR, and repressed the progression of BO. The effectiveness of everolimus failed when allografts were diagnosed with mild to severe acute vascular rejection and low to high grade lymphocytic bronchiolitis.

The F344-to-WKY LTX model, a mild histoincompatible rat strain combination, merged the histological characterization of the development of both AR and CR after rat LTX. The classification of our study groups representing different extent of preexisting damage of the allografts was based on histopathological observations from Matsumura et al. (1985). Already on POD 7 they described a mild acute vascular rejection and low grade airway inflammation reaching maximum rejection on POD 14 (ISHLT-A2-3/B1R) which persisted up to POD 21. Based on these histopathological alterations we analysed the immunosuppressive activity of everolimus and initiated drug therapy on POD 0 as a representative for A0-1/B0-B1R, POD 7 as a representative for A2-3/B1R and POD 14 as a representative for A4/B2R. Histological analysis of our non-treated animals (group 1) on POD 20 and 60 approved the data from Matsumura et al. (1985). A particular feature in this group was the identification of advanced chronic vascular alterations in the early phase after LTX (POD 20). The majority of allografts presented high grade vasculopathy and low grade chronic airway alterations. The latter was identified by intraluminal polyps of granulation tissue in more than one terminal bronchiole or loose subepithelial fibrin structures around individual terminal bronchioles. We speculated that these early chronic alterations might be a precursor for the development of BO. The effectiveness of everolimus in this rat LTX model depended on the grade of acute inflammation of the allografts before drug treatment. Only initial treatment with everolimus (group 4) significantly reduced the progression of acute

vascular rejection and airway inflammation in the early phase after LTX (ISHLT-A2-3/B1R). However, AR was not completely repressed and persisted up to POD 60. Everolimus might delay early steps in the inflammatory transmigration of leukocytes across the vascular wall. This includes an inhibition of (1) the direct migration of leukocytes across arteriolar and venular walls into the perivascular interstitium as shown in animal models of acute and chronic airway inflammation (Wang et al., 2011) and (2) the expression of endothelial cell adhesion molecules at sites of leukocyte interaction (Wang et al., 2011; Singh et al., 2005). The underlying mechanism of delayed airway inflammation under everolimus treatment might include a possible communication of peribronchial and perirarterial compartments. However, we can not exclude that a prolongation of the observation period increased the risk for the development of BO and vasculopathy in that allografts. The partial inhibition of AR after everolimus treatment in our model was in contrast to data from Hausein et al. (1999). An everolimus monotherapy resulted in severe rejection by POD 21. Only coapplication with cyclosporine suppressed lung rejection (Hausein et al., 1999; Hausein et al., 2000). They used a complete histoincompatible rat strain combination (Brown Norway lungs to Lewis recipients) presenting fast and complete rejection within 7 days after LTX. The synergistic effect of cyclosporine and everolimus was also shown in an international randomized, double-blind clinical trial BO-free maintenance patients receiving everolimus within 3 months after LTX demonstrated a significant slowing of loss in lung function (Snell et al., 2006). In addition, at 24 months, the incidence of AR remained significantly less in the everolimus group. Up to now, there were no data on calcineurin-inhibitor-free (CNI) immunosuppression after LTX. The elimination of CNIs in the immunosuppressive regimen in other solid organ transplants did not improve the rates of AR but maintained the efficacy and safety of this drug to improve the long-term outcome in selected patients (Budde et al., 2011). Moreover, it should be considered that in comparison to other solid organ transplants, the incidence of AR is significantly higher in LTX patients (Hausein and Morris, 1987). This may be due to the vast intrinsic immune apparatus in the lung that is constantly activated due to the unique exposure of the lung to extrinsic infections or irritative agents via the airways (Trulock 1997).

The immunosuppressive activity of everolimus affected the development of first signs of chronic alterations which were a particular feature in our non-treated animals on POD 20. It was supposed that injury and inflammation of epithelial and subepithelial structures of small airways cause excessive growth factor-mediated proliferation of myofibroblasts due to ineffective epithelial regeneration and aberrant tissue repair (Wynn, 2008). Independent of initiation of drug treatment (representing the degree of acute inflammation of the lung allografts before drug treatment), everolimus significantly reduced the prominence of early signs of chronic airway alterations and vasculopathy. We supposed that the anti-proliferative activity of everolimus manifested in the early time after LTX. However, the effectiveness of the drug depended on the progression of these early fibroproliferative processes. Only allografts with none to minimal acute vascular and airway rejection (group 4) benefited from the mTOR inhibitor treatment. Early (group 3) and late (group 2) application of everolimus reduced the accumulation of early chronic deposits but did not prevent the development of BO and high grade vascular alterations. This reflects the special significance of the lung, in the clinical situation, the detection of first signs of chronic alterations in lung biopsy specimen is very difficult as discussed above. Replacement of azathioprine with everolimus 3 months after LTX in stable lung transplant recipients without diagnosis of BO showed significant slowing of loss in lung function (Snell et al., 1996). After 24 months, there was a much higher incidence of BO syndrome in the azathioprine group (50% vs. 23%) (Snell et al., 2006). After 3 years, rates of efficacy failure became similar between the groups (Snell et al., 2006).

