

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

**Einsatz des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib
in In-vivo-Studien zur
Prävention der chronischen Transplantatabstoßung
in der Rattenlunge**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elke Boxhammer

2020

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

**Einsatz des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib
in In-vivo-Studien zur
Prävention der chronischen Transplantatabstoßung
in der Rattenlunge**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elke Boxhammer

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: PD Dr. Mariette von Süßkind-Schwendi
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stephan Schreml
Tag der mündlichen Prüfung: 05. Oktober 2020

**Für meine Eltern und für Martin
In Liebe und Dankbarkeit**

„Wer kämpft, kann verlieren.
Wer nicht kämpft, hat schon verloren.“

Bertolt Brecht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Bronchiolitis obliterans als Hauptursache chronischer Transplantatabstoßung nach Lungentransplantation.....	10
1.2 Bisherige Therapiemöglichkeiten der Bronchiolitis obliterans	12
1.3 Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib – Molekularer Wirkmechanismus und klinischer Einsatz	14
1.4 Zielsetzung und Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Tiermodell der Arbeitsgruppe.....	18
2.2 Unterbringung, Haltung und Versorgung der Tiere	19
2.3 Versuchsgruppen	20
2.4 Operationsablauf	21
2.4.1 Vorbereitung, Narkose, Beatmung und Lagerung	21
2.4.2 Spenderoperation.....	24
2.4.3 Empfängeroperation	26
2.5 Postoperative Nachsorge der Tiere und Medikamenten-applikation	28
2.6 Organentnahme und –gewinnung	29
2.7 Organaufbereitung und Färbungen.....	32
2.7.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien im Überblick	32
2.7.2 Herstellung der histologischen Schnitte der Lunge	33
2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	34
2.7.4 Kombinationsfärbung aus Resorcin-Fuchsin, Sirius-Red- und Eisenhämatoxylin-Färbung	35
2.7.5 Masson-Goldner-Färbung	37
2.7.6 Immunhistochemische Färbung von PDGF und VEGF	39
2.8 Auswertungsschemata der In-vivo-Studien.....	42
2.8.1 Histologie der Rattenlungen.....	42
2.8.2 Auswertungsschemata der konventionellen Histologie	46
2.8.3 Auswertung der Immunhistochemie	53
2.8.4 Statistische Auswertungen	54
3. Ergebnisse	56
3.1 Allgemeinzustand und postoperativer Gewichtsverlauf der Versuchstiere	56
3.2 Ergebnisse der konventionellen Histologie.....	57
3.2.1 Native und rechte Lunge	57

3.2.2 Unbehandelte Kontrollgruppe POD 20	60
3.2.3 Unbehandelte Kontrollgruppe POD 60	65
3.2.4 Nintedanib-Gruppe POD 20	70
3.2.5 Nintedanib-Gruppe POD 60	79
3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie (PDGFA, PDGFR-α, VEGFA, VEGFR-2)	84
3.3.1 Immunhistochemie – POD 20	84
3.3.2 Immunhistochemie – POD 60	88
3.3.3 Immunhistochemie der <i>in situ</i> verbliebenen, rechten Lungen der Empfängertiere	92
4. Diskussion	96
4.1 Rattenmodell	97
4.2 Konventionelle Histologie	99
4.2.1 Unterschiede im Pathomechanismus der BO und der idiopathischen Lungenfibrose – Schlüssel für die fehlende Medikamentenwirksamkeit von Nintedanib?	100
4.2.2 Fehlende Wirksamkeit von Nintedanib am POD 20 – mögliche Hypothesen	108
4.2.3 Fehlende Wirksamkeit von Nintedanib am POD 60 – mögliche Hypothesen	110
4.3 Immunhistochemie (PDGFA, PDGFR-α, VEGFA, VEGFR-2)	113
4.3.1 Positive Ergebnisse in der immunhistochemischen Auswertung – Medikamentenwirkung oder fibrotische Präparate?	113
4.3.2 Relevanz der von Nintedanib inhibierten Rezeptoren für das BOS	115
4.3.3 Vergleich zwischen Imatinib und Nintedanib bei Fibrose-bedingten Erkrankungen	120
4.3.4 Immunhistochemische Ergebnisse der rechten Empfängerlungen – Kompensationsmechanismen?	122
5. Zusammenfassung und Ausblick	125
6. Abkürzungsverzeichnis	130
7. Abbildungsverzeichnis	133
8. Tabellenverzeichnis	136
9. Literaturverzeichnis	137
10. Anhang	162
10.1 Messwerte und Berechnungen	162
10.1.1 Berechnung der maximalen Konzentration c_{\max} von Nintedanib im in dieser Arbeit vorliegenden Tiermodell	162
10.2 Publikationen	163
10.2.1 Erste Veröffentlichung 2017	163
10.2.2 Zweite Veröffentlichung 2020	177

11. Danksagung.....	196
12. Eidesstattliche Erklärung	197
13. Lebenslauf	198

1. Einleitung

1.1 Bronchiolitis obliterans als Hauptursache chronischer Transplantatabstoßung nach Lungentransplantation

Lungentransplantationspatienten zeigen eine exzellente 1-Jahres-Überlebensrate von 80% nach dem operativen Eingriff (Madill, Aghdassi, B. Arendt, et al. 2009). Diese erfreuliche Zahl ist unter anderem den in den letzten 10 Jahren durchwegs verbesserten chirurgischen Techniken, gutem postoperativem Management sowie neuen Immunsuppressiva zuzuschreiben. Trotz all dieser Verbesserungen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Lungentransplantation (LTx) lediglich bei ca. 50% (Yusen et al. 2015), wodurch die Lunge im Vergleich zu anderen Organen ein wesentlich schlechteres Langzeitüberleben zeigt. Hauptursache für dieses chronische Transplantatversagen ist das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) (Estenne et al. 2002).

Diese Spätkomplikation manifestiert sich klinisch mittels spirometrischer Testung in einer irreversiblen, progressiven Abnahme der Einsekundenkapazität (FEV₁) sowie des forcierten exspiratorischen Atemflusses bei 25 – 75% der Vitalkapazität (FEF_{25-75%}) (Estenne & Hertz 2002). Hierfür wird zunächst für jeden Patienten der postoperative Basiswert der FEV₁ sowie des FEF_{25-75%} erhoben und in weiteren Kontrolluntersuchungen regelmäßig überprüft. Diese Basiswerte werden aus den beiden besten Werten nach Transplantation ermittelt, die im Abstand von drei Wochen gewonnen werden (Estenne et al. 2002). Für die frühe Detektion des BOS (BOS 0-p) zeigt sich der kombinierte Einsatz der gemessenen Werte von FEV₁ und FEF_{25-75%} als vorteilhaft. Bei einer Abnahme des FEV₁ um mehr als 20% im Vergleich zum Ausgangswert (Meyer et al. 2014) spricht man von einem BOS des Stadiums 1. Zuvor ist allerdings der Ausschluss anderer Ursachen wie akute Abstoßungsreaktionen oder Infektionen unabdingbar. Tabelle 1.1 zeigt in einer Zusammenfassung die weitere Stadieneinteilung:

Stadieneinteilung	Spirometrisch erfasste Parameter
BOS 0	FEV ₁ > 90% <u>und</u> FEF _{25-75%} > 75% des Ausgangswertes
BOS 0-p	FEV ₁ = 81 – 90% <u>und/oder</u> FEF _{25-75%} ≤ 75% des Ausgangswertes
BOS 1	FEV ₁ = 66 – 80% des Ausgangswertes

BOS 2	$FEV_1 = 51 - 65\%$ des Ausgangswertes
BOS 3	$FEV_1 \leq 50\%$ des Ausgangswertes

Tabelle 1.1: Klinische Stadieneinteilung des Bronchiolitis obliterans Syndroms anhand der spirometrisch erfassten Kriterien von FEV_1 und $FEF_{25-75\%}$; aus Estenne et al. (Estenne et al. 2002) und Meyer (Meyer 2012)

Histopathologisch wird diese chronische Transplantatabstoßung als Bronchiolitis obliterans (BO) bezeichnet und beschreibt eine konstriktive Bronchiolitis mit fibroproliferativ-entzündlichen Veränderungen an den kleinen Atemwegen sowie einer fortschreitenden Obliteration und Vernarbung derselben (Meyer 2012). Dieser Vorgang ist häufig begleitet von Intimaverdickung und Gefäßsklerose (Stewart et al. 2007).

Die Pathogenese ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Initial wird diese Komplikation durch inflammatorische Prozesse eingeleitet, indem lymphozytäre Infiltrate in die Submukosa der Atemwege eindringen, die Basalmembran passieren und das respiratorische Epithel sowie subepitheliale Strukturen schädigen (Estenne et al. 2002; Knoop et al. 2006). Entsprechende Risikofaktoren, die sowohl alloimmun-abhängige als auch alloimmun-unabhängige Mechanismen darstellen, können Tabelle 1.2 entnommen werden.

Risikofaktoren für die Entstehung einer BO	
• alloimmun-abhängig Risikofaktoren	<ul style="list-style-type: none"> ○ Akute Abstoßungsreaktion ○ Lymphozytäre Bronchiolitis ○ Diskrepanz („Mismatching“) der Human-Leukocyte-Antigens (HLA)
• alloimmun-unabhängige Risikofaktoren	<ul style="list-style-type: none"> ○ Grunderkrankungen des Empfänger ○ Infektionen (Bakterien, Viren, Pilze) ○ Gastroösophagealer Reflux ○ Ischämie-Reperfusions-Zeit ○ Fehlende Patientencompliance (v.a. in Bezug auf Medikamenteneinnahme) ○ Umwelteinflüsse (Tabakrauch, Umweltverschmutzung)

Tabelle 1.2: Risikofaktoren für die Entstehung einer Bronchiolitis obliterans; modifiziert nach Meyer (Meyer 2012), Kroshus (Kroshus et al. 1997) und Estenne & Herz (Estenne & Hertz 2002)

Getriggert durch diese erste, lokale Entzündungsantwort wird eine Kaskade von weiteren unspezifischen Entzündungsreaktionen initiiert und es werden weitere inflammatorische Zellen, insbesondere Makrophagen sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten, angelockt (Estenne et al. 2002). Durch Ausschüttung von weiteren Zytokinen werden Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen aktiviert und die fibroproliferative Phase eingeleitet (Verleden et al. 2009; Meyer 2012). Hierbei scheint die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Transforming Growth Factor Beta (TGF β) (Liu et al. 2002; Tikkanen et al. 2006; Meyer & Glanville 2013) aus o.g. Zellen eine wesentliche Rolle zu spielen. Durch überschließende Reperaturvorgänge kommt es sowohl intraluminal zur Bildung von Exsudat sowie fibromyxoidem Granulationsgewebe, als auch exzentrisch um die kleinen Atemwege angelagert, zu Vernarbungsprozessen und Gewebeneubildungen (Estenne et al. 2002), die zu einem vollständigen Verschluss der Bronchiolen und zum letztendlichen Bild der Bronchiolitis obliterans führen.

1.2 Bisherige Therapiemöglichkeiten der Bronchiolitis obliterans

50 – 60% der Lungentransplantierten entwickeln 5 Jahre nach dem operativen Eingriff ein Bronchiolitis obliterans Syndrom (Boehler et al. 1998), das die Morbidität und die Mortalität der Patienten signifikant steigert (Madill, Aghdassi, B. M. Arendt, et al. 2009). Derzeit sind keine effektiven, gegenwärtigen Therapien außer einer erneuten Transplantation mit deutlich schlechterem Überleben bzw. schnellerem, erneutem Auftreten des BOS im Gegensatz zu Erstrecipienten beschrieben (Novick et al. 1998). Dadurch muss die Retransplantation aus ethischer Sicht in Zeiten des Organmangels durchaus kritisch betrachtet werden (Estenne & Hertz 2002). In frühen diagnostizierten Phasen des BOS bzw. bei bekannten Risikofaktoren (vgl. oben) können die Patienten dennoch von einer intensivierten, immunsuppressiven Therapie profitieren (Estenne & Hertz 2002), ohne jedoch den Verlauf und das Fortschreiten des BOS signifikant zu verzögern (Tikkanen et al. 2006). Die initial eingeleitete Therapie verteilt sich auf mehrere Standbeine nach Meyer (Meyer et al. 2014; Meyer 2012), die für jeden Patienten – auch unter Berücksichtigung des Nebenwirkungsprofiles – individuell ausgewählt werden:

Gegenwärtige Therapieoptionen für das Bronchiolitis obliterans Syndrom

1. Hochdosierter Einsatz von Kortikosteroiden (> 30 mg/d)

2. Einsatz des Makrolids und Calcineurin-Inhibitors Tacrolimus
3. Einsatz des Makrolids Azithromycin
4. Ergänzung der zytostatisch wirksamen Substanzen um Methotrexat oder Cyclophosphamid
5. Einsatz eines mTOR-Inhibitors wie bspw. Sirolimus oder Everolismus
6. Gabe von intravenösen Immunglobulinen
7. Durchführung einer Plasmapherese oder extrakorporaler Photopherese
8. Antikörpertherapie wie bspw. Rituximab

Tabelle 1.3: Therapieoptionen für das BOS; modifiziert nach Meyer (Meyer et al. 2014; Meyer 2012)

Viele dieser Therapieoptionen haben im klinischen Verlauf keine signifikanten Verbesserungen der Lungenfunktion gezeigt. Eine kurzzeitige Stabilisierung der Lungenfunktion ist teilweise durch das Medikament Azithromycin beschrieben (Verleden et al. 2006; Vos et al. 2011).

Tikkanen und Mitarbeiter (Tikkanen et al. 2006) gehen sogar davon aus, dass in der fibroproliferativen Phase des BOS, also in weiter fortgeschrittenem Stadium bzw. bei deutlicher Abnahme der FEV₁, eine gesteigerte oder veränderte Immunsuppression keine Wirkung zeigt. Ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der BO, dem diese finnische Arbeitsgruppe nachgeht, ist der Einsatz von Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren (RTK-Inhibitoren), von denen bereits eine breite Basis im klinischen Alltag in den unterschiedlichsten Fachdisziplinen Einzug findet. Dieses Konzept (Tikkanen et al. 2006) geht davon aus, dass die in der fibroproliferativen Phase ausgeschütteten Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF β und VEGF über Rezeptor-Tyrosinkinasen wirken. Zum einen konnte gezeigt werden, dass u.a. dem Wachstumsfaktor PDGF eine wichtige Rolle in der Pathogenese des BO zugeschrieben werden kann (Aubert et al. 1997) und zum anderen durch eine Inhibition dieses Wachstumsfaktors bzw. des entsprechenden Rezeptors signifikant fibrotische Prozesse zurückgedrängt werden konnten (Kallio et al. 1999).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die gegenwärtig zugelassenen Behandlungskonzepte keine wesentlichen Erfolge in der Behandlung der BO erzielen. Der Einsatz von RTK-Inhibitoren hat bereits in einigen Tiermodellen (Bleomycin-induzierte, pulmonale Fibrose in

der Maus (Gurujevalakshmi & Giri 1995) und Trachealspangenmodell in der Ratte (Tikkanen et al. 2006)) durchaus Erfolgsaussichten für zukünftige Therapieoptionen zur Behandlung der BO gezeigt.

1.3 Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib – Molekularer Wirkmechanismus und klinischer Einsatz

Nintedanib ist ein intrazellulärer RTK-Inhibitor, der multiple Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, insb. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) 1, 2 und 3, Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) α und β , Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 1, 2 und 3 sowie zahlreiche weitere Rezeptoren blockiert (Roth et al. 2014). Ursprünglich wurde Nintedanib als Medikament zur Antitumortherapie entwickelt, um aufgrund seiner Wirkung auf den VEGF die Angiogenese zu hemmen und dadurch die Blutversorgung des Tumors zu unterbinden (McCormack 2015).

Im klinischen Alltag findet Nintedanib bereits Anwendung bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (Richeldi, du Bois, et al. 2014) sowie in Kombination mit Docetaxel zur Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Rolfo et al. 2013). In Phase-2- und Phase-3-Studien befindet sich das Medikament zur Behandlung von Ovarialkarzinomen, Prostatakarzinomen, Nierenzellkarzinomen, hepatzellulären Karzinomen sowie kolorektalen Karzinomen (McCormack 2015).

Auf molekularer Ebene stellen Rezeptor-Tyrosinkinasen Transmembranrezeptoren dar, die sowohl einen extrazellulären Anteil für die Bindung des Liganden, in diesem Fall den entsprechenden Wachstumsfaktor, als auch einen intrazellulären Teil mit Tyrosinkinaseaktivität besitzen (Rassow et al. 2012). Bei Bindung eines Wachstumsfaktors werden die intrazellulären Rezeptoren dimerisiert, ihre Tyrosinreste phosphoryliert und dadurch zur Autophosphorylierung befähigt. Durch diese Phosphorylierungsprozesse werden die Tyrosinkinasen in ihre aktive Konformation überführt und sind dadurch zugänglich für weitere Signaltransduktionsmoleküle (Rassow et al. 2012). Ein wichtiger Signalweg ist, wie in Abbildung 1.1 dargestellt, der Ablauf über die Effektormoleküle Ras/Raf/MEK/ERK. Diese unterschiedlichen Kinasen, insbesondere die Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) als eigentliche Effektorkinase, gelangt nach ihrer Aktivierung in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren,

wodurch die Transkription des entsprechenden Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnittes gesteigert wird. Fibroblasten werden bspw. über PDGF und FGF in Richtung Zellproliferation, -differenzierung und sogar -transformation in Myofibroblasten stimuliert.

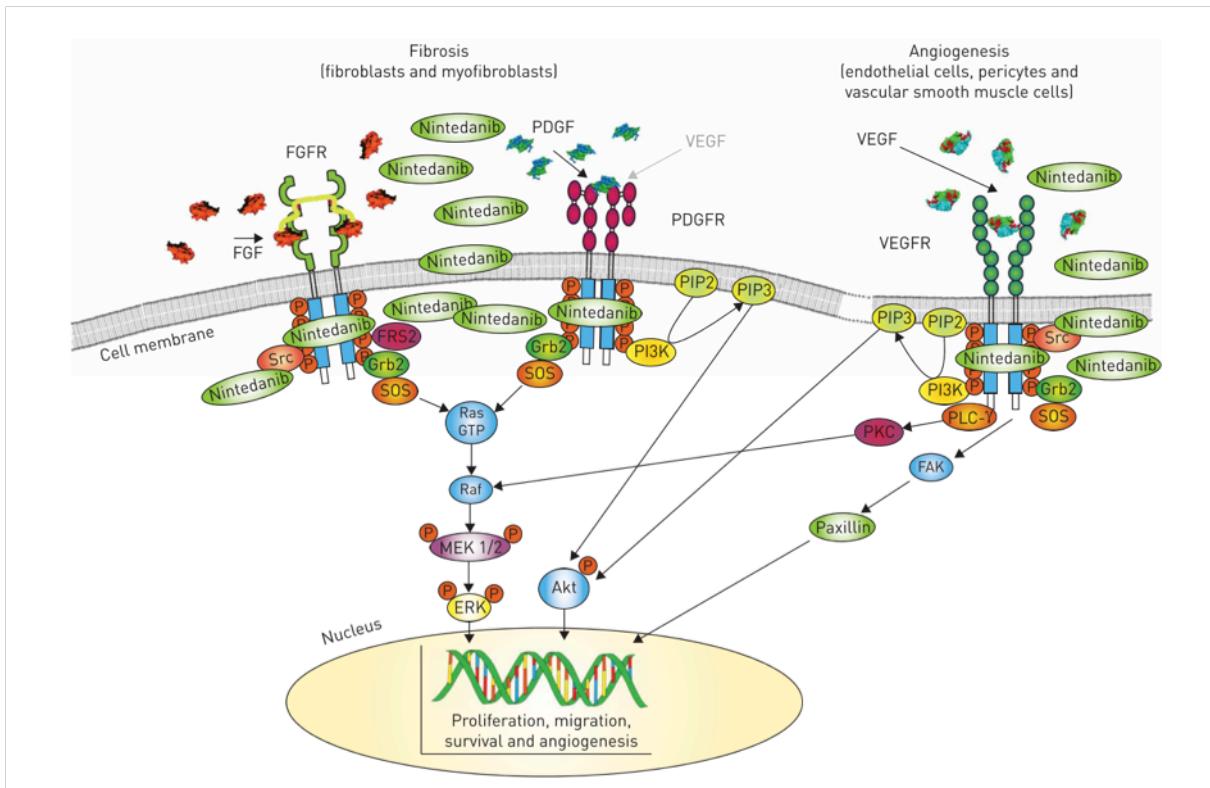


Abbildung 1.1: Übersicht über den molekularen Wirkmechanismus von Nintedanib sowie weitere intrazelluläre Signalwege und -moleküle; Bildmaterial übernommen aus Wollin et al. (Wollin et al. 2015)

Nintedanib selbst greift in diesen Signalweg ein, indem es intrazellulär an den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) bindet, wodurch der für die Phosphorylierung der Tyrosinreste so wichtige Phosphatrest nicht mehr hydrolytisch abgespaltet werden kann (vgl. Abbildung 1.2) und dadurch auch weitere Autophosphorylierungsprozesse entfallen (Wollin et al. 2015).

Einige Experimente haben bereits gezeigt, dass Nintedanib fibrotische Prozesse sowie durch Entzündungsprozesse getriggerte Kollagensynthese in der Lunge signifikant reduziert. Gleichzeitig interagiert Nintedanib in In-vitro-Studien mit Fibroblasten, indem es die Proliferation, die Migration und die Transformation in Myofibroblasten limitiert und dadurch erheblich zu einer Reduktion der Sekretion von extrazellulärer Matrix beiträgt (Wollin et al. 2015; Huang et al. 2015). Aufgrund seiner anti-fibrotisch und anti-inflammatoryischen Komponente

(Wollin et al. 2014) könnte Nintedanib auch bei der Therapie der Bronchiolitis obliterans eine gewichtete Rolle spielen.

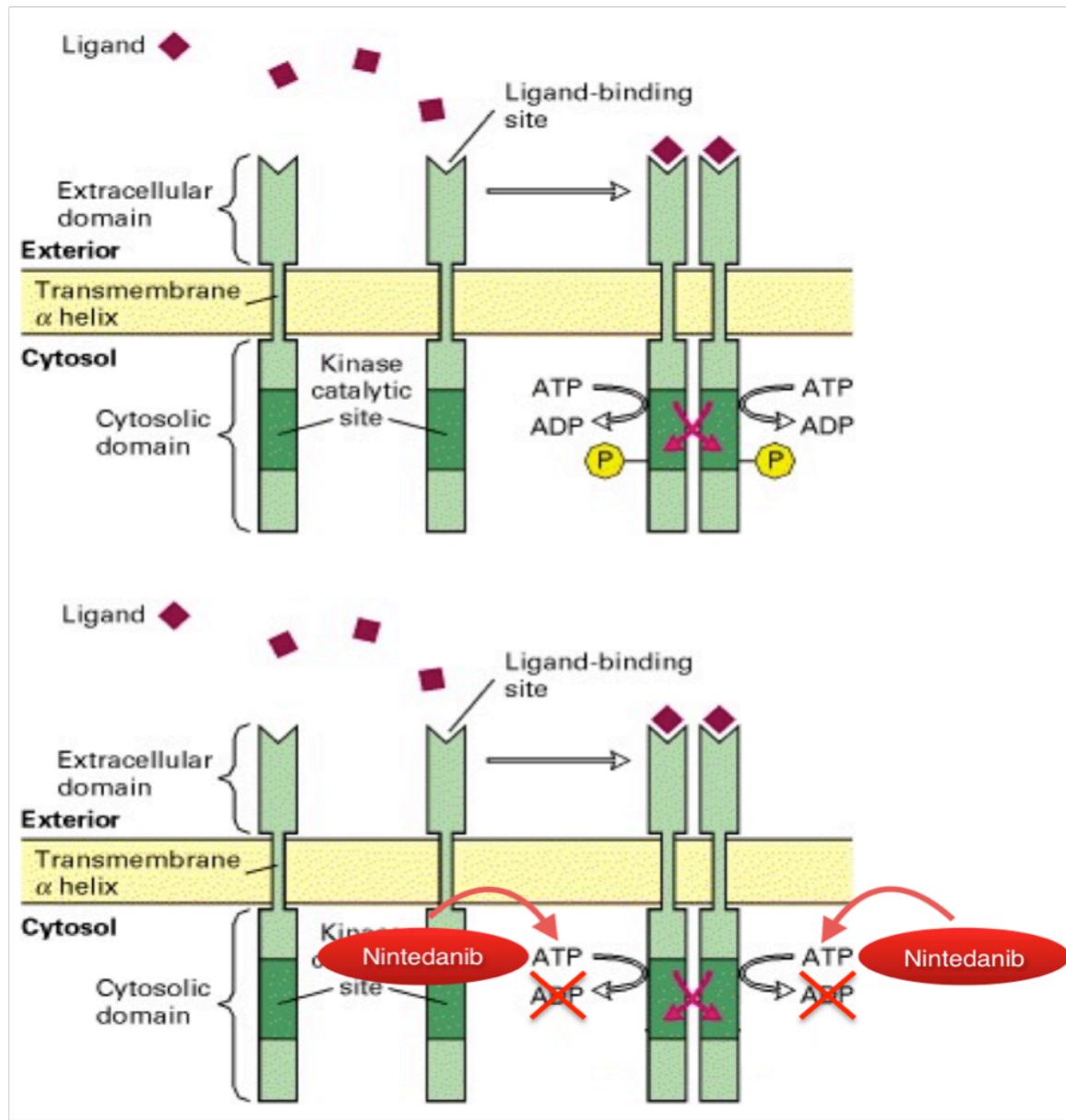


Abbildung 1.2: Interaktion von Nintedanib mit den intrazellulären Domänen der Tyrosinkinaserezeptoren; modifizierte Abbildung nach Lodish et al (Lodish et al. 2000)

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel des im Folgenden beschriebenen Tierexperiments war es, die Auswirkungen des RTK-Inhibitors Nintedanib auf die chronische Abstoßung nach orthotoper unilateraler Lungentransplantation in der Ratte mittels histologischer Methoden zu untersuchen.

Dabei standen folgende Fragestellungen Im Mittelpunkt:

1. Zeigt der eingesetzte RTK-Inhibitor Nintedanib als Monotherapie in dem von der eigenen Arbeitsgruppe bereits etablierten Tiermodell (vgl. 2.1) Effekte auf die chronische Transplantatabstoßung?
2. Inwiefern zeigt Nintedanib Auswirkungen auf die Expression der Wachstumsfaktoren PDGF-A und VEGF-A sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2?
3. Kann der RTK-Inhibitor Nintedanib als potenzielles Medikament etabliert werden, um die chronische Transplantatabstoßung zu verhindern?

Alle durchgeföhrten Untersuchungen befassten sich neben der Beobachtung des klinischen Verlaufes der transplantierten Versuchstiere vor allem mit histologischen und immunhistologischen Auswertungen.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell der Arbeitsgruppe

Um die Auswirkungen des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib (Boehringer Ingelheim, Biberach/Deutschland) auf die akute und chronische Abstoßung nach LTx wissenschaftlich untersuchen zu können, wurde ein in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliertes Transplantationsverfahren an Ratten ausgewählt. Hierbei wird eine linksseitige, orthotope, unilaterale LTx durchgeführt, bei der schwach allogene männliche Fischer-Ratten (F344[RT1^{lv1}]) als Spender und männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY[RT1^l]) als Empfänger fungieren.

Die Auswahl dieser Rattenstammkombination stützt sich auf Arbeiten von Matsumuara (Matsumura et al. 1995), auf Tierversuche der Universität Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Stephan Hirt (Hirt et al. 1998; Hirt et al. 1999; Hirt 2003) und auf Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe unter Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012). Diese speziell gezüchteten Inzuchtstämme haben sich vor allem deswegen bewährt, weil aufgrund der nur schwach immungenetisch ausgeprägten Unterschiede zwischen den MHC-Klasse-I-Komplexen von Fischer- und Wistar-Kyoto-Stämmen die klinische Situation eines lungentransplantierten Menschen gut imitiert werden kann.

Für den oben genannten (o.g.) Tierversuch wurden alleinig männliche Ratten der Firma Charles River, Sulzfeld, verwendet. Zum Versuchszeitpunkt waren die Tiere circa (ca.) acht bis zehn Wochen alt und wogen ca. 280 bis 330 g, wobei zwei in etwa gleich schwere Tiere als ein Versuchspaar ausgewählt wurden.

Die Transplantation der Lungen erfolgte unter Berücksichtigung der anatomischen Gegebenheiten. Die linke Lunge der Ratte setzt sich aus einem einzigen Lungenlappen mit Arterie, Vene und Bronchus zusammen, wohingegen die rechte Lunge aus vier separaten Lappen besteht (Hirt 2003). Deshalb wurde für dieses Transplantationsmodell die linke Lunge ausgewählt.

Den für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens gemäß § 8 Absatz(Abs.) 1 Tierschutzgesetz erforderlichen Antrag genehmigte die Regierung der Oberpfalz am 26.01.2015.

2.2 Unterbringung, Haltung und Versorgung der Tiere

Die Ratten werden vor Beginn der Versuche zuerst zwei Wochen lang an die neuen Haltungsbedingungen in den Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) des Universitätsklinikums Regensburg im Forschungsbau D4 angepasst. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß der Richtlinien der Europäischen Union (EU) 2010/63/EU vom 22. September 2010 unter standardisierten, konventionellen Umweltbedingungen bei 22°C Raumtemperatur, 50-60% Luftfeuchtigkeit und angepasstem Tag-/Nachtrhythmus. Die Parameter wie Luftwechselrate, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtverhältnisse werden laufend von der Technischen Zentrale (TZ) dokumentiert, kontrolliert und überwacht.

Maximal fünf Versuchstiere wurden gemeinsam in speziellen Filterdeckelkäfigen mit Kleintierstreu und Weichholzgranulat (ssniff GmbH, Soest/Deutschland), sogenannten (sog.) Euro-Typ-IV Polycarbonatkäfigen (Nutzfläche: 1820 cm²), gehalten. Unmittelbar nach dem operativen Eingriff wurden die Ratten für ein bis drei Tage in Euro-Typ-III Polycarbonatkäfigen separiert und nach entsprechender Erholung wieder in Euro-Typ-IV Käfige überführt. Die Käfige wurden wöchentlich mit 80°C heißem Wasser gereinigt und extra dafür ausgetauscht.

Die Fütterung der Tiere erfolgte je nach Bedarf mit Standard-Diäten für Laborratten (ssniff GmbH, Haltungsfutter V1535); Leitungswasser stand den Tieren unbegrenzt mittels Tränkeflaschen zur Verfügung. Die Ratten wurden täglich kontrolliert, ihr Allgemeinzustand nach Operation (OP) sowie Futter- und Wasseraufnahme dokumentiert. Zugleich erfolgte auch das tägliche Wiegen der Tiere, um den postoperativen Gewichtsverlust aufzeichnen zu können.

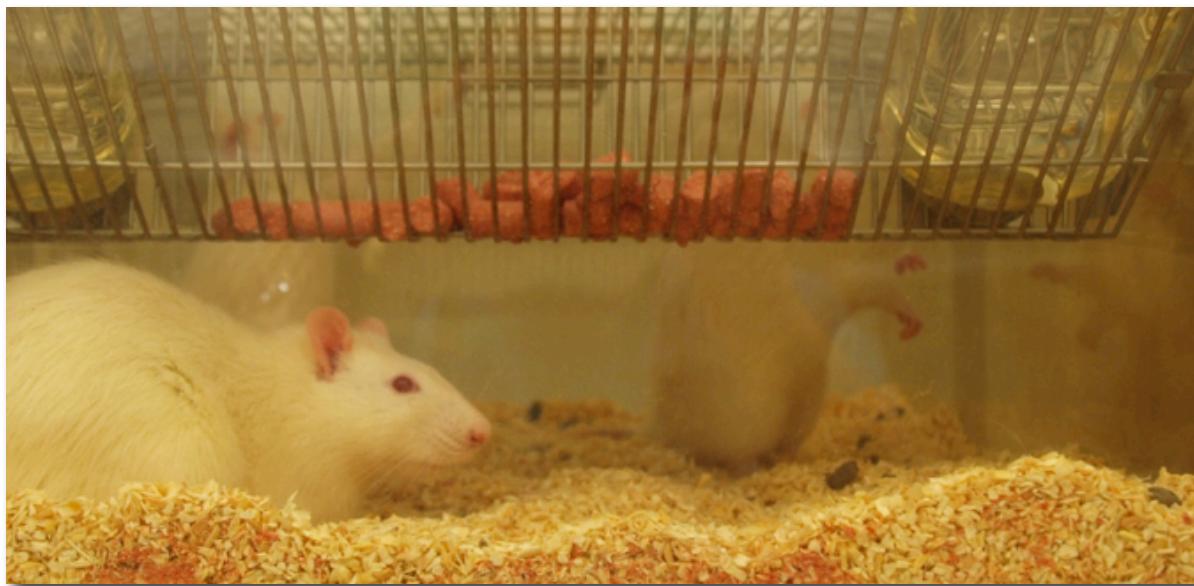


Abbildung 2.1: Haltung der Versuchstiere in speziellen Filterdeckel-/Polycarbonatkäfigen mit Kleintierstreu und Weichholzgranulat

2.3 Versuchsgruppen

Um die Auswirkung von Nintedanib auf die akute und chronische Transplantationsabstoßung histologisch auswerten zu können, wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. In jeder Gruppe wurde die Lunge linksseitig, allogen von F344[RT1^{lv1}] nach WKY[RT1]¹ transplantiert. Eine Gruppe bekam das Medikament Nintedanib in einer berechneten Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht (KG) in vollentsalztem (VE-)Wasser appliziert, während die Kontrollgruppe ohne jegliche postoperative Immunsuppression blieb. Zur Beurteilung der akuten Abstoßungsreaktion der Lunge erfolgte die Tötung der Tiere der Kontroll- und Nintedanib-Gruppe jeweils am 20. postoperativen Tag (POD); dafür wurden sechs Ratten der Interventionsgruppe und elf der Kontrollgruppe verwendet. Für die Untersuchung der chronischen Abstoßung wurden die Tiere – jeweils sechs Nintedanib- sowie zwölf Kontrolltiere – am POD 60 getötet. Eine übersichtliche Zusammenfassung der Versuchsgruppen sowie der Anzahl an verwendeten Tieren liefert folgende, angefügte Tabelle:

Spendertier > Empfängertier	Versuchsgruppen	POD	Anzahl der Empfängertiere	Dosierung des Medikaments
F344 > WKY	Nintedanib	POD 20	6	30 mg/kg KG
	Nintedanib	POD 60	6	30 mg/kg KG
F344 > WKY	Kontrolle	POD 20	11	-

	Kontrolle	POD 60	12	-
--	-----------	--------	----	---

Tabelle 2.1: Übersicht über die Versuchsgruppen mit Tötungszeit, Anzahl der Empfängertiere und Medikamentendosierung

Sowohl die linke als auch die rechte Lunge der getöteten Tiere gelangten zur histologischen Auswertung, um den direkten Unterschied der Lungenarchitektur zwischen transplantiertem, linker und nicht-transplantiertem, rechter Lunge beurteilen zu können.

Neben den beiden Versuchsgruppen wurden sechs native Lungen histologisch und immunhistologisch untersucht: Drei nicht-transplantierte, rechte Lungen von Fischer-Spendertieren und drei explantierte, linke Lungen von Wistar-Kyoto-Empfängertieren. Diese sechs Präparate dienten als Referenz für physiologisch-gesunde Lungen ohne transplantsbedingte Schäden bzw. Medikamenteninduktion.

2.4 Operationsablauf

Die chirurgischen Eingriffe an den Ratten wurden von Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi und Frau Eva Lesser in einem Eingriffsraum der ZTL der Universität Regensburg unter hygienisch sauberen Bedingungen durchgeführt. Sowohl die Transplantationsoperationen als auch das Töten der Tiere erfolgten jeweils in tiefer Narkose. Im Folgenden wird nun der Ablauf einer LTx an der Ratte einschließlich Vorbereitung, Lagerung, Narkose und postoperative Nachsorge der Tiere beschrieben. Grundlagen dieses operativen Ablaufs waren Vorversuche der Universität Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stephan Hirt, auf dessen Arbeit – insbesondere seine Habilitationsschrift mit einer detaillierten Darstellung der Operationen – an dieser Stelle verwiesen wird (Hirt 2003; Hirt et al. 1999; Hirt et al. 1998).

2.4.1 Vorbereitung, Narkose, Beatmung und Lagerung

Die Spender- und Empfängertiere erhielten in einer speziellen Begasungsvorrichtung, die an das Inhalationsgerät Trajan 808 oder Sulla 808 (beide: Dräger, Lübeck/Deutschland) angeschlossen wurde, eine kurze Isofluran-Rauschnarkose (2,8 Vol% Isofluran) mit einem O₂-

Flow von 0,8 bis 2 l/min. Nach ca. 5 Minuten (min) bekamen sie intraperitoneal (i.p.) eine gewichtsadaptierte Menge des in der Tiermedizin gebräuchlichen Narkosemittels Chloralhydrat (300 mg/kg KG) verabreicht. Der Bauch des Tieres wurde zur besseren Verteilung des Medikaments massiert. Das verwendete Chloralhydrat hat den Vorteil, neben dem narkotischen Effekt, gleichzeitig auch atemdepressiv zu wirken, was ein übermäßiges Mitatmen der Ratten unter laufender Beatmung während der Operation minimiert. Parallel dazu wurde den Versuchstieren das subcutan (s.c.) zu verabreichende, zentral wirkende Opiat Buprenorphin gewichtsadaptiert in einer Dosis von 0,05 bis 0,1 mg/kg KG gespritzt. Anschließend wurden die Spenderratten im Thorakal- und Abdominalbereich, die Empfängerratten auf der linken Throaxseite vom äußeren Rippenbogen bis zum Sternum und zum Beckenansatz mit einem Schergerät (B. Braun Aesculap, Tuttlingen/Deutschland) rasiert und ein weiteres Mal kurzzeitig in die Begasungsvorrichtung gelegt.

Während die Spenderoperation am spontanatmenden Tier erfolgte, wurde nach erfolgreich eingeleiteter Narkose das Empfängertier endotracheal mit einer Intubierhilfe und einer 16G-Abbccath-Kanüle (Abbott Diagnostics, Wiesbaden/Deutschland) intubiert und an die Isofluran-Inhalationsnarkose (Baxter, Unterschleißheim/Deutschland) angeschlossen. Die fortgeführte Beatmung mit dem Beatmungsgerät Typ 683 Small Animal Rodent Ventilator (Harvard Apparatus, March-Hugstetten/Deutschland) gelang mit 100% Sauerstoff bei einer Atemfrequenz von 40 bis 50 Atemzügen/min sowie einem Atemzugvolumen von 2,5 ml. Zum Erhalt der Narkose wurde Isofluran mittels Isoflurancavaporisator (Dräger, Lübeck/Deutschland) in ein Gasgemisch von 1,5 l/min zugeführt. Ein weiteres Medikament war das intramuskulär (i.m.) verabreichte Atropinsulfat (0,2 mg/kg KG), welches die bronchiale Sekretion vermindern und den parasympathischen Einfluss bei chirurgischen Manipulationen am Thorax so gering wie möglich halten sollte. Bei Bedarf erfolgte der Einsatz des Muskelrelaxans Pancuronium (0,01 mg/kg KG).

Nach erfolgreicher Intubation des Empfängertieres wurde dieses auf einen beheizten OP-Tisch auf die rechte Körperseite gelegt und mit zwei 10x10 cm großen Mullkompressen unterpolstert. Der Tubus wurde mit der Schnauze am Tisch, die Vorderpfoten nach vorne Richtung Kopf und die Hinterpfoten nach hinten Richtung Schwanz fixiert, sodass das Tier in leicht hochgelagerter Überstreckung zu liegen kam und sich die linke Seite des Brustkorb besser hervorwölben konnte. Anschließend erfolgte die Desinfektion des Tieres mit einer 70%igen Alkohollösung.

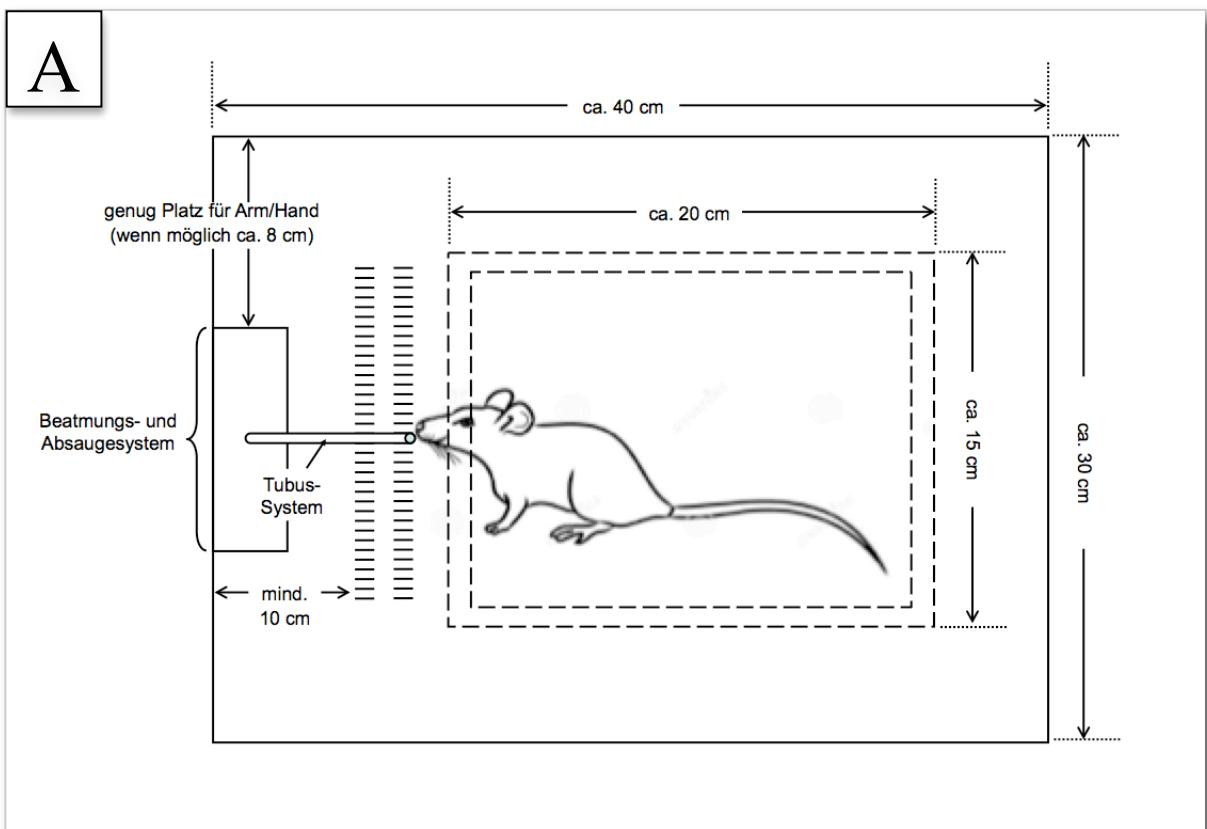


Abbildung 2.2: Lagerung der Versuchstiere auf dem Operationstisch; A: Übersichtsskizze (Quelle: Marietta von Süßkind-Schwendi), B: Darstellung der Lagerung in vivo

Nach durchgeföhrter Intubation erfolgte die Lagerung des Versuchstieres auf einem beheizten Operationstisch. Eine Übersichtsskizze dazu liefert Teilbild A. Der Tubus wurde an das entsprechende Be-

atmungssystem angeschlossen und die Schnauze fixiert. Durch entsprechende Verlagerung der Pfoten erfolgt die anschließende Fixierung des Tieres in leicht überstreckter Position mit optimaler Hervorwölbung des linken Thorax. Anschließend erfolgte die Desinfektion des entsprechenden OP-Areals nach bereits erfolgter Rasur (vgl. Teilbild B).

2.4.2 Spenderoperation

Das Spendertier wurde wie oben beschrieben narkotisiert und nach erfolgter Zwischenzehenreflexprobe in dorsaler Lage fixiert. Im Anschluss erfolgte eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba mit Freilegung des Abdomens sowie der Vena (V.) cava inferior und der Aorta abdominalis.

In die untere Hohlvene wurde ein Bolus von 1500 Einheiten/kg KG Heparin-Natrium 25000 (Ratiopharm, Ulm/Deutschland) zur Vollheparinisierung injiziert. Nach kurzer Wartezeit zur besseren Verteilung des Heparin-Natrium-Gemisches im Körperkreislauf wurden die Bauchgefäße durchtrennt; das führte den Tod des Versuchstieres herbei.

Nach durchgeführter, medianer Sternotomie mit zusätzlicher Eröffnung des Zwerchfells erfolgte die Kanülierung der Arteria (A.) pulmonalis über dem rechten Ventrikel, um hierüber eine pulmoplegische Lösung mit 4°C kalter modifizierter Euro-Collinslösung (4 ml/kg KG, Fresenius Pharma, Gräfelfing/Deutschland) unter Zusatz von 1,75 g des Prostaglandins I-lomidin (20 µg/ml, Bayer AG, Leverkusen/Deutschland) verabreichen zu können. Diese Medikamentenlösung soll zum einen das Verkleben der Alveolen verhindern, zum anderen wirkt das beigefügte Prostaglandin pulmonal vasodilativ und antithrombogen.

Nach Beendigung der Perfusion wurden beide Lungen durch stammnahes Absetzen der pulmonalen Gefäße entnommen und die linke Lunge bis zur Implantation in das Empfängertier in 4°C kalter, modifizierter Euro-Collins-Lösung gelagert. Die Ischämiezeit betrug dabei nicht mehr als eine Stunde, die Zeit vom Hautschnitt bis zur Organentnahme ca. 5 min.

Zur Vermeidung einer schlechten Perfusion wurde auf eine weiße Farbe und niedriges Gewicht der Lunge geachtet. Rot-fleckig imponierende Färbung sowie schwerere Organe gaben

Anhalt für Minderperfusion bzw. für das Vorliegen eines interstitiellen Ödems. Derartige Organe wurden für eine Transplantation ausgeschlossen.