Clinical trials introducing everolimus earlier after LTX or an immunosuppressive regimen without CNI failed. CNI-free and everolimus-based immunosuppression after kidney transplantation improved renal function but only selected patients may benefit in their long-term outcome (Budde et al., 2011). A common problem of everolimus treatment after transplantation was the presence of serious adverse events such as lipid and hematologic abnormalities (Ponticelli et al., 2011), pulmonary toxicity (Otton et al., 2008; Exposito et al., 2008; Ponticelli et al., 2011), and wound healing problems (Dandekar et al., 2010) which can lead to discontinuation of drug therapy (Snell et al., 2006). A balanced ratio of reduced BO

and justifiable adverse effects might improve long-term outcome in selected patients (Snell et al., 2006; Budde et al., 2011). Side effects of everolimus were also prominent in our animal study. A massive weight loss limited survival of lightweight animals (<250g initial weight). Recently, Debbon et al. (2011) demonstrated that mTOR inhibitor treatment promoted a decrease in food intake and concomitant weight loss. Furthermore, these rats were glucose intolerant, hyperinsulinemic and hyperglycaemic. In our study, food intake was not controlled systematically. However, all of the everolimus treated small animals lost weight which was no longer compatible with live. Only heavyweight recipients survived the LTX procedure and everolimus treatment without other clinical anomalies. After an initial weight loss early after LTX animals recovered. However, long-term application of everolimus prohibited maximum body weight. We speculated that treatment of heavyweight rats with mTOR inhibitors induced a fair mass loss as shown in the study of Debbon et al. (2011). Hausen et al. (1999; 2000) approved our observations using the same dosage (2.5 mg/kg/day). Only delayed application of everolimus (in combination with cyclosporine) improved grooming behavior and activity and stopped loose stools (Hausen et al., 2000). Nevertheless, we can not exclude that the selected dosage of everolimus increased toxic side effects. Blood trough levels of everolimus in our study and in the acute LTX model of Hausen et al. (1999; 2000) ranged between 16 and 27 µg/l which was much higher than in humans (6–12 µg/l) (Snell et al., 2006). In addition, in our study half of the everolimus-treated animals presented an accumulation of foamy alveolar macrophages in alveolar spaces of right and syngeneic transplanted lungs partially associated with isolated lymphocytes and a mild widening of the alveolar septa. The presence of alveolar macrophages in lungs of individual everolimus-treated patients was also described after kidney and heart transplantation (Otton et al., 2008; Exposito et al., 2008; Ponticelli et al., 2011). We can not exclude a pulmonary toxicity after long-term application of 2.5 mg/kg/day everolimus in our rats. However, our rats showed no additional clinical anomalies. This everolimus-associated pneumonitis improved after withdrawal of the drug.

In conclusion, the effectiveness of everolimus after rat LTX depended on the severity of acute inflammation of the allograft before initiation of drug therapy. Treatment of allografts with moderate to severe AR prohibited a successful prevention of BO and vasculopathy after rat LTX. Only allografts with no or low grade AR benefit from everolimus treatment in their long-term outcome. Based on these data, we speculate that early application of everolimus after LTX might be essential to improve long-term outcome. Only patients free of early BO might benefit from an everolimus-based immunosuppression.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Eva Lesser, SH, TP were supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (No. HI-1333). MvS was founded by a grant from University of Regensburg (No. 1101-03). There were no financial or other relations that could lead to conflict of interest.

REFERENCES

- Azzola A, Havryk A, Chhajed P, Hostettler K, Black J, Johnson P, Roth M, Glanville A, Tamm M. Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. *Transplantation*. 2004;77(2):275-80.
- Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pierack F; ZEUS Study Investigators. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9768):837-47.
- Daniel M, Lehmkohl HB, Knosalla C, Hetzer R. Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. *Transpl Immunol*. 2010;23(3):93-103.
- Deblon N, Bourgoin L, Veyrat-Dubreux C, Peyrou M, Vindiguera M, Caillou A, Maeder C, Fournier M, Monlet X, Rohner-Jeanrenaud F, Foti M. Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. *Br J Pharmacol*. 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01716.x.
- Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003;349(9):847-58.
- Expósito V, de Prada JA, Gómez-Román JJ, González-Vilchez F, Llano-Cardenal M, García-Camarero T, Fernández-Valls M, Ruano J, Martín-Durán R. Everolimus-related pulmonary toxicity in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(7):797-800.
- Gourishankar S, Halloran PF. Late deterioration of organ transplants: a problem in injury and homeostasis. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(5):576-83.
- Hachem RR, Khalifah AP, Chakrinala MM, Yusen RD, Aboush AA, Mohanakumar T, Patterson GA, Trulock EP, Walter MJ. The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation*. 2005;80(10):1406-13.

9. Hachem RR. Lung allograft rejection: diagnosis and management. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009 Oct;14(5):477-82. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, et al. Registry of international society for heart and lung transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(8):782-95.
10. Hausen B, Morris RE. Review of immunosuppression for lung transplantation. Novel drugs, new uses for conventional immunosuppressants, and alternative strategies. *Clin Chest Med.* 1997;18(2):353-66.
11. Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Segarra IT, Christians U, Morris R E. Suppression of acute rejection in allogeneic rat lung transplantation: A study of efficacy and pharmacokinetics of Rapamycin derivative (SDZ RAD) used alone and in combination with a microemulsion formulation of cyclosporine. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:150-59.
12. Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Christians U, Schüler W, Morris RE. Successful treatment of acute, ongoing rat lung allograft rejection with the novel immunosuppressant SDZ-RAD. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 904-9.
13. Hernández D, Martínez D, Gutiérrez E, López V, Gutiérrez C, García P, Cobelo C, Cabello M, Burgos D, Sola E, González-Molina M. Clinical evidence on the use of anti-mTOR drugs IN renal transplantation. *Nefrologia.* 2011;31(1):27-34.
14. Hirt SW, You XM, Möller F, Boeke K, Ernst M, Starke M, Spranger U, Wottge HU. Early treatment of acute rejection prevents chronic rejection in a rat model of allogenic left lung transplantation. *Transplant Proc.* 1998;30(4):1005-6.
15. Martinu T, Howell DN, Palmer SM. Acute cellular rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010;31(2):179-88.
16. Matsumura Y, Marchevsky A, Zuo XJ, Kass RM, Maloff JM, Jordan SC. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation.* 1995;59(11):1509-17.
17. Nashan B. Review of the proliferation inhibitor everolimus. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(12):1845-57.
18. Neuringer IP, Chalermkulrat W, Aris R. Obliterative bronchiolitis or chronic lung allograft rejection: a basic science review. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(1):3-19.
19. Ottow J, Hayward CS, Keogh AM, Gianville AR, Macdonald FS. Everolimus-associated pneumonitis in 3 heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(1):104-6.
20. Ponticelli C, Salvadori M, Sciolari MP, Citterio F, Rigotti P, Veneziano A, Bartezaghi M; EVEREST Study. Everolimus and minimization of cyclosporine in renal transplantation: 24-month follow-up of the EVEREST study. *Transplantation.* 2011;91(10):e72-3.
21. Salminen US, Mäslanta PK, Taskinen EI, Alho HS, Ikonen TS, Harjula AL. Prevention of small airway obliteration in a swine heterotopic lung allograft model. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19(2):193-206.
22. Sato M, Keshavjee S, Liu M. Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9(9):1981-7.
23. Schuler W, Sedrati R, Cottens S, Häberlin B, Schulz M, Schuermann HJ, Zenke G, Zenewes HG, Schreier MH. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation.* 1997;64(1):36-42.
24. Schuermann HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrati R, Tanner M, Zenke G, Schuler W. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation.* 1997;64(1):32-5.
25. Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(2):223-9.
26. Snell GI, Esmon R, Williams TJ. Cycolytic therapy for the bronchiolitis obliterans syndrome complicating lung transplantation. *Chest.* 1996;109(4):874-8.

- FIGURE LEGENDS
- Figure 1.
- Comparison of mean group body weight over time (group 1, n = 10; group 2, n = 9; group 3, n = 6; group 4, n = 6). Data were presented as mean and standard deviation.
27. Snell GI, Valentine VG, Vitullo P, Gianville AR, McGiffin DC, Loyd JE, Roman A, Ans R, Sole A, Hmissi A, Pirron U; RAD B159 Study Group. Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2006;6(1):169-177.
28. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GA, Boehmer A, Burke MM, Gianville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinmoen NL, Scott JP, Stidder SM, Tazelaar HD, Walwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A, Yousem SA. Revision of the 1996 working formulation for standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(12): 1029-1042.
29. Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(3):789-818.
30. Viganò M, Tuzcu M, Benza R, Boissonnat P, Haverich A, Hill J, Laufer G, Love R, Parameshwar J, Pulpon LA, Reuland D, Apeywickrama K, Crelin N, Starling RC, Eisen HJ; RAD B253 Study Group. Prevention of acute rejection and allograft vasculopathy by everolimus in cardiac transplants recipients: a 24-month analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(6):584-592.
31. Wang PM, Kachiel DL, Casta MF, Martin WJ 2nd. Direct leukocyte migration across pulmonary arterioles and venules into the perivascular interstitium of murine lungs during bleomycin injury and repair. *Am J Pathol*. 2011;178(6):2560-2572.
32. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):195-210.
- Figure 2.
- Representative histology of a right lung from everolimus treated rats (group 4) on POD 60. Lung section presented an accumulation of foamy alveolar macrophages in the alveolar spaces (stars), mild widening of the alveolar septa (long arrows) and scattered lymphocytes (broad arrow) (HE-staining).
- Figure 3.
- Representative histopathology of acute vascular rejection and airway inflammation on POD 20 (MG-A) and HE-(B-D)-staining. Allografts from group 1 (A) show severe vasculitis (ISHLT-A4) in combination with first signs of perivascular and fibrointimal fibrosis (arrow). The terminal bronchile (B) shows epithelial hyperplasia accompanied by an intense inflammatory cell infiltrate. Group 2 (B) shows diffuse perivascular, interstitial and air-space infiltration of mononuclear cells associated with prominent alveolar pneumocyte damage (stars) (ISHLT-A4). Terminal bronchioles (B) show an intense mucosal and peribronchiolar mononuclear cell infiltrate involving the epithelium with a distinct epithelial damage (short arrow) (ISHLT-B2R). Allografts from group 3 (C) demonstrate severe acute vascular rejection (ISHLT-A4 0), cuffing of mononuclear cells around small vessels (V, long arrow) and extension of inflammatory cells into perivascular and peribronchiolar alveolar septal airspaces (short arrows). Terminal bronchioles (B) exhibit high grade lymphocytic bronchiolitis (ISHLT-B2R). Allografts from group 4 (D) present perivasular cuffing (long