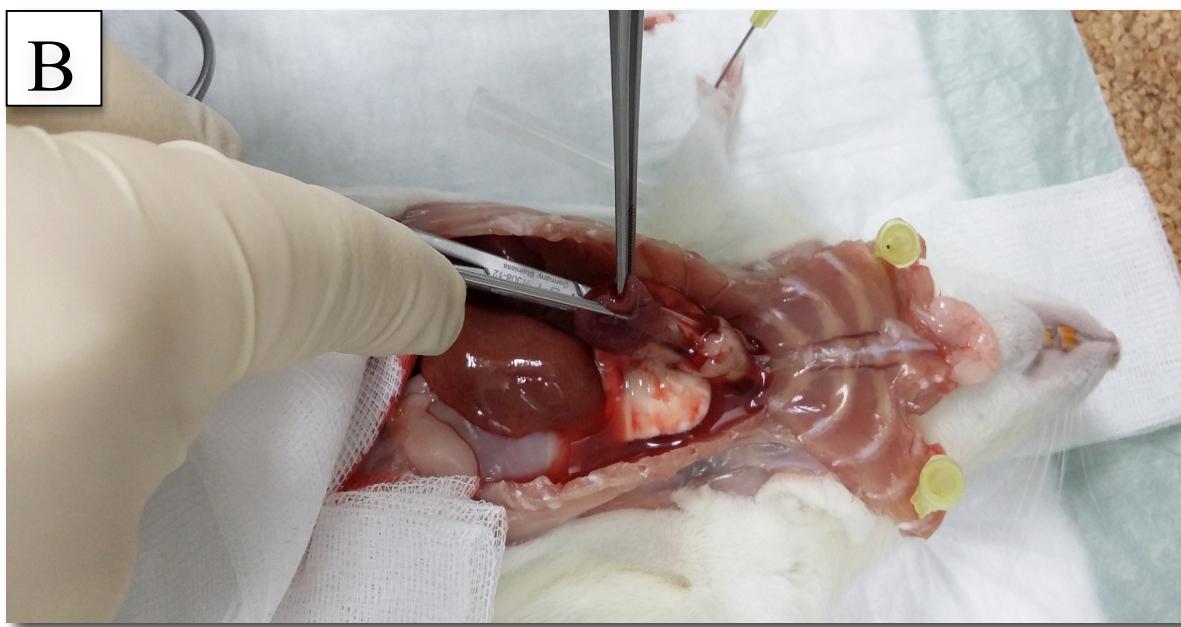


Abbildung 2.3: Spenderoperation; A: Fixation der Ratte in Rückenlage und Durchführung einer medianen Laparotomie, B: Durchführung einer medianen Sternotomie und Explantation beider Lungen

Das Spendertier wurde nach ausreichender Narkotisierung in Rückenlage gebracht und eine mediane Laparotomie – wie in Bild A dargestellt – durchgeführt. Nach Vollheparinisierung über die V. cava inferior erfolgte die Erweiterung des operativen Zuganges über eine mediane Thorakotomie (Bild B).

Nach Kanülierung der A. pulmonalis und Einbringung einer pulmoplegischen Lösung wurden beide Lungen stammnahe abgesetzt.

2.4.3 Empfängeroperation

Nach der oben beschriebenen Narkose, Beatmung und Lagerung des Empfängertiers auf dem vorbereiteten, desinfizierten OP-Tisch erfolgte eine laterale Thorakotomie auf der linken Seite im dritten und vierten Interkostalraum mit anschließender Eröffnung des OP-Feldes mittels Rippen-Mikrospreizer (B. Braun Aesculap, Tuttlingen/Deutschland). Nachdem die linke Lunge vorsichtig mit Wattestäbchen aus dem Brustkorb nach extrakorporal verlagert und in feuchte Kompressen eingeschlagen wurde, liefen alle weiteren Operationsschritte unter einem speziellen Operationsmikroskop (Wild M650, Leitz, Stuttgart/Deutschland) in 16-facher Vergrößerung ab.

Nach Freipräparation der A. und V. pulmonalis sowie des dazugehörigen linken Hauptbronchus wurden die Lungengefäße mittels zentral platzierte Klemme und der Bronchus durch eine zentrale, okkludierende Ligatur unterbunden und so hilusfern wie nur möglich abgesetzt, um lange Stümpfe zu erhalten. Unter Schonung des Nervus (N.) phrenicus und des retrohilär verlaufenden N. vagus erfolgte die Explantation der linken Lunge.

Parallel wurde ex situ der Hilus der linken Spenderlunge präpariert, wobei auch hier möglichst lange Stümpfe des Bronchus sowie der vaskulären Strukturen erhalten wurden. Nach Anpassung der bronchialen und vaskulären Stümpfe der Spenderlunge an die Verhältnisse des Empfängersitus erfolgte eine End-zu-End-Anastomose der A. und V. pulmonalis des Empfängers mit den Gefäßen der Spenderlunge in fortlaufender Nahttechnik mittels Prolene 10.0 Fäden (Serag-Wiessner, Naila/Deutschland). Zügig erfolgte die Entfernung der Gefäßklemmen, um die Reperfusion der Spenderlunge zu erzielen und die Ischämiezeit zur Vermeidung von Reperfusionsschäden unter einer Stunde zu halten.

Im weiteren Verlauf wurde der Empfängerbronchus mit dem Bronchus der Spenderlunge mittels Prolene 10.0 (Covidien, Neustadt an der Donau/Deutschland) vernäht. Dabei hat es sich bewährt, die Hinterwände beider Bronchien, die nahe an der Arterie zu liegen kamen, mit Einzelstichen zu versorgen und dann in der oben beschriebenen Technik der fortlaufenden Naht die Anastomose fertigzustellen. Vor vollständigem Abschluss der bronchialen Anasto-

mose wurde eine Kanüle eingeführt, um die Lunge durch induziertes Aufblähen vor späteren Atelektasen zu schützen. Anschließend wurde die okkludierende Ligatur des Empfängerbronchus gelöst.

Um die Dichtigkeit der Anastomosen zu überprüfen, erfolgte eine Wasserprobe, wobei der Brustraum mit Kochsalz gespült und auf aufsteigende Luftbläschen geachtet wurde, die kennzeichnend für eine Anastomoseninsuffizienz waren.

Nach Einlage einer dünnlumigen Abbocath-16G-Thoraxdrainage (Abbott Diagnostics, Wiesbaden/Deutschland) zur Erzeugung eines Unterdrucks wurde die Lunge ein zweites Mal manuell unter Sicht gebläht. Anschließend erfolgte der schichtweise Verschluss des Thorax sowie des Muskel- und Bindegewebes in fortlaufender Naht mittels Prolene 3.0 (Serag-Wiessner, Naila/Deutschland), während die Oberhaut mit Klammernähten zusammengehalten wurde.

Das Narkosegas Isofluran wurde abgestellt und das Tier konnte bei ausreichender Spontanatmung und vorhandenem Kornealreflex von der Beatmung genommen werden. Nach einer nochmaligen Aspiration wurde die Thoraxdrainage entfernt und die Extubation bei gesicherter Spontanatmung eingeleitet. Danach stand der Ratte noch über 40 min lang Sauerstoff über eine entsprechende Beatmungsmaske zur Verfügung. Anschließend wurde das Versuchstier in einem beheizten Euro-Typ-III Polycarbonatkäfig für ein bis drei Tage von den anderen Tieren separiert. Insgesamt nahm der Eingriff in etwa 60 min in Anspruch.



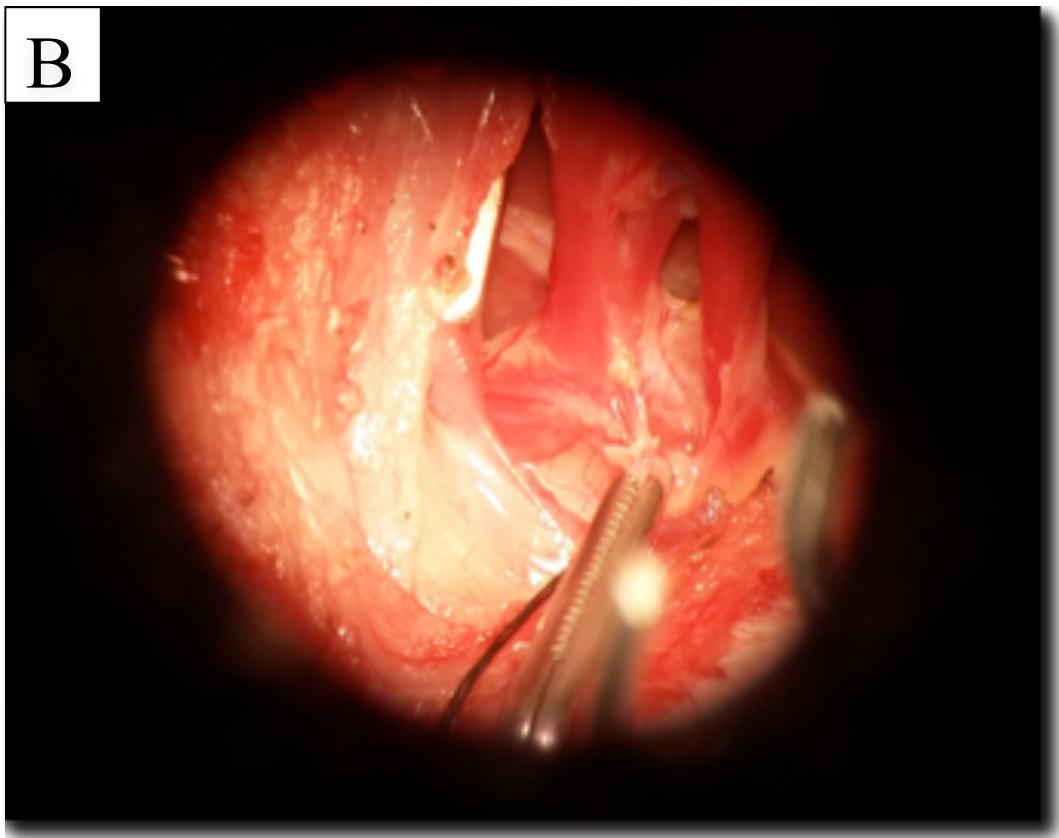


Abbildung 2.4: Empfängeroperation; A: Lagerung des Empfängers bei lateraler Thorakotomie, B: Blick durch das OP-Mikroskop auf den OP-Situs

Nach entsprechender Lagerung und Narkotisierung wurde die Empfängerratte entsprechend des Bildes A lateral thorakotomiert und die native linke Lunge mit Gefäßen und Hauptbronchus so peripher wie möglich abgesetzt. Anschließend erfolgte die Implantation der Spenderlunge mit End-zu-End-Anastomose von vaskulären und bronchialen Strukturen (vgl. Bild B).

2.5 Postoperative Nachsorge der Tiere und Medikamentenapplikation

Die postoperative Nachsorge übernahmen Frau Eva Lesser, Angelika Urbanek und Christina Leykauf unter der Anleitung von Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi. Nach dem operativen Eingriff verblieben die transplantierten Versuchstiere die ersten Stunden unter permanenter Beobachtung und je nach Allgemeinverhalten und Wundheilung noch ein bis drei Tage von anderen Tieren getrennt, wobei in den ersten ein bis zwei Tagen die Käfige noch über Wärmeplatten mit ca. 39°C beheizt wurden. Es wurde versucht, die Zeit in den

Einzelkäfigen so kurz wie möglich zu halten, da sich eine schnelle Wiedereingliederung in die gewohnte Umgebung positiv für die Gesundung der Ratten erwies.

Zur Prophylaxe von postoperativen Schmerzen wurde das zentral wirksame Buprenorphin über drei bis sechs Tage gewichtsadaptiert in einer Dosis von 0,05 bis 0,1 mg/kg/KG s.c. alle zwölf Stunden injiziert.

Täglich wurden das Gewicht, die Nahrungsaufnahme, die Atmung, die Wundheilung und der allgemeine Gesundheitszustand des Tieres kontrolliert und protokolliert. Die Entfernung der Hautklammern erfolgte bei reizlosen Wundverhältnissen am siebten postoperativen Tag.

Für die Dauer der täglichen Applikation des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib erhielten die Tiere kurzzeitig eine Isofluran-Inhalationsnarkose (vgl. 2.4.1). Die Verabreichung des Medikaments erfolgte intragastral über eine Schlundsonde und wurde bereits einen Tag vor dem operativen Eingriff begonnen. Dieser Applikationsbeginn lässt sich entsprechenden Arbeiten von Tikkanen und Mitarbeitern (Tikkanen et al. 2006) entnehmen. Wiederum die Dosierung von 30 mg/kg KG ergab sich aus Arbeiten von Wollin und Kollegen (Wollin et al. 2014); die Tiere mussten daher vor jeder Applikation gewogen werden, um die gewichtsadaptierte Dosis an Nintedanib bestimmen zu können. Vor der Verabreichung wurde das Medikament in 37°C warmem VE-Wasser gelöst.

2.6 Organentnahme und –gewinnung

Nachdem die Diagnose der akuten und chronischen Transplantatabstoßung sowie der vaskulären Sklerose in diesem Tiermodell ausschließlich durch histologische Veränderung des Lungenparenchyms nachgewiesen werden konnte, erforderte es die Tötung des Tieres. Andere Methoden wie serielle, transbronchiale oder offene Biopsien wären im postoperativen Verlauf nicht durchführbar gewesen. Eine mögliche bronchoalvelöre Lavage (BAL) war bei dem Versuchsmodell der unilateralen LTx obsolet und wurde aus diesem Grund nicht in Betracht gezogen.

Die Versuchsratten wurden zum definierten Zeitpunkt (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) am POD 20 zur Bestimmung der akuten und chronischen Abstoßung sowie am POD

60 für Untersuchungen der chronischen Abstoßung gewogen und anschließend narkotisiert. Verwendung dafür fand eine Dreifachnarkose bestehend aus Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (2 mg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG), welche sowohl gute narkotisierende als auch analgetische Wirkung zeigte. Anschließend erfolgten nach Rasur im Bauch-, Brust- und Halsbereich die mediane Laparotomie und das Aufsuchen der Bauchgefäß in dorsaler Fixierung des Tieres. Die Ratte kam mit einem Schnitt durch die V. cava inferior ad exitum.



Abbildung 2.5: Organentnahme eines Nintedanib-Tieres am POD 20; A: Organpaket aus beiden Lungen, Herz und Leber in situ, B: Entnommenes Organpaket aus Herz sowie linker, abgestoßener und rechter, nicht-transplantierter Lunge

Für die Organentnahme wurden die Versuchstiere mittels Dreifachnarkose aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl narkotisiert und anschließende eine Rasur sowie eine mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Durchtrennung der aufgesuchten Bauchgefäß, die mit dem Tod des Tieres einherging, wurde der Thorax eröffnet und die Brustorgane freipräpariert (Bild A). Nach vollständiger Herauslösung des in Bild B dargestellten Organpaket, erfolgte neben der makroskopischen Betrachtung und Dokumentierung eine Konservierung in Paraformaldehyd und eine anschließende Überführung über mehrere Zwischenschritte in Paraffin.

Es wurden sowohl beide Lungenflüge als auch das Herz entnommen und makroskopisch unter den Gesichtspunkten Größe, Konsistenz und Färbung beurteilt. Dann wurden die Organe in 0,9%iger Kochsalzlösung gespült, gewogen, in mehrere Teile geschnitten und in 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, München/Deutschland) konserviert. Der Einsatz von Paraformaldehyd hatte den Sinn, Proteine zu denaturieren und quer zu vernetzen, um eine einsetzende Autolyse bzw. Heterolyse des Gewebes zu verhindern.

Die Präparate wurden anschließend in eine Einbettungskapsel eingeschlossen und mit Wasser gut durchgespült, um Reste des Paraformaldehyds zu entfernen. Im nächsten Schritt folgte die Entwässerung des Gewebes durch eine aufsteigende Alkoholreihe und abschließend die Einbettung in Paraffin (Paraplast, Leica Biosystems, Wetzlar/Deutschland). Die Entwässerung und der Einschluss des Gewebes mit Paraffin erfolgten mit einem speziellen Paraffin-Einbettungsautomaten im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Regensburg nach standardisiertem Protokoll.

Im Anschluss wurden die Proben an einer Einbettstation manuell in Paraffin eingegossen. Dafür mussten die Einbettungskapseln geöffnet, die Präparate entnommen, in bereits mit Paraffin bedeckte, 60°C erwärmte Metallformen überführt und mit restlichem Paraffin übergossen werden. Es wurde in einen gemeinsamen Paraffinblock zugleich rechte als auch linke Lunge eingebettet. Die eine Hälfte der Einbettungskapsel, bevorzugt der beschriftete Anteil, wurde zur Abdeckung und Identifizierung des Präparats in das noch flüssige Paraffin eingelagert. Zur Aushärtung des Paraffinblöckchens fand eine Lagerung der Metallformen auf 5°C kalten Kühlplatten statt.

2.7 Organaufbereitung und Färbungen

2.7.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien im Überblick

Hier erfolgt tabellarisch die Darstellung der wichtigsten, verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Aufbereitung der Organe, die Herstellung der histologischen Schnitte und die durchgeführten histologischen und immunhistochemischen Färbungen; die für die jeweiligen Färbungen nötigen Reagenzien sind separat aufgelistet.

Name	Hersteller	Firmensitz
Eindeckgläser 24 mm x 40 mm 24 mm x 60 mm	VWR	Ismaning (D)
Einmalhandschuhe, Kimtech, Green Nitrile	Kimberley-Clark	Koblenz-Rheinhafen (D)
Eppendorf Reference 0,5 -10 µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)
Eppendorf Research 2 – 20 µl 100 µl 1000 µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)
Gilson Pipetten 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	Gilson	Middleton (USA)
Kühlschrank Liebherr Comfort	Liebherr	Ochsenhausen (D)
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel	Braunschweig (D)
Pinzetten	FST Instruments	Heidelberg (D)
Paraffin Paraplast	Leica	Wetzlar (D)
Reagenzgefäße 0,5 ml 1,5 ml 2 ml	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)

Rotationsmikrotom (Microm HM 340E)	Thermo Fisher Scientific	Walldorf (D)
Spitzen 10 μ l 100 μ l 300 μ l 1000 μ l	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)
Sterilfilter (Spritzenaufsatz) 0,22 μ m	Sartorius	Göttingen (D)
Vortex-Gerät	Heidolph	Schwabach (D)

Tabelle 2.2: Übersicht über verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die histologischen Färbungen

2.7.2 Herstellung der histologischen Schnitte der Lunge

Nach dem Einbetten der Proben in Paraffin erfolgte das Schneiden der Präparate mit Hilfe eines Paraffin-Mikrotoms (Rotationsmikrotom HM 340E, Thermo Fisher Scientific, Walldorf/Deutschland) in 5 μ m dünne Schnitte. Die Paraffinblöckchen wurden hierfür kurzzeitig gekühlt, damit das Schneiden erleichtert und die späteren histologischen Schnitte nicht zu stark zusammengeschoben wurden. Im nächsten Schritt erfolgte das Einspannen der Paraffinblöcke in entsprechende Halterungen des Rotationsmikrotoms. Der automatische Vorschub wurde auf 5 μ m eingestellt und die Halterung mit dem entsprechenden Paraffinblock durch das Rotationsrad parallel zur Klinge auf und ab bewegt. Die angefertigten Serienschnitte konnten sofort in ein 42°C warmes Wasserbad überführt werden, welches dem Zweck diente, das Präparat zu glätten und Faltenfreiheit zu erzielen. Abschließend wurden die histologischen Schnitte auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel, Braunschweig/Deutschland) gezogen und über Nacht bei ca. 50°C in den Wärmeofen zum Trocknen gestellt. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bis zur Weiterverarbeitung in histologischen Schnittkästen bei Raumtemperatur und Dunkelheit oder wahlweise im Kühlschrank.

2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um eine Entparaffinierung der Präparate zu erreichen, wurden die Objektträger für 2 x 10 min in Xylol überführt, dann durch eine sich anschließende absteigende Alkoholreihe (2 x 5 min 100% Ethanol, 2 x 5 min 96% Ethanol und 1 x 5 min 70% Ethanol) rehydratisiert und in VE-Wasser gewaschen.

Für die HE-Färbung wurde zuerst mit saurem Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt/Deutschland) gefärbt. Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der sich bevorzugt an die sauren, negativ geladenen Bestandteile der DNA, der Ribosomen oder des rauen endoplasmatischen Retikulums anlagert und sich daher hervorragend für eine sog. basophile Kernfärbung eignet. Bei entsprechender Anfärbung der Kerne nach 2 bis 5 min wurden die Präparate zur Entfernung überschüssiger Farbe mit VE-Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser farblos war. Anschließend wurden die Präparate in einer 0,1%igen Salzsäure-Alkohollösung (37%ige oder 25%ige Salzsäure (HCl) mit 70%igem Alkohol versetzt) zwei bis drei Mal eingetaucht, um eine bessere Differenzierung des Präparates zu erzielen, gut mit VE gewaschen und anschließend 2 x 5 min lang unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung des Präparats mit dem Xanthen-Farbstoff Eosin G. Um die gebrauchsfertige 1%ige Eosinlösung (Merck, Darmstadt/Deutschland) auf Alkoholbasis verwenden zu können, mussten die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 2 min 70% Ethanol, 1 x 2 min 96% Ethanol) entwässert werden, bevor 10 min lang mit Eosin inkubiert wurde. Eosin ist hierbei negativ geladen, bindet gewöhnlich an positiv geladenen Bestandteil, wie z.B. Proteine, Mitochondrien oder an das glatte endoplasmatische Retikulum und dient daher als eosinophile Plasmafärbung. Das überschüssige Eosin wurde nach Ablauf von zehn Minuten mit 96%igem Ethanol gespült.

Nach weiterer aufsteigender Alkoholreihe (2 x 2 min 96% Ethanol und 2 x 2 min 100% Ethanol) und Überführung in 2 x 5 min Xylol, erfolgte die blasenfreie Eindeckung des Präparats durch das Einschlussmittel Entellan (Merck, Darmstadt/Deutschland).

Name	Hersteller	Firmensitz	Zweck
Entellan	Merck	Darmstadt (D)	Einschlussmittel
Eosin	Merck	Darmstadt (D)	Plasmafärbung

Essigsäure	Merck	Darmstadt (D)	Differenzierung der Präparate
Ethanol	Roth	Karlsruhe (D)	Rehydratisierung
	Merck	Darmstadt (D)	Dehydratisierung
Hämalaun	Merck	Darmstadt (D)	Kernfärbung
Salzsäure (37%)	Merck	Darmstadt (D)	Differenzierung der Präparate
Salzsäure (25%)	Riedel de Haen	Seelze (D)	
Xylol	VWR	Ismaning (D)	Entparaffinierung

Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien der HE-Färbung

Als Ergebnis dieser konventionellen Färbung in der Histologie erhält man basophil gefärbte, blau-violette Zellkerne mit der darin befindlichen DNA, sowie eosinophil angefärbtes, rötlches Zytoplasma und Kollagen (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012).

2.7.4 Kombinationsfärbung aus Resorcin-Fuchsin, Sirius-Red- und Eisenhämatoxylin-Färbung

Die im Folgenden beschriebene Färbung stellt eine Kombination aus drei Färbeprozessen dar, um optimale histologische Ergebnisse für das o.g. Versuchsmodell zu erzielen.

Es erfolgte, wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben, die Entparaffinierung des Präparats in Xylol, die Rehydratisierung in absteigender Alkoholreihe und anschließendes Waschen in VE-Wasser. Weil die erste der drei Färbungen (Resorcin-Fuchsin) auf Alkoholbasis beruhte, wurden die Präparate kurzzeitig in 2 x 96%igem Ethanol behandelt.

Als erster Färbeprozess wurde die gebrauchsfertige Resorcin-Fuchsin-Lösung in einem Wasserbad auf 60°C erhitzt, die Präparate in dieser erwärmten Lösung für 20 min belassen und dann 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Es erfolgte danach eine Differenzierung in 96%igem Ethanol bis zur Entfärbung des Hintergrunds und der deutlichen Darstellung der schwarz gefärbten elastischen Fasern.

Der zweite Färbeprozess war eine Eisenhämatoxylinfärbung nach Weigert, bei der die ebenfalls gebrauchsfertigen Weigert-Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 für 3 min bei Raum-

temperatur inkubiert, für 2 x 5 min in fließendem Leitungswasser gebläut und dann in VE-Wasser gewaschen wurden. Lösungsansatz A beinhaltete 1g Hämatoxylin in 100 ml 96%igem Ethanol, während Lösung B 4 ml Eisen(III)-chlorid und 1 ml 25%ige Salzsäure gelöst in 95 ml destilliertem Wasser enthielt.

Daran schloss sich für 45 min die letzte Färbung mit einer Picro-Sirius-Red-Lösung an. Diese Lösung setzte sich aus dem Sirius-Red-Farbstoff Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, München/Deutschland) und gesättigter wässriger Pirkinsäure zusammen. Für die drei Jahre haltbare Stammlösung erfolgte ein Ansatz von 0,5 g Direct Red und 500 ml gesättigter, wässriger Pirkinsäure. Die Präparate durchliefen dann in weiteren Arbeitsschritten eine zweimalige Waschung in angesäuertem Wasser, bevor sie in 3 x 100% Ethanol entwässert, in 2 x Xylol überführt und abschließend in Entellan eingedeckt wurden.

Name	Hersteller	Firmensitz	Zweck
Direct Red 80 (Sirius-Farbstoff)	Sigma-Aldrich	München (D)	Kollagenfärbung
Entellan	Meck	Darmstadt (D)	Eindeckmittel
Ethanol	Roth Merck	Karlsruhe (D) Darmstadt (D)	Rehydratisierung Dehydratisierung
Eisenhämatoxylin nach Weigert (Lösung A und B)	Roth	Karlsruhe (D)	Kernfärbung
Pirkinsäure	Merck Fluka	Darmstadt (D)	Kollagenfärbung
Resorcin-Fuchsin- Lösung	Waldeck	Münster (D)	Anfärbung der elastischen Fasern
Xylol	VWR	Ismaning (D)	Entparaffinierung

Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Diese Kombination aus drei Färbeprozessen stellt sich für die histologische Aufarbeitung des o.g. Versuchsmodells als besonders hilfreich dar, weil durch die kräftige Rotfärbung des Kollagens die auftretende Fibrose und die Vermehrung des Bindegewebes deutlicher als bspw. in

der HE-Färbung erkennbar werden. Auch Veränderungen der elastischen Fasern des Lungenparenchyms bzw. der Gefäße sind eindeutig besser darstellbar.

2.7.5 Masson-Goldner-Färbung

Nach der durchgeführten Entparaffinierung wie oben beschrieben wurden die histologischen Präparate zuerst 1 bis 2 min mit dem Kernfarbstoff Eisenhämatoxylin nach Weigert gefärbt und dann für ca. 10 min mit Leitungswasser gewaschen.

Danach erfolgte für 10 min zur Anfärbung des Zytoplasmas eine Inkubation in einer Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung und im Anschluss für etwa 30 Sekunden (s) eine Spülung mit einer 1%igen Essigsäure.

Um eine Entfärbung des Bindegewebes zu erreichen, folgte die Behandlung der Objektträger mit Wolframatophosphorsäure-Orange für 3 min, eine weitere Spülung mit 1%iger Essigsäure und eine Gegenfärbung mit Lichtgrün für weitere 7 min. Um das überschüssige Lichtgrün zu entfernen, wurde auch hier mit 1%iger Essigsäure gewaschen.

Zum Abschluss erfolgte eine Entwässerung für 2 x 2 min in 100%igem Ethanol, dann eine Überführung in Xylol mit anschließender Einbettung in Einschlussharz.

Eine Masson-Goldner-Färbung ist eine sog. Trichromfärbung, die durch den kombinierten Einsatz der drei Reagenzien Azophloxin, Orange G und Lichtgrün eine selektive Darstellung von blassroten Muskelfasern, grünlichem Bindegewebe, orangerötlichem Zytosol und braunschwarzen Zellkernen ermöglicht.

In Tabelle 2.6 sind die Lösungsansätze der Masson-Goldner-Färbung noch einmal genauer in der Übersicht dargestellt. Diese Ansätze sind größtenteils der Internetseite www.aeisner.de entnommen und dienten bei dieser Färbung als Protokollvorlage.

Name	Hersteller	Firmensitz	Zweck
Azophloxine (Azofarbstoff)	Sigma-Aldrich	München (D)	Protein- und Plasmafärbung

Eisenhämatoxylin nach Weigert (Lösung A und B)	Roth	Karlsruhe (D)	Kernfärbung
Entellan	Merck	Darmstadt (D)	Eindeckmittel
Essigsäure	Merck	Darmstadt (D)	Differenzierung der Präparate
Ethanol	Roth Merck	Karlsruhe (D) Darmstadt (D)	Rehydratisierung Dehydratisierung
Lichtgrün SF (Triphenylmethanfarbstoff)	Merck	Darmstadt (D)	Kollagenfärbung
Orange G	Sigma-Aldrich	München (D)	Färbung der Erythrozyten
Ponceau de Xyliidine (Azofarbstoff)	Sigma-Aldrich	München (D)	Protein- und Plasmafärbung
Säurefuchsin (Triphenylmethanfarbstoff)	Chroma	Münster (D)	Protein- und Plasmafärbung
Wolframatophosphorsäure	Fluka	Buchs (CH)	Entfärbung des Bindegewebes
Xylol	VWR	Ismaning (D)	Entparaffinierung

Tabelle 2.5: Verwendete Reagenzien der Masson-Goldner-Färbung

Färbelösung	Gefertigter Ansatz
Eisenhämatoxylin nach Weigert (Lösung A und B)	Weigert-Lösung A und B im Verhältnis 1:1
Masson-Goldner	0,2 g Ponceau de Xyliidine und 0,1g Säurefuchsin in 300 ml destilliertem Wasser auflösen; kurzes Kochen; Zugabe von 0,6 ml Eisessig (0,2%ig), Filtration
Azophloxin-Lösung	0,5 g Azophloxin in 100 ml destilliertem Wasser (mit 0,2 ml Eisessig versetzt) lösen
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	176 ml 0,2%ige Essigsäure mit 14 ml Masson-Lösung und 4 ml Azophloxinlösung vermischen
Wolframatophosphorsäure-Orange	7,5 g Wolframatophosphorsäure und 4 g Orange G in 200 ml destilliertem Wasser lösen
Lichtgrün	0,1 bis 0,2 g Lichtgrün SF mit 100 ml destilliertem Wasser (mit zusätzlich 0,2 ml Eisessig) versetzen

Tabelle 2.6: Lösungsansatz der Masson-Goldner-Färbelösungen (in modifizierter Form übernommen aus: www.aeisner.de/methoden/farb36.html)

2.7.6 Immunhistochemische Färbung von PDGF und VEGF

Für den Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib wurden in zahlreichen Literaturen Regulationseffekte auf verschiedene Wachstumsfaktoren beschrieben (Hostettler, Zhong, et al. 2014; Wollin et al. 2014). Um diese veränderte Expression histologisch sichern zu können, wurden beispielhaft die Proteine PDGF-A und VEGF-A sowie deren dazugehörige Rezeptoren PDGF- α und VEGF-R2 sowohl für die Medikamentengruppen als auch für die Kontrollgruppen immunhistochemisch gefärbt.

In gleicher Weise, wie bei den oben beschriebenen Färbungen, wurden zur Entparaffinierung die Präparate in Xylol und zur Rehydratisierung in eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100% - 2 x 96% - 2 x 90% - 1 x 70% Ethanol) und VE-Wasser überführt.

Um die endogen wirkenden Peroxidasen zu blockieren, erfolgte für 2 x 5 min die Inkubation in 3%iger H₂O₂-Lösung (180 ml VE-Wasser mit 20 ml 30%igem H₂O₂). Danach wurde ausgiebig mit VE-Wasser gespült.

Für den nächsten Schritt wurden die Objektträger für 20 min in einem 98°C heißen Wasserbad mit einem Target Retrieval Solution Citrate Puffer (pH 6) gekocht, der im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt war. Dieser Vorgang diente dem Aufschluss vernetzter Epitope. Anschließend mussten die Präparate bei Raumtemperatur abgekühlt und überschüssiger Citrat-Puffer gut mit VE-Wasser gewaschen werden.

Die Präparate wurden getrocknet und dann mit einem Fettstift separat umrandet, um ein Verlaufen der aufgebrachten Flüssigkeiten und somit die Gefahr des Austrocknens im weiteren Färbeprozess zu verhindern. Anschließend wurden sie in eine Küvette mit VE-Wasser zurückgestellt und 3 x 5 min mit phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline (PBS)) gewaschen.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, erfolgte die Inkubation mit 10%igem Ziegen-Normalserum (engl. normal goat serum (NGS)) für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, wobei NGS im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt werden musste. Nach Ablauf der 30 min wurden die Präparate erneut für 3 x 5 min in PBS gewaschen.

Danach erfolgte die Auftragung der Primärantikörper in der jeweilig austrierten Verdünnung (vgl. Tabelle 2.7) mit 5% NGS.

Antikörper gegen ...	Hersteller	Firmensitz	Verdünnung
PDGF-A (N-30) Rabbit Polyclonal Antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg (D)	1:300
PDGFR- α (C-20) Rabbit Polyclonal Antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg (D)	1:1000
VEGF-A Rabbit Polyclonal Antibody	Biologo	Kronshagen (D)	1:80
VEGFR-2 Rabbit Polyclonal Antibody	Dianova	Hamburg (D)	1:100

Tabelle 2.7: Übersicht über verwendete Primärantikörper

NGS wurde im Verhältnis 1:20 mit PBS versetzt. Der ganze Gewebeschnitt sollte reichlich mit Antikörperlösung bedeckt sein, um die Gefahr der Austrocknung des Präparates trotz Inkubation in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C zu verhindern. Pro Objektträger mit rechter und linker Lunge wurde ca. ein Volumen von 70 bis 100 μ l Antikörperlösung veranschlagt.

Am nächsten Tag wurden die Präparate 3 x 5 min mit PBS gespült und anschließend in einer Verdünnung von 1:300 mit 5%iger NGS-PBS-Lösung der biotinylierter Zweitantikörper goat anti rabbit aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach weiteren 3 x 5 min Waschen mit PBS wurde ein Avidin-Biotin-Complex (ABC) 1:100 mit PBS aufgebracht und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dem erneuten Waschvorgang mit 3 x 5 min in PBS erfolgte die Färbung mit dem sensitiven Substratchromogen Histogreen bis zum entscheidenden grünen Farb-

bumschlag. Die Reaktion wurde dann sofort mittels 3 x 5 min Spülen in VE-Wasser abgestoppt.

Zum Abschluss wurde noch die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun durchgeführt, bei der zwei Mal in die bereits gebrauchsfertige Lösung gedippt wurde. Danach erfolgte ein Waschvorgang in VE, das Bläuen der Präparate unter Leitungswasser, gefolgt von einem weiteren Waschvorgang in VE. Die Präparate wurden dann zur Entwässerung in 100% Ethanol für 2 x 30 s und in Xylol für 2 x 30 s überführt und dann mit Entellan eingedeckt.

Name	Hersteller	Firmensitz	Zweck/Ansatz
Biotinylierte Antikörper goat anti rabbit	Vector	Burlingame (USA)	Sekundärantikörper
Entellan	Merck	Darmstadt (D)	Eindeckmittel
Ethanol	Roth Merck	Karlsruhe (D) Darmstadt (D)	Rehydratisierung Dehydratisierung
Hämalaun	Merck	Darmstadt (D)	Kernfärbung
Histogreen	Linearis	Dossenheim (D)	Substratchromogen
H ₂ O ₂ (30%)	Merck	Darmstadt (D)	Blockade endogener Peroxidasen
NGS	Sigma-Aldrich	München (D)	Blockade unspezifischer Bindungen
Target Retrieval Solution Citrate Puffer	Dako	Hamburg (D)	Aufschluss vernetzter Epitope
Vectastain Elite ABC Kit (Standard)	Vector	Burlingame (USA)	Avidin-Biotin-Enzymkonjugat
Xylol	Merck	Darmstadt (D)	Entparaffinierung

Tabelle 2.8: Verwendete Reagenzien der immunhistochemischen Färbung

Diese oben dargestellte Methode der Immunhistochemie ist eine indirekte Färbemethode, weil sich zuerst der aufgebrachte Primärantikörper aufgrund seiner Affinität an ein entsprechendes Epitop des zu detektierenden Proteins bzw. Rezeptors anlagert. Im Anschluss dockt ein zweiter biotinylierter Antikörper an das F_c-Fragment des ersten Antikörpers. Durch die Biotinylierung

rung, also die Markierung des Zweitantikörpers mit Biotin, kann dieser eine starke chemische Bindung mit dem Glykoprotein Avidin des im Anschluss eingesetzt ABC ausbilden. Das Avidin bietet in seiner Tertiärstruktur bis zu vier Bindungsstellen für Biotinmoleküle; gleichzeitig ist an das Biotin das Enzym Peroxidase (genauer Meerrettichperoxidase – engl. horseradish-peroxidase (HRP)) gebunden. Das HRP kann sich mit H_2O_2 leicht verbinden und als Komplex effektiv chromogene Substanzen wie das Färbemittel Histogreen oxidieren und einen grünen Farbumschlag hervorbringen.

2.8 Auswertungsschemata der In-vivo-Studien

2.8.1 Histologie der Rattenlungen

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte über ein Lichtmikroskop (Olympus BX 41, Tokio/Japan). Um die pathologischen Veränderungen nach Lungentransplantation (Abstoßungsreaktionen, Fibrose) histologisch verifizieren zu können, ist es zuerst notwendig, sich mit den gesunden, histologischen Verhältnissen einer Lunge zu beschäftigen. Diese besteht aus drei wichtigen Hauptkomponenten, nämlich dem Bronchialbaum mit dem mehrfach dichotomen Verzweigungsmuster, dem speziellen Gefäßsystem, bestehend aus Vasa publica und Vasa privata, sowie dem umgebenden Lungenparenchym. Nachdem der mikroskopische Aufbau der Rattenlunge sich nur gering von dem eines Menschen unterscheidet, soll im Folgenden die physiologische Histologie der menschlichen Lunge dargelegt werden:

Atemwege

Das Bronchialsystem des Menschen weist von der Trachea bis zu den Alveolen insgesamt 21 bis 23 dichotome Verzweigungen auf (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012). Man unterscheidet funktionell einen konduktiven Anteil, der für die Fortleitung der Luft zuständig ist, von einem respiratorischen Anteil, an dem der Gasaustausch stattfindet.

Der luftleitende Abschnitt setzt sich aus den Haupt-, gefolgt von den Lappen-, Segment- (Kaliberstärke: 8 mm) und Subsegmentbronchien zusammen, die sich im weiteren Verlauf in mehreren Generationen von nicht näher bezeichneten Bronchien (Kaliberstärke: 1mm) aufzweigen. Daran schließt sich eine weitere Aufteilung in die Bronchiolen an (Kaliberstärke: <

1mm), wobei die Bronchioli terminales mit einem Kaliberdurchmesser von ca. 0,4 mm die Endstrecke des konduktiven Abschnittes darstellen (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012).

An die terminalen Bronchiolen schließt sich unmittelbar der respiratorische Abschnitt des Bronchialbaums an, der mit den Bronchioli respiratorii beginnt und sich weiter in die Ductus alveolares fortsetzt. Aus diesen gehen wiederum die Sacculi alveolares mit den abschließenden Alveolen hervor (Schünke et al. 2015).

Da sich die ISHLT-Klassifikation (Stewart et al. 2007) bzw. die modifizierte Version unserer Arbeitsgruppe (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) primär auf die pathologischen Veränderungen der Bronchiolen bezieht, wird bevorzugt ihr histologischer Wandaufbau beschrieben. Die Schichten der kleineren Luftwege bestehen aus der am innersten gelegenen Tunica mucosa mit der Lamina epithelialis und Lamina propria, gefolgt von einer Tunica muscularis und einem kontinuierlichen peribronchialen Bindegewebe.

Während bei den Bronchiolen des konduktiven Abschnittes im Vergleich zu den kleinen Bronchien das charakteristische respiratorische Flimmerepithel von einreihig nach einschichtig abnimmt und auch die Muzin den Becherzellen seltener werden, nehmen die zilienfreien, kubisch bis hochprismatischen, Surfactant produzierenden Clara-Zellen zu. Im respiratorischen Abschnitt sind keine Becherzellen mehr zu finden; hier können allerdings bereits Pneumozyten-Typ-II vorgefunden werden. Die Lamina propria besitzt weniger Bindegewebe, dafür aber ein Netz mit längs verlaufenden, elastischen Fasern, die Lymphozyten und Makrophagen für die Immunabwehr enthalten können. (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012)

Die Tunica muscularis, die der Tunica fibro-musculo-cartilaginea der kaliberstärkeren Bronchien entspricht, enthält weder Knorpellemente noch Drüsanteile. Die glatte Muskulatur bildet ein Netzwerk kräftiger, sich zum Teil überkreuzender, scherengitterartiger Muskelbündel (Welsch et al. 2014).

Das peribronchiale Bindegewebe ist mit den elastischen Strukturen der Alveolenwände und der umliegenden interlobulären und intersegmentalen Bindegewebsssepten verbunden. Der dabei entstehende radiäre Zug hält das sternförmige Lumen der Bronchiolen offen (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012; Welsch et al. 2014). In dem außen aufgelagerten Bindegewebe finden sich auch die Vasa privata des Bronchialbaums, also die Gefäße, die zur Versorgung der Bronchien bzw. Bronchiolen selbst dienen, sowie Nerven und Lymphgefäße.

Gefäßsystem

Die Lunge steht in ihrer Rolle als gasaustauschendes Organ in einem besonderen Verhältnis zum Blutkreislaufsystem, da sie nämlich sowohl mit dem großen als auch mit dem kleinen Kreislauf in Verbindung steht.

Den Großteil der intrapulmonalen Gefäße bilden die Vasa publica des kleinen Kreislaufes (Aa. und Vv. pulmonales). Diese versorgen den Körperkreislauf durch Oxygenierung des Blutes mit ausreichend Sauerstoff, wobei die Aa. pulmonales der Aufteilung der Bronchien bis in die Peripherie hin folgen, wohingegen die Vv. pulmonales unabhängig von der Aufteilung des Bronchialbaums in den intersegmentalen Septen verlaufen und erst später proximal in das peribronchiale Bindegewebe eintreten (Schünke et al. 2015).

Die Vasa privata des großen Kreislaufes (Rr. bronchiales, Vv. bronchiales) dienen der Versorgung des Gefäß- und Bronchialbaums sowie der Pleura und verlaufen, wie bereits vorher beschrieben, im peribronchialen Bindegewebe (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012). Insbesondere zwischen den terminalen Gefäßästen von Vasa privata und publica gibt es zahlreiche Anastomosen, was den Sättigungsgrad mit Sauerstoff etwas reduziert (Welsch et al. 2014).

Der histologische Aufbau der Gefäße ist dreischichtig: Von Innen nach Außen bestehen sie aus einer Intima (Tunica intima) mit dem Endothel und einer weiteren subendothelialen Schicht, einer Media (Tunica media) mit glatter Muskulatur und einer Adventitia (Tunica externa oder adventitia) mit elastischen und kollagenen Fasern (Welsch et al. 2014). Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel aus polygonalen, der Basallamina aufsitzenden, flachen Zellen mit vielfältigen Zell-Zell-Kontakten (Tight junctions, Gap junctions usw.), die eine optimale Schranke zwischen Intra- und Extravasalraum bilden. Die darauffolgende subendotheliale Schicht enthält kaum Zellen und nur wenig extrazelluläre Matrix (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012). Die Media besteht aus glatten Muskelzellen sowie elastischen und kollagenen Fasern; die Muskelzellen sind zirkulär oder in flachen Spiralen angeordnet. Die Adventitia als äußerste Schicht besteht aus Bindegewebe, das Nerven, Lymphgefäß und eigene Blutgefäße (sog. Vasa vasorum) führt. Zwischen Intima und Media bzw. Media und Adventita sind jeweils Flechtwerke elastischer Fasern (Membrana elastica interna und externa) als Trennschicht eingelagert, wobei die Membrana elastica externa nur bei großen Arterien gut zu sehen ist (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012).

Der Hauptunterschied zwischen Arterie und Vene liegt im Aufbau der Media, der sich bei arteriellen Gefäßen ausgeprägter als bei venösen Gefäßen darstellt. Venen haben allgemein eine weniger ausgeprägte Schichtengliederung im Gegensatz zu Arterien und eine deutlich dünneren Wand insbesondere mit Auflockerung der Media durch kollagene und elastische Fasern. Das Lumen von Venen ist teilweise etwas größer und eher charakterisiert durch ein kolabiertes, nicht-kreisrundes Lumen (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012).

Bei der Lunge treffen auch gleichzeitig Arterien des elastischen Typs auf den des muskulären Typs, die anhand des Aufbaus der Tunica media sowie des Anteils der elastischen Fasern unterschieden werden. Die aus dem Truncus pulmonalis abzweigenden Aa. pulmonales gehören hierbei dem elastischen Typ an, wobei die Vasa privata dem muskulären Typ zuzuordnen sind (Welsch et al. 2014; Schünke et al. 2015).

Arterielle Gefäße mit einem Innendurchmesser von unter 100 µm mit nur ein bis zwei Muskelschichten gehören der Gruppe der Arteriolen an, wohingegen bei Kapillaren und größeren Sinusoiden mit einem Durchmesser von größer zehn Mikrometer die Muskelschicht vollständig fehlt und die Wandschicht allein aus Endothel und vereinzelten Perizyten besteht (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012).

Lungenparenchym

Das Lungenparenchym ist gegliedert in Lobuli und Azini. Ein Lobulus setzt sich aus mehreren Azini zusammen; ein Azinus wird gebildet durch alle Strukturen, die von einem Bronchiolus terminalis abzweigen, was gleichbedeutend ist mit Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares sowie zahlreichen Alveolen. Die Lunge des Menschen enthält ca. 300 Millionen Alveolen, die jeweils einen Durchmesser von 250 µm besitzen (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012). Die Alveolarwände weisen eine Dicke von fünf bis acht Mikrometer auf und sind von einem außerordentlich dichten Kapillarnetz durchzogen, in dem sich elastische und kollagene Fasern sowie Zellen der Immunabwehr befinden. Bindegewebszellen sind nur spärlich ausgebildet. Das Epithel der Lungenbläschen besteht aus zwei Zelltypen, den Pneumozyten-Typ-I und -Typ-II. Die Pneumozyten-Typ-I bilden mit ihren großflächigen, dünnen Zelleiben etwa 95% der Blut-Luft-Schranke aus, wohingegen die Pneumozyten-Typ-II mit ihrer kubischen Oberfläche nur geringen Raum einnehmen, dafür aber den wichtigen Surfactant produzieren (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012; Schünke et al. 2015).