arrow) without spreading into adjacent alveolar septa and air spaces (ISHLT-A2.5). Scattered mononuclear cells surround tB (ISHLT-B1R).

Figure 4.

Overview of chronic vascular rejection (A) and chronic airway rejection (B) on POD 20 and POD 60 in groups 1 to 4. Chronic vascular rejection is divided into no, low grade (\leq occlusion of small with mononuclear cells and fibrous tissue), high grade CR (= distinct vascular sclerosis of smaller and medium sized vessels with fibrominal thickening of arteries and veins; ISHLT-D) and complete fibrosis of the allografts. Chronic airway rejection is divided into no, low grade CR (= first signs of intraluminal polyps of granulation tissue in >1 terminal bronchile or loose subepithelial fibrin structures around terminal bronchioles), bronchiolitis obliterans (BO, dense fibrosis of the submucosa of the terminal bronchioles, resulting in a partial or complete luminal occlusion), and complete fibrosis of the allografts.

Figure 5.

Representative histopathology of CR (POD 60, MG- (A,B) and HE- (C,D) staining). Allografts from group 1 (A) present intimalfibrosis of small vessels (V), attenuated epithelium of terminal bronchile (B) with fragmentation of the smooth muscle cell airway wall (short arrow) and scarring of the sub-nuerosa. Alveolar sepa are destructed and replaced by fibrous tissue (stars). Allografts from group 2 (B) show fibronitimal thickening of vessels (V), submucosal scarring of terminal bronchioles (B), with destruction of the smooth muscle cells and the overlaying epithelium, and persisting AR (stars). Allografts from group 3 (C) describe a scarring of small vessels (V) in association with a scarring of the submucosa and an attenuation of the overlaying epithelium of the bronchioles terminals (B). An accumulation of type II pneumocytes are present (short arrow). Allografts from group 4 (D) show mild acute vascular rejection with mononuclear cell infiltrates surrounding small vessels, and scattered mononuclear cell infiltrates in the submucosa of small bronchioles (ISHLT-A2B1R). Plaques of foamy alveolar macrophages (long arrow) are present in the alveolar-spaces.

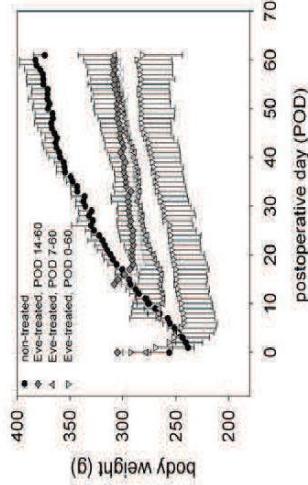


Figure 1

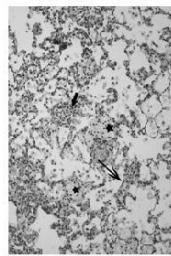


Figure 2

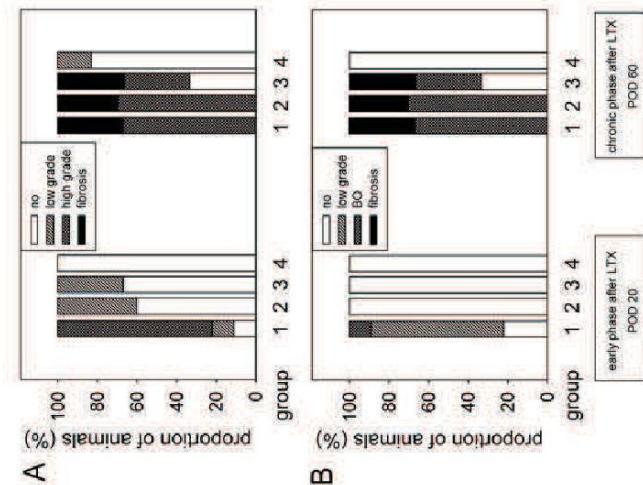


Figure 3

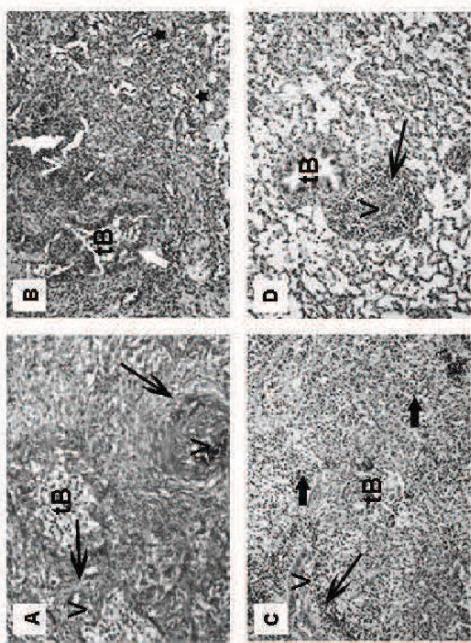


Figure 4

Article: title: 9 words; 1,224 words (abstract to references); abstract, 169 words;

1 table; 1 figures; 10 references

TITLE: Everolimus attenuated persistent acute rejection after experimental lung transplantation

Authors: Elisabeth Brunner¹, Karla Lehle¹, Stephan W. Hirt¹, Christof Schmid¹, Marietta von Suesskind-Schwendi¹

Affiliation: ¹Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, University of Regensburg, Germany

Correspondence to: Dr. Marietta von Suesskind-Schwendi

phone: +49-(0)941-944 9901

fax: +49-(0)941-944 9902

e-mail: Marietta.suesskind-von@klinik.uni-regensburg.de

Running title: rat lung transplantation and everolimus

Grant support : SH supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (No. HI-1333). MvS was founded by a grant from University of Regensburg (No. 1101-03)

Abstract

Background: Acute rejection after lung transplantation aggravated the risk of chronic rejection and mortality.

Objectives: The aim was to verify whether an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (everolimus) contained the extent of persistent acute rejection after left lung allo-transplantation in rats.

Material and Methods: Rats (F344-to-WKY) with high grade of acute rejection were treated with methylprednisolone (10mg/kg, postoperative days 14-16) alone or in combination with everolimus (2.5 mg/kg, postoperative days 14-30). Rats were killed on postoperative day 20 and 30. Infiltration of inflammatory cells (ED1, CD11a, CD18) and activation of endothelial cells (ICAM-1) were measured by immunohistochemistry.

Results: Everolimus-treatment significantly reduced the number of ICAM-1 positive small vessels (66%; p<0.05) and suppressed the infiltration of leucocytes (CD11a (64%), CD18 (42%); p<0.05) and macrophages (ED1; 22%) in the allografts. Despite this anti-inflammatory effect, lung allografts showed severe acute vascular rejection in combination with high grade small airway inflammation.

Conclusion: In conclusion, despite its anti-inflammatory effect everolimus could not delay the progression of acute inflammation in lung allografts.

Key words: Lung transplantation, acute lung injury, everolimus, rats

Introduction

Lung transplantation (LTx) is a valid therapeutic option for a variety of end stage pulmonary diseases. However, despite advances in immunosuppressive therapy, acute allograft rejection and lymphocytic bronchiolitis remained high risk factors for development of chronic allograft rejection, morbidity and mortality [1]. While the application of steroids for three days is the 'golden standard' for therapy of acute allograft rejection, this therapy often failed. These patients often develop recurrent acute rejection or persistent rejection. Underlying mechanisms are unknown [2]. It was discussed that immune cells that escape the effects of immunosuppressive drugs may be responsible for acute persistent-recurrent rejection [1].

Today, everolimus was successfully used to prevent acute and chronic rejection after solid organ transplantation [3]. We hypothesize that the anti-inflammatory effect of everolimus [4] might influence the progression of persistent acute rejection after left lung allo-transplantation in rats.

Material and Methods

A moderate allogenic F344-to-WKY ($n=20$) rat strain combination model was used that presents both, acute rejection in the early time after LTx (up to postoperative day (POD) 30) and chronic rejection in the long term follow up [5]. Orthotopic left LTx was performed as described earlier [5]. Rats were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany; 280-30g). All animals received human care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the European Union Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (publication No. 86/609/EWG). Rats in the control-group ($n=10$) were treated with methylprednisolone (MP, Urihason®, Hoechst AG, Frankfurt, Germany) (10mg/kg body weight, intraperitoneal on POD 14-16). Rats in the everolimus-group ($n=10$) additionally received everolimus (Novartis Pharma, Basel, Switzerland) (2.5mg/kg body weight, intragastral from POD 14-30). Cohorts of 5 animals each were killed on POD 20 and 30. Right lung were used as internal control. Native lungs of non-transplanted rats were used as initial tissue. Aside from conventional histology, cell adhesion molecules (ED1, CD11a, CD18, ICAM-1) were investigated [6]. Acute rejection was graded according to the ISHLT working formulation [7].