2.8.2 Auswertungsschemata der konventionellen Histologie

Wie oben bereits erwähnt, wurden die Versuchstiere an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten – POD 20 und POD 60 – getötet, um histologische Präparate der Lungen gewinnen zu können. Diese Versuchszeitpunkte ergaben sich aus vorhergehenden Studien (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012), die zeigten, dass ohne immunsuppressive Therapie eine akute Transplantatabstoßung in dem gewählten Transplantationsmodell innerhalb der ersten 20 Tage eintritt, wohingegen eine chronische Abstoßung innerhalb von 60 Tagen zu beobachten ist.

Die rechten, nicht-transplantierten Lungen der Versuchstiere bzw. nativen Lungen (linkes Organ des Empfängertieres WKY und rechtes Organ des Spendertieres Fischer 344) wurden zum einen zum Vergleich gegenüber der transplantierten linken Lunge verwendet, zum anderen auch dafür herangezogen, um mögliche Aspirationen und Infektionen auszuschließen, da diese Krankheitsbilder ähnliche pathohistologische Veränderungen hervorrufen können (Verleden et al. 2005).

Um die konventionell gefärbten histologischen Schnitte nach dem Grad der akuten und chronischen Transplantatabstoßung bewerten zu können, wurden die Kriterien der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) nach Yousem et al. (Yousem et al. 1996) bzw. in der aktualisierten Form von Stewart et al. (Stewart et al. 2007) verwendet und für das oben beschriebene Transplantationsmodell modifiziert (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012). Am POD 20 wurde sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung bewertet, während am POD 60 alleinig die chronische Abstoßung klassifiziert wurde. Die Kriterien der ISHLT wurden hierbei auf jedes Gefäß und jeden Bronchiolus innerhalb des gesamten histologischen Präparats angewandt.

Die pathologisch veränderten Strukturen des Lungenparenchyms wurden in Fibrosegrade nach der modifizierten Ashcroft-Skala von Hübner et al. (Hübner et al. 2008) eingeteilt.

Akute Transplantatabstoßung

Die akute Transplantatabstoßung wurde gemäß der ISHLT nach dem Ausmaß der perivaskulären sowie interstitiellen Infiltration von mononukleären Zellen beurteilt (Stewart et al. 2007). In der Lunge sind dies überwiegend B- und T-Lymphozyten sowie Alveolarmakrophagen.

gen, die durch eine Reihe von Zytokinen aktiviert werden und primär der Immunabwehr dienen.

Der Grad der vaskulären Abstoßung richtete sich vor allem nach der Ausrichtung dieser Zellinfiltrate um die Gefäße bzw. die Ausdehnung in die angrenzenden Alveolarsepten. Die Einteilung erfolgte in fünf Schweregrad mit dem Buchstaben „A“ für akute, vaskuläre Abstoßung, wobei A0 gesunde, nicht-entzündliche Gefäße und A4 den höchsten Grad der akuten, vaskulären Abstoßung bedeutete (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012). Eine Übersicht über die Gradierung der akuten, vaskulären Abstoßung zeigt Tabelle 2.9.

Grad der Abstoßung	Akute Transplantatabstoßung	Pathohistologische Veränderungen der Gefäße
A0	Keine akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Kein Nachweis von mononukleären Zellen • Keine entzündlichen Veränderungen der Gefäße
A1	Minimale akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Vereinzelte Infiltrate mononukleärer Zellen • Perivaskulärer Saum von zwei bis drei Lymphozytenringen • Kein Nachweis eosinophiler Granulozyten
A2	Milde akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Gehäuftes Auftreten von Infiltraten mononukleärer Zellen mit teilweise subendothelialer Ausbreitung • Perivaskulärer Saum von mehr als drei Lymphozytenringen • Nachweis eosinophiler Granulozyten • Entzündliche Veränderung des Endothels
A3	Moderate akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Dichte Infiltrate mononukleärer Zellen mit Ausdehnung in perivaskuläre und peribronchiale Alveolarsepten und in das umliegende alveoläre Lumen • Nachweis eosinophiler und gelegentlich neutrophiler Granulozyten • Deutliche, entzündliche Veränderungen des Endothels
A4	Schwere akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Diffuse, perivaskuläre und interstitielle Infiltrate mononukleärer Zellen (oft paradoxerweise Auflockerung der perivaskulären Infiltrate) • Deutliche Schädigung des Endothels bzw.

		<p>Alveolarepithels</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mögliches Auftreten von intraalveolärer Epithelzellnekrose, hyalinen Membranen, Einblutungen, Parenchymnekrosen und nekrotisierender Vaskulitis • Massive, entzündliche Veränderungen des Endothels
--	--	--

Tabelle 2.9: Histologische Klassifikation des Schweregrades der akuten, vaskulären Abstoßung nach LTx; Darstellung der ISHLT-Kriterien (Stewart et al. 2007) in modifizierter Form nach von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012)

Die akute, bronchioläre Abstoßung, die in der ISHLT-Klassifikation mit dem Buchstaben „B“ abgekürzt wird, wurde in drei Schweregrade unterschieden. B0 stellte gesundes Lungenparenchym ohne jegliche Entzündung dar, wohingegen B2R für die schwerste akute, bronchiolare Abstoßung Verwendung fand. „R“ steht in dieser Einteilung für „revised“, weil die hier verwendete Klassifikation auf die überarbeitete und verbesserte Version aus dem Jahr 2007 (Stewart et al. 2007) zurückgreift. Die Entzündungen der Atemwege mit mononukleären Infiltraten in der bronchiolären Submukosa und gleichzeitiger Schädigung des respiratorischen Epithels treten in den meisten Fällen simultan zu den vaskulären Veränderungen auf. Weitere Details sind Tabelle 2.10 zu entnehmen.

Die akute, bronchioläre Transplantatabstoßung mit der begleitenden, lymphozytären Bronchiolitis wird als eine von mehreren ursächlichen Faktoren für die Entstehung des Krankheitsbildes Bronchiolitis obliterans gehandelt (Hirt et al. 1998; Hirt et al. 2013; von Süßkind-Schwendi, Hirt, et al. 2012).

Grad der Abstoßung	Akute Transplantatabstoßung	Pathohistologische Veränderungen der Bronchiolen
B0	Keine akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Entzündungen der Bronchiolen • Keine Infiltrate mononukleärer Zellen
B1R	Geringgradige akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Sporadische oder teilweise zirkumferentiell verteilte Infiltrate mononukleärer Zellen in der Submukosa • Gelegentliches Auftreten von eosinophilen Granulozyten in der Submukosa

		<ul style="list-style-type: none"> • Kein Nachweis von Epithelschaden oder intraepithelial vorhandener lymphozytärer Infiltrate
B2R	Hochgradige akute Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> • Dichte Infiltrate mononuklearer Zellen in der Submukosa • Deutlicher Nachweis von eosinophilen Granulozyten • Epithelschäden in Form von Nekrose, Metaplasien und intraepithelialer lymphozytärer Infiltration • Gelegentlich mögliches Ablösen des Epithels von der Basalmembran • Mögliches Auftreten von epithelialer Ulzeration, fibrinös-eitrigem Exsudat, Zelldebris und neutrophilen Granulozyten

Tabelle 2.10: Histologische Klassifikation des Schweregrades der akuten, bronchiolären Abstoßung nach LTx; Darstellung der ISHLT-Kriterien (Stewart et al. 2007) in modifizierter Form nach von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012)

Chronische Transplantatabstoßung

Der Prozess der chronischen Transplantatabstoßung von Gefäßen und Bronchiolen wird gemäß der ISHLT-Klassifikation (Stewart et al. 2007) lediglich mit Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Abstoßungsprozessen eingeteilt. Für diese Arbeit fand die modifizierte Klassifikation von von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) Anwendung, da diese eine bessere histologische Differenzierung für das o.g. Versuchsmodell bietet.

Die chronische, vaskuläre Abstoßung wird mit „D“ abgekürzt und in drei Schweregrade von D0 (keine Abstoßungsprozesse erkennbar) bis D2R (maximale Abstoßungsreaktion) klassifiziert. An den Gefäßen, insbesondere den kleinsten, beginnt dieser Vorgang durch Adhärenz von Leukozyten an das Endothel (D1R) mit teilweiser oder vollständiger Okklusion (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012). Die maximale Ausprägung zeigt sich durch vaskuläre Sklerose, massive fibrointimale Verdickungen sowie perivaskulär ausgeprägte Fibrose sowohl der Arterien als auch der Venen (Stewart et al. 2007; Belperio et al. 2009). Eine tabellarische Übersicht ist im Folgenden gezeigt:

Grad der Abstoßung	Chronische Transplantatabstoßung	Pathohistologische Veränderungen der Gefäße
D0	Keine chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Keine vaskuläre Destruktion
D1R	Geringgradige chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Obstruktion kleiner Gefäße durch am Endothel haftender Leukozyten
D2R	Hochgradige chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Ausgeprägte perivaskuläre Fibrose Vollständiger Verschluss kleiner Gefäße Deutliche fibrointimale Verdickung mittelgroßer Gefäße Ausbreitung von perivaskulärer Fibrose in das umliegende Interstitium

Tabelle 2.11: Histologische Klassifikation des Schweregrades der chronischen, vaskulären Abstoßung nach LTx; Darstellung der ISHLT-Kriterien (Stewart et al. 2007) in modifizierter Form nach von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012)

Die chronische, bronchioläre Transplantatabstoßung geht mit dem Vollbild der Bronchiolitis obliterans einher. Die Schädigung des respiratorischen Epithels und zahlreiche Entzündungsprozesse der Epithelzellen sowie subepithelialer Strukturen der kleinen Atemwege führen zu intraluminärer Fibroproliferation (Boehler & Estenne 2003). Durch den nur sehr insuffizienten Reparaturprozess der Fibroblasten manifestiert sich in der Submukosa der Bronchiolen eine dichte, hyaline Fibrose mit teilweise deutlichen eosinophilen Infiltraten. Diese übermäßige Gewebsvermehrung kann sich sowohl konzentrisch mit Ausdehnung in das angrenzende Lungenparenchym als auch exzentrisch anlagern. Die exzentrische Fibrose kann im weiteren Verlauf zu einer Stenose bis hin zur vollständigen Okklusion der Bronchiolen führen. Die Gefahr der irreversiblen Zerstörung der glatten Muskulatur ist hierbei gegeben. Des Weiteren finden sich in Lungenbiopsien von Patienten mit Bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation intraluminäre Polypen aus fibromyxoidem Granulationsgewebe sowie submukös gelegenes, fibrinöses Narbengewebe, die zur Obliteration der terminalen Bronchiolen führen (Knoop et al. 2006).

Die chronische Abstoßung der Bronchiolen wird nach der ISHLT mit „C“ abgekürzt und wiederum lediglich mit An- oder Abwesenheit von chronischen Abstoßungsreaktionen beurteilt. Die modifizierte Version von von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi,

Ruemmele, et al. 2012) klassifiziert wie bei den Gefäßen in drei Schweregrade von C0 bis C2R; Details können nachfolgender Tabelle 2.12 entnommen werden.

Grad der Abstoßung	Chronische Transplantatabstoßung	Pathohistologische Veränderungen der Bronchiolen
C0	Keine chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Keine bronchioläre Destruktion
C1R	Geringgradige chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Erste Anzeichen von intraluminalen Polypen durch Granulationsgewebe mit Fibroblasten und Fibrinfilamenten Lose subepitheliale Fibrinstrukturen um terminale Bronchiolen angeordnet (konstruktive Bronchiolitis)
C2R	Hochgradige chronische Abstoßung	<ul style="list-style-type: none"> Ausgeprägte sowohl konzentrische als auch exzentrische peribronchiale Fibrose mit partiell oder kompletten Verschluss des Lumens Fragmentierung oder vollständige Destruktion der glatten Muskulatur der Bronchiolen Verminderung oder komplett Zerstörung des respiratorischen Epithels Deformierung des gesamten bronchialen Lumens oder vollständige Obliteration durch Narbengewebe (schwere konstriktive Bronchiolitis) Ausdehnung des Narbengewebes ins peribronchiale Intersitium Ansammlung von Schleim und lungenspezifischen Makrophagen (Histiozyten) in den distalen Atemwegen

Tabelle 2.12: Histologische Klassifikation des Schweregrades der chronischen, bronchiolären Abstoßung nach LTx; Darstellung der ISHLT-Kriterien (Stewart et al. 2007) in modifizierter Form nach von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012)

Beurteilung der Fibrosegrade

Die dritte Komponente des Lungenparenchyms blieb bisher bei der ISHLT-Klassifikation nahezu außen vor, obwohl diese neben der Veränderung an Gefäßen und Bronchien wesentlich zur chronischen Transplantatabstoßung beiträgt. Um die pulmonale Fibrose in den vor-

handenen histologischen Präparaten klassifizieren zu können, wurde auf die von Ashcroft et al. (Ashcroft et al. 1988) entwickelte und von Hübner et al. (Hübner et al. 2008) modifizierte Ashcroft-Skala zurückgegriffen. Diese numerische Skala von Grad 0 (keine Fibrose) bis Grad 8 (maximal fibrotisches Präparat) bewertet sowohl pathologische Veränderungen der Lungenstruktur als auch der Alveolarsepten. Die nachfolgende Tabelle 2.13 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Einteilungskriterien der Fibrosegrade:

Fibrosegrad	Pathohistologische Veränderung des Lungenparenchyms
0	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Keine fibrotischen Veränderungen; keine Verdickungen; höchstens dünne Fasern in einigen Alveolarwänden Lungenstruktur: Normales Lungenparenchym
1	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Isolierte, leicht fibrotische Veränderungen (Septen maximal dreimal so dick wie normal) Lungenstruktur: Alveolen teilweise vergrößert und vereinzelt; aber keine fibrotischen Anhäufungen vorhanden
2	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Deutlich fibrotische Veränderungen (Septen mehr als dreimal so dick wie normal) mit knotenartigen, nicht miteinander verbunden Strukturen Lungenstruktur: Alveolen teilweise vergrößert und vereinzelt; aber keine fibrotischen Anhäufungen vorhanden
3	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Zusammenhängende, fibrotische Veränderungen (Septen mehr als dreimal so dick wie normal) im ganzen histologischen Präparat vorhanden Lungenstruktur: Alveolen teilweise vergrößert und vereinzelt; aber keine fibrotischen Anhäufungen vorhanden
4	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Keine einheitlichen Veränderungen; sehr variables, mikroskopisches Bild Lungenstruktur: Einzelne fibrotische Strukturen (weniger als 10% des histologischen Präparats)
5	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Keine einheitlichen Veränderungen; sehr variables, mikroskopisches Bild Lungenstruktur: Zusammenhängende fibrotische Strukturen (mehr als 10%, aber weniger als 50% des histologischen Präparats); massiv zerstörte, aber teilweise noch erkennbare Lungenstruktur
6	<ul style="list-style-type: none"> Alveolarsepten: Variables Bild; weitestgehend nicht mehr vorhanden Lungenstruktur: Großflächige, zusammenhängende fibrotische Strukturen (mehr als 50% des histologischen Präparats); Lungenstruktur als solche weitestgehend nicht mehr vorhanden

7	<ul style="list-style-type: none"> • Alveolarsepten: Nicht mehr vorhanden • Lungenstruktur: Nahezu vollständige Fibrose; selten noch „Luftblasen“, die an ursprüngliche Alveolarstruktur erinnern; keine Lungenstruktur mehr erhalten
8	<ul style="list-style-type: none"> • Alveolarsepten: Nicht mehr vorhanden • Lungenstruktur: Vollständige Fibrose; keine Lungenstruktur mehr erhalten

Tabelle 2.13: Einteilung der Fibrosegrade des interstitiellen Lungenparenchyms nach der sog. Ashcroft-Skala (Ashcroft et al. 1988); modifiziert nach Hübner et al. (Hübner et al. 2008)

2.8.3 Auswertung der Immunhistochemie

Zusätzlich zu den konventionell gefärbten Präparaten erfolgte die Beurteilung der Immunhistochemie. Dabei wurden verschiedene Antikörper wie oben beschrieben (2.7.6) auf die Lungschnitte aufgebracht.

Die Auswertung wurde bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop durchgeführt, wobei zu allererst jeweils die Beurteilung der Negativkontrolle erfolgte und nur bei fehlender Hintergrundaktivität die Auszählung für die linke und rechte Lunge sowie für sechs native Lungen vollzogen wurde (Hirt 2003).

Zellzahl

Bei den Präparaten mit den vier Antikörpern gegen die Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF-A und ihrer Rezeptoren VEGFR-2 und PDGFR- α wurden jeweils die positiv angefärbten Zellen in fünf verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt.

Es wurden jeweils zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bewertet, wobei Anschnitte von Gefäßen oder Bronchiolen mit gefärbten Zellen des Endothels bzw. Epithels keine Berücksichtigung fanden.

Intensität

Auch die Intensität der immunhistochemischen Färbung spielte bei der Auswertung eine zentrale Rolle. Hierfür wurden die vier Antikörper gegen VEGFA und PDGFA und ihrer Rezepto-

ren in unterschiedlichen Epithelen (Endothel, bronchiales Epithel) und Zellen (Pneumozyten, Alveolarmakrophagen, etc.) nach der Stärke der Färbung bewertet.

- bedeutete keine Anfärbung der Zellen, + stand für schwache, ++ für moderate und +++ für starke Intensität. Diese Auswertung erfolgte wiederum in mehreren repräsentativen Gesichtsfeldern bei einer 200-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop.

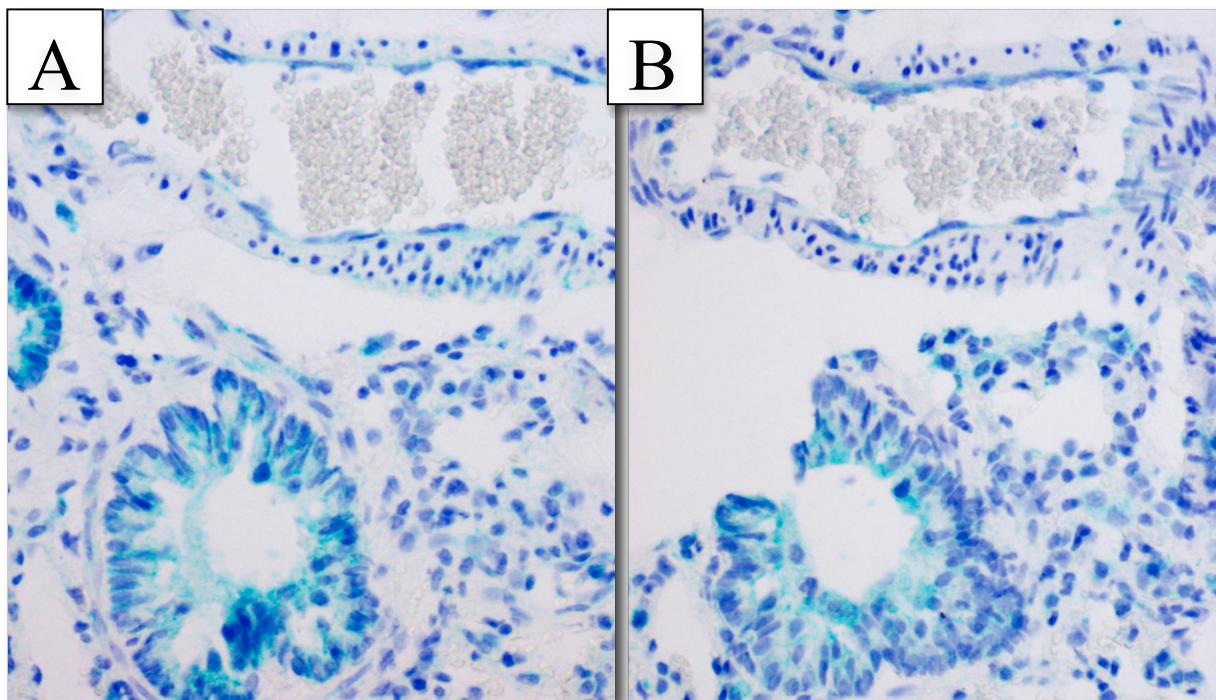


Abbildung 2.6: Identischer, histologischer Ausschnitt für die immunhistochemische Färbung einer nativen Lunge; A: PDGF-A-Färbung, B: PDGFR- α -Färbung

2.8.4 Statistische Auswertungen

Die konventionell gefärbten, histologischen Präparate wurden gemäß der Klassifikation der ISHLT (Stewart et al. 2007) bzw. der von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) modifizierten Kriterien bezüglich der Schwere der akuten und chronischen Transplantatabstoßung analysiert. Dafür wurden die oben beschriebenen Versuchsgruppen (vgl. 2.3) am festgelegten postoperativen Tag 20 bzw. 60 getötet. Aus den ausgewerteten Daten wurde für jedes histologische Präparat der Mittelwert für die linke und rechte Lunge berechnet und dann der Mittelwert aus allen Tieren einer Versuchsgruppe (POD

20 und POD 60 von Medikamenten- und Kontrolltieren) mit zugehöriger Standardabweichung gebildet.

Bei den immunhistochemischen Präparaten wurden die gefärbten Zellen von rein zufällig ausgewählten fünf Gesichtsfeldern in die Bewertung miteingeschlossen. Hierbei erfolgte die Auszählung sowohl von linker als auch rechter Lunge eines Versuchstieres sowie sechs nativen Lungen bei den Antikörpern gegen die Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF. Für die rechte und linke Lunge bzw. die nativen Lungen jedes Einzeltieres wurden Mittelwerte gebildet und anschließend Gruppenmittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen für jede Kohorte berechnet.

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad PrismTM 8 (San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt und ein p -Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Hierbei fand der Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunn's Post-hoc-Test sowie der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Auf den Kruskal-Wallis- sowie den Dunn's Post-hoc-Test wurde zurückgegriffen, um mehr als zwei, nicht-normalverteilte Stichproben miteinander zu vergleichen (Daten der Immunhistochemie). Der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test wurde herangezogen, um zwei nicht-normalverteilte Stichprobenmengen statistisch zu berechnen (Daten der Rattengewichte sowie Berechnung der konventionellen Histologie).

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeinzustand und postoperativer Gewichtsverlauf der Versuchstiere

Die erfolgreich transplantierten Versuchstiere aller Gruppen zeigten unmittelbar postoperativ einen zu erwartenden geschwächten Allgemeinzustand mit eingeschränkter Nahrungsaufnahme und veränderter Beschaffenheit des Fells. Sowohl eine geringe Anzahl von Kontroll- als auch Medikamententieren zeigten kurzzeitig eine angestrengte, teilweise rasselnde Atmung. In kürzester Zeit konnten sich die Tiere jedoch gut erholen, wurden zunehmend agiler, normalisierten ihr Fress- sowie Sozialverhalten und zeigten mit einzelnen Ausnahmen gute Wundverhältnisse im weiteren postoperativen Verlauf. Der postoperative Gewichtsverlauf der einzelnen Versuchsgruppen ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

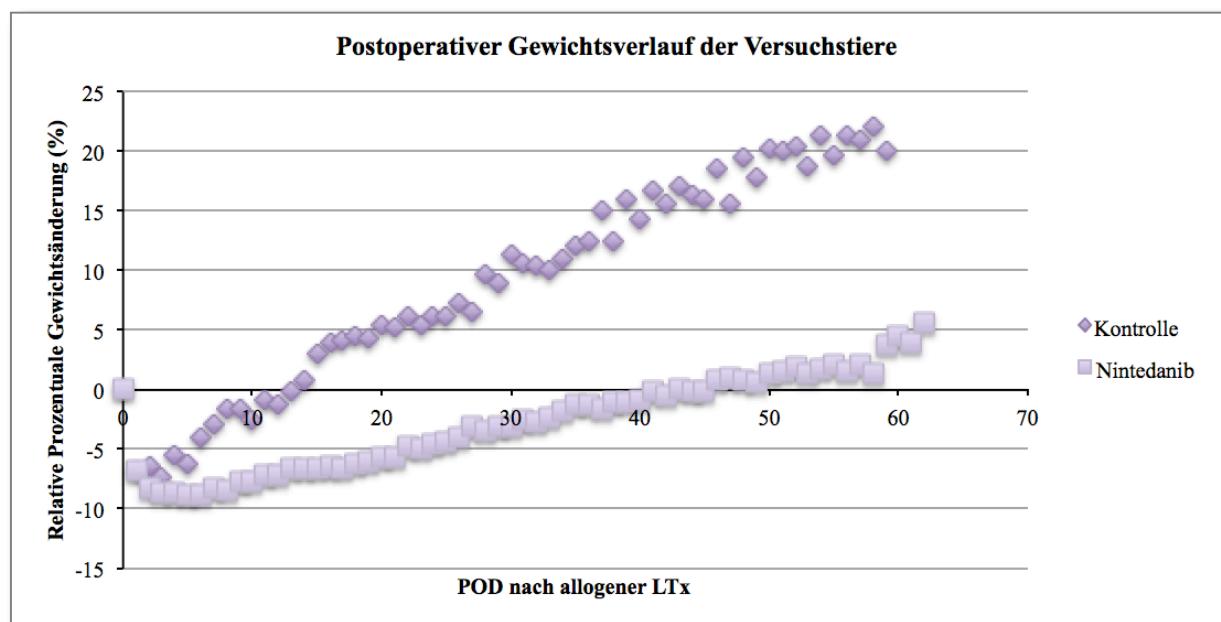


Abbildung 3.1: Postoperative Gewichtszunahme der beiden Versuchsgruppen im Verlauf; Kontrollgruppe mit n = 23 und Medikamentengruppe mit n = 12

Für den Basis- bzw. Nullwert wurde das erfasste Gewicht am Tag des operativen Eingriffs herangezogen. Unabhängig von der Medikamentenbehandlung erfuhren die Tiere unmittelbar nach der Lungentransplantation eine Restriktion der Nahrungszufuhr, um einer möglichen Aspiration vorzubeugen. Das Minimum wurde bei der Kontrollgruppe am postoperativen Tag 3, bei der Nintedanibgruppe am POD 5 erreicht. Das Körpergewicht verringerte sich sowohl

bei den Kontrolltieren um $6 \pm 6\%$ ($p = 0,0009$) als auch bei den Medikamententieren um $8 \pm 3\%$ ($p \leq 0,0001$) im Vergleich zum präoperativen Ausgangsniveau signifikant. Danach erfolgte eine kontinuierliche Zunahme des Körpergewichts bei beiden Versuchsgruppen. Die Kontrolltiere erreichten nach ca. 13 ± 2 Tagen ihr initiales Körpergewicht, wohingegen die mit Nintedanib therapierten Tiere erst nach ca. 43 ± 3 Tagen das Ausgangsniveau erreichten. Die Applikation von Nintedanib verhinderte im Vergleich zur Kontrollgruppe durchwegs signifikant eine schnellere, kontinuierliche Körpergewichtszunahme (POD 10: $p = 0,0112$; POD 20: $p \leq 0,0001$; POD 30: $p = 0,0012$; POD 40: $p = 0,0002$; POD 50: $p = 0,0022$). Trotz stetiger Gewichtszunahme erreichte die Nintedanib-Gruppe am POD 60 nur etwa $104 \pm 2\%$ des Ausgangsgewichtes und unterschied sich damit erneut signifikant ($p = 0,0238$) von der Kontrollgruppe mit $120 \pm 6\%$.

3.2 Ergebnisse der konventionellen Histologie

In diesem Abschnitt werden nun die histologisch-pathologischen Ergebnisse der präparierten Rattenlungen, die an POD 20 und POD 60 entnommen wurden, erläutert. Die abgelaufenen Umbau- und Fibrosierungsprozesse können nur dargelegt und verstanden werden, wenn der histologische Aufbau einer gesunden Lunge bekannt ist (vgl. Abschnitt 2.1.8.1). Die Klassifikation erfolgte nach modifizierten Kriterien der ISHLT (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012).

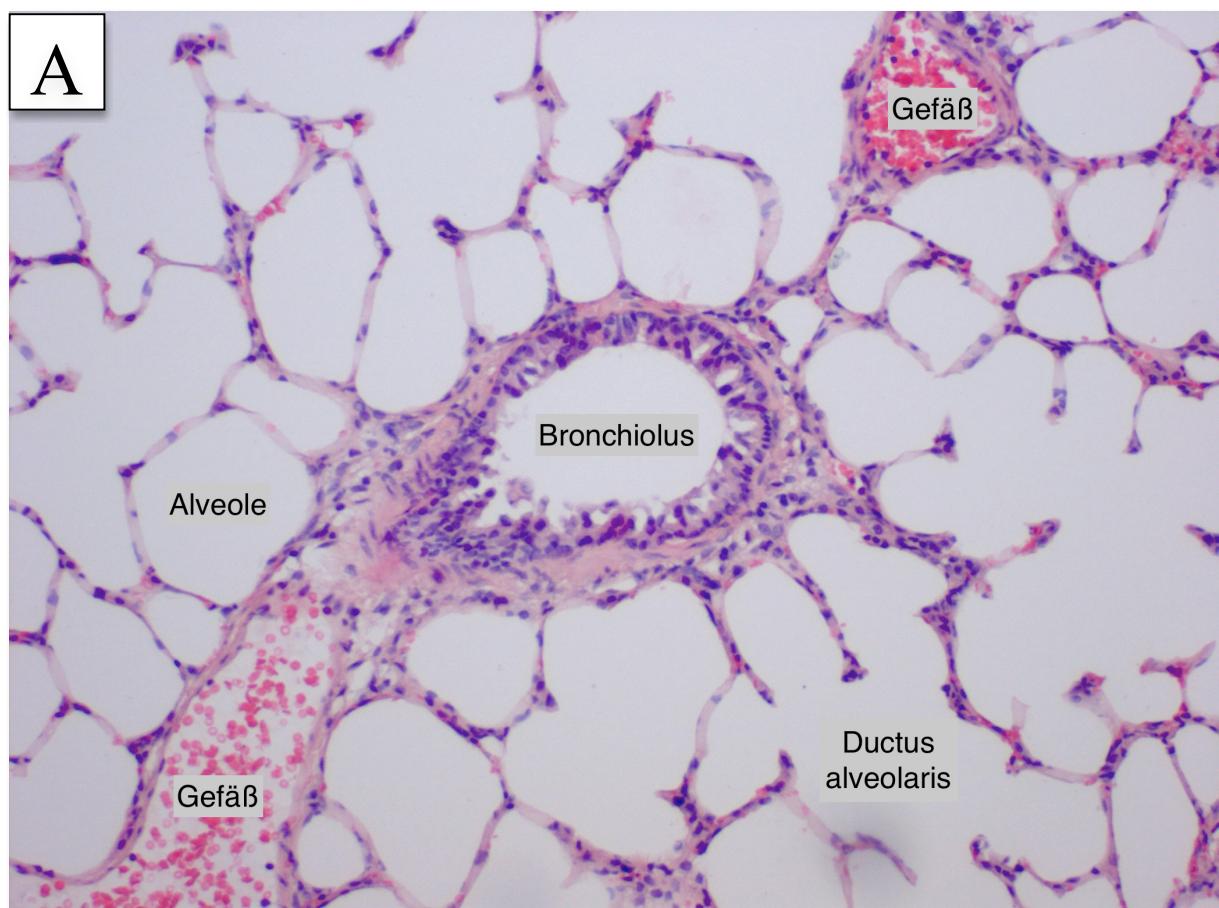
3.2.1 Native und rechte Lunge

Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich sowohl die nativen (linkes Organ des Empfängertieres WKY und rechtes Organ des Spendertieres Fischer 344) als auch die rechten Rattenlungen der transplantierten Tiere an POD 20 und 60 ohne pathologische Veränderungen. Zeichen einer möglichen Aspiration bzw. Infektion konnten nicht nachgewiesen werden.

Bronchioläre und vaskuläre Strukturen waren intakt. Das respiratorische Flimmerepithel in den Bronchiolen folgte dem beschriebenen physiologischen Aufbau mit basal liegenden Zellkernen und saß einer durchgängig intakten Lamina propria auf. Die mit glatten Muskelzellen ausgestattete Tunica muscularis zeigte die typische schergitterartige Anordnung ohne jegliche

Unterbrechungen. Das peribronchiale Bindegewebe war locker um den Bronchiolus angela-
gert. Auch die Gefäße zeigten den typischen histologischen Aufbau aus Tunica intima, media
und Adventitia. Das einschichtige Endothel mit den langgezogenen Zellkernen lag unbeschä-
digt vor; auch die Muskulatur, die sich in den Venen weniger kräftig im Vergleich zu den
Arterien darstellte, und die um die Gefäße angeordnete Bindegewebsschicht stellten sich re-
gelhaft dar. Zeichen von mononukleären Infiltraten oder Fibroseprozessen konnten sowohl bei
den Gefäßen als auch bei den Bronchiolen ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.2).

Das Lungenparenchym gestaltete sich unauffällig. Die Alveolarsepten waren nicht verdickt
oder fibrotisch verändert; Alveolen lagen im Allgemeinen nicht vergrößert oder vereinzelt
vor. Der Fibrosegrad lag bei den native Lungen sowohl an POD 20 als auch 60
nach der modifizierten Ashcroft-Skala zwischen 0 und 1.



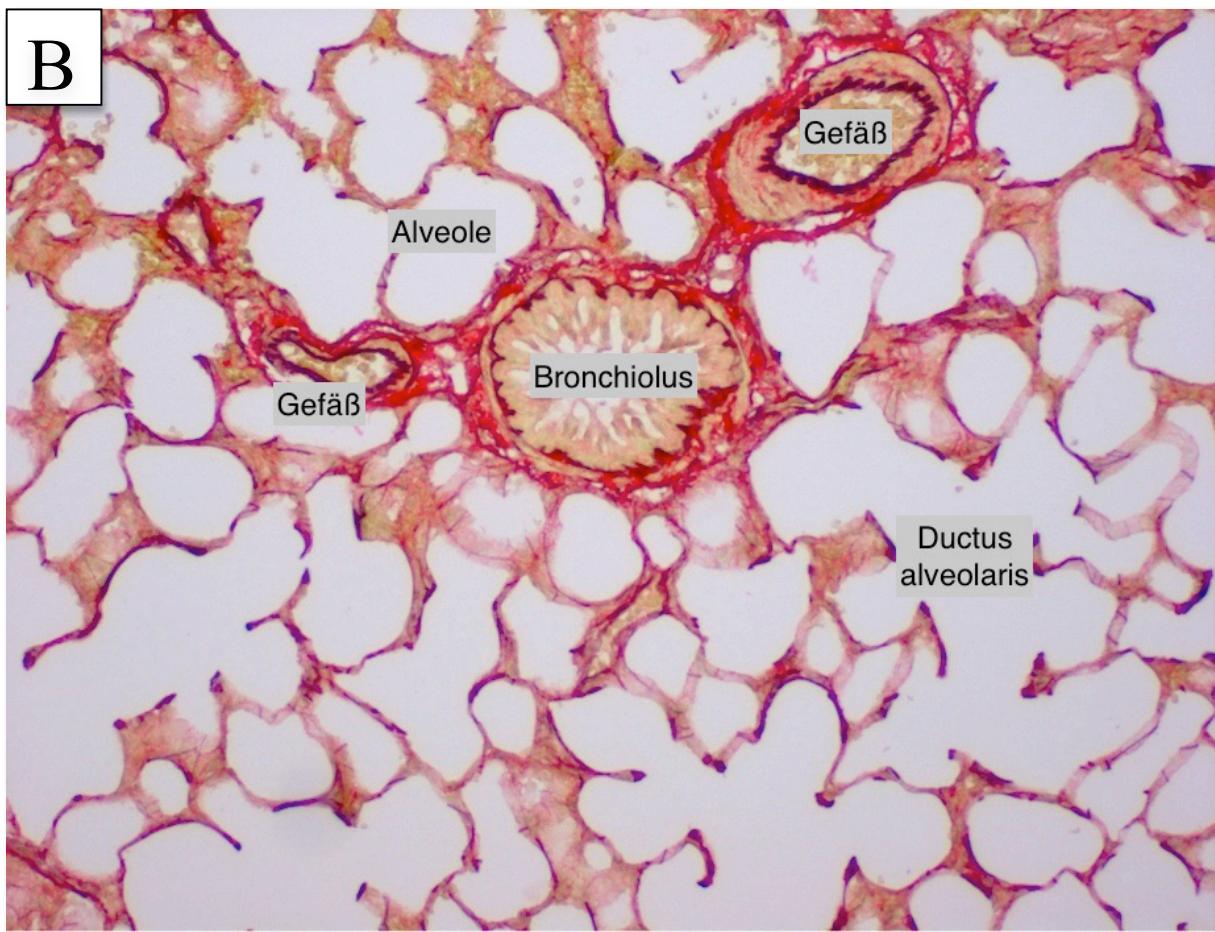


Abbildung 3.2: Ausschnitte aus einer nativen, unveränderten Lunge; A: HE-Färbung, B: Sirius-Red-Färbung

Beide Präparate zeigen den physiologischen Aufbau einer gesunden Rattenlunge mit den drei Hauptkomponenten aus vaskulären und bronchialen Strukturen sowie dem Lungenparenchym. Die Gefäße in beiden Abschnitten zeigen deutlich das einschichtige Endothel und das perivaskuläre Bindegewebe. In Ausschnitt A sieht man in dem angeschnittenen Bronchiolus deutlich das respiratorische Epithel und die darunterliegende Lamina propria. Die elastischen Fasern der Lamina propria kommen in Ausschnitt B durch die Sirius-Red-Färbung deutlich zum Ausdruck. Auch die elastischen Fasern in den Alveolen sind bei dieser Färbung gut dargestellt. Die Lumina der Alveolen sind frei von Infiltraten bzw. Ödemen. Für weitere histologische Charakteristika wird auf 2.1.8.1 verwiesen.

3.2.2 Unbehandelte Kontrollgruppe POD 20

Am POD 20 zeigte sich in allen allogen transplantierten linken Lungen der 11 Kontrolltiere ausgeprägte perivaskuläre, peribronchiale und interstitielle Entzündungsreaktionen mit mononukleären Infiltraten. In einem Großteil der Präparate hatten sich weitläufig interstitielle Ödeme gebildet. Diese Situation entsprach dem Bild einer akuten, sowohl vaskulären als auch bronchialen Abstoßungsreaktion.

In einem Großteil der Bronchiolen war das Lumen mit hyalinem, teilweise fibrinös-eitrigem Exsudat und Zelldebris gefüllt, das respiratorische Epithel größtenteils metaplastisch verändert und destruiert, nicht mehr durchgängig vorhanden bzw. teilweise vollständig von der Lamina propria abgelöst. Es zeigten sich massive, dichte, lymphozytäre Infiltrate sowohl in der Submukosa mit Ausdehnung in die Tunica muscularis als auch in dem umgebenden peribronchialen Bindegewebe (Abbildung 3.3). Des Weiteren gelang der Nachweis von eosinophilen Granulozyten sowie dem deutlich gehäuften Auftreten von Alveolarmakrophagen. Durchwegs alle bronchiolären Strukturen wurden daher nach der ISHLT-Klassifikation (vgl. 2.1.8.2) mit B2R bewertet, was einer akuten bronchiolären Transplantatabstoßung entsprach.

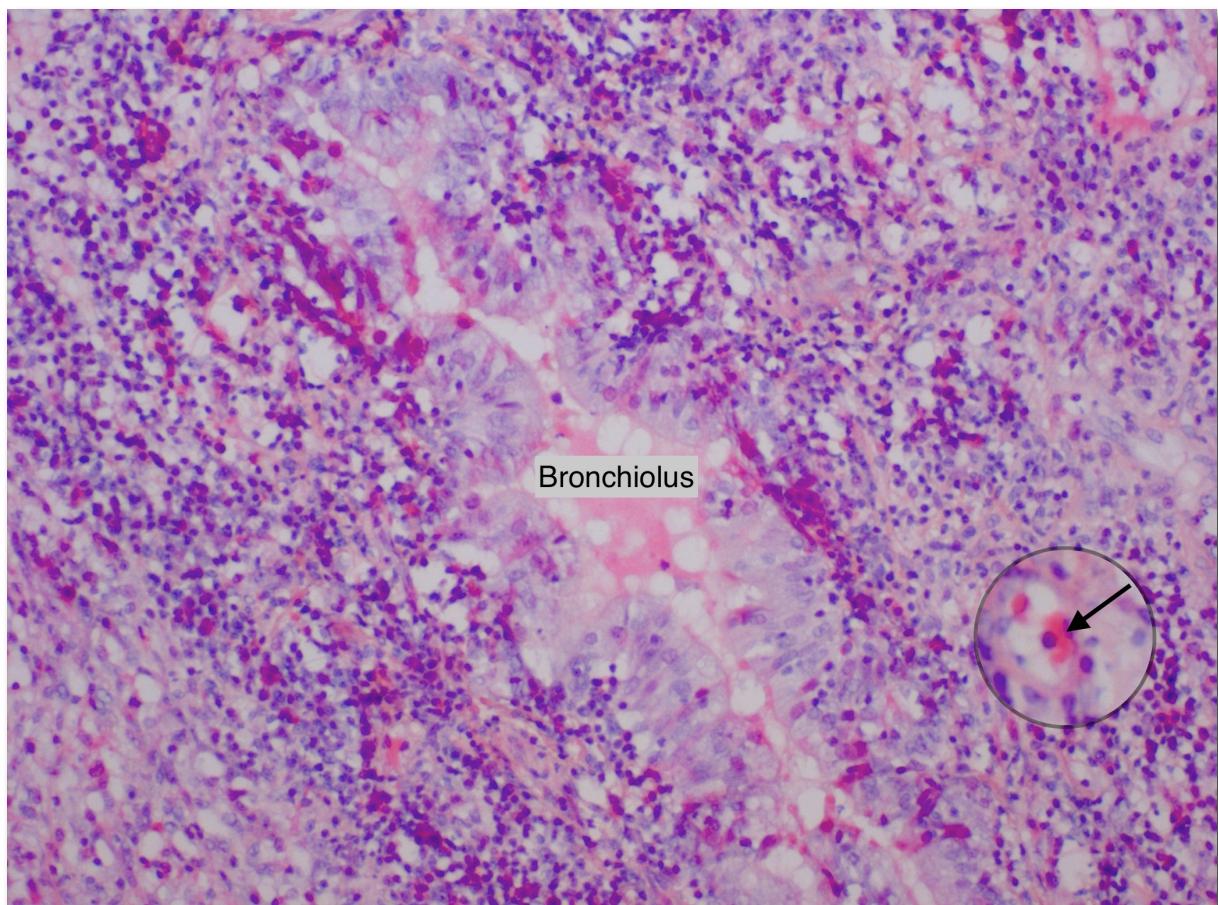


Abbildung 3.3: Anschnitt eines Bronchiolus aus einer linken, allogen transplantierten Lunge eines POD 20-Kontrolltieres, HE-Färbung

Zentral ist ein Bronchiolus mit intraluminalem Exsudat angeschnitten. Deutlich wird hier die lymphozytäre Infiltration des peribronchialen Bindegewebes sichtbar, die teilweise bis in die Tunica mucosa übertritt. Das Epithel ist größtenteils destruiert und bereits teilweise von der darunter liegenden Lamina propria abgelöst. In dem vergrößerten Abschnitt ist ein eosinophiler Granulozyt markiert. (nach ISHLT: B2R/C1R)

Die Gefäße zeigten ebenfalls eine deutliche, diffuse perivaskuläre und interstitielle Infiltration durch mononukleäre Zellen mit Ausdehnung in die Tunica muscularis sowie eine massive Schädigung des Endothels bis hin zu einer nekrotisierenden Vaskultis (Abbildung 3.4). Auch hier gelang der Nachweis von perivaskulär gelegenen neutrophilen sowie eosinophilen Granulozyten. Fast durchwegs ($98,77\% \pm 1,37\%$) wurden daher die Gefäße nach ISHLT mit A4 (Mittelwert (MW): $3,9878 \pm 0,0137$) bewertet; selten konnten kleinere Gefäße (insb. Arteriolen) mit A3 bewertet werden. Dies entsprach einer akuten vaskulären Abstoßungsreaktion.

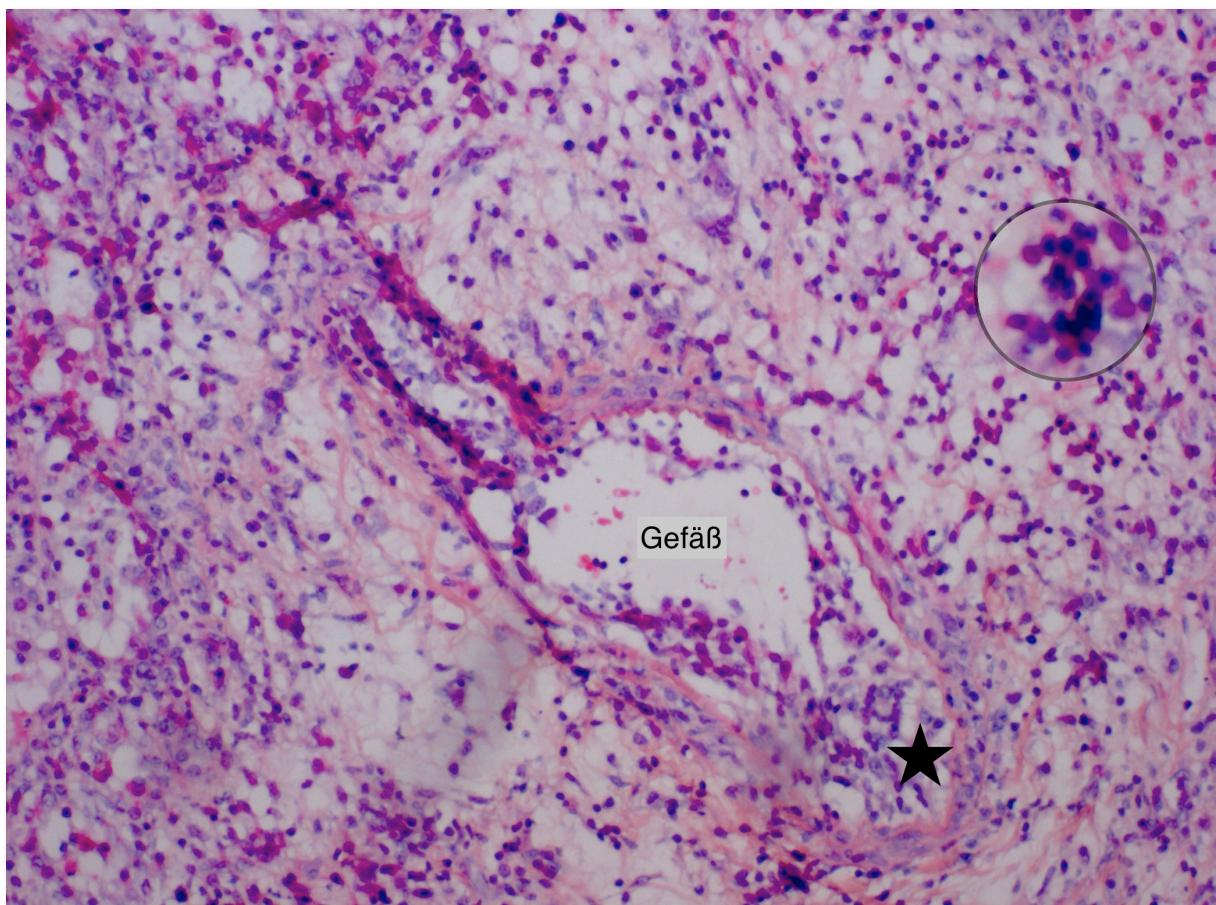


Abbildung 3.4: Gefäßanschnitt eines POD 20-Kontrolltieres, HE-Färbung

Das angeschnittene Gefäß zeigt deutlich destruierten Charakter; die ursprüngliche Dreischichtung ist kaum noch zu erkennen. Eine massive Durchsetzung mit Entzündungszellen jeglicher Art penvaskulär (vergrößerter Ausschnitt) sowie intravaskulär tritt hier deutlich hervor. Das Gefäß ist von einem perivaskulären Ödem umgeben und das Lumen bereits mit mononukleären Zellen angereichert (Stern), aber noch nicht okkludiert. Dies stellt ein erstes Zeichen für eine beginnende, chronische Abstoßung dar (nach ISHLT: A4/D1R)

Die Lungenstrukturen der Kontrolltiere waren bereits am POD 20 pathologisch verändert bzw. teilweise massiv zerstört. Das Lungenparenchym mit der alveolären Grundstruktur konnte in den meisten Fällen noch als solches erkannt werden. Dennoch waren verdicktes Alveolarepithel bzw. massive entzündliche Infiltrate in einem Großteil der Präparate allgemeinwähig. Fibrotisch veränderte Alveolen, die etwa 10 bis 50% des gesamten Organs ausmachten, prägten das Bild, wodurch die linken Kontrolllungen am POD 20 mit einem Fibrosegard von 4,727 nach der modifizierten Ashcroft-Skala bewertet wurden.

Um den Verlauf und das Einsetzen der chronischen Abstoßung beurteilen zu können, wurden die entsprechenden ISHLT-Bewertungskriterien auch für die POD-20-Tiere angewandt. Für diese Bewertung war die angefertigte Kombinationsfärbung aus Sirius-Red-Elastica sehr hilfreich, weil sich beginnende peribronchiale bzw. -vaskuläre Fibrose deutlich besser als in der HE-Färbung zeigte.

Bereits am POD 20 konnten an den histologischen Schnitten der Kontrolltiere sowohl bei den Bronchiolen als auch bei den Gefäßen beginnende chronische Abstoßungsprozesse nachgewiesen werden. So dominierten nach ISHLT-Kriterien bronchiolär erste Anzeichen von intraluminalen Polypen aus Granulationsgewebe sowie subepithelial, um die terminalen Atemwege angeordnete Fibrinstrukturen (C1R: $75,51\% \pm 11,63\%$). Unberührt (C0) von jeglicher Destruktion waren $13,14\% \pm 6,85\%$ der Bronchiolen (Abbildung 3.5: Bildausschnitt A), wohingegen $11,35\% \pm 8,64\%$ einsetzende peribronchiale Fibrose, Destruktion der glatten Muskulatur sowie beginnende Obliteration durch Granulations- und Narbengewebe zeigten (C2R). Durchschnittlich wurden die Bronchiolen der POD 20-Kontrolltiere nach ISHLT-C mit $0,9882 \pm 0,1040$ bewertet.

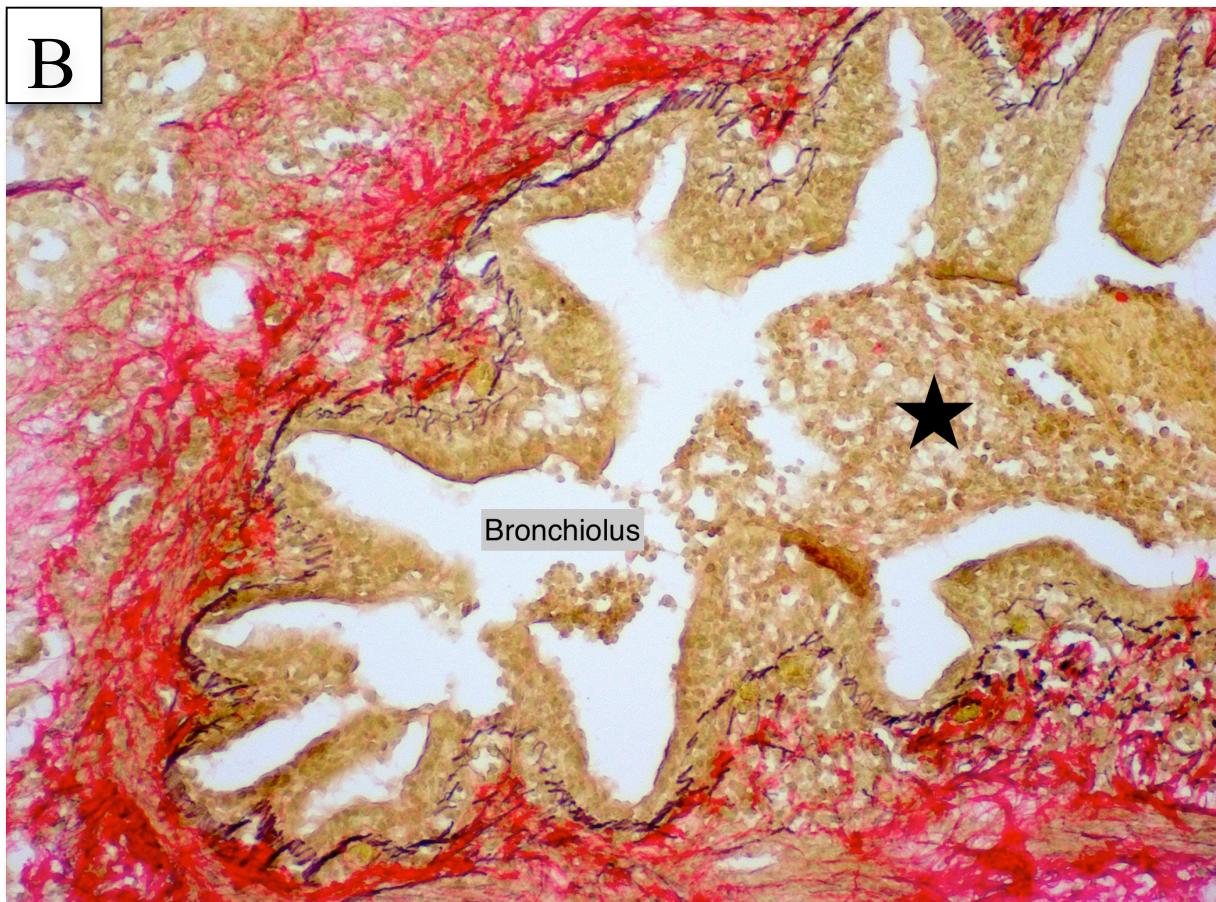
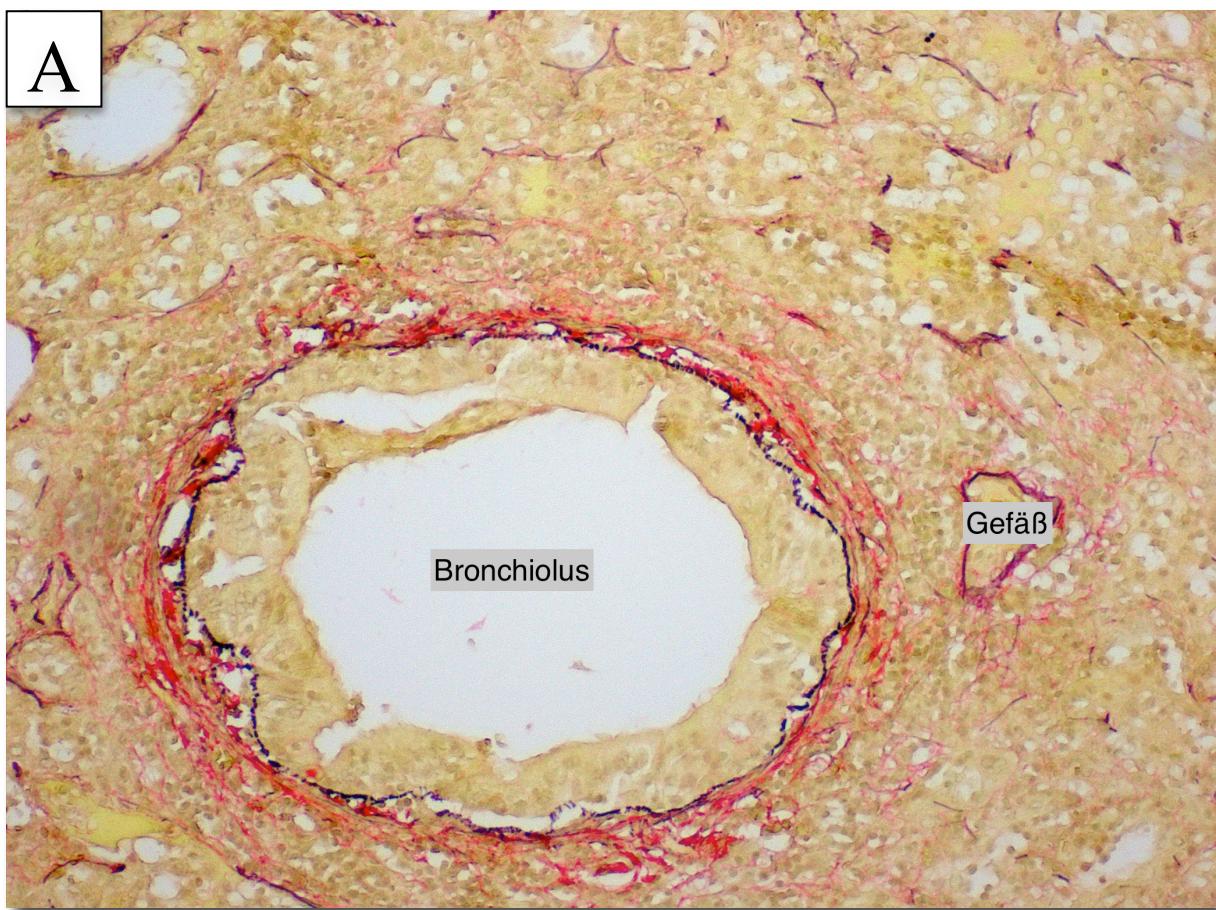
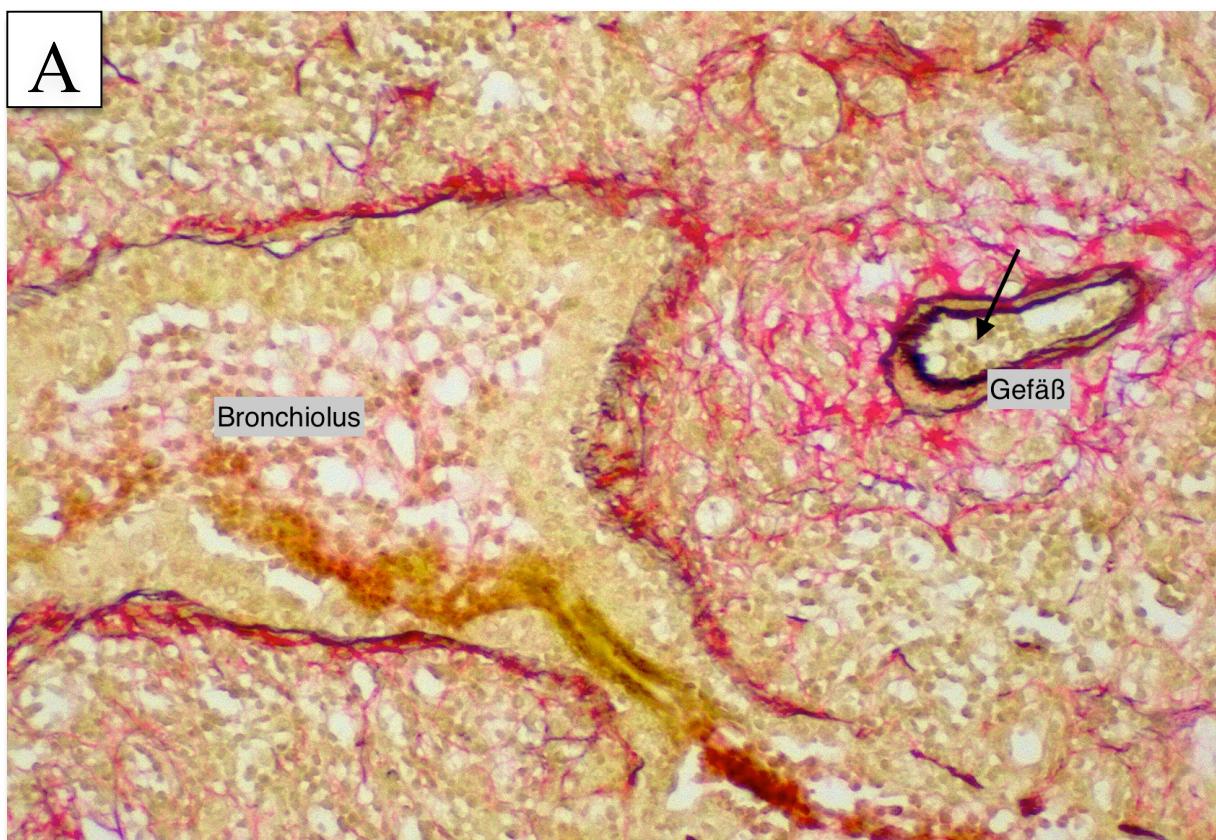


Abbildung 3.5: Bronchioli aus linken, allogen transplantierten Lungen von Kontrolltieren am POD 20, Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Bild A zeigt einen Bronchiolus und ein dazugehöriges Begleitgefäß (nach ISHLT: A4/D1R) ohne chronische Abstoßungsprozesse. Das Lumen ist durchgängig und nicht durch Granulationsgewebe oder Narbengewebe verschlossen. Peribronchial sind keine fibroproliferativen Prozesse zu erkennen. (nach ISHLT: B2R/C0)

In Bild B ist ein weiterer Bronchiolus dargestellt mit beginnender Obliteration durch Granulationsgewebe (Stern). Peribronchial werden durch die Sirius-Red-Färbung die einsetzenden Fibroseprozesse erkennbar, die sich in das umliegende Lungenparenchym ausdehnen. (nach ISHLT: B2R/C1R-2R)

Auch bei den vaskulären Strukturen zeigte sich ein ähnlich heterogenes Bild. $70,22\% \pm 5,14\%$ der Gefäße zeigte eine Obstruktion durch am Endothel haftende Entzündungszellen, was nach ISHLT mit D1R bewertet wurde (Abbildung 3.6: Bild A). Lediglich $18,32\% \pm 4,23\%$ zeigten keine vaskuläre Destruktion (D0), wohingegen sich in $11,46\% \pm 4,14\%$ der ausgezählten Gefäße ausgeprägte perivaskuläre Fibrose mit fibrointimaler Verdickung (D2R) fanden (Abbildung 3.6: Bild B). Insgesamt ergab sich ein Wert von $0,9314 \pm 0,0662$ für die ISHLT-D-Klassifikation der POD 20-Kontrolltiere.



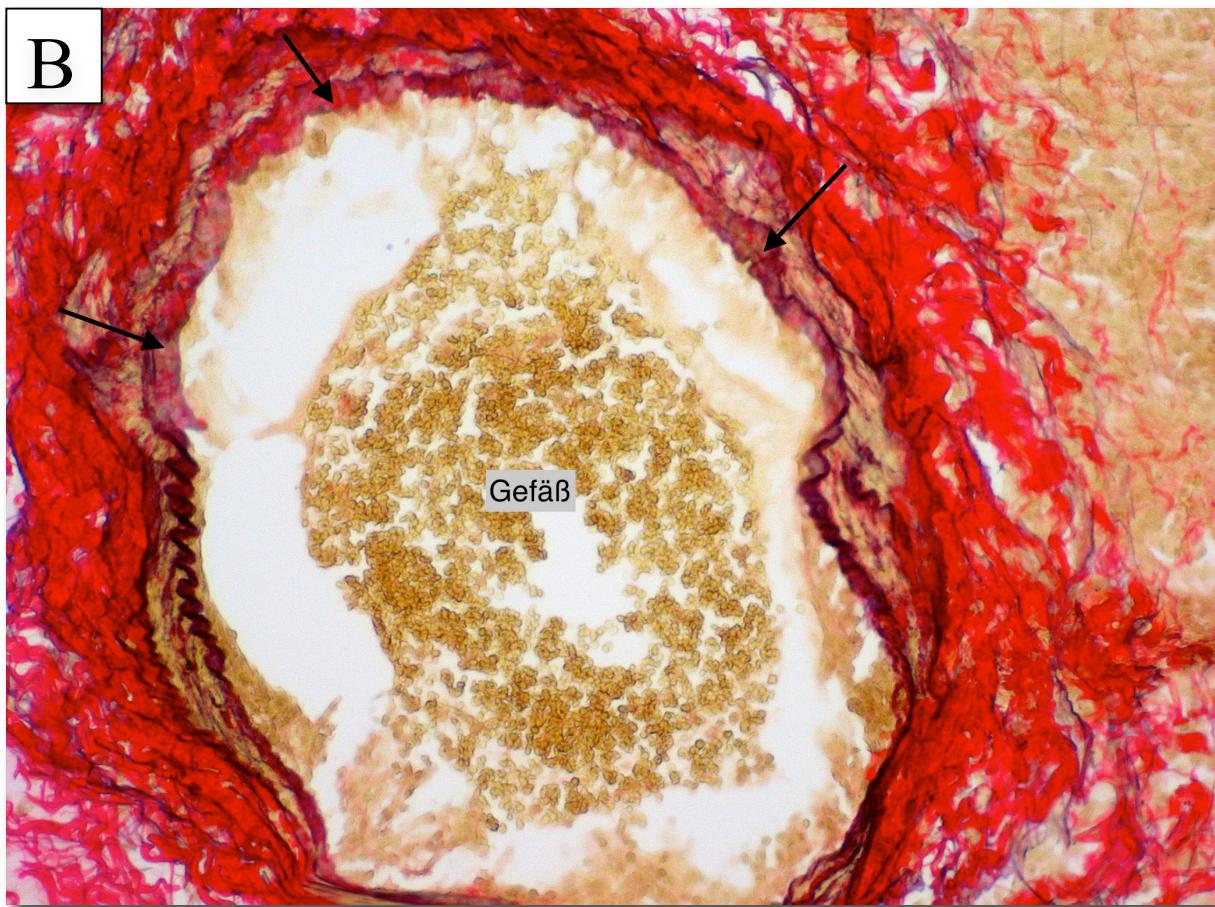


Abbildung 3.6: Gefäßausschnitte von POD 20-Kontrolltieren; A und B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red Färbung

In Bildausschnitt A sind ein Bronchiolus (nach ISHLT B2R/C1R) und ein mittelgroßes Gefäß dargestellt. Man sieht hier deutlich die durch den Pfeil markierte Adhäsion der Entzündungszellen, insb. Leukozyten an das Endothel, was zu einer Teilobstruktion des Gefäßes führt. (nach ISHLT A4/D1R) Bildausschnitt B demonstriert ein großes Gefäß mit deutlicher perivaskulärer Fibrose und Kollagenvermehrung mit teilweiser Ausbreitung in das umliegende Interstitium. Durch Pfeile ist die ausgeprägte fibrointimale Verdickung gekennzeichnet. (nach ISHLT A4/D2R)

3.2.3 Unbehandelte Kontrollgruppe POD 60

Am POD 60 konnte an den 12 unbehandelten allogen transplantierten, linken Kontrolllungen ein deutlicher Rückgang des akuten Entzündungsgeschehens festgestellt werden. Es fanden sich im Gegensatz zu den POD 20-Tieren kaum bis keine perivaskulären, peribronchialen und interstitiellen Infiltrationen mononukleärer Zellen. Stattdessen prägte die vorherrschende

chronische Abstoßung das Bild. Kennzeichnend hierfür waren die deutlichen perivaskulären und peribronchialen fibrotischen Umbauprozesse mit Ausbreitung in das umliegende Lungenparenchym. Dort vollzogen sich ebenfalls fibroproliferative Prozesse mit sukzessiv bindegewebiger Transformation.

$94,57\% \pm 6,95\%$ der ausgezählten bronchiolären Strukturen der POD 60-Kontrolltiere zeigten ausgeprägte kon- und exzentrische peribronchiale Fibrose mit partiellm oder vollständigem Verschluss des Lumens (ISHLT: C2R). Die Tunica muscularis war an einigen Stellen komplett zerstört und das respiratorische Epithel abgeflacht oder abgelöst. Zusätzlich war das bronchiolare Lumen deformiert oder durch entstandenes Narbengewebe im Zeichen einer schweren konstriktiven Bronchiolitis obliteriert (Abbildung 3.7). Lediglich $5,43\% \pm 6,95\%$ zeigten geringergradige chronische Abstoßungsprozesse, in denen das Lumen nur durch intraluminale Polypen von Granulationsgewebe teilweise obliteriert war und der bindegewebige Umwandlungsprozess noch nicht vollständig vollzogen war (C1R). Insgesamt ergab sich für die POD 60-Kontrolltiere ein MW nach der ISHLT-C-Klassifikation von $1,9458 \pm 0,0696$, was gleichbedeutend ist mit einer massiven, chronischen, bronchiolären Abstoßungsreaktion.

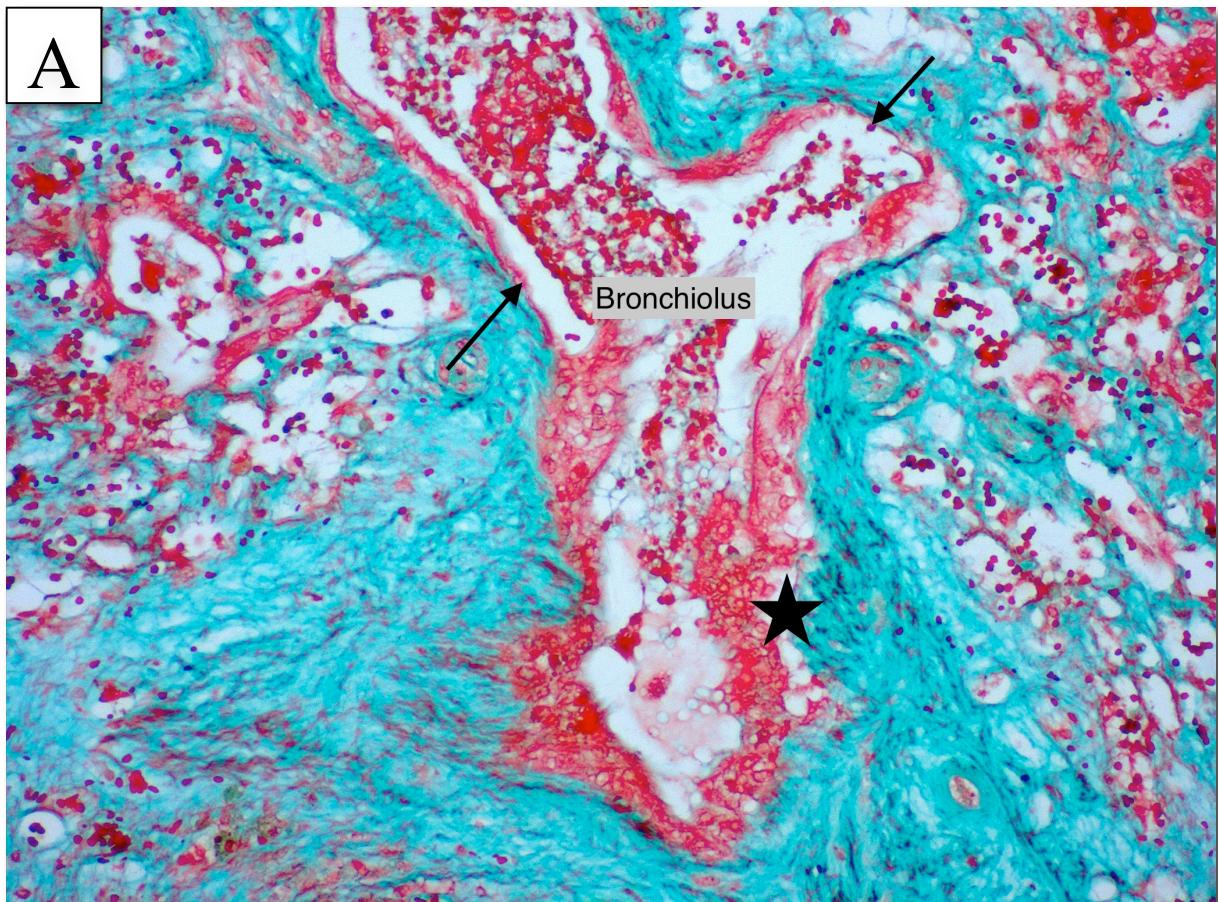


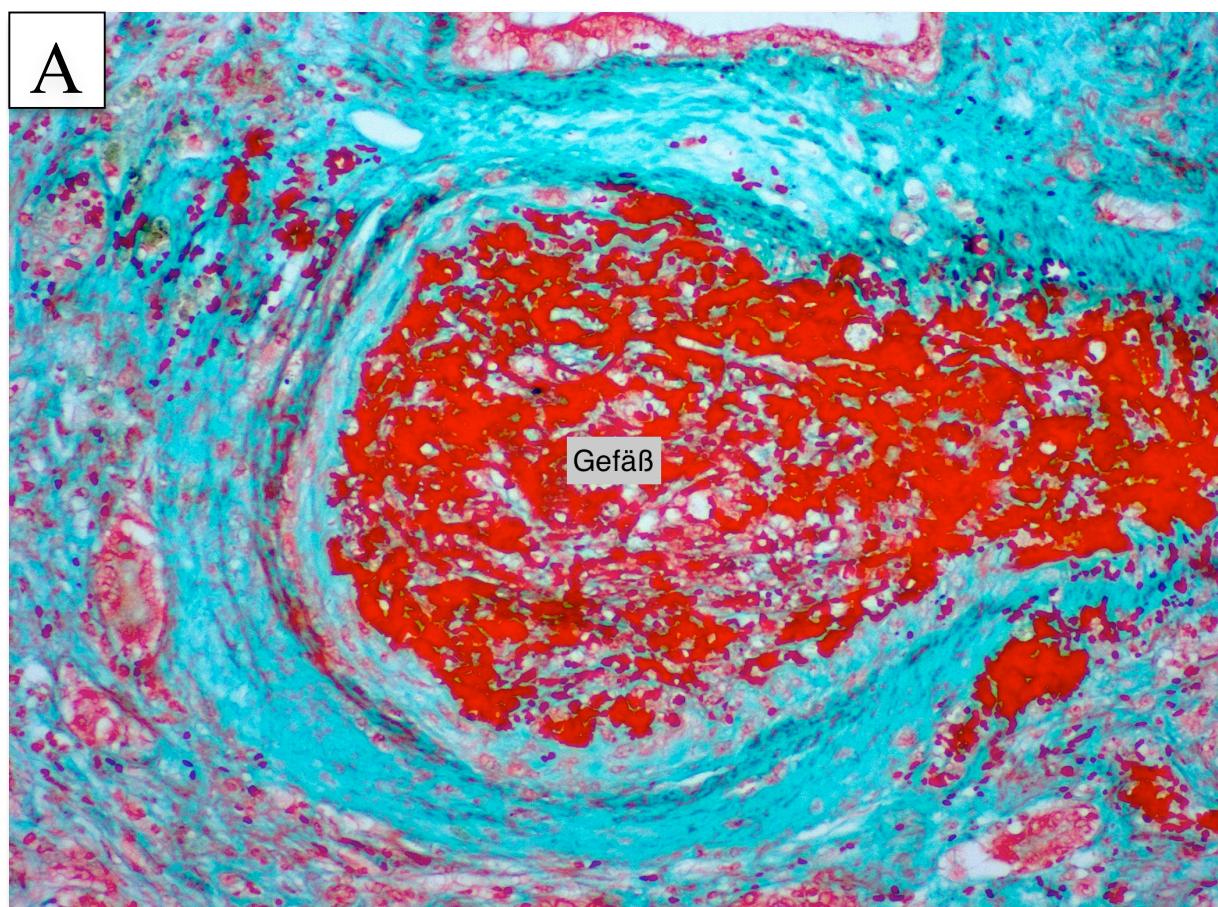


Abbildung 3.7: Bronchiolenanschnitte aus allogen transplantierten, linken Lungen von POD 60-Kontrolltieren; A: Masson-Goldner-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Bild A: Um den Bronchiolus angeordnet erkennt man – in der Masson-Goldner-Färbung deutlich an der grün-bläulichen Darstellung – die peribronchiale Bindegewebsvermehrung. Das Lumen des Bronchiolus ist stark deformiert; die Pfeile zeigen auf Stellen mit massiv abgeflachtem bzw. vollständig abgelöstem Flimmerepithel. Durch fibroproliferative Prozesse, entstehendes Narbengewebe und zusätzliches intraluminales Granulationsgewebe kommt es zum Vollbild der konstriktiven Bronchiolitis obliterans. Der Stern markiert kollagenes Bindegewebe, das das Lumen von außen komprimiert, sowie Granulationsgewebe, das die Öffnung des Bronchiolus von innen her verschließt. Die auf dem Bild kaum noch erkennbaren Lungenparenchymstrukturen sind fibrotisch und metaplastisch verändert. Alveolen sind, wenn überhaupt, nur noch in äußerst geringem Ausmaß vorhanden. (nach ISHLT C2R)

Bild B: Auch hier wird die Bindegewebsvermehrung um die beiden angeschnittenen Bronchiolen sowie die zunehmende Okklusion deutlich. (nach ISHLT C2R)

Auch die Gefäße waren ähnlich stark von der chronischen Abstoßungsreaktion betroffen. $88,07\% \pm 5,57\%$ der vaskulären Strukturen zeigten deutliche perivaskuläre Fibrose mit Ausbreitung in das umliegende Interstitium (Abbildung 3.8). Auch die Intima selbst – insbesondere von mittelgroßen Gefäßen – unterlag diesen fibrotischen Umbauprozessen. Diese und kleinste Gefäße waren am häufigsten von vollständiger Okklusion und vaskulärer Sklerose betroffen (nach ISHLT: D2R). Nur $11,93\% \pm 5,57\%$ zeigten geringere perivaskuläre Fibrose bzw. unvollständige Obliteration (D1R). Insgesamt ergab sich hierbei ein Durchschnittswert aller ausgezählten Gefäße von $1,8808 \pm 0,0558$ nach ISHLT-D. Dieses Ergebnis entspricht dem einer chronischen, vaskulären Abstoßungsreaktion.



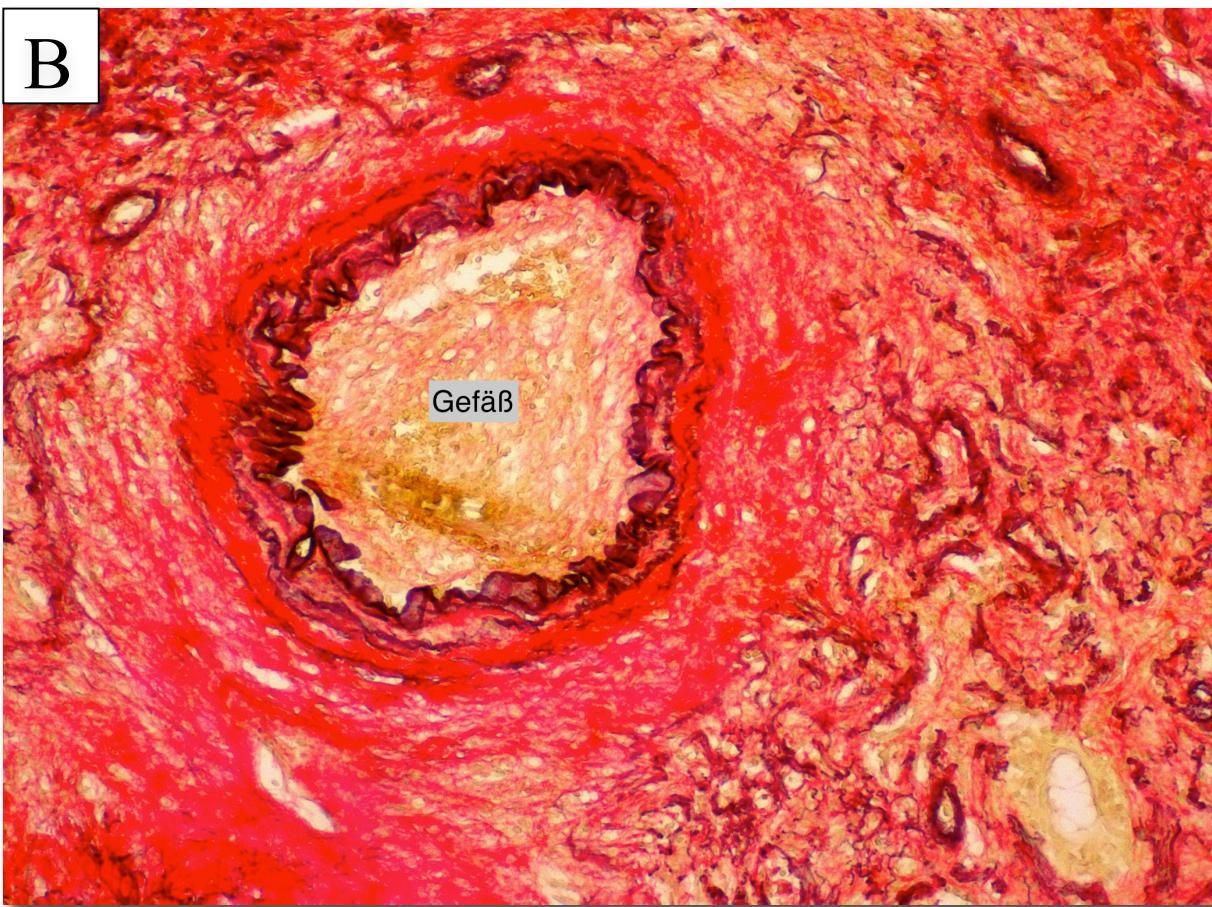


Abbildung 3.8: Gefäße aus POD 60-Kontrolltieren; A: Masson-Goldner-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Bildausschnitt A und B zeigen jeweils einen Gefäßanschnitt. In beiden Färbungen dominiert eine massive perivaskuläre Fibrose mit deutlicher Ausweitung bis in das umliegende Lungenparenchym. Die Lumina der Gefäße sind vollständig okkludiert. Von der eigentlichen Dreiteilung der Gefäße ist insbesondere in Ausschnitt A nicht mehr viel zu erkennen. (nach ISHLT D2R)

Am POD 60 ist aufgrund der abgelaufenen akuten und der gegenwärtigen chronischen Abstobungsreaktion das Lungenparenchym nahezu vollständig destruiert. Mit Ausnahme von 3 der 12 Kontrolltiere, die nach der modifizierten Ashcroft-Skala mit 6 bewertet wurden (Fibrose > 50% des Präparates), zeigten die anderen Präparate nahezu vollständige interstitielle Fibrose ohne jegliche erkennbare Lungenstruktur. Insgesamt erreichten die linken Lungen der Kontrolltiere am POD 60 einen Fibrosegrad von 7,167

3.2.4 Nintedanib-Gruppe POD 20

In den 6 linken, allogen transplantierten Lungen der Medikamentengruppe des 20. postoperativen Tages zeigten sich die gleichen akuten Transplantatabstoßungsprozesse wie bereits in der entsprechenden Kontrollgruppe beschrieben. Deutlich prägten perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate mononukleärer Zellen, die bis in das umliegende Interstitium übergriffen, das Bild.

Die Bronchiolen waren nach ISHLT durchwegs mit B2R bewertet (Abbildung 3.9), die vaskulären Strukturen zeigten mit wenigen Ausnahmen (A3: $1,98\% \pm 0,77\%$) eine maximale akute Abstoßungsreaktion, weshalb die Klassifikation A4 mit $98,02\% \pm 0,77\%$ am häufigsten gewählt wurde (Abbildung 3.10). Für die ISHLT-A-Klassifikation ergab sich somit bei den mit Nintedanib behandelten Tieren am POD 20 ein MW von $3,9803 \pm 0,0078$. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass bei den mit Nintedanib behandelten Tieren ebenso wie bei den Kontrolltieren eine ausgeprägte Form der akuten vaskulären und bronchialen Transplantatabstoßung ohne Nachweis einer Signifikanz (A3: $p = 0,2939$; A4: $p = 0,2939$; B2R: $p = 1$) beobachtet werden konnte. Nintedanib bewirkt demnach keine Reduktion der inflammatorischen Prozesse in der akuten Phase der Transplantationsabstoßung.

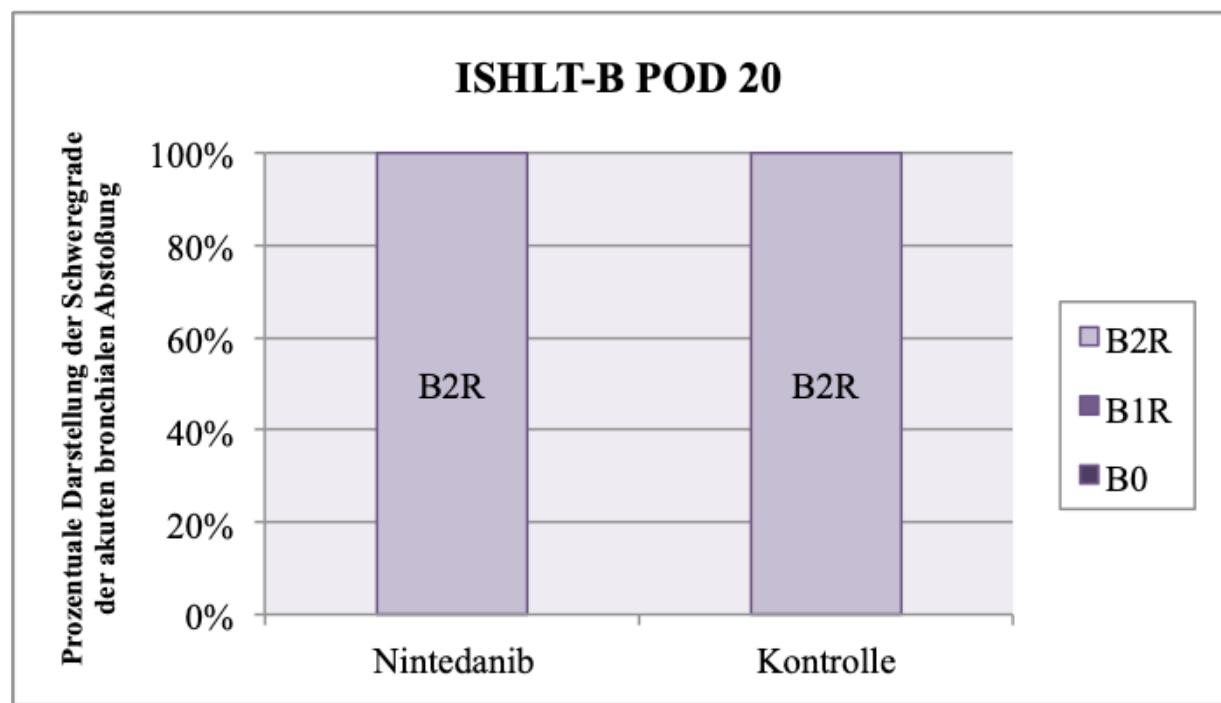


Abbildung 3.9: Vergleich der Schweregrade der akuten bronchialen Abstoßungsreaktion (ISHLT-B) zwischen Medikamenten- und Kontrollgruppe am 20. postoperativen Tag (B2R: $p = 1$)

Dieses Säulendiagramm demonstriert, dass die akute, bronchiale Abstoßungsreaktion in der Medikamenten- und der Kontrollgruppe allgegenwärtig war. Beide Gruppen wurden durchwegs nach ISHLT mit B2R bewertet.

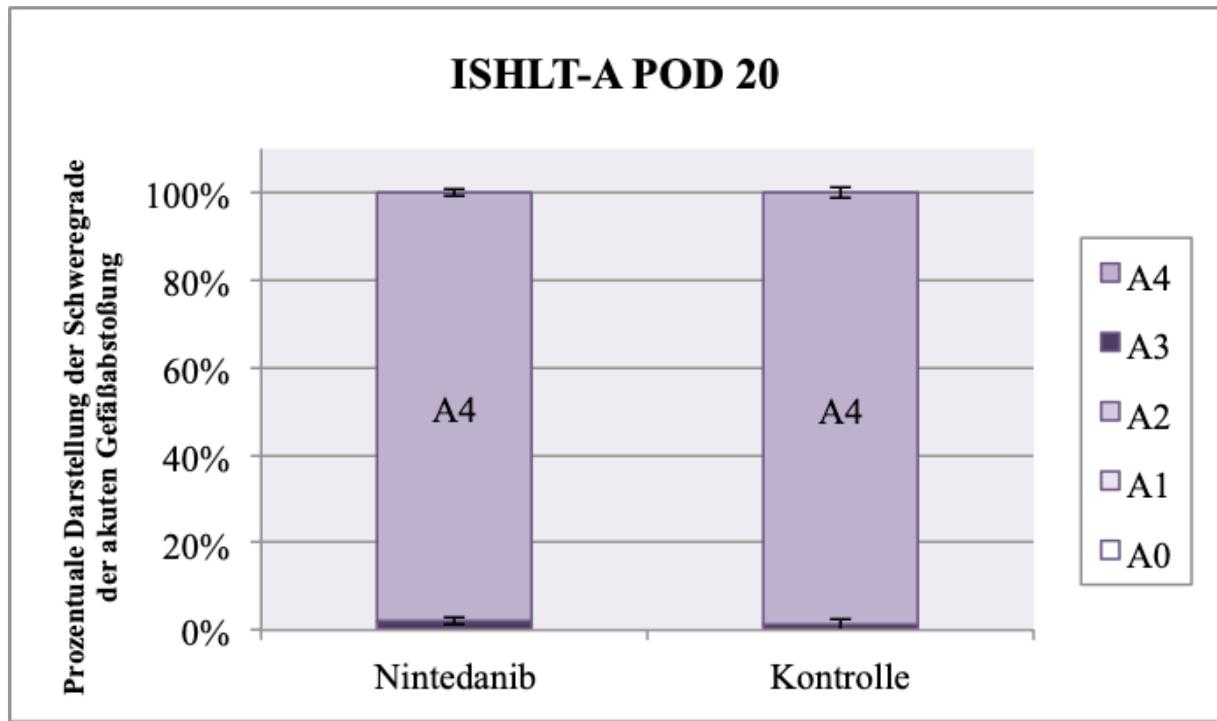


Abbildung 3.10: Vergleich der Schweregrade der akuten vaskulären Abstoßungsreaktion (ISHLT-A) zwischen Medikamenten- und Kontrollgruppe am 20. postoperativen Tag (A3: $p = 0,2939$; A4: $p = 0,2939$)

Auch dieses Säulendiagramm zeigt, dass sich im Bezug auf die akute vaskuläre Abstoßung keine Unterschiede hinsichtlich Behandlung bzw. Nicht-Behandlung der POD 20-Tiere ergeben. In den Nintedanib-Tieren wurden $98,02\% \pm 0,77\%$ mit dem höchsten ISHLT-Schweregrad A4 bewertet, bei der Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von $98,77\% \pm 1,37\%$. Beide Versuchsgruppen entsprachen dabei dem Bild einer schweren, akuten, vaskulären Transplantatabstoßung.

Auch die dritte Komponente, das Lungenparenchym, konnte durch den Einsatz der RTK-Inhibitors Nintedanib nicht vor beginnenden, fibrotischen Prozessen geschützt werden. Von den 6 allogen transplantierten und mit Medikament behandelten Lungen zeigten 2 einen Fibroseanteil von 10-50% innerhalb des histologischen Präparates, was einem interstitiellen Fibrosegrad nach der modifizierten Ashcroft-Skala von 5 entspricht. Die weiteren 4 Lungen, die nur 10% fibrotische Veränderungen aufwiesen, wurden mit dem Fibrosegrad 4 bewertet,

wodurch sich ein MW von 4,333 ergab. Im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe (MW: 4,727) ergab sich kein relevanter, signifikanter Unterschied ($p = 0,1618$).