The number of ED1+, CD11a+ and CD18+ cells and the proportion of ICAM-1+ vessels was measured in five different microscopic fields (ICAM-1 grading: 1: <25%, 2: 25-50%, 3: 50-75%, 4 > 75% positive vessels per microscopic field). The difference between left and right lung of respective animals was used to demonstrate the effect of the drugs on the extent of acute rejection. Statistical analysis (SPSS 16.0.2, SPSS Inc, Chicago, IL) included analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnnett T3 post-hoc-test with p-values considered significant below <0.05.

Results

On POD 20 and 30, all allografts from the control-group and the everolimus-group showed moderate to severe acute cellular rejection and high grade lymphocytic bronchiolitis (Table 1). Right lungs of transplanted rats were without inflammatory findings (mean number of positive cells per microscopic field: ED1, 17 ± 1 ; CD11a, 24 ± 4 ; CD18, 27 ± 2 ; proportion of ICAM-1+ vessels per microscopic field, 2.3 ± 0.3). Similar results were documented in native lungs of non-transplanted rats (data not shown). Independent of treatment, allogeneic LTx accelerated the infiltration of inflammatory cells and activated endothelial cells in small vessels. That means in both groups, the number of inflammatory cells and the proportion of activated vessels in the allografts significantly increased within 20 days after LTx (differences between left and right lungs: control-group: ED1: 8 ± 2 ; CD11a, 16 ± 2 ; CD18, 27 ± 5 ; ICAM-1: 1.5 ± 0.3 ; everolimus-group: ED1: 7 ± 3 ; CD11a, 19 ± 2 ; CD18, 28 ± 2 ; ICAM-1, 1.0 ± 0.7). In the control-group, the inflammatory response remained high up to POD 30. As shown in Figure 1, the additional application of everolimus up to POD 30 resulted in a significant decrease in the number of infiltrated lymphocytes (CD11a+ and CD18+ cells) ($p < 0.05$). In addition, the proportion of activated vessels was significantly lower in the allografts of the everolimus-group ($p < 0.05$). However, the number of alveolar macrophages remained unchanged.

Discussion

Persistent and recurrent acute rejection episodes are major risk factors in lung transplant patients leading to chronic rejection and graft failure. The exact trigger remains unknown. Present data exemplified that the anti-inflammatory properties of Everolimus caused a significant containment of inflammatory infiltration in allografts after experimental LTx.

The relevance of acute rejection as a risk factor for the development of chronic rejection was already shown in the same animal model by Hirt and coworkers [8]. Both early and late application of a steroid bolus attenuated the extent of acute rejection on POD 20. However, only early therapy suppressed chronic rejection in the long-term follow-up. Late treatment of acute rejection could not prevent the development of extensive vascular fibrosis and bronchiolitis obliterans [8]. However, in our rats, late application of MP on POD 14-16 did not affect acute rejection. The reasons for this discrepancy might be breeding differences resulting in various sublines of the same rat strain [5]. Hirt and coworkers used animals from Harlan-Winkelmann and our rats were purchased from Charles River. The source and husbandry history of the animals is important for analysis of immuno-mediated processes [5]. In the present study, we hypothesized that the additional application of an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (everolimus) attenuate persistent cellular inflammatory responses after left lung allograft transplantation in rats (F344-Io-WKY). Everolimus significantly attenuated the infiltration of lymphocytes and reduced the expression of its corresponding endothelial receptor (ICAM-1) in small vessels of lung allografts. Underlying mechanisms might be the suppression of inflammatory mediators (IL-6 or MCP-1) and T-cell activation markers

(IL-2, IFN-gamma) [9], as well as the inhibition of growth factor-stimulate proliferation of lymphocytes [4]. However, despite the suppression of infiltration of inflammatory cells during persistent acute rejection after application of everolimus its anti-inflammatory effect could not stem the progression of severe cellular rejection and advanced lymphocytic bronchiolitis. The overall histological evaluation of the allografts described an ISHLT-A4/B2R. Based on the high grade of acute rejection we suppose that treatment of persistent acute rejection with a bolus of MP and everolimus could not prevent the development of chronic rejection. Similar results were already shown in an earlier study using a monotherapy of everolimus [10]. Only early application of Everolimus reduced the grade of acute rejection and the development of vasculopathy and bronchiolitis obliterans [10].

In conclusion, despite its anti-inflammatory effect Everolimus could not delay the progression of acute inflammation in lung allografts.

References

- Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Webber S, Ristich J, Zhang J, Iacono A, Dauber J, McDade K, Zaldonis D, Lamba J, Burckart GJ: The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005; 14, 1, 37-42.
- Gimita AL, McCurry KR, Iacono AT, Duquesnoy R, Corcoran TE, Awad M, Spichtig KJ, Yousem SA, Burckart G, Dauber JH, Griffith BP, Zeevi A: HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23, 10, 1135-1141.
- Moes DJ, Press RR, den Hartigh J, van der Straaten T, de Fijter JW, Guchelaar HJ: Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of everolimus in renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2012; 1, 51, 7, 467-480.
- Lehle K, Birnbaum DE, Preuner JG: Predominant inhibition of interleukin-6 synthesis in patient-specific endothelial cells by mTOR inhibitors below a concentration range where cell proliferation is affected and mitotic arrest takes place. In: *Transplant Proc* 2005; 37, 1, 159-161.
- von Süßkind-Schwendi M, Rümmeli P, Schmid C, Hirt SW, Lehle K: Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. *Exp Lung Res* 2012; 38, 3, 111-123.
- Hirt SW, You XM, Möller F, Boeke K, Starke M, Spranger U, Wottge HU: Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation:

Table 1: Evaluation of acute vascular rejection and lymphocytic bronchiolitis (B) of the control-group and the everolimus-group. Samples were graded according to The International society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [7].

7. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Gianville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinsmoen NL, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A, Yousem SA: Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007, 26, 12, 1229-1242.
8. Hirt SW, You XM, Möller F, Boeke K, Ernst M, Starke M, Spranger U, Wottge HU: Early treatment of acute rejection prevents chronic rejection in a rat model of allogenic left lung transplantation. *Transplant Proc* 1998, 30, 4, 1005-1006.
9. Fujishiro J, Pech TC, Finger TF, Prakkenjo M, Stoffels B, Standop J, Abu-Elmagd K, Tuerler A, Hirner A, Kalff JC, Schaefer N: Influence of immunosuppression on alloresponse, inflammation and contractile function of graft after intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2010, 10, 7, 1545-1555.
10. von Suesskind-Schwendi M, Brunner E, Hirt SW, Diez C, Ruemmele P, Puehler T, Schmid C, Leble K: Suppression of bronchiolitis obliterans in allogeneic rat lung transplantation-Effectiveness of everolimus. *Exp Toxicol Pathol* 2012, 25, in press.

Legend for Figures

Figure 1: Evaluation of lymphocytic cells (CD11a, CD18), macrophages (ED1) and activated vessels during severe acute rejection (POD 30). White column: MP control group, black column: everolimus study group. There was a significant reduction of lymphocytic cells and activated vessels (asterisk; $p < 0.05$)

Poster:

UKR
Universitätsklinikum
Regensburg

Everolimus in the treatment of chronic lung rejection

Marietta v. Süsskind, Elisabeth Brunner, Karla Lehle, Thomas Pühler, Christof Schmid, Stephan W. Hirt

Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center, Regensburg, Germany

Introduction and aim:
Lung transplantation (LTx) is a therapeutic option for patients with end-stage pulmonary disorders. Compared with other vascularized organs, the clinical outcome of lung transplantation is still poor (Gourishankar, 2002). The improvement in survival has been concentrated in the first year, long-term outcome after LTx is still suboptimal. The survival rate were 52% at 5 years (Christie et al., 2009). The main obstacle to long-term success is the development of chronic rejection (CR), which is characterized histologically in form of obliterative bronchiolitis (OB) or its clinical correlate bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (BLEPERIO et al., 2009). The macrolide antibiotic Everolimus inhibits T-cell activation and antagonizes the growth factor-induced cell proliferation of fibroblasts and smooth muscle cells via inhibition of mTOR activation (Nair et al., 1997). The aim of this study was to assess the efficacy of Everolimus to attenuate acute rejection (AR) and CR after LTx.

Material and methods:
A rat model of left lung allo-transplantation (F344-to-WKY) was performed to study the effect of methylprednisolone (MP, 10mg/kg on day 14, 15 and 16) and Everolimus (30mg/kg from day 14 to 100) on the development of OB. Light microscopy were used for conventional histology (hematoxylin-eosin (HE)) and standard immunohistology stains such as CD11a, CD18 ED1 and ICAM. AR and CR was graded according to the ISHLT working formulation.

Fig. 1: ISHLT classification for grading acute pulmonary vascular rejection and acute pulmonary airway rejection (B1-4).
AR is based on the presence of perivascular and interstitial mononuclear cell infiltrates graded in AR (no inflammation) to AA (severe vascular inflammation) and the presence of small airway inflammation to be graded in B2 to B4.

Fig. 2: ISHLT classification for grading chronic pulmonary airway rejection (C1-4) and chronic pulmonary vascular rejection (D1-4).
CR is manifested by fibrous scarring. It can be divided in chronic airway rejection, obliterative bronchiolitis (Grade C) and chronic vascular rejection (Grade D). The severity of CR was scored according to the extension of perivascular (Grade D0 to D4) and peribronchial (Grade C0 to C4).