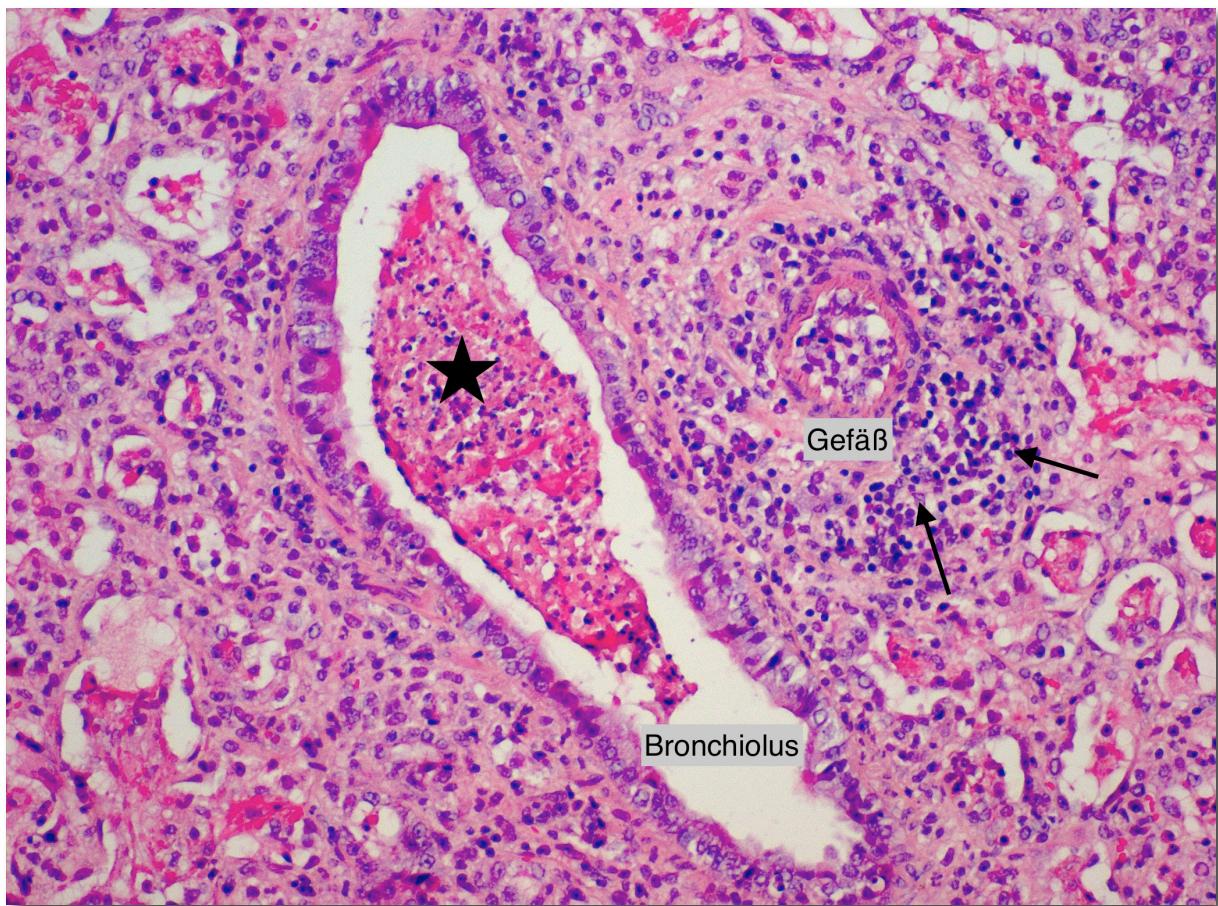


Abbildung 3.11: Histologisches Präparat einer allogen transplantierten und mit dem RTK-Inhibitor Nintedanib behandelten Lunge am POD 20, HE-Färbung

In diesem histologischen Ausschnitt sind ein Bronchiolus und ein mittelgroßes Gefäß angeschnitten. Sowohl peribronchial als auch perivaskulär (Pfeile) finden sich dichte Infiltrate mononukleärer Zellen. Das respiratorische Flimmerepithel des Bronchiolus ist deutlich abgeflacht bzw. destruiert. Intraluminal befindet sich ein Polyp aus Granulationsgewebe mit Fibroblasten und abgelösten Epithelzellen, was gemäß der ISHLT einer Klassifikation von B2R/C1R entspricht. Die Intima des angeschnittenen Gefäßes zeigt bereits entzündliche Veränderungen, wodurch sich Leukozyten an das Endothel anlagern und das Lumen teilweise okkludieren. Auch erste Züge einer beginnenden fibrotintimalen Verdickung sind zu erkennen. Nach ISHLT entspricht dies einer Klassifikation von A4/D1R.

Auch die wiederum am POD 20 mitbeurteilte chronische Abstoßungsreaktion der Bronchiolen und Gefäße unter Nintedanib wies ein ähnlich heterogenes Bild auf wie es bei der Kontrollgruppe zu beobachten war. Sowohl bronchiolär als auch vaskulär konnten beginnende chronische Abstoßungsprozesse beobachtet werden, die auch in den Tieren, denen der RTK-Inhibitor Nintedanib verabreicht worden war, nicht minimiert werden konnten.

Bei den Bronchiolen zeigten $62,04\% \pm 9,06\%$ intralluminale Polypen durch Granulationsgewebe (C1R), während $22,08\% \pm 4,73\%$ keine bronchiolären Destruktionen (C0) und $15,88\% \pm 6,62\%$ ausgeprägte peribronchiale Fibrose bzw. Obliteration des Lumens (C2R) aufwiesen. Sowohl bei den unbehandelten als auch bei den mit Nintedanib behandelten Tieren wurden chronische, bronchioläre Abstoßungsreaktionen bereits am 20. postoperativen Tag beobachtet (Abbildung 3.12), die durch den RTK-Inhibitor nicht verhindert werden konnten.

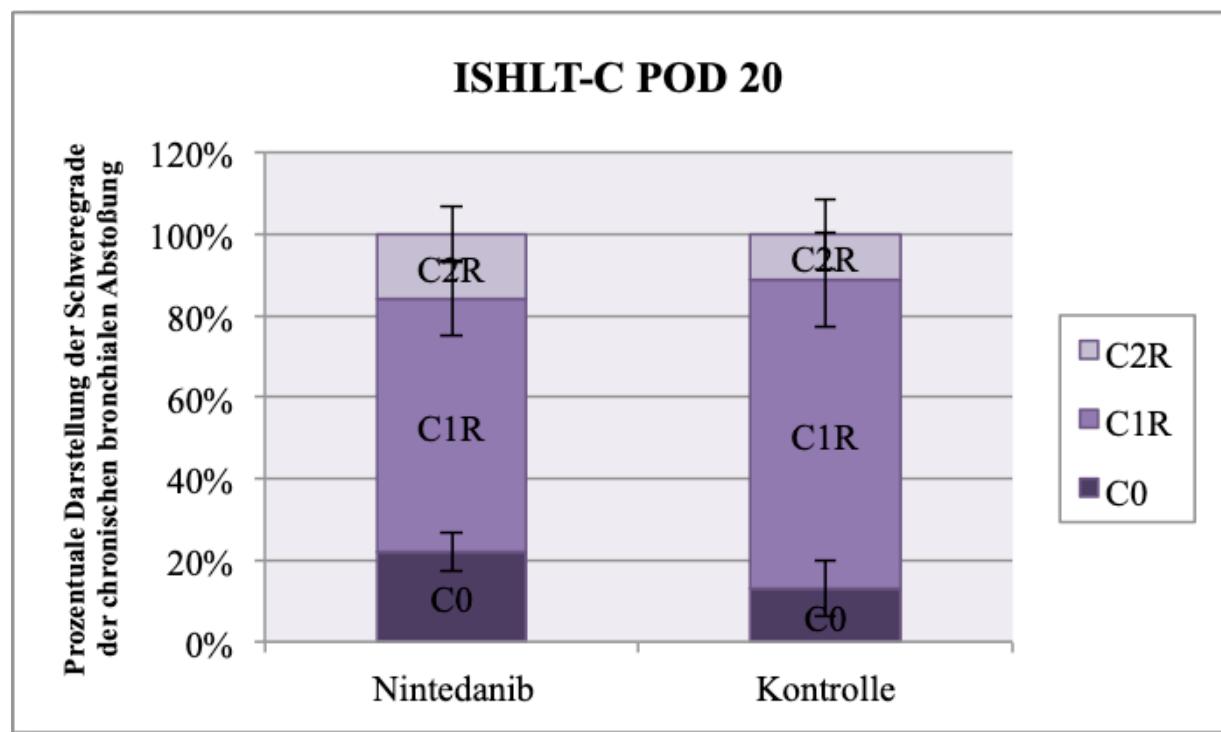


Abbildung 3.12: Vergleich der Schweregrade der chronischen Bronchialabstoßung (ISHLT-C) nach LTx bei Medikamenten- und Kontrolltieren am POD 20 (C0: $p = 0,0113$; C1R: $p = 0,0477$; C2R: $p = 0,3135$)

Aus diesem Säulendiagramm lässt sich erkennen, dass sowohl bei der Nintedanib- als auch bei der Kontrollgruppe am POD 20 beginnende, chronische Abstoßungsprozesse eingesetzt haben. Nintedanib-Tiere zeigen mit $22,08\% \pm 4,73\%$ im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ($13,14\% \pm 6,85\%$)

mehr bronchioläre Strukturen ohne Destruktion und Fibrose (C0-Balken) und damit auch einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0113$), dafür aber auch eine größere Anzahl an massiv fibrotisch (C2R-Balken) veränderten Luftwegen ($15,88\% \pm 6,62\%$ Nintedanib vs. $11,35\% \pm 8,64\%$ Kontrolle) allerdings ohne Signifikanz ($p = 0,3135$). Zwischen Behandlung und Nicht-Behandlung ergab sich keine relevante, die chronische Bronchialabstoßung betreffende Verbesserung.

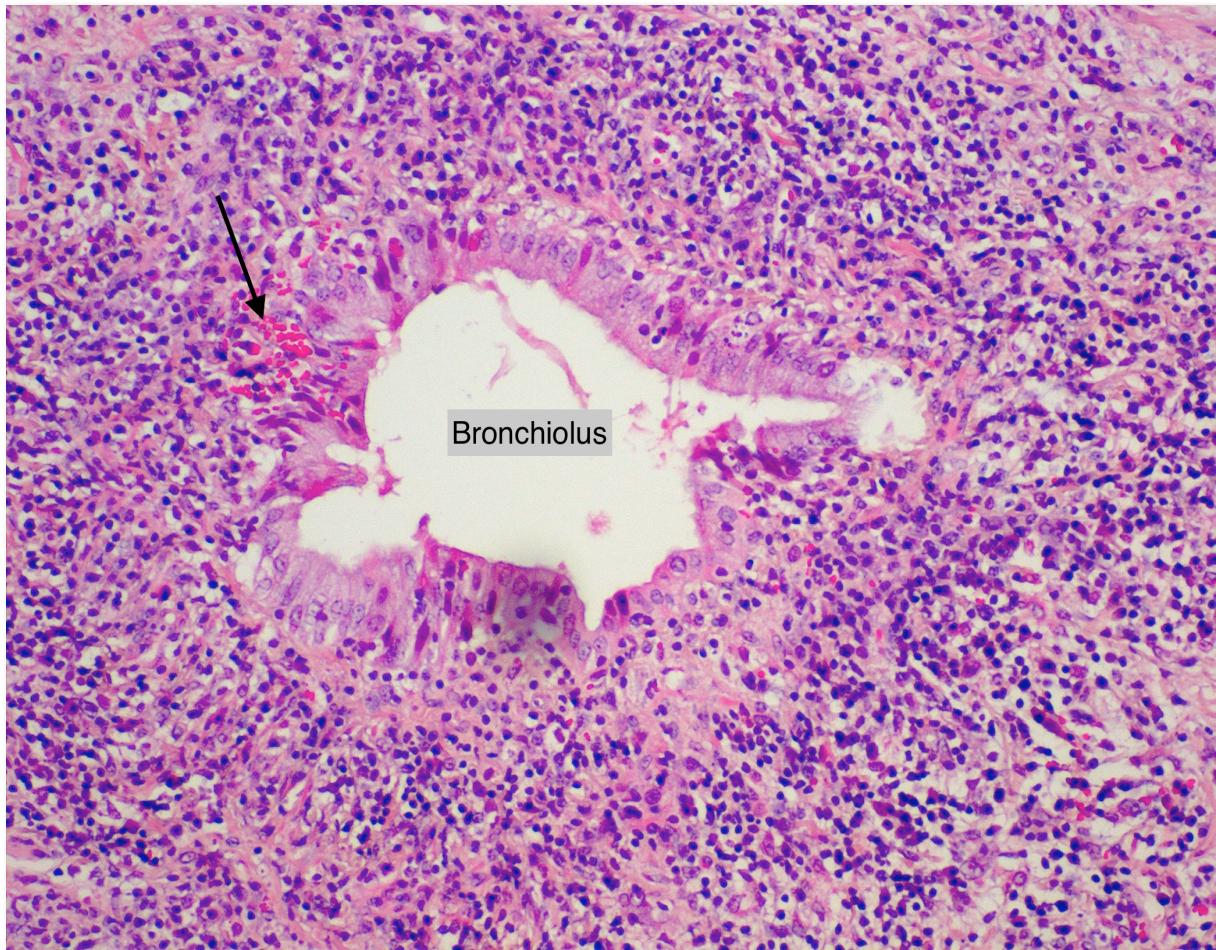


Abbildung 3.13: Anschnitt eines Bronchiolus aus einer linken Lunge eines POD 20-Medikamententieres, HE-Färbung

In dem angeschnittenen Bronchiolus wird ein weiteres Mal die peribronchioläre Infiltration von Entzündungszellen als Zeichen der akuten Abstoßung deutlich. Gleichzeitig findet sich ein bereits teilweise von der Basalmembran abgelöstes, metaplastisch verändertes Epithel sowie eine deutliche Einblutung in das Epithel (Pfeil). In diesem Bild sind keine Merkmale einer einsetzenden chronischen Abstoßung zu erkennen. Das bronchiale Lumen ist im Gegensatz zu Abbildung 3.11 frei von Granulationsgewebe und peribronchiolär sind keine fibroproliferativen Vorgänge oder gar ausgedehnte Vernarbungen zu erkennen. (nach ISHLT: B2R/C0)

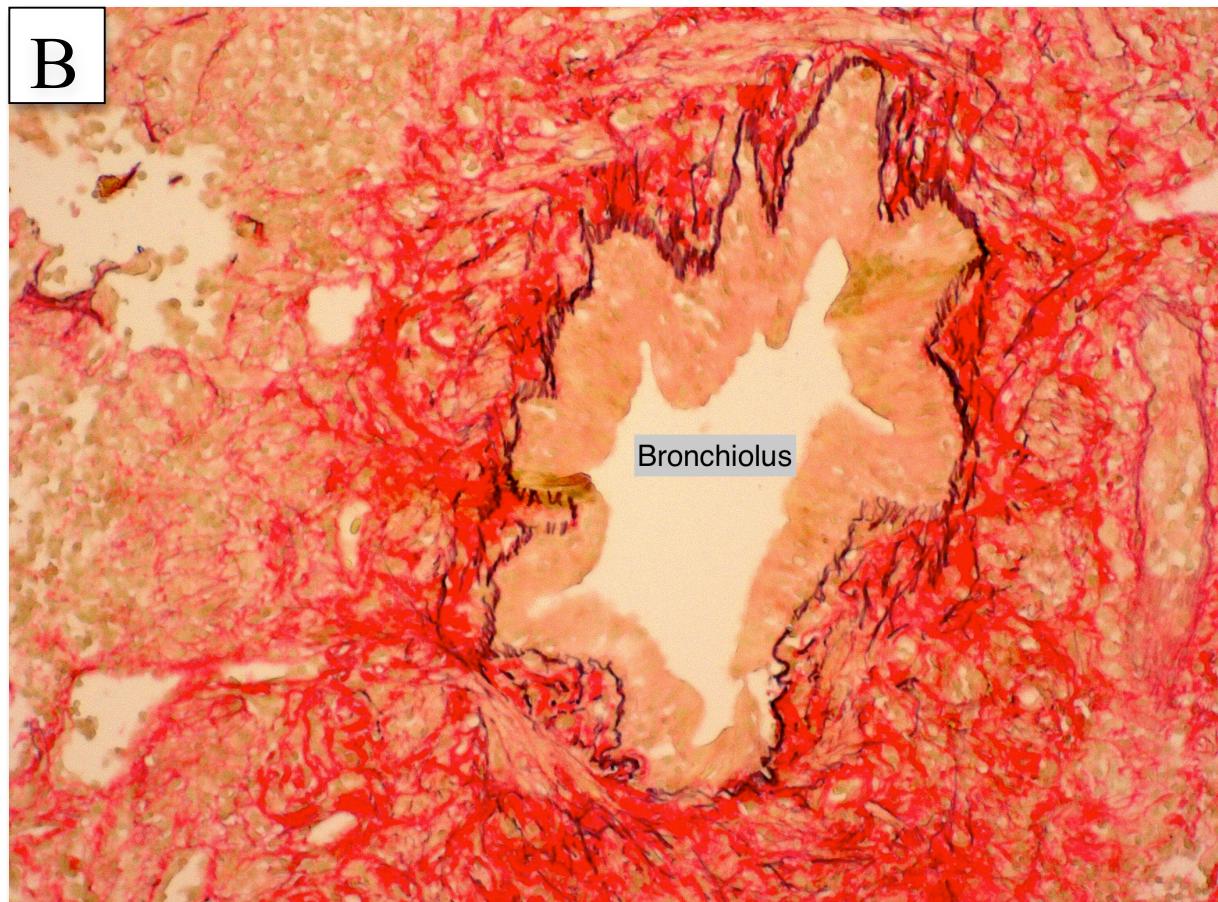
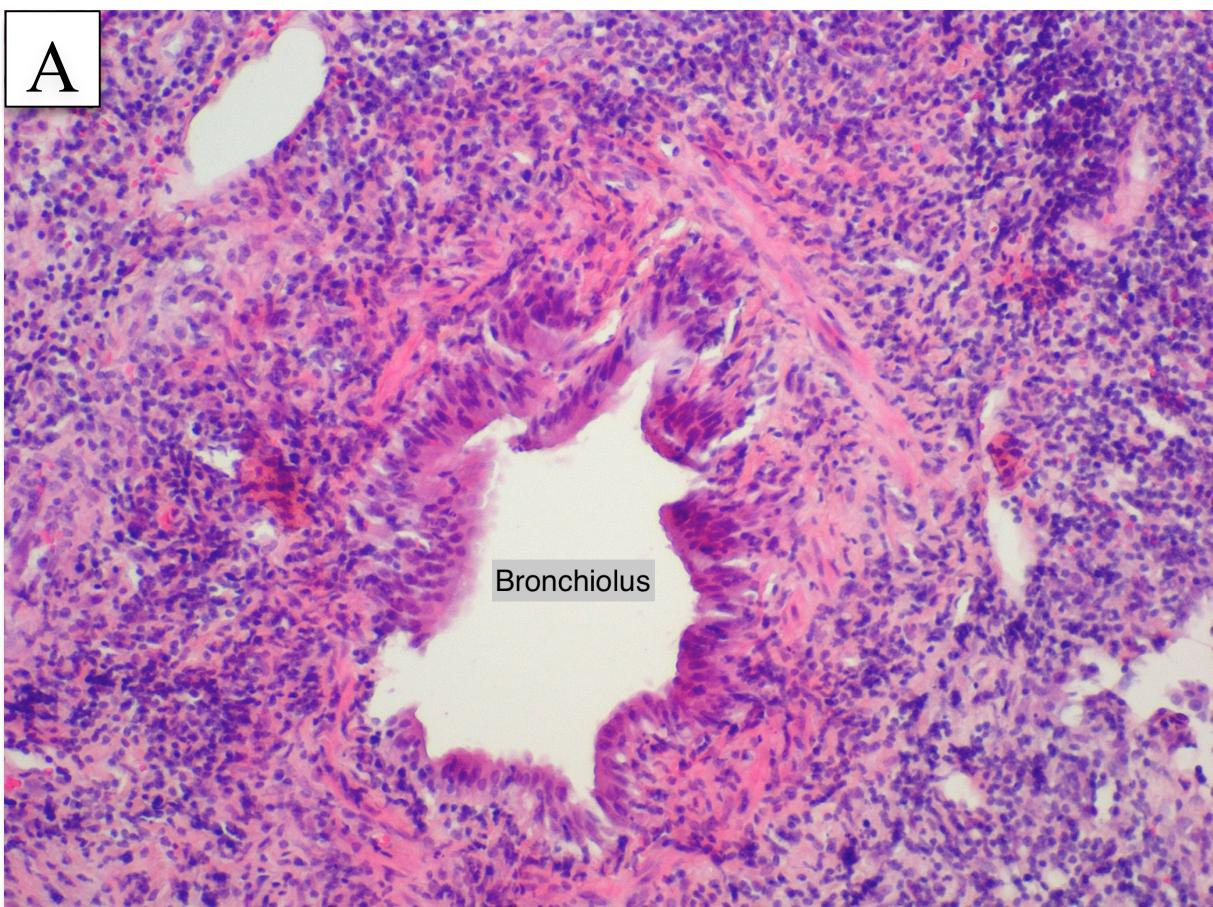


Abbildung 3.14: Identischer Bronchiolus aus der linken Lunge eines Nintedanib-Tieres am POD 20 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Neben den bereits mehrmals beschriebenen Merkmalen der akuten, bronchiolären Abstoßung sieht man im Gegensatz zu Abbildung 3.11 und 3.13 in beiden Bildern deutlich die konzentrisch um den Bronchiolus angelagerten fibrotischen Veränderungen mit Ausdehnung in das umliegende Interstitium. (nach ISHLT B2R/C2R)

Bei der Bewertung der chronischen Gefäßabstoßung waren ein weiteres Mal alle drei Schwergrad nebeneinander vertreten. Die Mehrheit der vaskulären Strukturen ($72,13\% \pm 6,73\%$) war geprägt durch beginnende Obstruktion des Lumens (Abbildung 3.16) durch am Endothel haftender Entzündungszellen (D1R). $16,21\% \pm 6,67\%$ der ausgezählten Gefäße waren frei von vaskulären Destruktionsprozessen (D0), wohingegen sich $11,66\% \pm 4,20\%$ massiv fibrotisch (Abbildung 3.17) und vollständig okkludiert (D2R) darstellten. Auch bei den Gefäßen zeigte sich kein protektiver Effekt von Nintedanib gegenüber beginnenden, chronischen Abstoßungsprozessen (Abbildung 3.15).

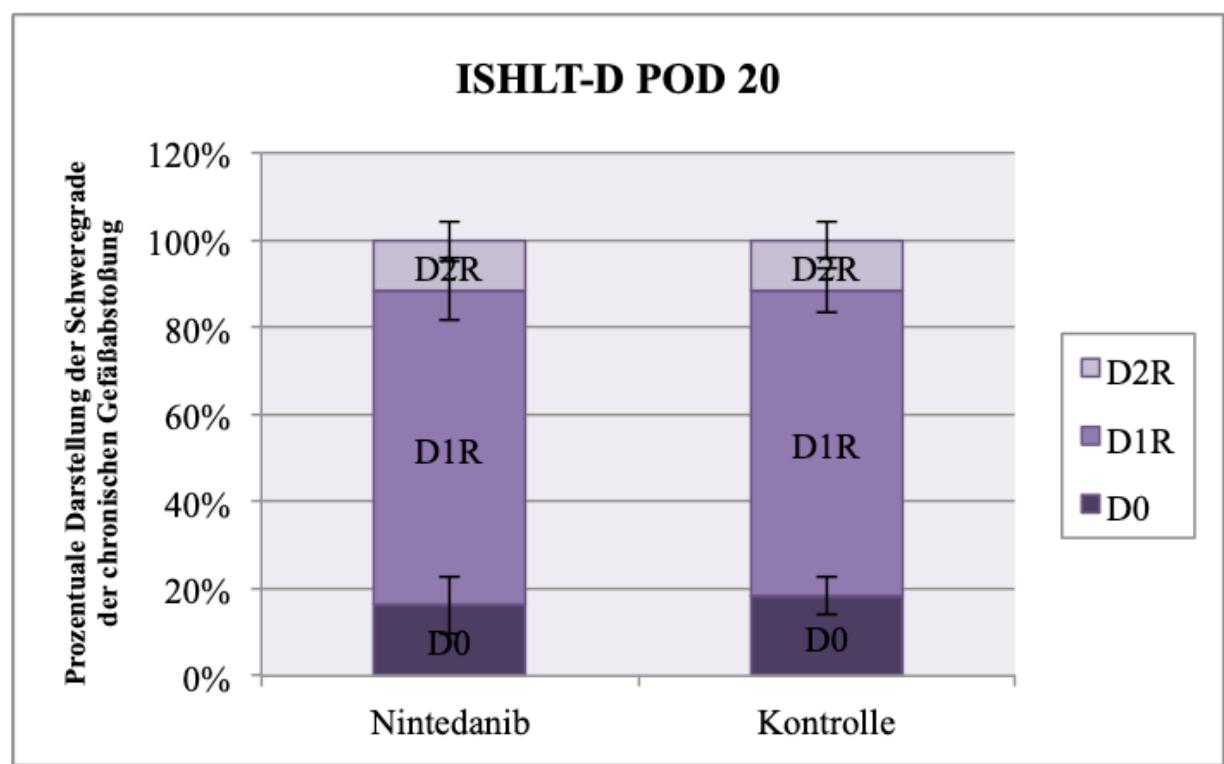


Abbildung 3.15: Vergleich der Schweregrade der chronischen Gefäßabstoßung (ISHLT-D) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 20. postoperativen Tag (D0: $p = 0,5908$; D1R: $p = 0,4774$; D2R: $p = 0,9612$)

In diesem Säulendiagramm wird ersichtlich, dass sowohl die Medikamentengruppe als auch die unbehandelte Kontrollgruppe erste Anzeichen einer chronischen Gefäßabstoßung zeigen. Alle drei Schweregrade sind in beiden Versuchsgruppen vertreten und von der prozentualen Verteilung her ungefähr ähnlich ausgeprägt. Durch diese Auftragung wird deutlich, dass kein signifikanter Unterschied in der chronischen Abstoßungsreaktion zwischen Nintedanib- und Kontrollgruppe an POD 20 besteht.

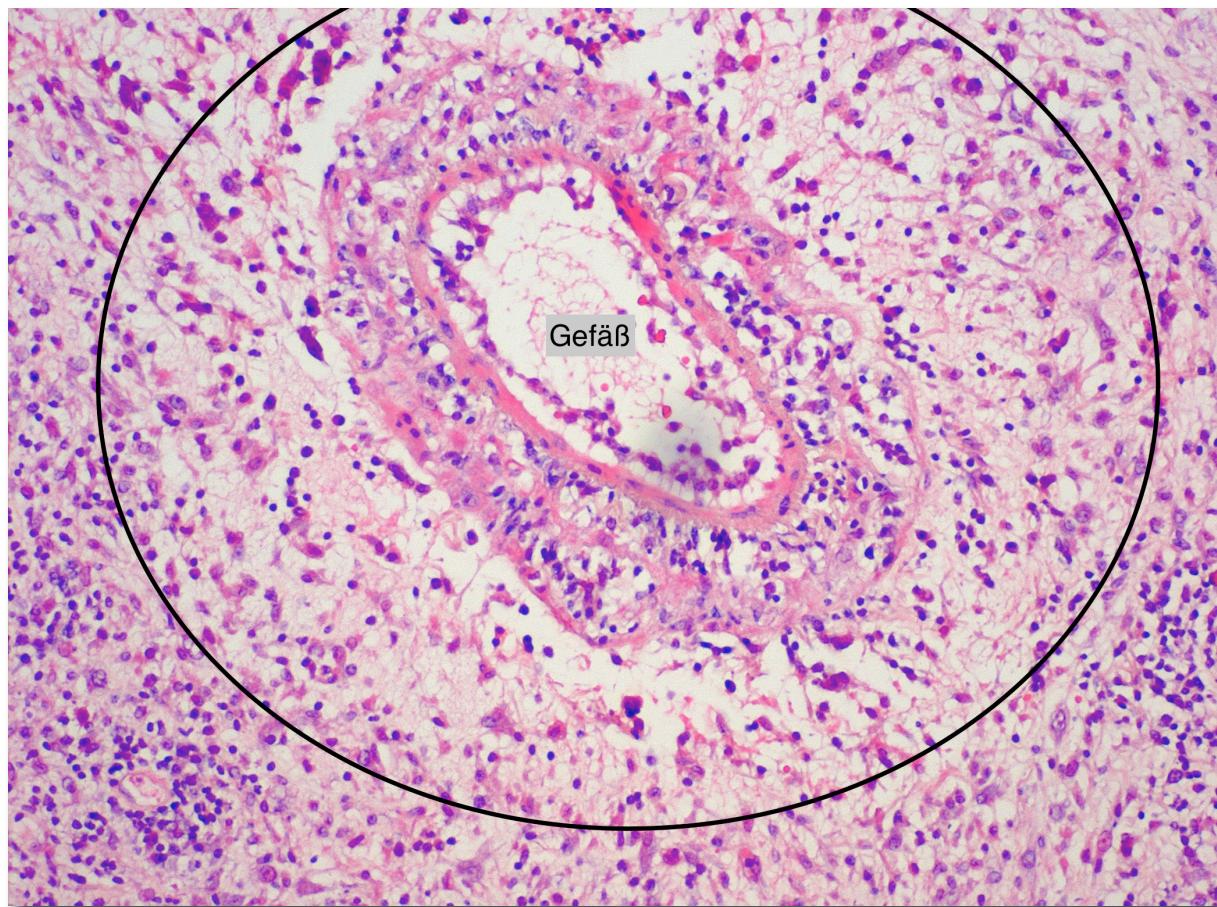
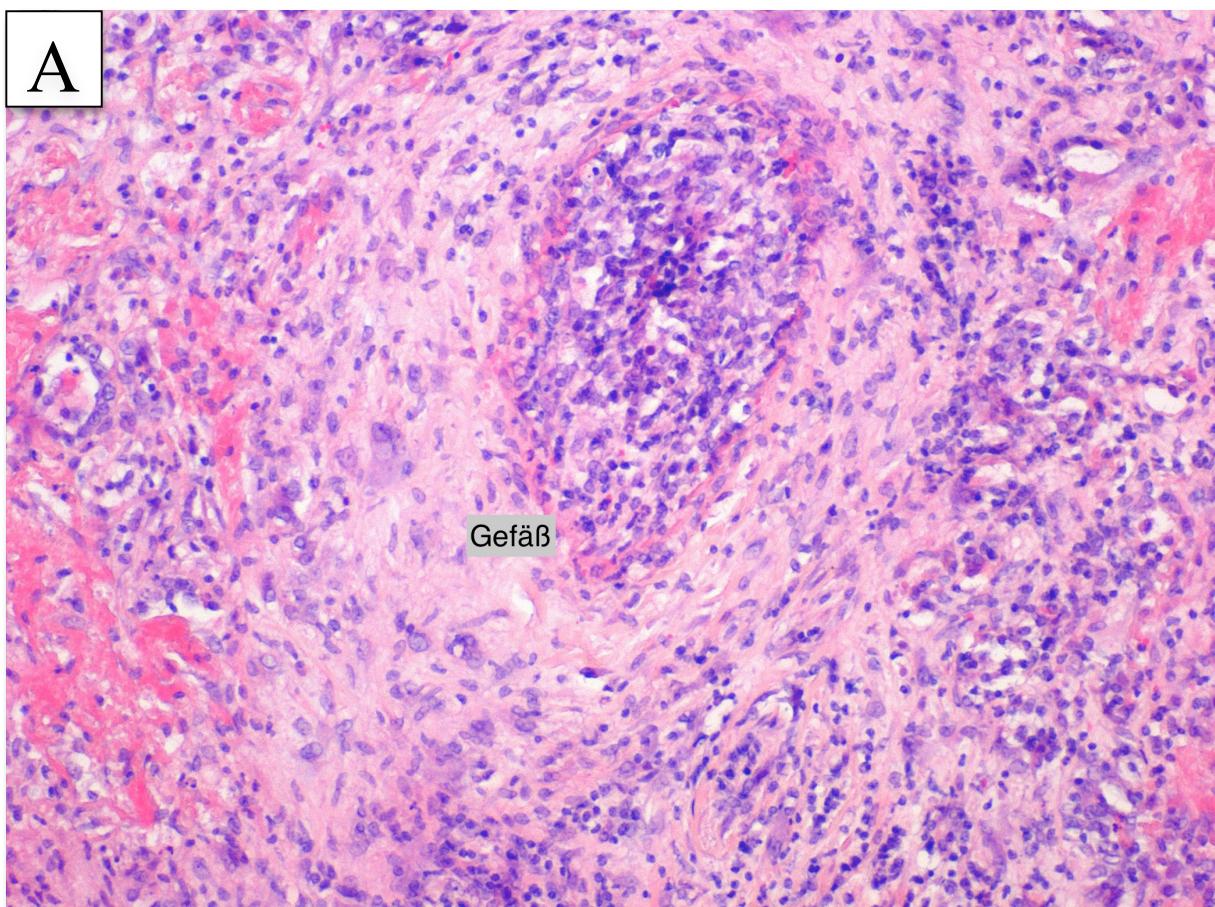


Abbildung 3.16: Gefäßanschnitt aus einer allogen transplantierten, linken Lunge eines Medikamententiers am 20. postoperativen Tag, HE-Färbung

Die Kennzeichen der akuten Gefäßabstoßung sind in diesem Präparat deutlich zu erkennen: perivaskuläre Infiltration mononukleärer Zellen und Endothelläsion mit massiven, entzündlichen Veränderungen. Von der Ellipse eingegrenzt ist ein das Gefäß umgebendes Ödem dargestellt, das sich teilweise bis in das Interstitium ausdehnt. Leukozyten lagern sich - durch entzündliche Prozesse getriggert - am Endothel an.

A



B

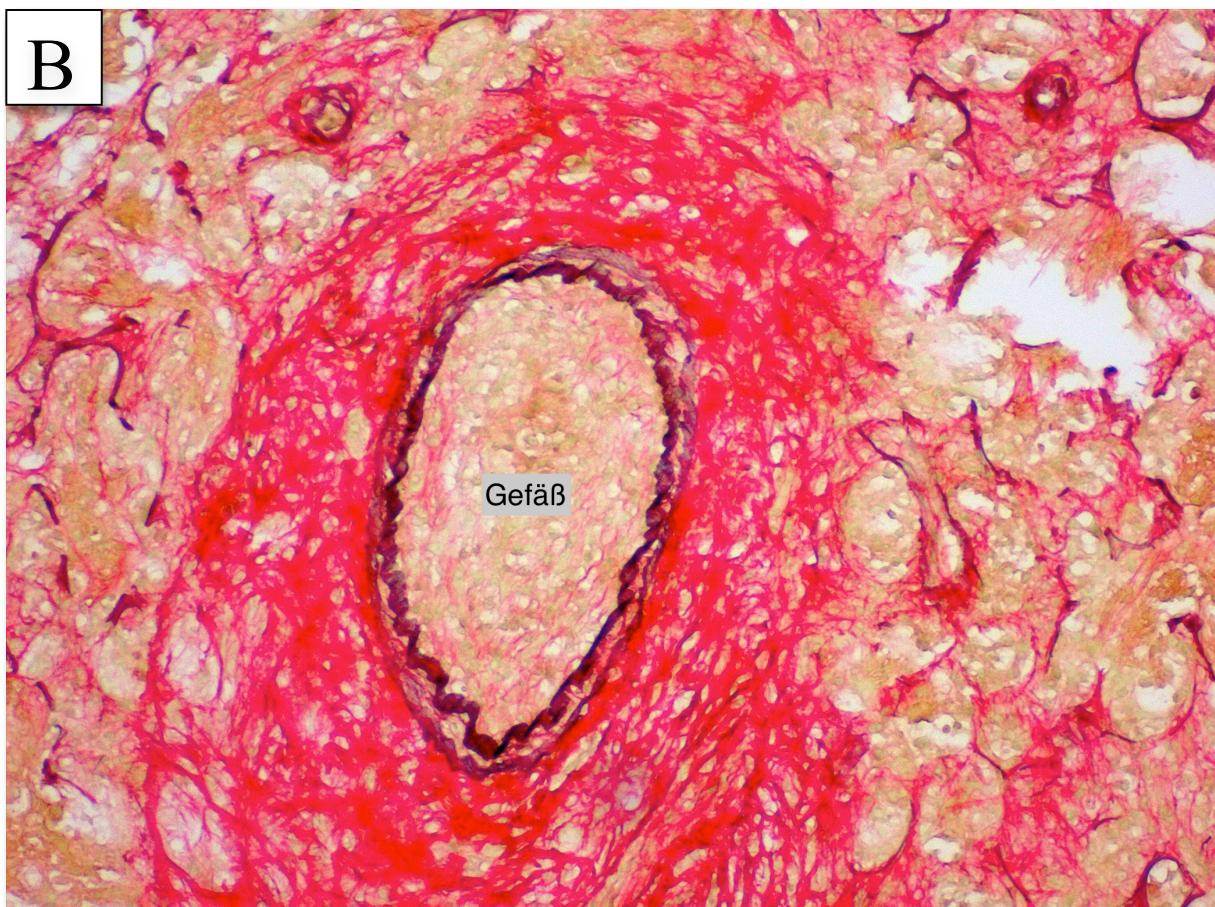


Abbildung 3.17: Identischer Gefäßanschnitt aus der linken Lunge eines Medikamenten-Tieres am POD 20 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Die akute vaskuläre Transplantatabstoßung ist auch in diesen Bildausschnitten dargestellt. Bei alleiniger Betrachtung des Bildes A tritt in der HE-Färbung die perivaskuläre Fibrose als wichtigstes Kennzeichen der chronischen Abstoßung nicht deutlich hervor. Die vollständige Obstruktion des Gefäßes mit Entzündungszellen würde dazu führen, diesen Bildausschnitt nach ISHLT mit A4/D1R zu bewerten. Bei simultaner Darstellung dieses Gefäßes in der Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung werden die fibrotischen Prozesse in der Circumferenz des Gefäßes deutlich, wodurch eine Klassifikation mit A4/D2R gewählt wurde.

3.2.5 Nintedanib-Gruppe POD 60

Die bereits am POD 20 eingesetzten, chronischen Abstoßungsprozesse setzen sich, wie bereits in der Kontrollgruppe zu beobachten war, auch in der Medikamentengruppe weiter fort. Massive chronische Abstoßungsreaktionen mit peribronchiolärer und perivaskulärer Fibrose mit diffuser Ausbreitung und Destruktion des Lungenparenchyms zogen sich durch alle histologischen Präparate der 6 allogen transplantierten Lungen der Nintedanib-Tiere am 60. postoperativen Tag. Nintedanib konnte also im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe keine Verbesserung in der fibroproliferativen Phase der Abstoßung erzielen und somit eine überschießende Bildung von Kollagen bzw. Narbengewebe nicht minimieren.

Bronchiolär zeigten in der Nintedanib-Gruppe $91,40\% \pm 7,53\%$ massivste peribronchiale Fibrose sowie Destruktion des Epithels und der glatten Muskulatur im Sinne einer schweren konstriktiven Bronchiolitis (Abbildung 3.19) und wurden daher mit dem höchsten Schweregrad C2R bewertet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $94,57\% \pm 6,95\%$ ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3912$). Lediglich $8,60\% \pm 7,53\%$ der ausgezählten Bronchiolen in den Medikamententieren und $5,43\% \pm 6,95\%$ der Kontrolltiere zeigten erste beginnende chronische Veränderungsprozesse und wurden daher mit C1R bewertet ($p = 0,3912$). Folgendes Säulendiagramm gibt eine vergleichende Übersicht über die Verteilung der Schweregrade der chronischen Bronchialabstoßung in behandelten und unbehandelten Tieren:

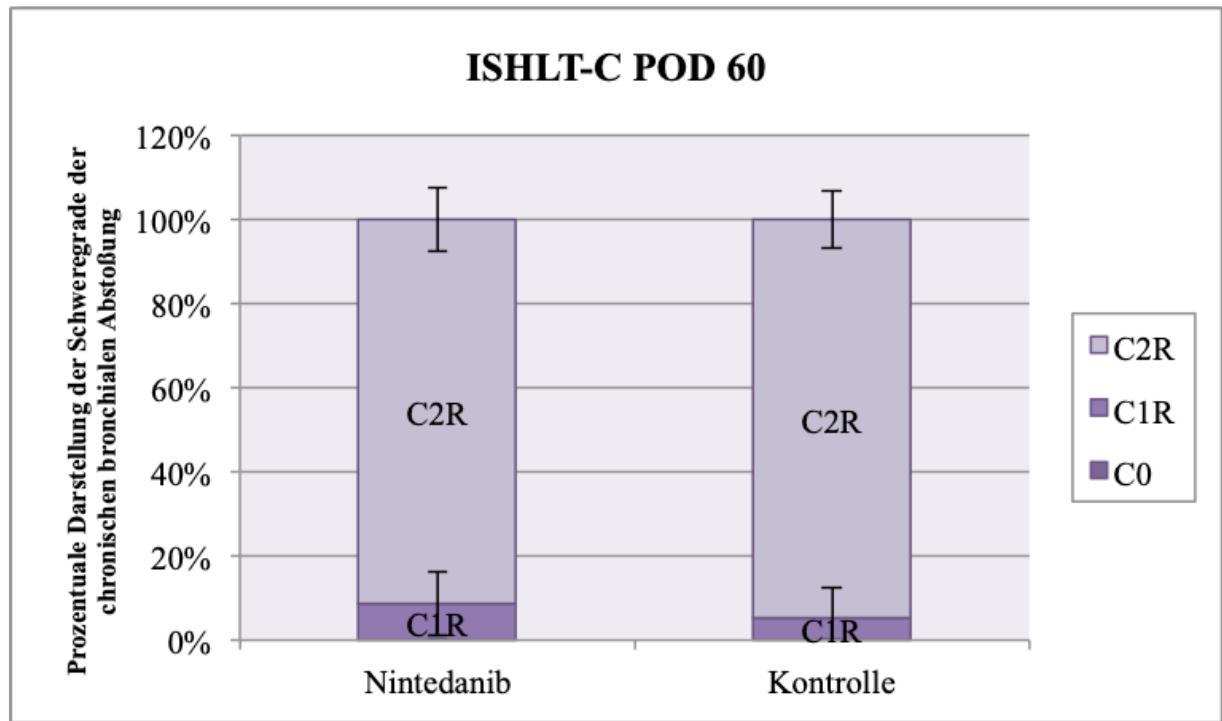


Abbildung 3.18: Vergleich der Schweregrade der chronischen Bronchialabstoßung (ISHLT-C) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 60. postoperativen Tag (C1R: $p = 0,3912$; C2R: $p = 0,3912$)

Dieses Säulendiagramm demonstriert, dass hinsichtlich chronischer, bronchiolärer Abstoßung keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen am POD 60 vorliegen. Nintedanib kann also nicht auf die bereits am POD 20 beginnenden, fibroproliferativen Prozesse einwirken und dementsprechend keine Reduktion der überschießenden Reparaturvorgänge in den Bronchiolen bewirken.

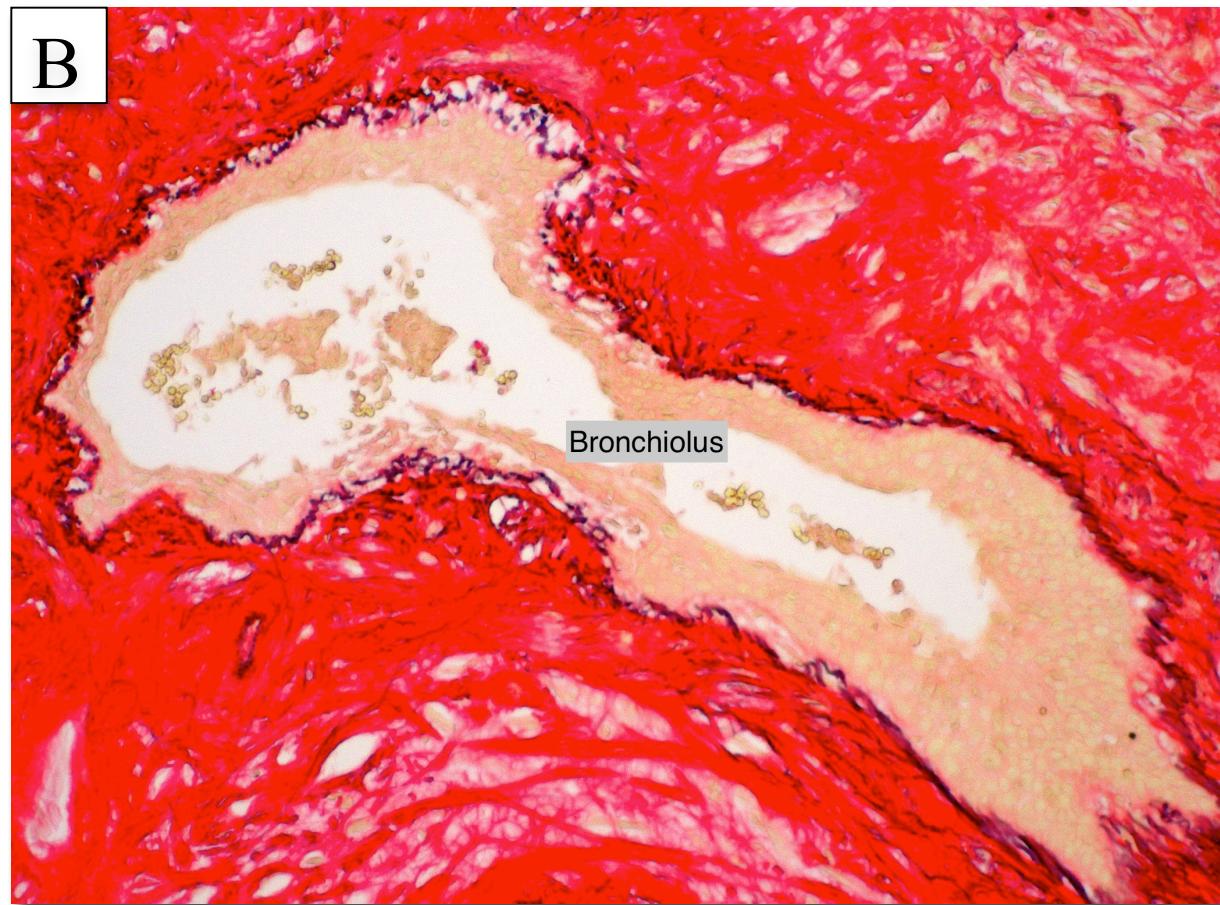
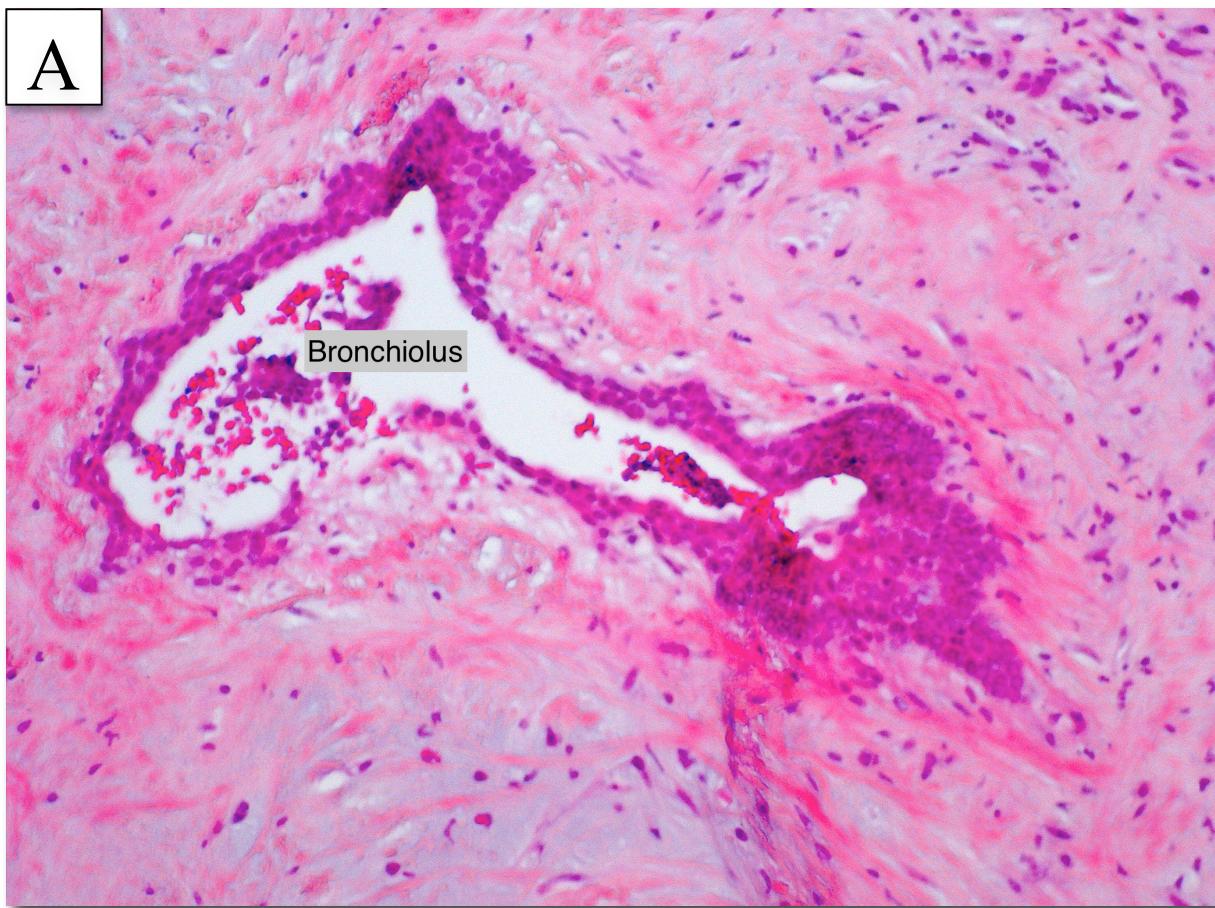


Abbildung 3.19: Identischer Bronchiolusanschnitt aus einem Nintedanib-Tier am POD 60 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

In beiden Bildausschnitten ist ein Rückgang der inflammatorischen Prozesse zu erkennen. Dafür ist die um die Gefäße deutlich angelagerte Fibrose und Deformierung des gesamten bronchialen Lumens sichtbar. (nach ISHLT C2R)

Eine massive Abstoßung zeigten auch die ausgezählten Gefäße in den Nintedanib-Tieren. $92,12\% \pm 2,68\%$ waren gekennzeichnet von perivaskulärer Fibrose und nahezu vollständiger Okklusion des Lumens (D2R). Nur $7,88\% \pm 2,68\%$ waren erst von beginnender chronischer, vaskulärer Abstoßung betroffen und konnten deswegen mit D1R bewertet werden. Den Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe liefert erneut das folgende Säulendiagramm:

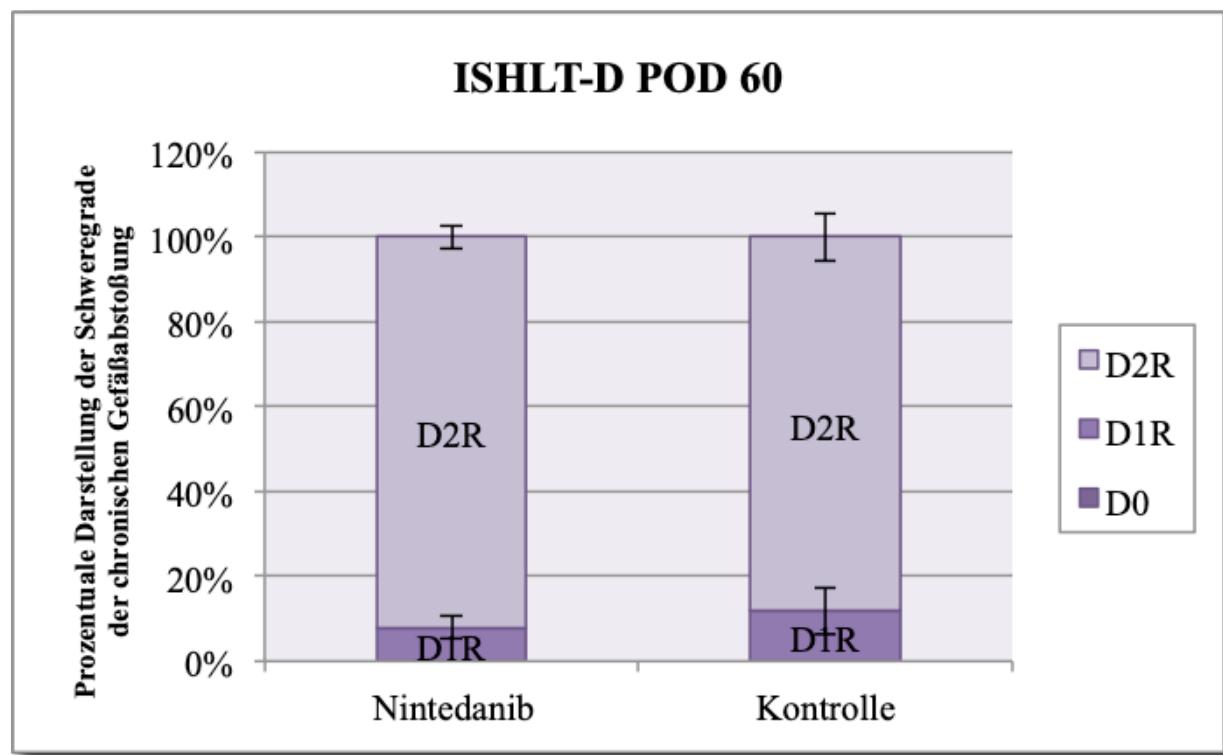


Abbildung 3.20: Vergleich der Schweregrade der chronischen Gefäßabstoßung (ISHLT-D) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 60. postoperativen Tag (D1R: $p = 0,2129$; D2R: $p = 0,2129$)

Sowohl bei der Medikamenten- als auch bei der Kontrollgruppe war am 60. Tag nach dem operativen Eingriff die Mehrzahl aller gezählten Gefäße von einer chronischen Abstoßungsreaktion betroffen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Behandlung und Nicht-Behandlung.

A



B



Abbildung 3.21: Identischer Gefäßanschnitt aus einem Nintedanib-Tier am POD 60 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung

Deutliche perivaskuläre Fibrose und Okklusion des angeschnittenen Gefäßes durch bindegewebige Vernarbung sind in beiden Bildern dargestellt. (nach ISHLT D2R)

Im Rahmen der Klassifikation des Lungenparenchyms zeigten 2 von den 6 allogen transplantierten und mit Nintedanib behandelten Lungen einen interstitiellen Fibrosegrad von 6 ($> 50\%$ fibrotische Veränderungen) nach der modifizierten Ashcroft-Skala, wohingegen die restlichen Präparate mit einem Wert von 7 eine nahezu vollständige Fibrosierung aufwiesen (MW 6,667). Im Vergleich zur dazugehörigen Kontrollgruppe konnte bei einem MW von 7,167 kein signifikanter Unterschied ($p = 0,33$) festgestellt werden.

3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie (PDGFA, PDGFR- α , VEGFA, VEGFR-2)

Um die Auswirkungen des RTK-Inhibitors Nintedanib auf die Expression der Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren beurteilen zu können, wurden immunhistochemisch sowohl PDGFA und VEGFA als auch PDGFR- α und VEGFR-2 angefärbt. Anschließend wurde die Zellzahl pro Gesichtsfeld (200-fache Vergrößerung) und die Intensität der Färbungen beurteilt.

3.3.1 Immunhistochemie – POD 20

Die Basisexpression der Wachstumsfaktoren und Rezeptoren wurde anhand der nativen Lungen und nicht anhand der *in situ* verbliebenen, rechten Lungen des Empfängers ermittelt, um Medikamenteneinflüsse oder Kompensationsmechanismen auszuschließen. Alle untersuchten Liganden und Rezeptoren waren in den nativen Lungen exprimiert. VEGFA war mit $3,2 \pm 0,45$ Zellen pro Gesichtsfeld schwächer ausgeprägt als VEGFR-2 ($5,60 \pm 0,58$) und PDGFA ($8,12 \pm 1,15$), wohingegen PDGFR- α mit $11,24 \pm 1,59$ ausgezählten Zellen im Vergleich zur Kontroll- bzw. Nintedanibgruppe überraschenderweise ähnlich stark exprimiert waren (Abbildung 3.22).

In den linken Lungen der Kontrollgruppe am POD 20 wurden signifikante Anstiege in der Expression von PDGFA ($13,64 \pm 2,07$; $p = 0,0001$), VEGFA ($9,16 \pm 0,65$; $p < 0,0001$) und VEGFR-2 ($11,74 \pm 1,84$; $p < 0,0001$) im Vergleich zu den nativen Lungen beobachtet (Abbildung 3.22). Die Ausprägung von PDGFR- α mit $12,65 \pm 1,59$ Zellen pro Gesichtsfeld war gegenüber den nativen Lungen nicht statistisch signifikant ($p > 0,9999$).

Auch in den Nintedanib-Tieren am POD 20 zeigte die Expression von PDGFA ($12,77 \pm 0,43$; $p = 0,0049$), VEGFA ($8,67 \pm 0,72$; $p < 0,0001$) und VEGFR-2 ($12,93 \pm 1,23$; $p < 0,0001$) mit Ausnahme von PDGFR- α ($12,36 \pm 0,38$; $p > 0,9999$) in Bezug auf die nativen Lungen statistische Signifikanz. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen taten sich jedoch keine statistischen Signifikanzen (PDGFA: $p > 0,9999$; PDGFR- α : $p > 0,9999$; VEGFA: $p > 0,9999$; VEGFR-2: $p > 0,9999$) auf (Abbildung 3.22).

Eine übersichtliche Darstellung findet sich in folgendem Säulendiagramm:

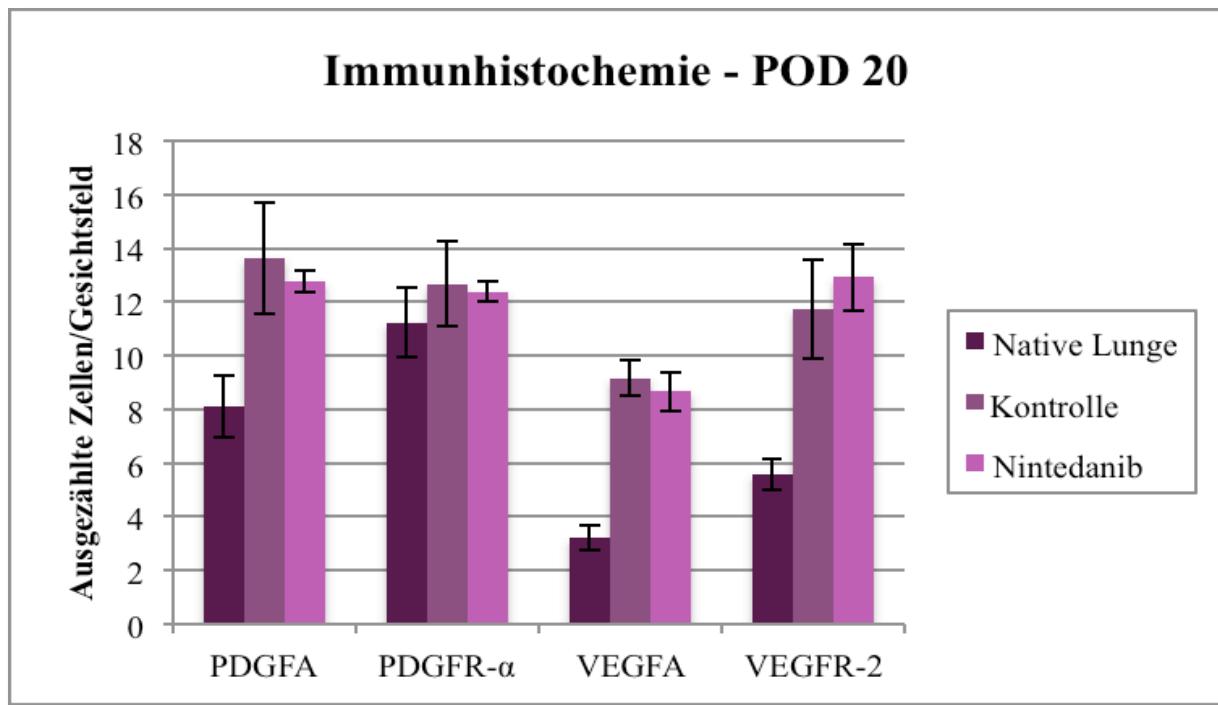


Abbildung 3.22: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 bei unbehandelten Kontrolltieren und Nintedanib-Tieren am postoperativen Tag 20

Für die Ermittlung der Basisexpression wurden native Lungen verwendet. Es zeigt sich im Bezug auf die nativen Lungen ein Anstieg der Wachstumsfaktoren und Rezeptoren sowohl in den linken Lungen der Kontroll- als auch in denen der Nintedanibgruppe. Zwischen Nintedanib-Tieren und unbehandelten Tieren selbst wurde keine statistische Signifikanz beobachtet.

Die Intensitätsbestimmung der immunhistochemischen Färbungen ergab für das Bronchialepithel der nativen Lungen einen dreifach positiven Wert bei PDGFA, dem dazugehörigen Rezeptor sowie VEGFR-2; bei VEGFA wurde im Bronchialepithel lediglich eine zweifach positive Intensität nachgewiesen. PDGFR- α zeigte ebenfalls eine starke Färbung in den Pneumozyten Typ II, wohingegen für die gleichen Zellen nur eine schwache PDGFA-Färbung festgestellt wurde. Eine moderate Intensität fand sich bei VEGFA und dem entsprechenden Rezeptor sowohl in den Alveolarmakrophagen, den Pneumozyten Typ II und dem Endothel der Gefäße sowie bei PDGFA in den Makrophagen und dem Endothel (Tabelle 3.1).

Gegenüber den festgestellten Intensitäten in den nativen Lungen wurden sowohl in der Kontroll- als auch in der Nintedanibgruppe keine gravierenden Unterschiede bestimmt. Es handelte sich lediglich um die Schwankungsbreite einer Intensität. Auch zwischen Kontroll- und Therapiegruppe war der Unterschied nur marginal anzusehen. Das Bronchialepithel war in allen Färbung dreifach positiv, die PDGFA-Färbungen in den Pneumozyten Typ II der unbehandelten und mit Nintedanib behandelten Gruppe um eine Intensität höher, im entsprechenden Rezeptor sowie bei VEGFA und VEGFR-2 um jeweils eine Intensität niedriger als die nativen Lungen. Das Endothel nahm in beiden Gruppen bei PDGFA, PDGFR- α und VEGFR-2 um eine Intensität ab. In den interstitiellen und mononukleären Zellen sowie in den metaplastischen Epithelzellen waren in allen Färbungen fast durchwegs einfach positive Intensitäten (Ausnahme: Mononukleäre Zellen in VEGFR-2) im Vergleich zur fehlenden Anfärbung der nativen Lungen deutlich erkennbar. Lediglich in den PDGFA- und PDGFR- α -Färbungen konnte in den Alveolarmakrophagen ein leichter Intensitätsrückgang der Nintedanibgruppe gegenüber der nicht-therapierten Gruppe festgestellt werden (Tabelle 3.1).

Folgende detaillierte, tabellarische Übersicht fasst die Ergebnisse der Intensitätsbestimmung am POD 20 noch einmal zusammen:

	PDGFA			PDGFR- α		
	Native Lunge	Kontrolle POD 20	Nintedanib POD 20	Native Lunge	Kontrolle POD 20	Nintedanib POD 20
Bronchial-epithel	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pneumozyten Typ I	-	+	+	+	+	(+)-
Pneumozyten Typ II	+	++	++	+++	++	++
Interstitielle Zellen	-	+	+	-	+	+
Vaskuläres Endothel	++	+	+	+ - ++	+	+
Alveoläre Makrophagen	++	++	+	++	++	+ - ++
Mononukleäre Zellen	-	+	+	-	+	+
Metaplastische Epithelzellen	-	+	+	-	+	+
	VEGFA			VEGFR-2		
	Native Lunge	Kontrolle POD 20	Nintedanib POD 20	Native Lunge	Kontrolle POD 20	Nintedanib POD 20
Bronchial-epithel	++	+++	+++	+++	+++	+++
Pneumozyten Typ I	-	-	-	-	-	-
Pneumozyten Typ II	++	+	+	++	+	+
Interstitielle Zellen	-	+	+	-	+	+
Vaskuläres Endothel	++	++	++	++	+	+

Alveoläre Makrophagen	++	+	++	++	++	++
Mononukleäre Zellen	-	+	+	-	+	++
Metaplastische Epithelzellen	-	+	+	-	+	+

Tabelle 3.1: Übersicht über die Intensitätsbestimmung der immunhistochemischen Färbung von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 am postoperativen Tag 20; - keine, + schwache, ++ moderate, +++ starke Färbung

3.3.2 Immunhistochemie – POD 60

Auch am postoperativen Tag 60 wurde die Expression der Liganden und Rezeptoren der nativen Lungen als Vergleichsgröße verwendet.

In den linken Lungen der Kontrollgruppe an POD 60 wurden signifikante Anstiege in der Expression von PDGFA ($14,15 \pm 1,16$; $p < 0,0001$), VEGFA ($8,12 \pm 0,86$; $p < 0,0001$) und VEGFR-2 ($11,78 \pm 1,88$; $p < 0,0001$) im Vergleich zu den nativen Lungen beobachtet (Abbildung 3.23). Die Ausprägung von PDGFR- α mit $13,15 \pm 0,97$ Zellen pro Gesichtsfeld war gegenüber den nativen Lungen nicht statistisch signifikant ($p > 0,9999$).

Die Kontrolltiere am POD 60 zeigten gegenüber den POD 20-Kontrolltieren keine weiteren signifikanten Anstiege in der Expression von PDGF ($p > 0,9999$), PDGFR- α ($p > 0,9999$), VEGFA ($p > 0,9999$) und VEGFR-2 ($p > 0,9999$).

Im Gegensatz dazu wurde in der Nintedanib-Gruppe am postoperativen Tag 60 im Vergleich zur nicht medikamentös beeinflussten Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion in sämtlichen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren beobachtet: PDGF ($7,97 \pm 3,12$; $p < 0,0001$), PDGFR- α ($7,5 \pm 3,07$; $p = 0,0028$), VEGFA ($3,64 \pm 1,12$; $p < 0,0001$) und VEGFR-2 ($8,03 \pm 1,59$; $p = 0,0012$).

Durch die Gabe von Nintedanib wurde die Ausprägung von PDGFA auf das Ausgangsniveau und PDGFR- α sogar unter die Basisexpression der nativen Lungen gesenkt (Abbildung 3.23).

Auch im unmittelbaren Vergleich der beiden Medikamentengruppen (POD 20 vs. POD 60) selbst ergab sich mit Ausnahme von PDGFR- α ($p = 0,2454$) eine signifikante Reduktion am POD 60 in allen Bereichen gegenüber POD 20 (PDGFA: $p = 0,0125$; VEGFA: $p < 0,0001$; VEGFR-2: $p < 0,0001$).

Auch hier werden die erhobenen Werte erneut in einem Säulendiagramm für eine bessere Übersichtlichkeit dargestellt:

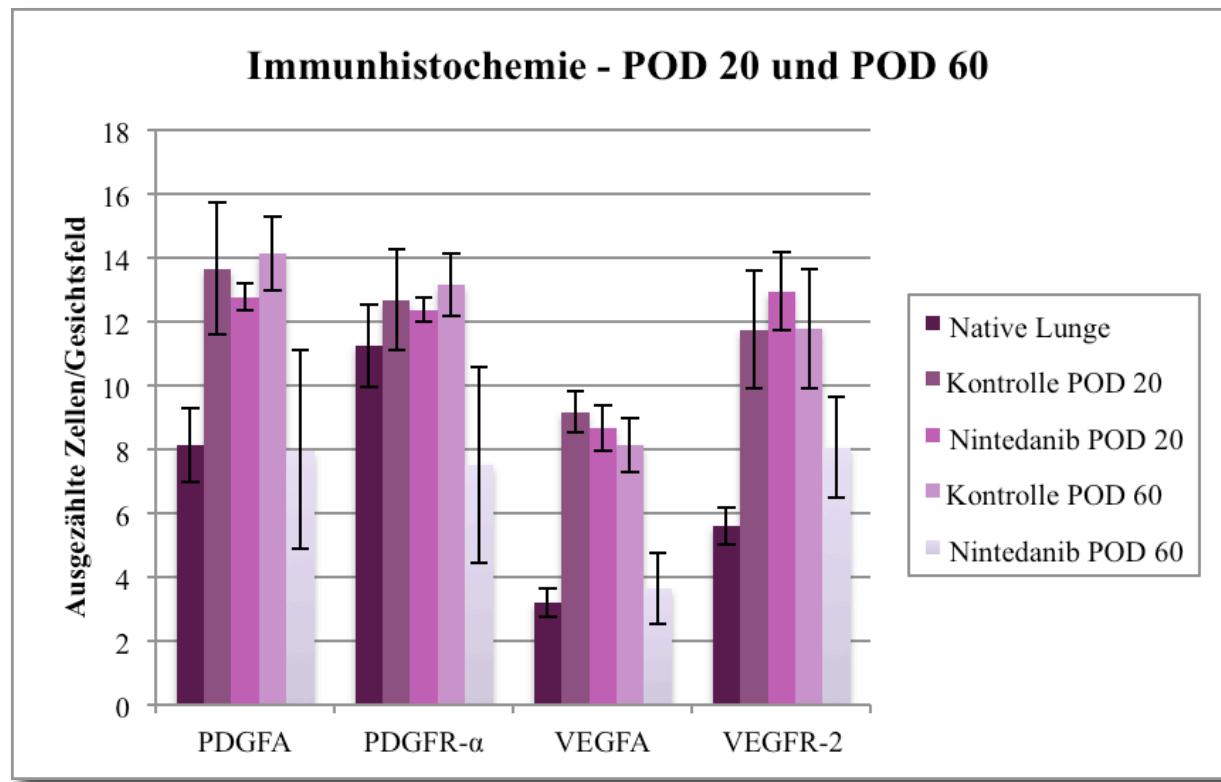


Abbildung 3.23: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 bei unbehandelten Kontrolltieren und Nintedanib-Tieren am postoperativen Tag 20 und 60

Für die Ermittlung der Basisexpression wurden native Lungen verwendet. Unter der Therapie mit Nintedanib wurde am postoperativen Tag 60 ein signifikanter Rückgang in der Expression aller Wachstumsfaktoren und Rezeptoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe am POD 60 beobachtet. PDGFA und PDGFR- α konnten durch die Gabe des RTK-Inhibitors sogar auf Werte der Basisexpres-

sion (PDGFA) bzw. sogar unter das Ausgangsniveau (PDGFR- α) der nativen Lungen gesenkt werden. Die unbehandelte Gruppe am POD 60 hingegen stabilisierte sich im Bezug auf die nicht-therapierte Gruppe am postoperativen Tag 20 auf ähnlich hohen Expressionswerten.

Die Veränderungen in der Rezeptoren- bzw. Ligandenexpression der Kontrolltiere am POD 60 schlugen sich ebenfalls in der Intensitätsbestimmung nieder. Es waren Abweichungen um einen Intensitätsgrad im Vergleich zur Kontrolle am POD 20 zu beobachten. Bei der PDGFA-Färbung kam es zu jeweils einer Graderhöhung im Endothel, in Alveolarmakrophagen und anderen mononukleären Zellen. PDGFR- α zeigte einen Intensitätsanstieg von moderat zu stark in Pneumozyten Typ II und alveolären Makrophagen sowie eine Erhöhung von schwach zu moderat in mononukleären Zellen und metaplastischen Epithelzellen. Die VEGFA- und VEGFR-2-Färbungen waren in den POD-60-Kontrolltieren eine Intensität höher als die entsprechenden Tiere am postoperativen Tag 20, wohingegen jeweils eine Intensität niedriger in den interstitiellen Zellen verzeichnet werden konnte. Auch im Endothel sowie in den alveolären Makrophagen fiel überraschenderweise die Intensität der VEGFR-2-Färbung um eine Stufe (Tabelle 3.2).

Erst in der Nintedanib-Gruppe am postoperativen Tag 60 waren deutliche Effekte bezüglich der immunhistochemischen Intensität in Analogie zur entsprechenden Kontrollgruppe feststellbar. In durchwegs allen Färbungen war ein eindeutiger Rückgang in der Färbeintensität zu erkennen (Tabelle 3.2). Am eindrücklichsten stellte sich dieser Effekt im Bronchialepithel dar, denn hier war ein Rückgang der Intensität bei PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 von dreifach positiv nach einfach positiv zu beobachten. Das gleiche Resultat zeigte sich in der PDGFA- und PDGFR- α -Färbung an den Alveolarmakrophagen und bei PDGFR- α in den Pneumozyten Typ II. Weitere Details sind Tabelle 3.2 zu entnehmen:

	PDGFA			PDGFR- α		
	Native Lunge	Kontrolle POD 60	Nintedanib POD 60	Native Lunge	Kontrolle POD 60	Nintedanib POD 60
Bronchial-epithel	+++	+++	+ - ++	+++	+++	+
Pneumozyten Typ I	-	+	-	+	+	-

Pneumozyten Typ II	+	++	+	+++	+++	+
Interstitielle Zellen	-	+	-	-	+	-
Vaskuläres Endothel	++	++	+	+ - ++	+	-
Alveoläre Makropagen	++	+++	+	++	+++	+
Mononukleäre Zellen	-	++	+	-	++	+
Metaplastische Epithelzellen	-	+	+	-	++	+
	VEGFA			VEGFR-2		
	Native Lunge	Kontrolle POD 60	Nintedanib POD 60	Native Lunge	Kontrolle POD 60	Nintedanib POD 60
Bronchial- epithel	++	+++	+	+++	+++	+
Pneumozyten Typ I	-	+	-	-	+	-
Pneumozyten Typ II	++	+	-	++	+	+
Interstitielle Zellen	-	-	-	-	-	-
Vaskuläres Endothel	++	++	+	++	++	+
Alveoläre Makropagen	++	+	+	++	+	++
Mononukleäre Zellen	-	+	-	-	+	+
Metaplastische Epithelzellen	-	+	-	-	++	+

Tabelle 3.2: Übersicht über die Intensitätsbestimmung der immunhistochemischen Färbung von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 am postoperativen Tag 60; - keine, + schwache, ++ moderate, +++ starke Färbung

3.3.3 Immunhistochemie der *in situ* verbliebenen, rechten Lungen der Empfängertiere

Durchaus überraschende Ergebnisse bot die immunhistochemische Auszählung der *in situ* verbliebenen, rechten Lungen der Empfängertiere (Abbildung 3.24).

In allen rechten Lungen – unabhängig von medikamentöser Therapie oder Zeitraum – wurde ein Anstieg in der Expression von PDGFA, VEGFA und VEGFR-2 beobachtet. Signifikante Werte ergaben sich bei PDGFA zwischen nativen Lungen und rechten Lungen der Kontrolltiere am POD 60 ($12,83 \pm 2,33$; $p = 0,003$) und bei VEGFA zwischen nativen Lungen und nicht medikamentös behandelten rechten Lungen an POD 20 ($6,92 \pm 1,15$; $p < 0,0001$) sowie POD 60 ($6,67 \pm 0,58$; $p = 0,0204$) als auch zwischen nativen Lungen und Nintedanib-therapierten rechten Lungen an POD 20 ($7,23 \pm 0,61$; $p < 0,0001$) und POD 60 ($7,30 \pm 1,09$; $p < 0,0001$). Die Expression von VEGFR-2 demonstrierte ebenfalls signifikante Werte zwischen den nativen Lungen und den rechten Lungen der Kontrollgruppe und Medikamentengruppe an POD 20 (Kontrollgruppe: $9,13 \pm 0,83$; $p = 0,0046$, Medikamentengruppe: $11,53 \pm 1,87$; $p < 0,0001$) sowie POD 60 (Kontrollgruppe: $11,31 \pm 2,42$; $p < 0,0001$, Medikamentengruppe: $11,57 \pm 0,98$; $p < 0,0001$). Aufgrund der bereits hohen Expressionsrate in den nativen Lungen scheint auch in diesem Fall PDGFR- α eine Sonderrolle einzunehmen. In diesem Rahmen zeigten sich nämlich im Bezug auf die Expressionsraten keinerlei Signifikanzen.

Ein potenzieller Effekt von Nintedanib lässt sich erneut nur am POD 60 und dieses Mal nur am Wachstumsfaktor PDGFA und seinem dazugehörigen Rezeptor erkennen. Abbildung 3.24 demonstriert hierbei einen signifikanten Unterschied zwischen den rechten Lungen der Kontrollgruppe und der Nintedanibgruppe am postoperativen Tag 60 (PDGFA: $p = 0,0183$; PDGFR- α : $p = 0,0032$). Bei VEGFA ($p > 0,9999$) und VEGFR-2 ($p > 0,9999$) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Abbildung 3.24 gibt einen Überblick über die Wachstumsfaktorenexpression in den jeweiligen rechten Lungen. Als Ausgangsniveau dienten erneut die Werte der nativen Lungen:

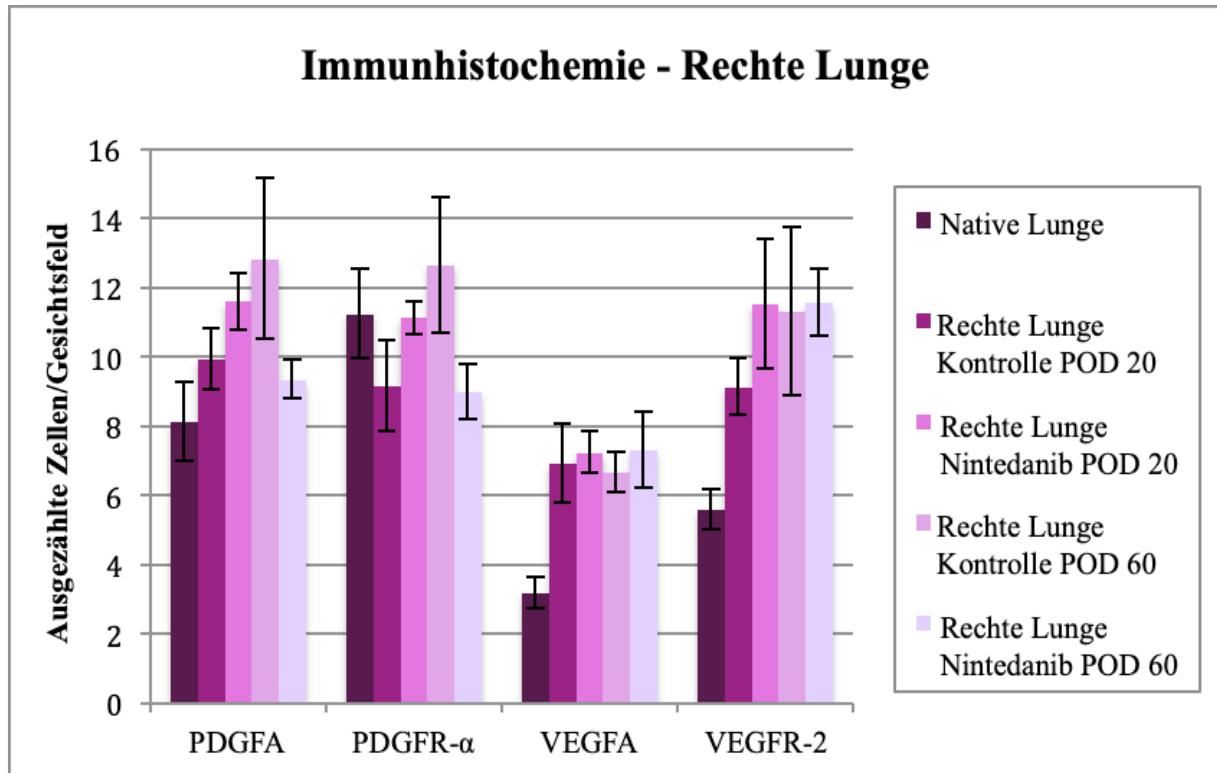


Abbildung 3.24: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den in situ verbliebenen rechten Lungen am postoperativen Tag 20 und 60

Für die Ermittlung der Basisexpression wurden native Lungen verwendet. In diesem Säulendiagramm tritt deutlich hervor, dass die rechten, in situ verbliebenen Lungen einen deutlichen Anstieg in der Expression von PDGFA, VEGFA und VEGFR-2 im Vergleich zu den nativen Lungen zeigen. Aufgrund des hohen Expressionsniveaus von PDGFR- α in den nativen Lungen ist die Aussagekraft in den rechten Lungen dafür eher gering.

Eine direkter Gegenüberstellung der rechten und linken Lungen am POD 20 (Abbildung 3.25) demonstriert einen kontinuierlichen Anstieg der Expression von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in den in situ verbliebenen, rechten Lungen des Empfänger. In allen Werten – unabhängig von der Therapie – blieben die rechten Lungen jedoch noch hinter dem Expressionsni-

veau der linken Lungen zurück. Ein protektiver Effekt von Nintedanib auf die rechten Lungen war am POD 20 nicht zu erkennen.

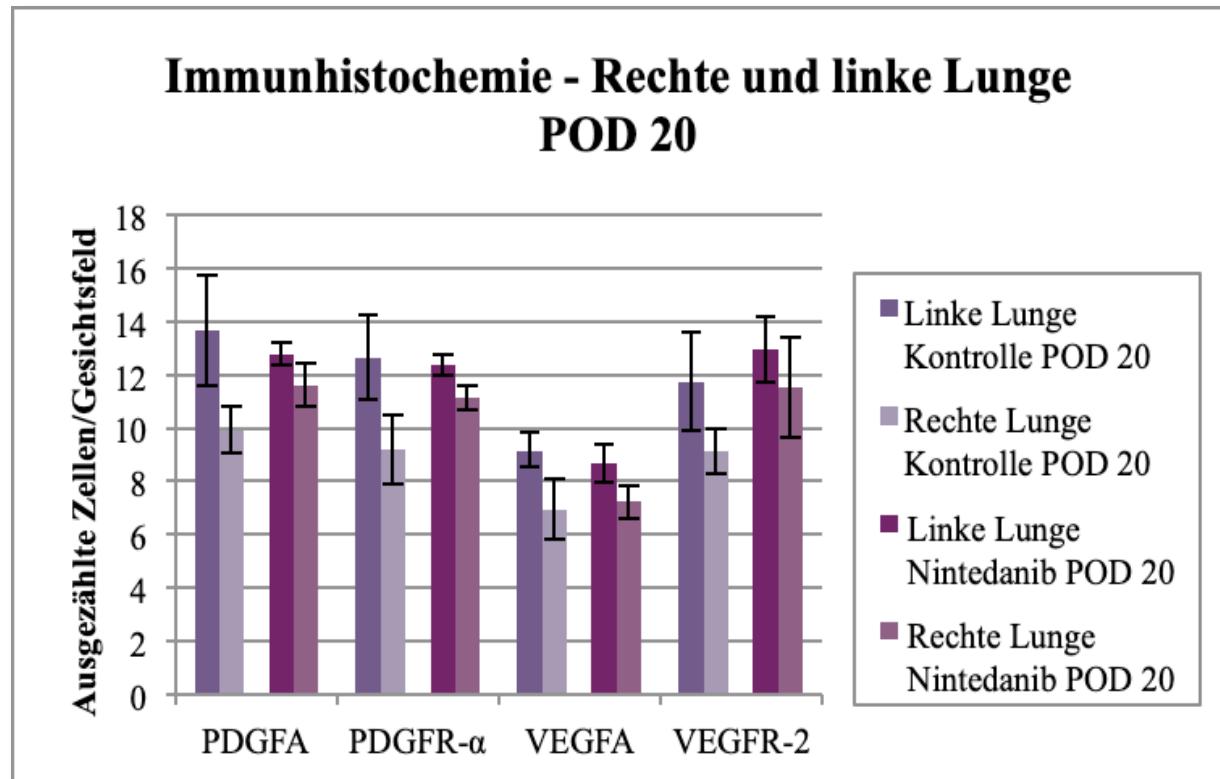


Abbildung 3.25: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den rechten und linken Lungen am postoperativen Tag 20

Der unmittelbare Vergleich von den in-situ verbliebenen, rechten und den allogen transplantierten, linken Lungen der Empfängertiere am postoperativen Tag 20 demonstriert einen kontinuierlichen Anstieg der Expression von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 in den rechten Lungen, die jedoch den Ausprägungsgrad der linken Lungen nicht übersteigt.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich für selbige Gegenüberstellung am postoperativen Tag 60 in den Lungen der Kontrollgruppe ab (Abbildung 3.26). Auch hier näherten sich die rechten Lungen sogar noch ein wenig stärker dem Expressionsniveau der linken Lungen an, ohne dies zu überschreiten. Bei der Nintedanibgruppe überstiegen die rechten, in situ verbliebenen Lungen sogar die Ergebnisse der linken Lungen.

Immunhistochemie - Rechte und linke Lunge POD 60

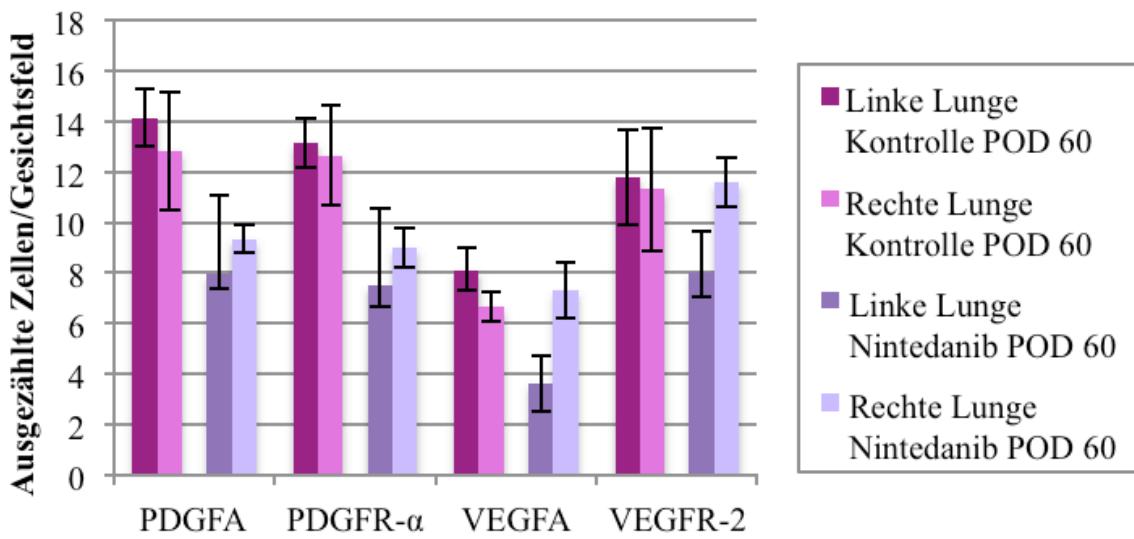


Abbildung 3.26: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den rechten und linken Lungen am postoperativen Tag 60

Auch in diesem Säulendiagramm zeigt sich in dem unmittelbaren Vergleich von in situ verbliebenen, rechten und transplantierten, linken Lungen am POD 60, dass sich in der Kontrollgruppe die rechten Lungen dem Ausprägungsgrad der linken Lungen nahezu angleichen. In der Nintedanibgruppe überschreiten die rechten Lungen sogar das Expressionsniveau der Gegenseite.

4. Diskussion

Die Lungentransplantation stellt heutzutage ein etabliertes Verfahren für die Therapie von Lungenerkrankungen im Endstadium dar (Hosenpud et al. 1998). Die postoperative 1-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahren aufgrund von stetiger Verbesserung der chirurgischen Techniken, der immunsuppressiven Medikation und des postoperativen Managements bei ca. 80% stabilisiert (Madill, Aghdassi, B. Arendt, et al. 2009).

Trotz dieses verbesserten Kurzzeitüberlebens zeigen Lungentransplantationspatienten lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50% (Yusen et al. 2015). Ursächlich für dieses limitierte Langzeitüberleben ist die Entstehung einer chronischen Transplantatabstoßung, die klinisch als Bronchiolitis obliterans bezeichnet wird und die Hauptursache für gesteigerte Morbidität und Mortalität darstellt (Estenne et al. 2002; Estenne & Hertz 2002).

Die gegenwärtig eingesetzten Therapien, bspw. eine Erhöhung der Cortikosteroiddosis oder ein veränderter Einsatz der immunsuppressiv wirkenden Medikamente (Belperio et al. 2009), brachten klinisch kaum eine Verbesserung und konnten das Fortschreiten der Erkrankung nicht verzögern (Boehler et al. 1998). Diese Therapiekonzepte zielten vor allem darauf ab, die inflammatorische Phase der Bronchiolitis obliterans – histologischer Terminus des Bronchiolitis obliterans Syndrom – abzuschwächen. Die Arbeitsgruppe um Tikanen et al. (Tikanen et al. 2006) beschrieb in ihren Untersuchungen, dass bei fortgeschrittenem Krankheitsprozess und mit Eintritt der fibroproliferativen Phase ein gesteigerter oder veränderter Einsatz der Immunsuppression keinen positiven Einfluss auf den Krankheitsprozess ausüben würde.

Durch die Hemmung der überschießenden, fibroproliferativen Prozesse könnte eine neue, potentiell kurative Therapieoption eingeführt werden, um die Progression des BOS deutlich zu verzögern oder ggf. zu unterbinden. In der Literatur (Tikanen et al. 2006; Majhail et al. 2006) wurden die RTK-Inhibitoren, wie bspw. Imatinib, Vatalanib, Dasatinib und Nintedanib, die bereits klinisch in unterschiedlichen Fachdisziplinen in Verwendung sind, als vielversprechende Substanzen genannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz des RTK-Inhibitors Nintedanib als Monotherapie auf die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans hin untersucht. Nintedanib agiert an

Rezeptoren für zahlreiche Wachstumsfaktoren, die über Tyrosinkinasen wirken, insb. PDGF, VEGF und FGF (Rolfo et al. 2013). Nintedanib blockiert hierbei intrazellulär die Phosphorylierung und damit Aktivierung dieses Enzyms und führt damit zu einem Abbruch des weiteren Signalkaskadewegs, der Proliferations-, Differenzierungs- und Transformationsvorgänge stimuliert (Wollin et al. 2015).

4.1 Rattenmodell

Für diese Arbeit wurde auf ein Rattenmodell zurückgegriffen, bei dem eine linksseitige, orthotope, unilaterale LTx durchgeführt wurde. Zum Einsatz kamen schwach allogene männliche Fischer-Ratten (F344[RT1lv1]) als Spender und männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY[RT1]l) als Empfänger. Diese Rattenstammkombination wurde von Matsumuara et al. (Matsumura et al. 1995) etabliert und mehrmals in Tierversuchen der Universität Kiel (Hirt et al. 1998; Hirt et al. 1999; Hirt 2003) und der eigenen Arbeitsgruppe (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) zur Simulation der akuten (POD 20) und chronischen Abstoßungsreaktion (POD 20 und 60) eingesetzt.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste Tiermodelle entwickelt, um den zugrundeliegenden Mechanismus des BOS besser zu verstehen und gleichzeitig effektive Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Die Arbeitsgruppe von Hertz et al. (Hertz et al. 1993) konzipierte ein präklinisches Mausmodell, bei dem insb. Trachealspangen eines Spendertieres heterotop in die subkutane Hautschicht am Rücken eines Empfängertieres transplantiert wurden. Trotz weitläufiger Akzeptanz sowie technisch einfacher Durchführbarkeit des etablierten Verfahrens zeigten sich im Verlauf einige Limitationen (Kuo et al. 2005; Sato et al. 2009; Jungraithmayr et al. 2010). Das vorliegende Mausmodell entspricht hierbei nicht der klinischen Begebenheit, da sich die BO primär in den kleinen Atemwegen und nicht in den trachealen Strukturen entwickelt (Jungraithmayr et al. 2010); bei dieser Methode bleiben allerdings die für das BOS essentiellen Bronchiolen unberücksichtigt. Gleichzeitig unterliegt die transplantierte Trachea einer initialen Ischämie (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012), die zu einer nachfolgenden, veränderten Immunantwort des Gewebes führen kann. Auch die Gefäßversorgung des Transplantats entspricht nicht der klinischen Situation, da die Trachea primär nicht vaskularisiert ist.

siert ist (Kuo et al. 2005), sondern lediglich über Diffusion ernährt wird. Dadurch ist weder eine vaskuläre Abstoßungsreaktion noch eine adäquate Medikamentenwirkungen anhand dieses Modells beurteilbar (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012). Durch die Heterotopie in der subkutanen Hautschicht unterliegt das Transplantat des Weiteren nicht dem physiologischen Atemprozess, was eine wesentliche Charakteristik in der Lungentransplantation darstellt (Jungraithmayr et al. 2010).

Weitere Versuchsmodelle, wie beispielsweise die orthotope End-zu End-Anastomose von Trachealsegmenten (Genden et al. 2002) oder die direkte, heterotope Platzierung von trachealen Transplantaten in das Lungenparenchym (Dutly et al. 2005) können zwar die Auswirkungen des pulmonalen Milieus auf das jeweilige Transplantat mitberücksichtigen (Sato et al. 2009), zeigen aber ansonsten ähnliche Schwachstellen auf, wie das o.g. Modell von Hertz et al. (Hertz et al. 1993).