Fig. 1a: Everolimus treated animal, POD 30, left lung, HE-staining, x100.
Moderate acute cellular rejection (A 2.5) with a high grade lymphocytic bronchiolitis (B 3.5). The lung parenchyma contains rather confluent and separated areas of lymphocytic infiltration. The infiltration extends into the perivascular interstitium and extends into alveolar septa. The small bronchi shows an intense mucosal and peribronchial mononuclear cell infiltration. There is no significant thickening of the epithelium involving the sphincter with focal epithelial damage. (Vessel, V; Bronchide, BR)

Fig. 1b: Everolimus treated animal, POD 60, left lung, HE-staining, x100.
This small bronchiolite shows eosinophilic scarring of the submucosa and focal damage with necrosis of the overlying epithelium. Lymphocytes have infiltrated the epithelium. Inflammation and lymphocytes appear in the lumens of the distended airways (C 3.5). The pulmonary vessels adjacent to airways show fibro-intimal thickening of the subendothelial zones (D 3). (Vessel, V; Bronchide, BR; scar tissue, st)

Fig. 2a: Everolimus treated animal, POD 60, left lung, HE-staining, x100.
Obliterative bronchiolitis. In this example the typical dense eosinophilic hyaline fibrosis in the submucosa of the small bronchioles resulted in a complete luminal occlusion (D 4). More than 75% of small vessels are destroyed (D 3.5). (fragments of a Bronchiole, IBR)

Fig. 3: Histology of an en bloc resected right lung, POD 30, HE staining, x100.
(Bronchide, BR; Bronchiale terminales, BFR; alveolar septa, AS; small vein, sv)

Fig. 3 Immunohistology of ED1, CD 11a, CD 18 and ICAM-1.
It shows the differences between the cell numbers of the left and the right lungs.

Fig. 4 Immunohistology (ED1, CD11a and CD18) of the eight lungs of the MP group and the Everolimus group.

Conclusion:
The mammalian target of rapamycin (m-TOR) inhibitor Everolimus is one of the new immunosuppressive used in combination with other immunosuppression drugs to improve graft survival after LTx. We wanted to demonstrate exclusively the effect of Everolimus applied during the zenith of AR. The immunohistology data showed the anti-inflammation effect of Everolimus 2 weeks after application (POD 30). However, despite the anti-inflammatory effect of Everolimus, the m-Tor-inhibitor applied during the zenith of AR had no influence on reducing acute graft destruction. Furthermore in this study Everolimus showed no potent anti-proliferative effect and therefore it fails to prevent the development of BO.

Further studies have to show, if an early immunosuppression with Everolimus might reduce AR episodes and attenuate the chronic vascular and bronchial destructions.

References:
Christie J, et al. Long-term outcome after lung transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 118-123.
Gourishankar S, et al. Chronic lung rejection: Mechanisms and therapy. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 10140-10145.
Nair A, et al. Everolimus: A new immunosuppressive agent for the prevention of organ transplant rejection. Am J Transplant 2006; 6: 101-108.
Bleperio Z, et al. IL-6 and IL-10 in the development of obliterative bronchiolitis in heart-lung transplant recipients. Transplantation 2000; 69: 1044-1049.
Nair A, et al. A deimmunosuppressive effect of everolimus on graft fibrosis induced by mTOR inhibitors: A key mechanism of its superior efficacy for prevention and treatment of drug-related chronic airway disease in lung transplant patients. Transplant Proc 2002; 34: 101-104.

9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2008 bis Mai 2013 an der Klinik und Poliklinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christof Schmid angefertigt. An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Schmid, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl und in seinen Forschungseinrichtungen durchzuführen.

Mein besonderer Dank geht auch an Herrn PD Dr. med. Stephan Hirt für die Überlassung des Themas sowie für sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Die Arbeit ist Teil eines von ihm beantragten DFG-Forschungsprojektes.

Ein großer Dank gilt auch Frau PD Dr. rer nat. Karla Lehle, die mir während des experimentellen Teils der Doktorarbeit stets bei Planung, Datenerhebung und Interpretation mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi für die intensive und vor allem freundschaftliche Betreuung, für die Hilfe bei der Auswertung der Präparate und für alle hilfreichen Tipps während der ganzen Zeit der gemeinsamen Zusammenarbeit. Frau Dr. med. von Süßkind-Schwendi hat gemeinsam mit Frau Eva Lesser in ausgezeichneter und professioneller Weise die Tierversuche durchgeführt, womit es mir erst möglich war, diese Arbeit zu erstellen.

Ein Dankeschön geht dabei auch an Frau Eva Lesser, welche gemeinsam mit Frau Dr. med. vet. von Süßkind-Schwendi die Tierversuche durchgeführt hat. Bei dem Laborpersonal Frau Christina Leykauf und Frau Angelika Urbanek bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte.

Herrn PD Dr. med. Thomas Pühler danke ich für die tatkräftige und sachkundige Unterstützung bei der Beurteilung der Präparate.

Herrn PD Dr. med. Claudius Diez möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Datensätze danken.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei vielen Menschen bedanken, die mich auf meinem Lebensweg geprägt, begleitet und unterstützt haben: Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Maximilian, meinem Freund Martin und meiner Oma.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Inhalte dieser Arbeit wurden bislang nicht veröffentlicht.

Regensburg, den 21.11.2013

Elisabeth Brunner