Eine orthotope LTx in einem Tiermodell – insbesondere der Ratte – kann das chirurgische Prozedere einer am Menschen durchgeführten LTx optimal simulieren (Sato et al. 2009) und war auch bezüglich der Nachteile in o.g. Modellen weit überlegen. Für dieses Verfahren wurden unterschiedliche Rattenstämme und –kombinationen erforscht. Akute Transplantatabstoßungsreaktionen sowie Ischämie-Reperfusionsschäden konnten in vielen gewählten Rattenstammkombinationen nachgewiesen werden, wohingegen die chronische Abstoßungsreaktion und damit die BOS in einigen Empfänger-Spender-Kombinationen oftmals nicht ausreichend reproduziert werden konnte (Sato et al. 2009). Ein Beispiel hierfür stellt die LTx von Brown Norway Ratten auf Lewis Ratten dar. Wie bei Sato et al. (Sato et al. 2009) beschrieben, spielt die Reaktion des Immunsystems unmittelbar nach Transplantation eine entscheidende Rolle, denn ohne immunsuppressive Therapie führt die akute Abstoßungsreaktion bei dieser gewählten Kombination zu nekrotischen Prozessen mit anschließendem Organversagen. Gleichermaßen unter Einsatz von Immunsuppression (Uyama et al. 1992; Lee et al. 1998) zeigte im Langzeitverlauf nur geringgradige, chronische Abstoßungsreaktionen und nicht das gewünschte Vollbild des BOS (Romaniuk et al. 1987; Atanasova et al. 2013).

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell basiert auf Untersuchungen von Matsumura et al. (Matsumura et al. 1995), der auf zwei Rattenstämme zurückgriff, die sich immunologisch hinsichtlich ihrer Histokompatibilität der MHC-I-Komplexe nur geringfügig voneinander unterschieden. Linke Lungen von F334-Spendertieren wurden auf WKY-Empfängertiere

(F344[RT1^{lv1}] → WKY[RT1]^l) transplantiert sowie in umgekehrter Reihenfolge (WKY[RT1]^l → F344[RT1^{lv1}]). Die Kombination von WKY auf F344 zeigte ohne den Einsatz von Immunsuppression bis zum 21. Tag eine zunehmende, akute Abstoßungsreaktion, entwickelte allerdings eine immunlogische Toleranz, sodass eine fulminante, chronische Abstoßung und somit ein BOS nicht beobachtet werden konnte. Die Reihenfolge von F344 → WKY hingegen wies bis zum 21. POD eine akute Abstoßungsreaktion auf, die im weiteren zeitlichen Verlauf (POD 49 – 100) in ein chronisches Transplantatversagen und somit in das histopathologische Korrelat der Bronchiolitis obliterans überging (Matsumura et al. 1995; Hirt et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) zeigte reproduzierbar, dass diese gewählte Kombination im Gegensatz zu oben beschriebenem Modell (Brown Norway → Lewis) ohne den Einsatz von immunsuppressiv wirkenden Medikamenten eine akute Abstoßung ohne nekrotische Prozesse entwickelte und im weiteren Verlauf ein chronisches Transplantatversagen generiert wurde. Dies konnte auch in anderen Arbeiten (Yasufuku et al. 2002; Mizobuchi et al. 2003) demonstriert werden.

Ausgewählte Arbeitsgruppen (Hirschburger et al. 2007; Atanasova et al. 2013) hingegen berichteten bei dem Einsatz der in dieser Arbeit gewählten Rattenstammkombination von inkonsistent und heterogen auftretenden histomorphologischen Korrelaten des BOS. Gründe für diese Resultate könnten daran liegen, dass identische Rattenstämme, die von verschiedenen Händlern bezogen wurden, zum einen sowohl unterschiedlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind und zum anderen minimale genetische Variationen untereinander aufzeigen (Xu et al. 1999; Perrotti et al. 2001). Diese Gründe können durchaus zu diesen inkonsistenten Ergebnissen geführt haben.

In dem hier vorliegenden Tiermodell wurden die Ratten alleinig von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchsgruppen zeigten sich reproduzierbare, verlässliche und konsistente Ergebnisse der histologischen Präparate.

4.2 Konventionelle Histologie

Die histologischen Auswertungen erfolgten, wie oben bereits erläutert, nach modifizierten Kriterien der ISHLT (Stewart et al. 2007; von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass Nintedanib als Monotherapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich akuter oder chronischer Abstoßungsreaktion aufwies. Histologisch zeigten sich bei den an Tag 20 getöteten Tieren massive perivaskuläre und peribronchiale Infiltrationen sowie beginnende chronische Abstoßungsprozesse mit fibroproliferativen Veränderungen. Am 60. postoperativen Tag waren nahezu alle Gefäße und Bronchiolen vollständig fibrotisch verändert und durch Narbengewebe okkludiert. Dies entsprach trotz medikamentöser Therapie dem histologischen Bild der Bronchiolitis obliterans.

4.2.1 Unterschiede im Pathomechanismus der BO und der idiopathischen Lungenfibrose – Schlüssel für die fehlende Medikamentenwirksamkeit von Nintedanib?

Der RTK-Inhibitor Nintedanib konnte nicht dazu beitragen, die überschießenden, fibroproliferativen Prozesse zu minimieren und konnte somit ein chronisches Transplantatversagen nicht verhindern. Um mögliche Ursachen dieser fehlenden Medikamentenwirksamkeit zu verstehen, lohnt sich ein erneuter Blick auf den pathophysiologischen Entstehungsmechanismus der BO.

Die Pathogenese der Bronchiolitis obliterans wird durch inflammatorische Reaktionen eingeleitet und aufrechterhalten. Für diese entzündungsinitierenden Vorgänge spielen zum einen alloimmun-abhängige Faktoren, wie die akute Abstoßungsreaktion (El-Gamel et al. 1999; Sharples et al. 2002), die mehrfach in Studien als Hauptrisikofaktor (Estenne et al. 2002; Verleden et al. 2005; Belperio et al. 2009) für die Entstehung der BO dargestellt wurde, das HLA-Mismatching (Jaramillo et al. 2005; Lobo et al. 2013) oder die lymphozytäre Bronchiolitis (Sharples et al. 2002; Verleden et al. 2009) eine entscheidende Rolle. Zum anderen haben auch alloimmun-unabhängige Faktoren (Nicod 2006) eine nicht zu unterschätzende Auswirkung auf den Verlauf der chronischen Transplantatabstoßung (Estenne & Hertz 2002; Boehler & Estenne 2003). Zu diesen Faktoren gehören u.a. gastroösophagealer Reflux (Hayes 2011), längere Ischämie-Reperfusions-Zeiten (Santacruz & Mehta 2009), fehlende Patientencompliance im Bezug auf Medikamenteneinnahme (Estenne et al. 2002) sowie Vorerkrankungen und Alter des Patienten (Verleden et al. 2009).

Dadurch, dass die Lunge als einziges transplantiertes Organ unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff direkt mit der Umwelt kommuniziert, ist sie auch in besonderem Maße weiteren, nicht-immunologischen, exogenen Einflüssen und daher Infektionsgeschehnissen ausgesetzt. Dazu gehören virale Erreger, insb. Cytomegalieviren (CMV) (Kroshus et al. 1997) und Community-acquired respiratory Viren (Verleden et al. 2016), Bakterien wie Chlamydien (Glanville et al. 2005; Lin & Zamora 2014) und Pseudomonaden (Botha et al. 2008; Lin & Zamora 2014) sowie mykotische Infektionen durch Aspergillen (Weigt et al. 2009), die aufgrund der supprimierten Immunabwehr oft mit therapierefraktären Pneumonien assoziiert sind.

Die Gesamtheit dieser Faktoren führt primär zu einer Irritation des respiratorischen Flimmerepithels, das hinsichtlich der Entwicklung eines chronischen Transplantatversages eine Schlüsselrolle einzunehmen scheint (Adams et al. 2000; Jaramillo et al. 2005; Verleden et al. 2016). Dadurch, dass Entzündungszellen sowie Zellen der adaptiven Immunabwehr wie Makrophagen, dendritische Zellen (Verleden et al. 2009), neutrophile Granulozyten (DiGiovine et al. 1996) und insbesondere B- und T-Lymphozyten (Laohaburanakit et al. 2003) ihren Weg in das entsprechende geschädigte Areal finden, wird eine inflammatorische Kaskade ausgelöst. Im weiteren Verlauf kommt es durch o.g. Zellen sowie durch die geschädigten Bronchialepithelzellen selbst zu einer Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen bzw. Mediatoren des oxidativen Stresses (Belperio et al. 2002; Laohaburanakit et al. 2003; Jaramillo et al. 2005; Madill, Aghdassi, B. Arendt, et al. 2009). Dadurch wird eine dauerhafte Entzündungsantwort unterhalten (vgl. Abbildung 4.1).

Parallel bzw. als Folge des chronischen Inflammationsprozesses, der sich vom Epithel bis in die subepithelialen Strukturen der kleinen Atemwege ausbreitet und auch die angrenzenden Gefäße mitfiltriert, wird eine Proliferation von Wachstumsfaktoren (Lappi-Blanco et al. 2001; Yasufuku et al. 2002; Aris et al. 2002) angestoßen. Diese Faktoren (vgl. Abbildung 4.1) führen zu einer Stimulation von Fibroblasten bzw. Fibrozyten (Lapar et al. 2011), Myofibroblasten (Ramirez et al. 2006), glatten Muskelzellen (Jaramillo et al. 2005) und Endothelzellen, die ihrerseits die Bildung von extrazellulärer Matrix und Kollagen sowie die Angiogenese beschleunigen. Durch diese überschießenden Reparaturvorgänge kommt es im weiteren Verlauf zu massiver Gewebsproliferation und Vernarbungsprozessen in den Bronchiolen, den Gefäßen und dem umgebenden Lungenparenchym (Estenne & Hertz 2002), was letztendlich zum Vollbild einer Bronchiolitis obliterans führt.

Folgende Abbildung demonstriert ein potenzielles, pathophysiologisches Modell der Entstehung eines BOS:

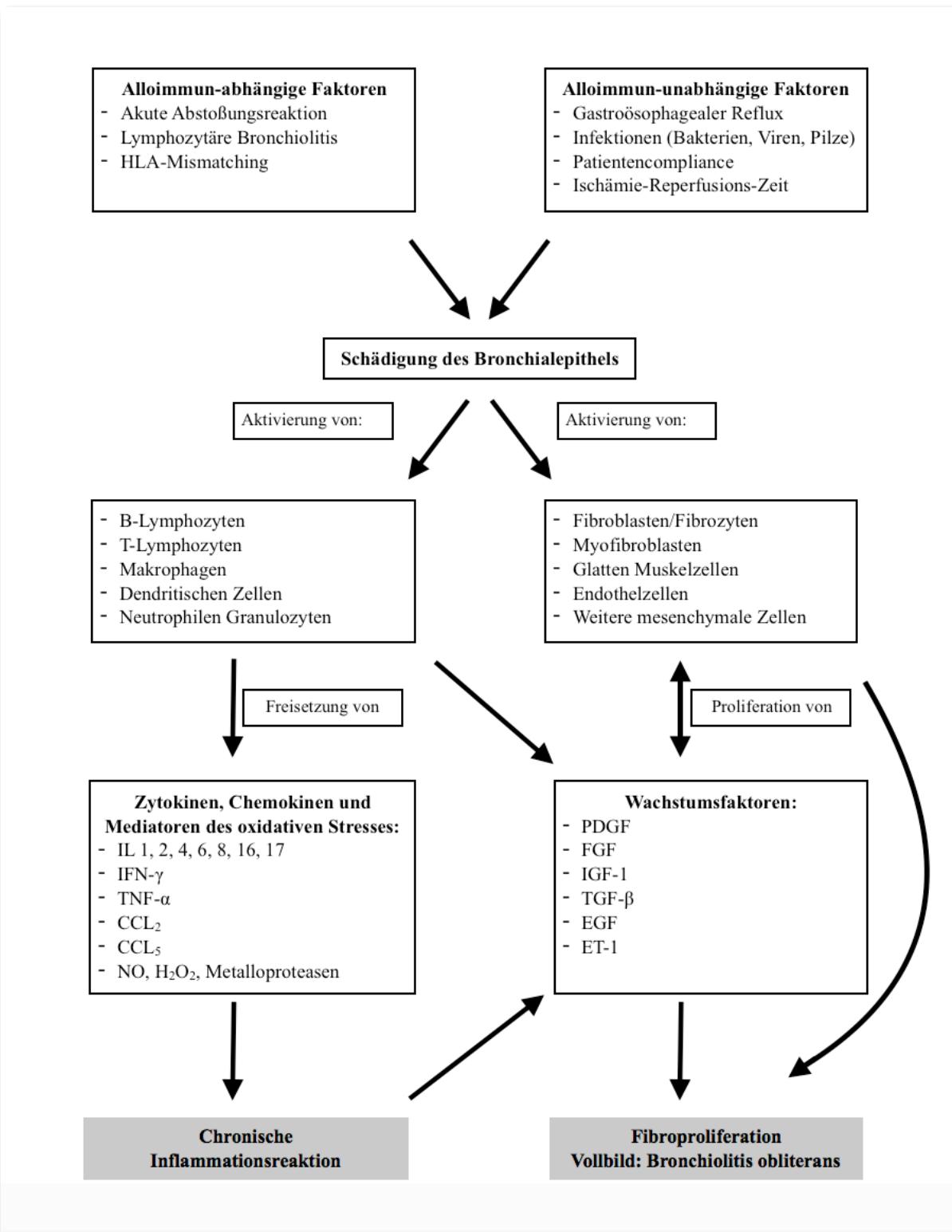


Abbildung 4.1: Pathomechanismus eines Bronchiolitis obliterans-Syndroms; modifizierte Abbildung nach Laohaburanakit et al. (Laohaburanakit et al. 2003), Jaramillo et al. (Jaramillo et al. 2005) und Nicod (Nicod 2006)

IL - Interleukin; IFN - Interferon; TNF - Tumornekrosefaktor; CCL - Chemokin Ligand; NO - Stickstoffmonoxid; IGF - Insulin-Like Growth Factor ; EGF - Epidermal Growth Factor; ET - Endothelin

Nach Tikkanen et al. (Tikkanen et al. 2006) lässt sich die Entstehung der Bronchiolitis obliterans in zwei Phasen einteilen: Zuerst tritt die akute, inflammatorische Phase mit Zerstörung des Bronchialepithels durch unkontrolliert freigesetzte Mediatoren auf, die dann durch Stimulation von Wachstumsfaktoren die fibroproliferative Phase induziert (Bonner 2004) und im Endstadium letztendlich in der fibrösen Okklusion von Bronchiolen und Gefäßen endet (Belperio et al. 2009). Gleichzeitig wird betont, dass bei Eintreten der fibroproliferativen Prozesse die gängigen Immunsuppressiva (Glucokortikoide, Calcineurin-Inhibitoren etc.) trotz Dosissteigerung keine positiven Auswirkungen auf das chronische Transplantatversagen mehr aufweisen, sondern im Gegenteil sogar eine Zunahme von infektiösen Ereignissen begünstigen (Nakajima et al. 2011).

Nintedanib wurde Anfang 2015 für die idiopathische Lungenfibrose (ILF) – eine progressive, interstitielle Lungenerkrankung unbekannter Genese – zugelassen. Die Patienten, meist männlich, aktive oder ehemalige Raucher über 50 Jahre, fallen klinisch mit progredienter Zunahme der Dyspnoe – zuerst unter Belastung und in weiterem Verlauf dann in Ruhe, sowie mit trockenem, nicht-produktivem Husten auf (Bonella et al. 2015). Die Diagnose wird multidisziplinär durch Spirometrie, radiologische Bildgebung, bronchoalveolare Lavage sowie bronchoskopischer Lungenbiopsie gesichert (King et al. 2001; Kim et al. 2006). Die idiopathische Lungenfibrose geht nach Diagnosestellung mit einem mittleren Überleben von 2 bis 3 Jahren einher (Scotton & Chambers 2007) und ist aufgrund der 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 20-40% (Bjoraker et al. 1998) folglich sogar mit einer höheren Mortalitätsrate im Vergleich zur BO bzw. zu zahlreichen Krebsarten gekennzeichnet. Unter der Therapie mit dem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib wurde in den Phase-III-Studien INPULSIS-1 und INPULSIS-2 (Richeldi, du Bois, et al. 2014) eine jährliche Reduktion des Rückgangs der forcierten Vitalkapazität (FVC) um 50% im Vergleich zur Placebogruppe beobachtet. Auch der Zeitraum bis zur ersten, akuten Exazerbation war in der INPULSIS-2-Studie unter Nintedanib im Vergleich zur Kontrollgruppe protrahiert (Richeldi, Cottin, et al. 2014). Insgesamt wurde durch den pharmakologischen Einsatz von Nintedanib die Progression der ILF verzögert.

gert (Bonella et al. 2015), aber keine signifikanten Effekte auf die Mortalitätsrate beschrieben (Richeldi, du Bois, et al. 2014).

Ungeachtet dessen, ob es sich um eine idiopathische, eine medikamenteninduzierte oder eine rheumatologisch bedingte Lungenfibrose handelt, können Ähnlichkeiten gegenüber dem pathologischen Entstehungsmechanismus der Bronchiolitis obliterans beobachtet werden. Dies wirft wiederum die Frage auf, warum Nintedanib in dem hier vorliegenden Tiermodell der BO am POD 60 nicht die erhoffte Reduktion der fibrotischen Umbauprozesse zeigte. Auch hier könnte unter Umständen ein genauerer Blick auf die Pathophysiologie der Lungenfibrose nützlich sein, hier am Beispiel der ILF:

Durch Mediatoren, Noxen bzw. Stimuli bisher unbekannter Genese wird eine wiederholte Schädigung des Bronchialepithels, des Endothels, ihrer dazugehörigen Basalmembrane sowie des umgebenden Lungenparenchyms erzeugt (Strieter 2005; Wolters et al. 2014). Ähnlich wie bei der BO (Banerjee et al. 2011) scheint auch hier die multifokale Schädigung des Bronchialepithels und damit der Alveolen eine Schlüsselrolle für den weiteren Verlauf der Erkrankung einzunehmen (Gross & Hunninghake 2001).

Die ursprüngliche Hypothese ging davon aus, dass sich aufgrund dieser Epithelverletzung – ähnlich wie der BO – ein chronischer Entzündungsprozess (Gross & Hunninghake 2001) entwickeln würde, der dann wiederum die fibrotische Proliferation in Gang setzt. Es gibt zahlreiche Gründe, weshalb man gegenwärtig klinisch Abstand von der Inflammationstheorie nimmt:

1. Mangelnde Korrelation der Entzündungsmarker und -parameter mit dem klinischen Stadium bzw. dem Outcome des Patienten (Selman et al. 2001)
2. Fehlendes Ansprechen auf anti-inflammatorische und zytostatische Medikamente wie Glucokortikoide, Azathioprin oder Cyclophosphamid (Scotton & Chambers 2007)
3. Geringe histopathologische Korrelate insb. in den frühen Stadien der ILF (Selman et al. 2001)

Die aktuelle Hypothese konzentriert sich gegenwärtig darauf, dass durch die Schädigung des Epithels und Endothels und vor allem durch den Verlust der Integrität der jeweiligen Basalmembran Reepithelialisierungs- und Reendothelialisierungsprozesse nur langsam bzw. nicht mehr adäquat ablaufen können (Strieter 2005). Alveolarepithelzellen Typ I werden so massiv

geschädigt, dass sie vermehrt in die Apoptose getrieben werden (Prasse & Müller-Quernheim 2013). Im Gegenzug dazu kommt es unter physiologischen Verhältnissen zu einer Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II, die sich allerdings nur an den Stellen, an denen eine intakte Basalmembran vorliegt, zu Alveolarepithelzellen vom Typ I differenzieren (Selman et al. 2001). Bei der ILF ist diese Basalmembran vielerorts geschädigt (Willis & Borok 2007), weshalb eine entsprechende Reepithelialisierung nicht gewährleistet werden kann und eine fehlgeleitete, abnorme Wundheilung (Todd et al. 2012) auftritt.

Konsekutiv synthetisieren diese proliferierenden Alveolarepithelzellen Typ II (Selman & Pardo 2001) profibrotische Wachstumsfaktoren – vor allem PDGF, TGF- β , TNF- α , ET-1 (Antoniades et al. 1990; Kapanci et al. 1994; Selman et al. 2001; Pardo & Selman 2002) – sowie Zytokine und Chemokine (Wilson & Wynn 2009). Folglich werden Entzündungszellen wie Makrophagen sowie Lymphozyten akquiriert (Todd et al. 2012), die aber infolge des „Zytokinsturms“ eher lediglich eine begleitende und keine dominierende Rolle einnehmen. Vielmehr wird die ILF als epithelial-fibroblastische Erkrankung beschrieben (Selman & Pardo 2001; King et al. 2011), weil durch den Untergang vieler Alveolarepithelzellen und durch die Synthese von Wachstumsfaktoren eine Migration und anschließende Proliferation von Fibroblasten angestrebt wird (Scotton & Chambers 2007). Die rekrutierten Fibroblasten lagern sich zu sog. subepithelialen fibroblastischen Foki – ein histopathologisches Korrelat der ILF – vor allem an den Stellen zusammen, an denen die Basalmembran geschädigt wurde, und differenzieren teilweise zu Myofibroblasten aus (Ofek et al. 2012). Fibroblasten und Myofibroblasten spielen auch wie im Krankheitsbild der BO die zentrale Rolle in der Synthese von extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Fibronectin und Proteoglykane (Selman et al. 2001).

Bisher wäre von einem rein physiologischen Wundheilungsprozess auszugehen: Bronchialepithelzellen werden durch entsprechende Stimuli irreversibel geschädigt, Fibroblasten migrieren an die jeweiligen pathologischen Stellen, proliferieren und bilden Kollagen, um entsprechenden Schaden zu reparieren (Selman & Pardo 2001). Studien der idiopathischen Lungenfibrose bestätigen, dass der Pathomechanismus vornehmlich mit einer Imbalance zwischen Auf- und Abbauprozessen der extrazellulären Matrix begründet werden kann (Pardo & Selman 2002).

Ein Auslöser dieser fehlgeleiteten Wundheilung vermag an der vermehrten Expression von TGF- β durch Alveolarepithelzellen bei Patienten mit ILF zu liegen. Nach Willis et al. (Willis

& Borok 2007) spielt das Signalmolekül TGF- β eine entscheidende Rolle für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Im physiologischen Wundheilungsprozess steuern Myofibroblasten nach der Produktion von Kollagen in den programmierten Zelltod; bei der ILF hingegen zeigt sich eine deutliche Resistenz der Fibroblasten gegenüber apoptotischen Vorgängen (King et al. 2011; Thannickal & Horowitz 2012). Die Vermutung liegt daher nahe, dass diese mesenchymalen Zellen durch Formierung in den fibroblastischen Foki unter Stimulation von TGF- β und ET-1 ein verlängertes Überleben zeigen (Kulasekaran et al. 2009). Gleichzeitig werden durch Alveolarmakrophagen sowie durch anti-apoptotische Myofibroblasten selbst die potenzen Wachstumsfaktoren PDGF und FGF gebildet (Antoniades et al. 1990). Dies führt zum einen zu einer zusätzlichen Akquirierung von weiteren mesenchymalen Zellen – insb. Fibroblasten/Myofibroblasten – und zum anderen zu einer autokrinen Feedback-Schleife – Fibroblasten selbst exprimieren PDGFR und FGFR – für die Bildung von extrazellulärer Matrix (Scotton & Chambers 2007; Hostettler, Zhong, et al. 2014). Folglich führt dieser Pathomechanismus zu einer aberranten Produktion von Kollagen und gesteigerter Fibrosierung des Lungenparenchyms. Dies bedingt wiederum eine weitere Zerstörung des Bronchialepithels (Selman & Pardo 2001) und mündet in einen Circulus vitiosus aus Zerstörung und kompensatorischer Fibroproliferation.

Ein weiterer pathologischer Mechanismus dieser unkoordinierten Wundheilung wird in zahlreichen Studien der Neovaskularisation und hierbei vor allem der Expression von VEGF zugesprochen (King et al. 2011). In den fibroblastischen Foki ist die Zahl neugebildeter Gefäße äußerst gering, wohingegen benachbartes, nicht-fibrotisches Lungengewebe verstärkt vaskularisiert ist (Ebina et al. 2004). Insbesondere in Alveolarepithelzellen und Endothelzellen der nicht-fibrotischen Areale ist die Expression von VEGF deutlich erhöht (Farkas et al. 2009). Es wird bis heute kontrovers diskutiert, ob VEGF eher eine positive oder negative Auswirkung auf das Krankheitsbild der idiopathischen Lungenfibrose ausübt (Wollin et al. 2015). Für einen negativen, profibrotischen Effekt sprechen Beobachtungen in Tierstudien (Hamada et al. 2005), in denen ein Rückgang der fibrotischen Vorgänge unter Inhibition von VEGF erfolgte.

Bei Vergleich der beiden Pathomechanismen von ILF und BO fällt auf, dass bei beiden Erkrankungen Schädigungen des Bronchialepithels unabhängig von der jeweiligen Genese als Auslöser für den Fibrosemechanismus im Mittelpunkt stehen, hingegen in der Induktion der Fibrosevorgänge der wesentliche Unterschied zu finden ist.

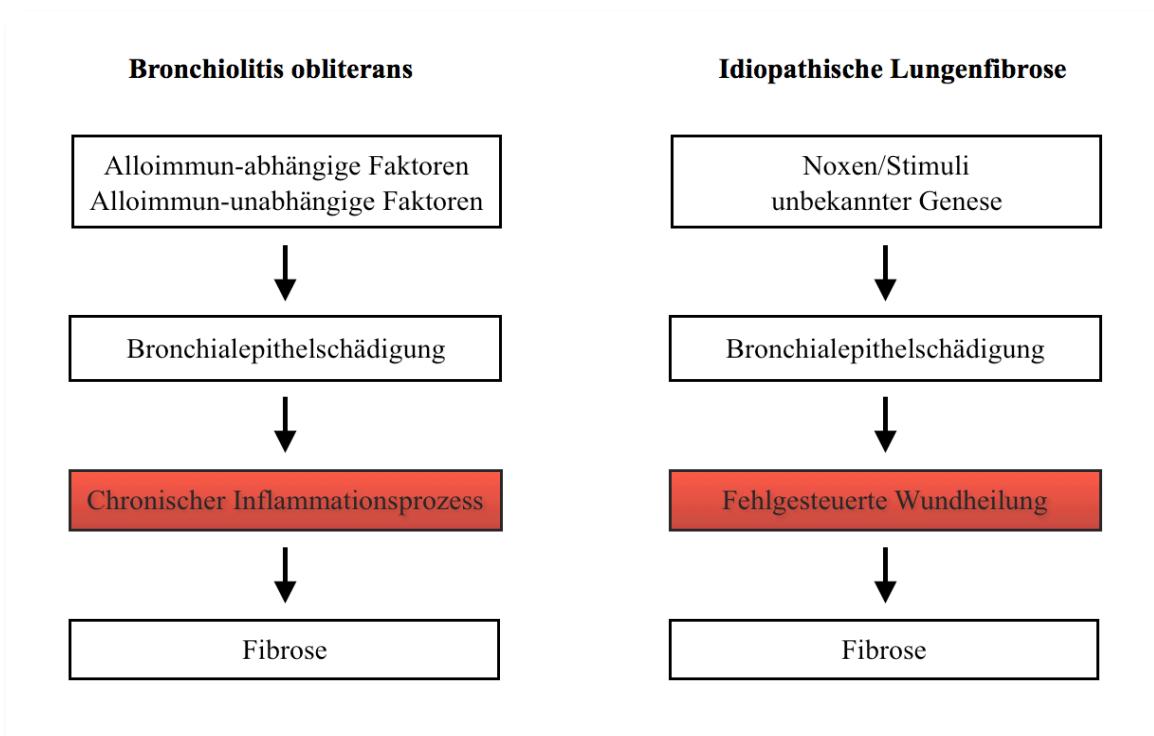


Abbildung 4.2: Gegenüberstellung des Pathomechanismus von BO und ILF

Eine massive Inflammationsreaktion wie sie bei der Bronchiolitis obliterans vorliegt, lässt sich in dieser Stärke bei der idiopathischen Lungenfibrose nicht nachweisen. In dem hypothetischen Modell nach Selman et al. (Selman et al. 2001) wird noch einmal deutlich, dass es sich bei der ILF vielmehr um den Prozess einer fehlgesteuerten Wundheilung handelt.

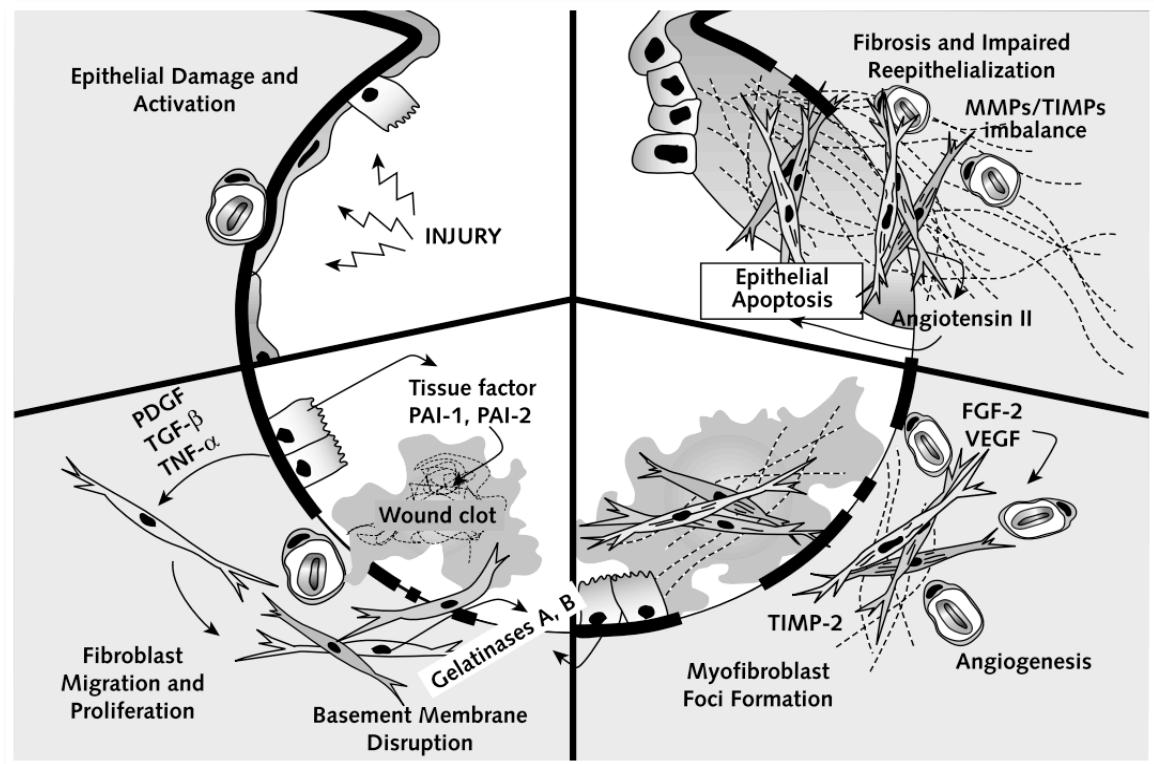


Abbildung 4.3: Hypothetisches Schema der idiopathischen Lungenfibrose nach Selman et al. (Selman et al. 2001); der gestörten Wundheilung wird in diesem Modell die Hauptursache für die Fibrosemechanismen zugeschrieben – Inflammationsreaktionen wurde kein Platz eingeräumt

Hier könnte ein potentieller Schlüssel liegen, weshalb der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib einen positiven, antifibrotischen Effekt in der Therapie der ILF im Gegensatz zur BO gezeigt hat.

4.2.2 Fehlende Wirksamkeit von Nintedanib am POD 20 – mögliche Hypothesen

Das in dieser Arbeit eingesetzte Medikament Nintedanib zielt als Target-Therapie darauf ab, die Proliferation v.a. der Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF und FGF und weniger die inflammatorischen Prozesse zu reduzieren, um damit die Angiogenese, die Produktion von extrazellulärer Matrix sowie Fibrosierungsprozesse zu vermindern (Antoniu 2012). Dies wird erreicht, indem das Indolinderivat insb. die Rezeptor-Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR 1,2 und 3, FGFR 1,2 und 3, PDGFR α und β inhibiert (Rolfo et al. 2013). Deswegen wird Nintedanib auch als dreifacher Angiokinase-Inhibitor bezeichnet (Kutluk Cenik et al. 2013); es werden aber auch weitere sowohl Rezeptor- als auch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen gehemmt, so u.a. die Fms-related tyrosine kinase (Flt) 3, die Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) und die protoonkogene Proteintyrosinkinase Src (Capdevila et al. 2014). Durch Bindung des Pharmakons an die ATP-Bindungsstellen der entsprechenden Rezeptoren (Hilberg et al. 2008) wird der dazugehörige intrazelluläre Signalkaskadeweg (vgl. 1.3) sowie die Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen unterbrochen und damit die Bildung von extrazellulärer Matrix und Kollagen eingedämmt (Hostettler, Zhong, et al. 2014).

Die erarbeitenden Ergebnisse der konventionellen Histologie am POD 20 bestätigen, dass der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib aufgrund seines molekularen Wirkmechanismus nicht dazu im Stande ist, die akuten, inflammatorischen Prozesse – ausgelöst durch alloimmun-abhängige und alloimmun-unabhängige Faktoren – zu begrenzen. Im Gegensatz dazu wiesen Wollin et al. (Wollin et al. 2014; Wollin et al. 2015) in ihren Studien an Mäusen einen anti-inflammatorischen Effekt von Nintedanib in der Behandlung der Bleomycin-induzierten

Lungenfibrose nach. In der histologischen Aufarbeiten der Mäuseleungen wurden signifikant reduzierte Entzündungsprozesse (Rückgang der Lymphozyteninfiltrate) unter der Therapie mit dem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor beobachtet. Auch in der bronchoalveolären Lavage zeigten sich erniedrigte Lymphozytenzahlen sowie erniedrigte Interleukin-1- β -Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Dieses Ergebnis kann in dieser Hinsicht kontrovers diskutiert werden, weil nach Reinert et al. (Reinert et al. 2013) im Pathomechanismus der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose Entzündungsreaktionen eine untergeordnete Rolle einnehmen. Diese inflammatorischen Prozesse, wie sie bei einer Lungenfibrose etwaiger Genese auftreten, erreichen nie das Ausmaß, das bspw. bei einer akuten Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation beobachtet wird. Dies wird noch einmal verdeutlicht, wenn man die histologischen Präparate von Wollin et al. (Wollin et al. 2014) mit den Bildern der akuten Abstoßungsreaktion der Versuchstiere am POD 20 vergleicht. Im Vergleich zu den histologischen Schnitten der Lungenfibrose zeigten sowohl Gefäße als auch Bronchiolen in den BO-Tieren maximal akute Abstoßungsreaktionen (ISHLT – A4 bzw. B2R) und neben den lymphozytären Infiltraten, die auch in den Lungenfibrose-Präparaten deutlich sichtbar wurden, waren weitere Entzündungszellen, insb. Makrophagen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten perivaskulär und peribronchial ange lagert.

Zusätzlich konnte in den histologischen Schnitten des BOS nekrotisierende Vaskulitiden bzw. ödematose Prozesse beobachtet werden, welche untypisch für jegliche Art der Lungenfibrose (Gross & Hunninghake 2001) sind. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei den in dieser Arbeit vorliegenden Entzündungsvorgängen um eine wesentlich intensivere, inflammatorische Reaktion im Vergleich zur Bleomycin-induzierten Lungenfibrose handelt. Unter der Annahme, dass Nintedanib bei dem Krankheitsbild der Lungenfibrose über die Blockade multipler Kinasen (Wollin et al. 2014) den Inflammationsprozess zurückdrängt, wäre dieser Effekt bei den massiven Entzündungsvorgängen eines Bronchiolitis obliterans Syndrom als marginal anzusehen.

Des Weiteren arbeiteten Wollin et al. (Wollin et al. 2014) in ihrer Bleomycin-Studie heraus, dass der Einsatz von Nintedanib präventiv – also eine analoge Verabreichung von Bleomycin und Nintedanib an die Versuchstiere – einen besseren Effekt hinsichtlich der Inflammation im Vergleich zu einer therapeutischen Gabe zeigte, bei denen den Versuchstieren sieben Tage

nach der Instillation von Bleomycin Nintedanib verabreicht wurde. Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass bei der Therapiegruppe im Gegensatz zur Präventivgruppe die Entzündungsreaktionen bereits einen Höhepunkt erreichten, noch bevor Nintedanib angeboten wurde (Wollin et al. 2014). Auch wenn es sich in dem hier vorliegenden Tiermodell um eine präventive Gabe von Nintedanib handelt – die Versuchstiere erhielten einen Tag vor der Lungentransplantation das Medikament – kann die Vermutung angestellt werden, dass die auftretenden Entzündungsreaktionen unmittelbar nach Transplantation so drastisch einsetzen, dass Nintedanib mit seiner geringen anti-inflammatoryischen Wirkung nicht zum Zug kommt. Auch eine frühere Instillation von Nintedanib könnte höchstwahrscheinlich diesen enormen Inflammationprozessen keinen Widerstand leisten.

Insgesamt ist es daher nicht verwunderlich, dass in dieser Arbeit histologisch keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Medikamentengruppe der POD 20 Tiere verzeichnet werden konnten.

4.2.3 Fehlende Wirksamkeit von Nintedanib am POD 60 – mögliche Hypothesen

Hostettler et al. (Hostettler, Zhong, et al. 2014) zeigten in In-vitro-Studien an humanen Fibroblasten, dass Fibroblasten aus ILF-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten wesentlich höhere Expressionsraten von PDGFR und FGFR zeigten. Gleichzeitig wurde mit bereits niedrigen Nintedanibkonzentrationen von 10 – 100 nM ein signifikanter Proliferationsrückgang der mit FGF, VEGF und PDGF stimulierten mesenchymalen Zellen beobachtet. Ähnliche Ergebnisse mit dem Pharmakon Nintedanib erzielten Wollin et al. (Wollin et al. 2014) am bereits beschriebenen Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose mit PDGF stimulierten Mäusefibroblasten. In beiden Studien und in einer weiteren von Hostettler et al. (Hostettler, Papakonstantinou, et al. 2014) wurde auch die Auswirkung des RTK-Inhibitors Nintedanib auf die Expression von TGF-β untersucht. Mit etwas höheren Konzentrationen (Wollin et al. 2014) wurden die von TGF-β induzierten Differenzierungsprozesse von Fibroblasten zu Myofibroblasten gehemmt. Zusätzlich konnten Hamada et al. (Hamada et al. 2005) in ihren Arbeiten zeigen, dass durch eine Therapie mit Anti-VEGF, ein Wachstums- hormon, das auch durch Nintedanib in seiner Wirkung zurückgedrängt wird, eine Fibrose- Reduktion im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose erreicht werden konnte.

Allerdings zeigte Nintedanib in entsprechenden In-vitro-Studien nur geringe Auswirkungen auf die Kollagenproduktion. Simultan zu den Inflammationsergebnissen wurde in den Untersuchungen von Wollin et al. (Wollin et al. 2014; Wollin et al. 2015) in der Präventivgruppe eine signifikante Reduktion der Produktion von extrazellulärer Matrix beobachtet, wohingegen in der therapeutischen Gruppe nach Ablauf von Entzündungsreaktionen zwar ein Rückgang an Kollagen, aber keine statistische Signifikanz gesehen wurde. Auf ähnliche Ergebnisse kamen Hostettler et al. (Hostettler, Zhong, et al. 2014), die Fibroblasten mit PDGF, VEGF und FGF stimuliert und anschließend die Kollagenproduktion gemessen hatten. Auch hier zeigten sich keine relevanten Veränderungen zwischen den mit Nintedanib und den unbehandelten Fibroblasten bezüglich der Synthese von extrazellulärer Matrix.

Es scheint trotzdem so, als sei das Pharmakon Nintedanib dazu in der Lage, den Teufelskreis in der idiopathischen Lungenfibrose zu unterbrechen, indem es die bestehende Imbalance des fehlgesteuerten Wundheilungsprozesses zumindest teilweise ausgleicht. Dies erfolgt scheinbar an mehreren Stellschrauben: Durch die Inhibition von TGF- β werden weniger Fibroblasten zu Myofibroblasten transformiert, die ihrerseits wiederum einen wichtigen Anteil zur Kollagenproduktion beitragen. Dadurch kommt es insgesamt zu einer geringeren Sekretion von Wachstumsfaktoren und damit zu einer verminderten Akquirierung weiterer Fibroblasten. Die von Alveolarmakrophagen und Bronchialepithelzellen zusätzlich sezernierten Wachstumsfaktoren PDGF und FGF werden durch Nintedanib inhibiert und die von Endothelzellen exprimierten VEGF blockiert. Alle diese Eigenschaften des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors führen im Gesamtbild gesehen durch Proliferationshemmung mesenchymaler Zellen bei der idiopathischen Lungenfibrose zu einer Reduktion der fibrotischen Vorgänge (Lehtonen et al. 2016).

Im Pathomechanismus der BO dominiert im Gegensatz zur ILF bereits zu Beginn eine akute Inflammationsreaktion mit Akquirierung von Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen sowie mit Synthese zahlreicher Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Interferone und Chemo-kine (Bharat et al. 2007). Durch diese überschießende Immunantwort wird zum einen eine Chronifizierung der Entzündungsprozesse (Boehler & Estenne 2003; Vanaudenaerde et al. 2008) und zum andere eine dauerhafte Hochregulation von Wachstumsfaktoren erreicht (Aris et al. 2002). Diese sekundär-chronische Inflammation ist einfach formuliert, der die Fibrose ernährende Faktor und kann als „Antrieb“ für den Circulus vitiosus der BO bezeichnet wer-

den. Dies stellt an sich den Hauptunterschied zur Pathogenese der ILF dar, bei der die Fibrose durch eine fehlgesteuerte Wundheilung erklärt wird und nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß durch Entzündungsprozesse unterhalten wird.

Nintedanib ist zwar in der Lage, fibrotische Prozesse zu reduzieren, wirkt aber nicht in dem Umfang anti-inflammatorisch, um den BO-Teufelskreis zu unterbinden. Durch die chronische Inflammation werden grundsätzlich immer wieder neue Wachstumsfaktoren hochreguliert, die ihrerseits Fibroblasten und weitere mesenchymale Zellen zu Proliferation, Differenzierung und Migration anregen. Letzten Endes reicht der antifibrotische Mechanismus von Nintedanib in dem hier vorliegenden Modell der BO nicht aus, um der massiven Produktion von extrazellulärer Matrix in den POD 60 Tieren beizukommen.

Dies lässt den Schluss zu, dass der Therapie der akuten, inflammatorischen Phase und vor allem dem Hauptsrisikofaktor, der akuten Transplantatabstoßung, ein wesentliches Standbein in der Therapie der BO eingeräumt werden muss. Dies konnte bereits in zahlreichen Studien bestätigt werden. So zeigten Hirt et al. (Hirt et al. 1998) am gleichen Tiermodell der orthotopen Lungentransplantation, dass durch den Einsatz des Glucokortikoids Methylprednisolon der Schweregrad der akuten Abstoßungsreaktion zurückging. Auf ähnliche Ergebnisse kamen von Süßkind-Schwendi et al. (von Süßkind-Schwendi, Hirt, et al. 2012) sowie Brunner et al. (Brunner et al. 2013) bei Untersuchungen mit den Immunsuppressiva Mycophenolat-Mofetil bzw. Everolimus. Eine essentielle Rolle spielte in allen drei Studien der Verabreichungszeitpunkt des Medikaments: Je früher das jeweilige Pharmakon verabreicht wurde, desto weniger massiv fiel die akute Abstoßungsreaktion und als Folge dessen das fibrotische Geschehen und damit einhergehend das chronische Transplantatversagen aus (von Süßkind-Schwendi, Hirt, et al. 2012; Brunner et al. 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Ablauf der akuten Abstoßungsreaktion die BO mit Hilfe von immunsuppressiv wirkenden Medikamenten nur sehr schwer aufzuhalten ist (Tikkanen et al. 2006).

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung des RTK-Inhibitors Nintedanib auf die chronisch-fibroproliferative Phase zu untersuchen. Es bestätigte sich hierbei erneut, was bereits in o. g. Studien gezeigt wurde, nämlich dass nach dem Erreichen des Zenits der akuten Abstoßung (Hirt et al. 1998) – in dem hier vorliegenden Tiermodell lief die akute Abstoßungs- und Inflammationsreaktion ohne relevante medikamentöse Gegensteuerung ab – ein

chronischer Prozess aus Inflammation und Fibrose eintritt, der alleine mit dem Monotherapeutikum Nintedanib nicht bewältigt werden kann.

Es bleibt trotz aller negativer Ergebnisse zu sagen, dass Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib (Watanabe et al. 2016) und Nintedanib bereits in In-vitro- und in In-vivo-Studien ihr antifibrotisches Potenzial gezeigt haben. Dies lässt durchaus folgende Hypothese zu, dass, wenn die akute Abstoßungsreaktion klinisch frühzeitig erkannt und medikamentös abgeriegelt wird, es durchaus nicht auszuschließen ist, dass RTK-Inhibitoren ihren Beitrag zur Verbesserung der Lebensqualität von BO-Patienten leisten. Erste Bestätigungen dazu lieferte der Einsatz einer Kombinationstherapie aus dem RTK-Inhibitor Imatinib und dem mTOR-Inhibitor Everolimus im Modell der orthotopen, unilateralen LTx (von Süßkind-Schwendi et al. 2013).

4.3 Immunhistochemie (PDGFA, PDGFR- α , VEGFA, VEGFR-2)

Für die immunhistochemischen Ergebnisse der untersuchten Wachstumsfaktoren und Rezeptoren ergab sich für die transplantierten, linken Lungen lediglich am POD 60 unter der Therapie mit Nintedanib im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion in der Expression aller untersuchten Faktoren sowie auch deutliche Unterschiede in der Intensitätsausprägung. Am POD 20 waren die Werte von Nintedanib- und Kontrollgruppe nahezu identisch. Überraschende Ergebnisse boten die untersuchten rechten, *in situ* verbliebenen Lungen, die sich in der Expressionsrate den transplantierten linken Lungen annäherten bzw. diese unter der Therapie mit Nintedanib am postoperativen Tag 60 sogar übertrafen.

4.3.1 Positive Ergebnisse in der immunhistochemischen Auswertung – Medikamentenwirkung oder fibrotische Präparate?

Die Ergebnisse am POD 60 zeigen einen Rückgang der Wachstumsfaktorenexpression unter Nintedanib. Dies kann durchaus mit einer eingetretenen Medikamentenwirkung erklärt werden. Es lässt sich hingegen aber auch nicht gänzlich ausschließen, dass die eingetretene Fibrose und die damit einhergehenden Vernarbungsprozesse zu einer automatischen Reduktion von PDGF-A und VEGF-A sowie deren Rezeptoren geführt haben.

Aris et al. (Aris et al. 2002) haben in ihren Studien den Verlauf der Wachstumsfaktorenexpression in einem BO-Modell der Maus (heterotope Trachealspangentransplantation) über 10 Wochen dokumentiert. Es stellte sich hierbei heraus, dass vier Wochen postoperativ der Höhepunkt der Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren (TNF, TGF- β , IGF-1, ET-1) erreicht war und es danach zu einer sukzessiven Abnahme aufgrund von Vernarbungsprozessen kam (Aris et al. 2002). Bei der Intensitätsbestimmung der durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktion wurden in der zweiten bis dritten Woche (analog zu POD 20) ähnliche Expressionsraten beobachtet wie in der achten bis neunten Woche (analog zu POD 60).

Diese Ergebnisse sind nahezu deckungsgleich mit den in dieser Arbeit vorliegenden Werten der Kontrollgruppe: Auch hier waren zwischen POD 20 und POD 60 nur sehr geringe Schwankungsbreiten bezüglich der Expression von PDGF-A und VEGF-A sowie der entsprechenden Rezeptoren gefunden worden. Im Bezug auf Nintedanib kam es hingegen zu einer wesentlich drastischeren Abnahme, die nicht alleine den fibrotischen Vorgängen zugeschrieben werden kann, wie es bei der Kontrollgruppe der Fall ist, sondern weil sich die Werte deutlich unter dem Niveau des 20. postoperativen Tages befanden. Auch die Abnahme in den Färbeintensitäten am POD 60 im Vergleich zur Kontrollgruppe sprechen für einen positiven Effekt von Nintedanib.

Der zweite Punkt, der für einen positiven Medikamenteneinfluss spricht, ist die Tatsache, dass es auch in den begleitend ausgewerteten, rechten, *in situ* verbliebenen Lungen zu einem Abfall in der Expression von PDGF-A und PDGFR- α am POD 60 im Vergleich zum POD 20 kam. Die rechten Lungen haben in der histologischen Auswertung keinerlei fibrotische Umbauprozesse gezeigt, weshalb hier durchaus ein Effekt von Nintedanib unabhängig von fibrotischen Geschehnissen gesehen werden kann.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse gemeinsam mit der signifikanten Gewichtsreduktion in den Nintedanib-Tieren im Vergleich zur Kontrolle ist davon auszugehen, dass die verabreichten 30 mg/kg Nintedanib eine pharmakologisch aktive Dosis darstellt und dementsprechend auch Auswirkungen auf die Tiere in dieser Studie zeigt.

4.3.2 Relevanz der von Nintedanib inhibierten Rezeptoren für das BOS

Für das Krankheitsbild der BO spielen zahlreiche Wachstumsfaktoren eine Rolle (Hertz et al. 1992; Al-Dossari et al. 1995; Aris et al. 2002). Allerdings zeigt die Ergebniszusammenführung der konventionellen Histologie und der Immunhistochemie, dass trotz signifikanter Reduktion der Wachstumsfaktoren PDGF-A und VEGF-A sowie deren Rezeptoren in der POD-60-Nintedanibgruppe keine wesentlichen Verbesserungen in den fibrotischen Umbauprozessen vonstatten ging. Neben der ausführlich besprochenen Hypothese, dass nach Ablauf der akuten Abstoßungsreaktion Gewebsneubildung und irreversibler Untergang des gesunden Lungengewebes nicht mehr aufzuhalten sind, könnten auch die Anzahl und die Auswahl der inhibierten Rezeptoren und die dadurch beeinflussten Wachstumsfaktoren einen möglichen Ausschlag geben.

Der durch die Rezeptorblockade von Nintedanib verminderte Wachstumsfaktor VEGF-A stimuliert die Proliferation, Migration sowie die proteolytische Aktivität von Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung und -permeabilität (Lappi-Blanco et al. 2001). Im Krankheitsbild der Bronchiolitis obliterans wird dieser Wachstumsfaktor durchaus kontrovers diskutiert (Kastelijn et al. 2010). Im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungfibrose konnte durch Inhibition von VEGF ein Rückgang fibrotischer Prozesse beobachtet werden (Hamada et al. 2005) bzw. im Rattenmodell der ILF unter virusbasierter Verbreitung von VEGF eine Zunahme der Fibrose aufgezeigt werden (Farkas et al. 2009). Gleichzeitig wird diesem Faktor aber auch ein protektiver, anti-apoptotischer Effekt im Bezug auf Endothelzellen zugesprochen (Meyer et al. 2001; Farkas et al. 2009). Eine ähnlich Problematik schilderten Krebs et al. (Krebs et al. 2005) im BO-Rattenmodell der heterotopen Trachealspangentransplantation, in dem die Überexpression von VEGF eine Schutzfunktion gegenüber dem Bronchialepithel zeigte, aber auch eine fibrotische Okklusion der Atemwege begünstigte.

Die VEGF-Expression war in dieser Arbeit unabhängig vom postoperativen Tag deckungsgleich mit den Ergebnissen einer Serumanalyse von Kastelijn et al. (Kastelijn et al. 2010): Die Konzentration von VEGF im Serum war bei einer nicht-transplantierten Kontrollgruppe wesentlich niedriger als bei der transplantierten BO-Gruppe und auch der nur marginale Anstieg dieses Wachstumsfaktors zwischen POD 20 und 60 konnte bestätigt werden. Trotzdem wiesen BOS-positive Patienten eine signifikant niedrigere Serumkonzentration an VEGF vergli-

chen mit stabilen, BOS-negativen Patienten auf. Auf gleiche Ergebnissen kamen Meyer et al. (Meyer et al. 2001) sowie Verleden et al. (Verleden et al. 2011) in ihrer jeweils durchgeführten bronchoalveolären Lavage: Die Proteinkonzentration bei den stabilen, BOS-negativen Probanden war deutlich höher als bei den BO-positiven. Unter der Verallgemeinerung, dass BOS-Patienten mit einer vergleichsweise geringen Expression von VEGF ausgestattet sind, ist in der Zusammenschau aller bisher vorliegenden Ergebnisse eine zusätzliche Inhibition von VEGF fragwürdig. Dies liegt darin begründet, dass der anti-apoptotische Effekt von VEGF im Krankheitsbild der BO potenziell überwiegt. Dies würde zumindest erklären, warum die Protein- bzw. Serumkonzentrationen von VEGF bei stabilen, BOS-negativen Patienten hochreguliert ist und im Gegenzug durch Epithel- und Endotheldestruktion bei BOS-positiven Probanden niedrigere Werte vorliegen. Folgt man der Hypothese, dass bei hoher VEGF-Expression fibrotische Vorgänge angetrieben würden, ist der gute Allgemeinzustand von BOS freien Testpersonen so nicht zu begründen. Daraus kann schlussgefolgert werden, dass eine zusätzliche Inhibition von VEGF beim Krankheitsbild der BO in puncto Fibroseprävention nur eine äußerst untergeordnete Rolle einnimmt, wohingegen die Schutzfunktion, die VEGF nachweislich auf Epithel und Endothel ausübt, unterbunden wird und dadurch eher ein negativer Gesamteffekt entsteht.

FGF ist ebenfalls ein Wachstumsfaktor, dessen Rezeptoren von Nintedanib inhibiert werden. Dieser wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ursächlich waren folgende Beweggründe:

Bei der Untersuchung von Nintedanib im Rahmen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose wurde anhand von Tiermodellen (Wollin et al. 2014; Wollin et al. 2015) in besonderem Maße die Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF sowie ihre dazugehörigen Rezeptor-Tyrosinkinasen erforscht. Tikkanen et al. (Tikkanen et al. 2006) untersuchten die Auswirkungen des RTK-Inhibitors Imabintib (bevorzugte Inhibition von c-kit, PDGF und BCR-ABL) auf das Krankheitsbild der BO. Die finnische Arbeitsgruppe wählte zur Simulation der BO das Modell der heterotopen Trachealspangentransplantation. Obwohl weitläufig akzeptiert und generell einfach durchzuführen, zeigt dieses Modell durchaus eindeutige Limitationen (Kuo et al. 2005; Sato et al. 2009; Jungraithmayr et al. 2010), die bereits in 4.1 dargestellt wurden. In dieser Arbeit sollten daher die antifibrotischen Ergebnisse, die mit anderen Medikamenten/anderem Tiermodell (Tikkanen et al.) bzw. anderem Krankheitsbild (Wollin et al.) erzielt wurden, auf das etablierte und für die BO klinisch relevantere Modell der orthotopen, unilateralen LTx

übertragen werden. Daher wurde in dieser Arbeit bewusst eine Beschränkung auf PDGF und VEGF vorgenommen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen.

Ein weiterer ausschlaggebender Punkt, weshalb FGF in dieser Arbeit nicht evaluiert wurde, war der Vergleich zwischen der maximalen Konzentration (c_{max}) von Nintedanib in dem hier vorliegenden Tiermodell und der bereits in Studien evaluierten mittleren, inhibitorischen Konzentrationen IC_{50} von FGFR. Der rechnerisch ermittelte Wert von c_{max} (vgl. Anhang 7.1.1) ergab $35 - 120$ nmol/l und ist gleichzusetzen mit dem Wirkspiegel des Medikaments im Serum. In gängig zitierten Übersichten über die *in vitro* ermittelten inhibitorischen Konzentrationen IC_{50} der Rezeptor-Tyrosinkinasen (Hilberg et al. 2008; Roth et al. 2014; Capdevila et al. 2014) ergaben sich für FGFR-1 69 ± 70 nmol/l, für FGFR-2 37 ± 2 nmol/l, für FGFR-3 108 ± 41 nmol/l und für FGFR-4 610 ± 117 nmol/l. FGFR-1-3 liegen demnach für das verwendete Tiermodell im entsprechenden Wirkungsbereich, wohingegen eine Inhibition von FGFR-4 demnach nicht erreicht wird.

Im Gegensatz dazu lieferten Hilberg et al. (Hilberg et al. 2008) und Wollin et al. (Wollin et al. 2014) in ihren jeweiligen Tyrosinkinase-Inhibitions-Assays gänzlich andere Werte. Wollin und Kollegen kamen bei FGFR-1, -3 und -4 in einem zellulären BA/F3-Assay auf IC_{50} -Werte von $300 - 1000$ nmol/l und bei FGFR-2 auf 257 nmol/l. Hilberg et al. zeigten an Endothelzellen eine Hemmkonzentration für den Wachstumsfaktor FGF von 290 ± 160 nmol/l. Gemäß dieser Ergebnisse würde die in der hier vorliegenden Studie ermittelte Konzentration von $35 - 120$ nmol/l definitiv nicht ausreichen, um eine adäquate Inhibition von FGFR zu gewährleisten. Diese Diskrepanz in den IC_{50} -Werten war ein weiterer Grund, sich auf die laut *in-vitro*-Studien zuverlässig wirkenden Tyrosinkinasen VEGFR und PDGFR zu beschränken.

PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Zellteilung von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Makrophagen und weiteren Zellen anregt und sie zusätzlich chemotaktisch stimuliert (Heldin & Westermark 1999). In fibrotischen Krankheitsbildern wird PDGF von einer ganzen Reihe von Zellen, insbesondere Alveolarmakrophagen, sezerniert (Bonner 2004). Im Krankheitsbild der Bronchiolitis obliterans konnte sowohl bei betroffenen Patienten, die einer bronchoalveolären Lavage (Hertz et al. 1992) oder einer Bronchoskopie mit transbronchialer Lungenbiopsie (El-Gamel et al. 1999) zugeführt wurden, als auch in entsprechenden experimentellen Studien (Aris et al. 2002; Tikanen et al. 2006; Alho et al. 2007) der Nachweis einer erhöhten Expression von PDGF erbracht werden. Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit durch die

vermehrte Ausprägung des Homodimers PDGF-A am POD 20 und 60 im Vergleich zu den nativen Lungen bestätigt.

Hertz et al. (Hertz et al. 1992), Kallio et al. (Kallio et al. 1999) sowie Wilson et al. (Wilson & Wynn 2009) sprachen dem Wachstumsfaktor PDGF eine wichtige Komponente in der Entstehung von nicht-malignen, fibrotischen Erkrankungen zu. Gleichzeitig postulierten Hertz und Kollegen bereits im Jahr 1992, dass durch die Inhibition von PDGF eine wertvolle therapeutische Option im Kampf gegen fibroproliferative Prozesse geschaffen werden könnte. Das anti-fibrotische Potenzial durch die Inhibition von PDGF wurde in mehreren Tierexperimenten (Tikkanen et al. 2006; Wollin et al. 2014) bzw. in In-vitro-Studien (Hostettler, Zhong, et al. 2014) bestätigt. In dieser Arbeit konnte zwar am postoperativen Tag 60 ein Rückgang der Expression von PDGF-A sowie dessen Rezeptor PDGFR- α beobachtet werden; am pathohistologischen Bild änderte sich deswegen jedoch nichts.

Eine mögliche Antwort darauf liefern unter Umständen die Studien von Yoshida et al. (Yoshida et al. 1995) und Yi et al. (Yi et al. 1996). Yoshida und Kollegen induzierten im Rattenmodell eine interstitielle Pneumonie mit nachfolgender Fibrose durch adenovirale Vektoren (Bonner 2004). Eine virusbasierte Verabreichung von PDGF-B alleine führte lediglich zu einer milden, fibroproliferativen Antwort. Auf ein ähnliches Ergebnis kamen Yi et al. (Yi et al. 1996), die Ratten intratrachel PDGF-B verabreichten und nur geringgradige Proliferationen von Bronchialepithelzellen und weiteren Gewebszellen mit nachfolgender, geringgradiger Ablagerung von Kollagen beobachteten (Bonner 2004). Erst eine simultane Gabe von TGF- β und PDGF-B steigerte signifikant die Proliferation von Fibroblasten sowie die Ablagerung von Kollagen (Yoshida et al. 1995).

TGF- β ist in fibroproliferativen Krankheitsbildern u. a. auch der BO (El-Gamel et al. 1999; DerHovanessian et al. 2016) ein weiterer, wichtiger Wachstumsfaktor, der chemotaktische Auswirkungen auf Entzündungszellen, insbesondere Fibroblasten, ausübt und wesentlich zur Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten beiträgt (Willis et al. 2005; Willis & Borok 2007). Gleichzeitig führt TGF- β zusätzlich zu einer erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix, Fibrose sowie Angiogenese (Roberts et al. 1986; Border & Noble 1994; Alho et al. 2007) und erhöhte die Transkription von Fibronectin und Kollagen bei gleichzeitiger Inhibition von Enzymen, die überschüssige extrazelluläre Matrix abbauen, bspw. Kollagenasen und Proteasen (Bergmann et al. 1998). Auch bei BO-Patienten konnten

Bergmann et al. (Bergmann et al. 1998) sowie Elssner et al. (Elssner et al. 2000) erhöhte Werte von TGF- β in der BAL nachweisen.

Die Wechselwirkung zwischen PDGF und TGF- β fungiert als Beispiel dafür, dass viele Wachstumsfaktoren zusätzlich ihre eigene Synthese verstärken, aber auch miteinander in Interaktion treten (Alho et al. 2007). Die Ausschüttung von TGF- β induziert nämlich neben einer weiteren TGF- β Produktion auch eine zusätzliche Hochregulation des PDGF (Battegay et al. 1990) sowie des Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (Xie et al. 2005). Es ist daher durchaus denkbar, dass sich durch Blockade einzelner Rezeptoren mittels Nintedanib eine Verlagerung von Interaktionen in Richtung anderer proliferativer und profibrotischer Wachstumsfaktoren wie eben TGF- β , TNF- α , CTGF oder ET-1 (Antoniades et al. 1990; Selman et al. 2001; Pardo & Selman 2002) zuträgt und dann über diese Wege fibrotische Prozesse generiert werden.

Allerdings wird der Hochregulation von TGF- β auch solitär eine essenzielle Rolle in der Entstehung von Abstoßungsreaktionen in anderen transplantierten Organen (Bergmann et al. 1998), wie bspw. dem Herz (Zhao et al. 1993) oder der Niere (Wolf et al. 1995) zugeschrieben. Auch bei lungentransplantierten Patienten wurde der Anstieg von TGF- β als negativer, prognostischer Marker im Hinblick auf eine chronische Abstoßung gedeutet (Charpin et al. 1998) und aufgrund des Auftretens im frühen Krankheitsstadium der BO als Ausgangspunkt für die exzessive Fibroproliferation gehandelt (Elssner et al. 2000). Zusätzlich erbrachten Khalil et al. (Khalil et al. 1993) den Beweis, dass sich die Gabe des Glucokortikoids Dexamethason im Krankheitsbild der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nicht im Geringsten auf die ebenfalls erhöhten Werte von TGF- β auswirkte. Nachdem bei nachgewiesener Bronchiolitis obliterans Therapien mit Glucokortikoiden nur wenig erfolgsversprechend waren, kann dem Wachstumsfaktor TGF- β durch das fehlende Ansprechen auf Dexamethason potenziell eine Schlüsselrolle im Krankheitsprozess der BO eingeräumt werden.

Unterm Strich wird deutlich, dass sich der pathologische Mechanismus der BO nicht auf einzelne Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren beschränkt, sondern vielmehr die Gesamtheit, das Zusammenspiel untereinander und die gegenseitige Stimulation zu fibroproliferativen Prozessen und letzten Endes zu exzessiver Ablagerung von extrazellulärer Matrix führen. Durch die Blockade einzelner Rezeptor-Tyrosinkinasen mittels Monotherapie werden zwar, wie in dieser Arbeit ersichtlich, die Expression der Rezeptoren und der dazugehörigen Wachs-

tumsfaktoren reduziert, aber eine positive Auswirkung auf den fibrotischen Untergang des Lungengewebes wird dabei nicht erreicht. Bei simultanem Versuchsaufbau demonstrierten Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass unter dem monotherapeutischen Einsatz anderer RTK-Inhibitoren wie bspw. Imatinib (von Süßkind-Schwendi et al. 2013) bzw. Vatalanib (von Süßkind-Schwendi et al. 2016) – ähnlich wie Nintedanib – keine wesentlichen Verbesserungen im Hinblick auf das chronische Transplantatversagen und die damit verbundene BO beobachtet wurden. Erst die Kombination von zwei RTK-Inhibitoren (von Süßkind-Schwendi et al. 2016) bzw. von einem RTK-Inhibitor und einem mTor-Inhibitor wie Everolimus (von Süßkind-Schwendi et al. 2013) erbrachte eine signifikante Reduktion fibrotischer Geschehnisse in den terminalen Bronchiolen, der vaskulären Strukturen und des interstitiellen Lungengewebes.

4.3.3 Vergleich zwischen Imatinib und Nintedanib bei Fibrose-bedingten Erkrankungen

Imatinib gehört ebenfalls wie Nintedanib zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren und wurde vor allem durch den Einsatz bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie bekannt (Gathmann et al. 2006). Neben dem PDGF-Rezeptor, der in den Überschneidungsbereich von Imatinib und Nintedanib fällt, blockiert Imatinib zusätzlich noch die Tyrosinkinasen Bcr-Abl, c-Abl und c-Kit (Homsi & Daud 2007). Imatinib wurde bereits in einigen Tiermodellen zur Prävention der idiopathischen Lungenfibrose (Daniels et al. 2004) und der Bronchiolitis obliterans (Krebs et al. 2005; Tikkanen et al. 2006; Watanabe et al. 2016) mit Erfolg eingesetzt. In den BO-Tierstudien von Krebs et al. (Krebs et al. 2005), Tikkanen et al. (Tikkanen et al. 2006) sowie Watanabe et al. (Watanabe et al. 2016) konnte Imatinib signifikant die fibrotische Okklusion der Atemwege, die Anzahl an Fibroblasten im Transplantat sowie im Gesamtbild das chronische Transplantatversagen reduzieren. Diese Arbeiten basierten jedoch alle auf dem Modell der heterotopen Tracheospangentransplantation, das eindeutige Limitationen für eine Übertragung auf das klinische Setting mit sich bringt (vgl. 4.1).

Die eigene Arbeitsgruppe untersuchte daher die Auswirkung des RTK-Inhibitors Imatinib im Modell der orthotopen, unilateralen LTx in der Ratte, das die klinischen Begebenheiten deutlich realitätsgenauer abbildet (von Süßkind-Schwendi et al. 2013). Die am POD 20 getöteten Tiere entwickelten trotz Imatinib simultan wie bei Nintedanib alle Kriterien einer massiven,

akuten Abstoßungsreaktion sowohl der Gefäße als auch der Atemwege. In zusätzlich am postoperativen Tag 30 getöteten Tieren wurden neben einer hochgradigen, akuten Abstoßung auch erste Anzeichen von chronischen, bronchialen und vaskulären Veränderungen beobachtet. Erst bei der Langzeitbehandlung mit Imatinib (POD 60 und 100) konnte in 3 von 12 Tieren das chronische Transplantatversagen vermieden werden und auch der prozentuale Anteil an fibrotisch veränderten Gefäßen (68%) war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (97%) signifikant reduziert (von Süßkind-Schwendi et al. 2013).

Die Tatsache, dass beide RTK-Inhibitoren von einer Arbeitsgruppe im gleichen, klinisch relevanten Modell der BO untersucht wurden, lässt eine gute Vergleichbarkeit der Wirkmechanismen beider Medikamente zu. Für die bessere Wirksamkeit von Imatinib gegenüber Nintedanib können durchaus die unterschiedlichen Rezeptorblockaden in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang beschrieben Daniels et al. (Daniels et al. 2004), dass Imatinib in In-Vitro-Studien der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose wesentliche Auswirkungen auf die Aktivität von TGF- β und insbesondere deren nachgeschalteter c-Abl-Kinase ausübte. Zusätzlich zeigten Plattner et al. (Plattner et al. 1999), dass eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF einen zusätzlichen Anstieg der c-Abl-Aktivität zur Folge hatte. Obwohl die exakte biologische Aktivität von c-Abl noch nicht vollständig geklärt ist, werden dieser Tyrosinkinase zahlreiche Aufgaben im Bereich der Zellmigration, -invasion und -transformation sowie in der Mitogenese zugesprochen (Sirvent et al. 2008). Demzufolge wird ein profibrotischer Kreislauf geschaffen, in dem TGF- β parallel PDGF (vgl. 4.3.2) und c-Abl stimuliert und PDGF für sich selbst wieder c-Abl anregt. Diese Zirkulation bietet demnach einen optimalen, pharmakologischen Ansatzpunkt für den RTK-Inhibitor Imatinib durch Blockade von PDGFR und c-Abl.

Ein weiterer potenzieller Mechanismus, der die geringere Vaskulopathie an den POD 60 und 100 Tieren unter der Therapie mit Imatinib (von Süßkind-Schwendi et al. 2013) erklären würde, stellt die Tyrosinkinase c-Kit – auch CD 117 genannt – dar. Genauer gesagt handelt es sich hierbei um eine Wechselwirkung zwischen dem Stammzellfaktor (SCF) und dem c-Kit (Da Silva et al. 2006). Diese SCF-c-Kit-Achse wird in vielen Krankheitsbildern im Zusammenhang mit fibrotischen Umbauprozessen genannt (Ding et al. 2013). Fuehrer et al. (Fuehrer et al. 2009) wiesen in BO-Patienten eine erhöhte Expression von CD 117 auf Mastzellen nach, die sich subepithelial in den kleinsten Atemwegen anreicherten; Da-Silvia et al. (Da Silva et al. 2006) berichteten bei Lungentransplantierten zusätzlich von einer vermehrten

Ausprägung des c-Kit im Bereich des Bronchialepithels. Auch in der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose wird nach Ding et al. (Ding et al. 2013) dem Stammzellfaktor c-Kit eine nicht unwesentliche Rolle im fibrotischen Pathomechanismus zugeschrieben. Buchdunger et al. (Buchdunger et al. 2000) bestätigten in ihren Studien die hohe Potenz von Imatinib gegenüber c-Kit bereits schon bei eingesetzten 100 nmol/l (IC₅₀-Wert) und lieferten damit eine weitere, plausible Grundlage für die antifibrotische Wirkung von Imatinib.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Imatinib sich gegenüber dem in dieser Arbeit untersuchten Medikament Nintedanib vor allem im Hinblick auf die zu inhibierenden Rezeptoren unterscheidet. Durch den Einsatz von Imatinib in der Studie von Süßkind et al. (von Süßkind-Schwendi et al. 2013) kann durchaus angenommen werden, dass effektiv neben PDGFR auch c-Abl und c-Kit im Pathomechanismus der BO ausgeschaltet werden. So zumindest können die erzielten Ergebnisse ausgelegt werden. Im unmittelbaren Vergleich zu Nintedanib muss diesen Kinasen somit ein größerer, fibrotischer Einfluss beigemessen werden. Es ist des Weiteren durchaus denkbar, dass Imatinib durch c-Abl indirekt Auswirkungen auf TGF-β, der wie bereits beschrieben, eine bestimmte Schlüsselrolle in der BO einnimmt, ausübt. In-vitro-Untersuchungen zu Imatinib von Daniels et al. (Daniels et al. 2004) und Watanabe et al. (Watanabe et al. 2016) sowie zu Nintedanib von Rangarajan et al. (Rangarajan et al. 2016) wiesen eine Inhibition von TGF-β bei gleichzeitiger Eindämmung von Fibroblastenmigration und -transformation durch beide Medikamente nach, jedoch auf Basis von Konzentrationen zwischen 500 – 2000 nmol/l und teilweise darüber hinaus, die in vivo nicht erreicht werden können. Trotzdem kann Imatinib durch Blockade von c-Abl und PDGFR zumindest teilweise in einen von TGF-β gesteuerten Prozess der Kollagensynthese eingreifen und somit ein größeres Potenzial im Bezug auf antifibroproliferative Mechanismen aufweisen.

4.3.4 Immunhistochemische Ergebnisse der rechten Empfängerlungen – Kompensationsmechanismen?

In dieser Arbeit wurden die nativen Lungen, also die rechten Spenderlungen und die linken, explantierten Empfängerlungen für die histologische Ausgangssituation und die Basisexpression verwendet, nicht die rechten, *in situ* verbliebenen Empfängerlungen. Der Grund hierfür lag daran, dass sich diese Lungen ebenfalls wie die linken, transplantierten Lungen unter dem

Einfluss des Medikamentes (bei der Interventionsgruppe) befanden. Des Weiteren zeigten in dieser Studie die rechten Empfängerlungen im Vergleich zu den nativen Lungen massiv erhöhte Expressionswerte der untersuchten Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Es kann durch diese erzielten Ergebnisse der rechten Lungen postuliert werden, dass sie durch den Untergang der linken Lunge einer Art Kompensationsmechanismus und „Proliferationsstress“ erfahren. So könnten potenziell die überraschenden Ergebnisse der rechten, *in situ* verbliebenen Empfängerlungen gedeutet werden.

Insgesamt wurde die Wachstumsfaktorenexpression der nicht-transplantierten Lunge nach einseitiger Lungentransplantation noch nicht anderweitig in der gängigen Literatur untersucht, weshalb Vergleichsstudien fehlen. PCR-Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe, die nicht Teil dieser Arbeit waren, bestätigen die immunhistochemischen Ergebnisse, wurden bisher aber noch nicht veröffentlicht. Trotzdem ist es nicht verwunderlich, dass bei akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen, wie sie in den Versuchstieren vorkommen, eine Gegenregulation der gesunden Seite auftritt, um die vorhandenen, geringeren pulmonalen Reserven auszugleichen (King et al. 2009). Zusätzlich beschrieben Frost et al. (Frost et al. 1995) diverse klinische Komplikationen, denen die nicht-transplantierten Lungen unterliegen können, wie bspw. einem gestörten Ventilations-Perfusions-Verhältnisse, Infektionen oder pulmonalen Infarkten. Zwar konnten histologisch Infarzierung und schwere, pulmonale Infektionen ausgeschlossen werden, jedoch könnten abgelaufene oder mildere Infekte sowie vermehrte Atemarbeit aufgrund der eingeschränkten Lungenfunktion – letztendlich war in den Versuchstieren nur noch die nicht-transplantierte Lunge funktionstüchtig – durchaus zu diesen kompensatorischen Effekten geführt haben. Auch in anderen Organen wie Leber oder Nieren haben sich kompensatorische Effekte über die Stimulation von Wachstumsfaktoren gezeigt. Nach subtotaler oder totaler Nephrektomie kam es neben einer Vergrößerung des verbleibenden Organs (Douglas-Denton et al. 2002) auch zu einem Anstieg zahlreicher Wachstumsfaktoren (Fagin & Melmed 1987; Mulroney et al. 1992; Matsumoto & Nakamura 2001). Ebenso bietet die Leber bei bspw. tumorbedingter Resektion ein überragendes Regenerationspotenzial durch Stimulation über Zytokine und Wachstumsfaktoren (Böhm et al. 2010).

Und noch eine Aussage kann aus den rechten, nicht-transplantierten Organen gezogen werden, nämlich dass erhöhte Wachstumsfaktoren und Rezeptoren nicht unbedingt zwangsläufig mit fibrotischen Veränderungen einhergehen. In gesundem Lungengewebe halten sich pro- und antifibrotische Mechanismen die Waage. Deshalb werden bei erhöhter Expression von

Wachstumsfaktoren und Rezeptoren u. a. unter den sog. Matrix-Metalloproteininasen (MMP) insbesondere diejenigen mit antiproliferativem Wirkmechanismus wie bspw. MMP-1, -10, -13 und -19 (Craig et al. 2015; Pardo 2016) hochreguliert, um die von den Wachstumsfaktoren initiierten, fibroproliferativen Prozesse einzudämmen. Des Weiteren sind auch auf zellulärer Ebene viele profibrotische Signalkaskaden bspw. Notch, Smad sowie Wnt herunterreguliert (Rosenbloom et al. 2013). Auch die fehlende Immun- und Entzündungsantwort führt zu einer wesentlich geringeren Rekrutierung von weiteren Chemokinen und Zytokinen sowie von Fibroblasten (Wynn 2008), wodurch diese keine speziellen Differenzierungsprozesse, wie bspw. eine Epithelial-mesenchymale Transition, durchlaufen (Herzog & Bucala 2010).

Insgesamt spielt bei fibrotisch-pathologischen Prozessen wie der idiopathischen Lungenfibrose oder des Bronchiolitis obliterans Syndroms der Überschuss an profibrotischen gegenüber antifibrotischen Faktoren die wesentliche Rolle. Hochregulierte Wachstumsfaktoren beschleunigen an dieser Stelle fibrotische Krankheitsbilder, wohingegen bei einseitiger Lungen-dysfunktion die gesunde Gegenseite kompensatorisch über eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren den pulmonale Funktionsverlust ausgleicht.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die erste erfolgreiche Lungentransplantation am Menschen wurde am 11. Juni 1963 in Mississippi durch Dr. James D. Hardy durchgeführt (Dalton 1995; Hardy 1999). Zuvor waren lediglich experimentelle Lungentransplantationsversuche an Hunden bekannt geworden (Blumenstock et al. 1964; Hardy et al. 1964). In den darauffolgenden 20 Jahren nach Hardys erster Lungentransplantation wurden mehr als 40 weitere Operationen durchgeführt (Davis & Pasque 1995). Das Kurzzeitüberleben der Patienten war extrem eingeschränkt zum einen aufgrund von inadäquater, immunsuppressiver Therapie und einer damit einhergehenden akuten Transplantatabstoßung (Blumenstock & Lewis 1993), zum anderen aufgrund einer bronchialen Anastomoseninsuffizienz mit assoziierter Funktionsstörung der Atmung (Davis & Pasque 1995; McKane et al. 2001).

Durch das schlechte Outcome der Patienten wurde das operative Verfahren kurzfristig eingestellt, bis in den frühen 1980er Jahren die Einführung von Cyclosporin A die Lungentransplantation revolutionierte (McKane et al. 2001). In etwa zur selben Zeit entwickelte ein Ärzte-team aus Toronto unter Dr. Joel Cooper eine neuartige Technik für eine bessere Bronchus-anastomose, die das allererste Mal am 7. November 1983 bei einer einseitigen LTx zum Einsatz kam (Cooper 1990). Die erste bilaterale Lungentransplantation wurde 1985 ebenfalls in Toronto durch Cooper und Kollegen (Cooper 1990; Pasque et al. 1990) durchgeführt.

Seither nahm das Überleben der Patienten durch weitere Verbesserung der chirurgischen Techniken sowie der immunsuppressiven Therapie und durch allgemein verbessertes, prä- und postoperatives Management stetig zu (Burton et al. 2005). Die 1-Jahres-Überlebensrate stabilisierte sich daher in den letzten Jahren bei ca. 80% (Madill, Aghdassi, B. Arendt, et al. 2009). Somit hat sich die Transplantation als Verfahren der Wahl bei Menschen mit Lungenerkrankungen im Endstadium nach Ausschöpfung aller konservativen Maßnahmen herauskristallisiert (Belperio et al. 2009). Dennoch ist das 5-Jahres-Überleben von Lungentransplantierten mit lediglich 50% (Yusen et al. 2015) und das 10-Jahres-Überleben mit 36% (Burton et al. 2007) geringer im Vergleich zu anderen Organen wie Niere, Herz oder Leber. Hauptursächlich hierfür ist die Entstehung einer chronischen Abstoßungsreaktion, die als Bronchiolitis obliterans bezeichnet wird (Estenne & Hertz 2002).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des RTK-Inhibitors Nintedanib, der seit 2015 beim Krankheitsbild der idiopathischen Lungenfibrose zugelassen ist, auf die chronisch-fibroproliferative Phase des BOS erforscht. Für diese Untersuchung wurde ein für die Erkrankung etabliertes Tiermodell (von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) verwendet, in dem eine linksseitige, orthotope LTx an zwei schwach allogenen Inzuchtrattenstämmen durchgeführt wurde. Eine Gruppe wurde bereits einen Tag präoperativ mit 30 mg/kg Nintedanib p. o. behandelt, wohingegen die andere Gruppe ohne jegliche Therapie blieb. Jeweils ein Teil der Kontroll- und Medikamentengruppe wurde am POD 20 zur Einschätzung der akuten Abstoßung und der andere Teil am POD 60 zur histologischen Klassifizierung der chronischen Abstoßung getötet. Anschließend wurden die Lungen explantiert, histologisch aufbereitet und hinsichtlich akuter und chronischer Abstoßungsreaktion sowie Wachstumsfaktorenexpression ausgewertet.

Hinsichtlich der akuten und chronischen Abstoßung – bewertet nach modifizierten Kriterien der ISHLT (Stewart et al. 2007; von Süßkind-Schwendi, Ruemmele, et al. 2012) – ergaben sich hinsichtlich Kontroll- und Medikamentengruppe weder am POD 20 noch am POD 60 nennenswerte Unterschiede. Sowohl die akut-inflammatorische Phase als auch die spätere chronisch-fibroproliferative Phase konnte in ihren Ausprägungen durch Nintedanib nicht unterbunden oder abgemildert werden. In allen Fällen wurde die maximale Ausprägung einer chronischen Abstoßungsreaktion in Form einer Bronchiolitis obliterans mit massiv okkludierten und fibrotisch veränderten Bronchiolen und Gefäßen beobachtet. Lediglich in der Expression von Wachstumsfaktoren kam es am POD 60 unter der Therapie mit Nintedanib zu einer relevanten Rückläufigkeit von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

Die Bronchiolitis obliterans ist und bleibt ein limitierender Faktor für das Langzeitüberleben von Lungentransplantierten, denn innerhalb von 5 Jahren nach LTx entwickeln bis zu 60% der Patienten dieses chronische Transplantatversagen (Lama et al. 2005). Das postoperative Management stellt das wichtigste Standbein in der Therapie der BO dar. Dazu gehören unter anderem die Prävention und das aggressive Vorgehen gegen Risikofaktoren wie akute Abstoßungsreaktionen und Atemwegsinfektionen durch virale oder bakterielle Erreger (Hayes 2011) sowie der effektive Einsatz von Immunsuppression (Meyer 2012). Des Weiteren ist für eine schnelle Detektion der BO im Frühstadium das routinemäßige durchgeführte, klinische Screening unabdingbar. Zu diesen Untersuchungen gehören u. a. regelmäßige Spirometrien

mit Bestimmung von FEV₁ und FEF_{25-75%}, Bronchoskopien mit Gewinnung von Lungenbiopsaten zur frühzeitigen Erkennung einer akuten Abstoßung, die bronchoalveoläre Lavage und hochauflösende Computertomographien (Belperio et al. 2009; Hayes 2011).

Die Probleme in den derzeitigen, klinischen Screeningmethoden bestehen darin, dass die Untersuchungen entweder eine geringe Sensitivität oder Spezifität für das frühzeitige Erkennen der BO aufweisen (Copeland et al. 2010). Das für die Einteilung des BO-Schweregrads und somit auch für die Früherkennung essenzielle, spirometrisch bestimmte FEV₁ zeigte in mehreren Studien stark fluktuierende Werte im zeitlichen Verlauf (Kapila et al. 2015) bzw. lediglich eine Sensitivität von knapp 70% für die Erkennung des Frühstadiums BOS 0-p (Lama et al. 2005). Auch in der BAL haben sich keine zuverlässigen, konsistenten Werte zur Detektion der BO ergeben. Lediglich eine Neutrophilie von > 15 – 20% in der BAL von BO-Patienten war ein aussagekräftiger Marker für einen Therapieversuch mit Azithromycin (Verleden et al. 2006; Verleden et al. 2011). In hochauflösenden Computertomographien zeigte sich bei hoher Sensitivität eine äußerst niedrige Spezifität für die Früherkennung der BO (Cook et al. 2003). Aufgrund bestimmter radiologischer Kennzeichen (Sabri et al. 2014) ist dieses Verfahren eher sinnvoll, um das Ausmaß der Schwere bei bereits eingetretener BO bzw. andere Ursachen für eine gesundheitliche Verschlechterung des Patienten beurteilen zu können (Laohaburanakit et al. 2003; Belperio et al. 2009).

Dies zeigt deutlich, dass auch bei engmaschiger Überwachung des Patienten die Gefahr besteht, das Frühstadium der BO zu übersehen. Insbesondere der Hauptschädigende Faktor der BO – die akute Abstoßungsreaktion (Knoop et al. 2006) – wird klinisch oft verkannt bzw. zu spät diagnostiziert. Ein routinemäßiger Einsatz der Bronchoskopie mit transbronchialer Biopsie wird derzeit aufgrund der Risikoabwägung (u. a. Pneumothorax) für den Patienten kontrovers diskutiert (Glanville 2006; Rahmanian & Wood 2010; Rademacher et al. 2014). Dennoch scheint klar zu sein, dass bei bereits geringsten, akuten Abstoßungsreaktionen dauerhafte Schäden des Transplantates nicht ausgeschlossen werden können und auch latente Transplantatabstoßungen ohne klinische Symptome für den Patienten zu einer BO führen (Belperio et al. 2009). Eine ältere Publikation von Bando et al. (Bando et al. 1995) demonstrierte, dass bei einer routinemäßigen Durchführung einer transbronchialen Lungenbiopsie die asymptomatischen Patienten von einer früheren Diagnosestellung noch vor einem Abfall der Lungenfunktion profitierten. Gleichzeitig konnte diese Arbeitsgruppe auch zeigen, dass durch ein frühes Eingreifen

mit angepasster Immunsuppression durchaus ein positiver Effekt auf den Krankheitsprozess der BO ausgeübt werden kann.

Es wird auch in dieser Arbeit deutlich, dass nach Einsetzen der akuten, inflammatorischen Phase die BO ihren Lauf nimmt und auch medikamentös nur sehr schwer eingedämmt werden kann. Unter der Therapie mit dem RTK-Inhibitior Nintedanib ließen Entzündungsprozesse ab, die aufgrund der pharmakologischen Eigenschaft des Medikamentes nicht reduziert werden konnten. Nintedanib wirkt zwar über die Inhibition der Wachstumsfaktoren in In-vitro-Studien (Wollin et al. 2014; Huang et al. 2015; Rangarajan et al. 2016) einer Fibroproliferation und einer überschließenden Gewebeneubildung, allerdings nicht primär inflammatorischen Vorgängen, entgegen. In gewisser Weise war es daher auch nicht überraschend, dass das Monotherapeutikum Nintedanib nach Ablauf diverser Entzündungsvorgänge nicht dazu befähigt ist, den Teufelskreis aus chronischer Inflammation und Fibrose zu unterbrechen und damit den Untergang des Lungengewebes zu verhindern.

In keinem anderen transplantierten Organ ist die akute Abstoßungsreaktion mit solch einer schweren, die Lebensqualität und das Überleben einschränkenden Folgewirkung assoziiert wie in der Lunge und in keinem anderen Organ spielen immunologische Prozesse eine derart wichtige Rolle (Meyer 2012). Deswegen muss das Ziel im klinischen Setting sein, die frühesten Anzeichen einer BO, einer akuten Abstoßung, einer lymphozytären Bronchiolitis oder anderer posttransplantärer Inflammationsprozesse (Bharat et al. 2007) zu erkennen, noch bevor bspw. ein Verlust der Lungenfunktion (Kastelijn et al. 2010) oder gar entzündlich-pathologische Korrelate in der Lungenbiopsie oder BAL nachweisbar sind. Erste vielversprechende Ansätze dazu lieferten Kastelijn et al. (Kastelijn et al. 2010) bezüglich der unterschiedlichen Expressionsmuster von Zytokinen der T-Helferzellen vom Typ 2 im Blutserum von BO-positiven und BO-negativen Patienten. Auch die verminderte Ausprägung von Interleukin-12 (Meloni et al. 2004) und die vermehrte Expression von Interleukin-8 (Elssner et al. 2000), -17 und -23 (Vanaudenaerde et al. 2003; Vanaudenaerde et al. 2008) wurden bisher diskutiert. Doch ein Durchbruch für einen geeigneten, sensitiven Biomarker wurde bisher nicht erzielt. Eventuell kann dies auch auf die Heterogenität des chronischen Transplantatversagens (Verleden et al. 2011) zurückgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei rechtzeitiger Erkennung und gleichzeitiger anti-inflammatorischer Therapie der akuten BO-Phase es nicht ausgeschlossen ist, dass die Mög-

lichkeiten von Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren, die bereits in zahlreichen In-vitro-Arbeiten (Daniels et al. 2004; Tikkanen et al. 2006; Lehtonen et al. 2016) und in klinischen Studien bspw. bei idiopathischer Lungenfibrose (Antoniu 2012; Richeldi, Cottin, et al. 2014; Keating 2015) oder beim Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Rolfo et al. 2013) aufgezeigt wurden, auch beim Krankheitsbild der Bronchiolitis obliterans zum Tragen kommen.

Das Potenzial des RTK-Inhibitors Nintedanib konnte in einer zusätzlich durchgeführten Studie belegt werden. In dieser wurde die Auswirkung der RTK-Inhibitors Nintedanib auf den oxidativen Stress in Lungenfibroblasten der Ratte über Immunfluoreszenz getestet. Oxidativer Stress wird in ausgewählten Studien als zusätzlicher Faktor beschrieben, der die BO als solches unterhält (Madill, Aghdassi, B. M. Arendt, et al. 2009) und die Kollagenproduktion der Fibroblasten begünstigt (Siwik et al. 2001). Die genauen Abläufe und Ergebnisse dieser Studie sind in Anhang 7.2 hinterlegt.

6. Abkürzungsverzeichnis

Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Abkürzungen wurden nach ihrer ersten Nennung im Text erklärt. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden noch einmal erwähnt:

Abkürzung	Erklärung
A. (pl. Aa.)	Arteria (Arterie)
ABC	Avidin Biotin Complex
Abs.	Absatz
BAL	Bronchoalveläre Lavage
BO	Bronchiolitis obliterans
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
bzw.	Beziehungsweise
bspw.	Beispielsweise
ca.	Circa
CLAD	Chronic Lung Allograft Dysfunction
CMV	Cytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
engl.	Englisch
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EU	Europäische Union
F344[RT1 ^{lv1}]	Fischer-Rattenstamm (Spenderstamm)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Rezeptor
ggf.	Gegebenenfalls
HRP	Horse-Radish-Peroxidase; Meerrettichperoxidase

ILF	Idiopathische Lungenfibrose
i.m.	Intramuskulär
insb.	Insbesondere
i.p.	Intraperitoneal
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LTx	Lungentransplantation
M	mol/l (Molar)
min	Minuten
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µM	µmol/l (Mikromolar)
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
N.	Nervus (Nerv)
NGS	Normal Goat Serum; normales Ziegenerum
o.g.	Oben genannt
PBS	Phosphate Buffered Saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor
POD	Postoperative Day; postoperativer Tag

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SCF	Stem Cell Factor; Stammzellfaktor
sog.	Sogenannt
UpM	Umdrehungen pro Minute
V. (pl. Vv.)	Vena, Vene
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser (demineralisiertes Wasser)
WKY[RT1] ¹	Wistar-Kyoto-Rattenstamm (Empfängerstamm)
ZTL	Zentrale Tierlaboratorien

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht über den molekularen Wirkmechanismus von Nintedanib	
Sowie weitere intrazelluläre Signalwege und -moleküle	22
Abbildung 1.2: Interaktion von Nintedanib mit den intrazellulären Domänen der	
Tyrosinkinaserezeptoren	23
Abbildung 2.1: Haltung der Versuchstiere in speziellen Filterdeckel-/Polycarbonatkä-	
figen mit Kleintierstreu und Weichholzgranulat	27
Abbildung 2.2: Lagerung der Versuchstiere auf einem speziellen Operationstisch; A:	
Übersichtsskizze, B: Darstellung der Lagerung in vivo	30
Abbildung 2.3: Spenderoperation; A: Fixation der Ratte in Rückenlage und Durch-	
führung einer medianen Laparotomie, B: Durchführung einer medi-	
anen Sternotomie und Explantation beider Lungen	32
Abbildung 2.4: Empfängeroperation; A: Lagerung des Empfängers bei lateraler Thora-	
kotomie, B: Blick durch das OP-Mikroskop auf den OP-Situs	34/35
Abbildung 2.5: Organentnahme eines Nintedanib-Tieres am POD 20; A: Organpaket	
aus beiden Lungen, Herz und Leber in situ, B: Entnommenes Organ-	
paket aus Herz sowie linker abgestoßener und rechter, nicht-transplan-	
tierter Lunge	37/38
Abbildung 2.6: Identischer, histologischer Ausschnitt für die immunhistochemische	
Färbung einer nativen Lunge; A: PDGF-A-Färbung, B: PDGFR- α -	
Färbung	61
Abbildung 3.1: Postoperative Gewichtszunahme der beiden Versuchsgruppen im Ver-	
lauf; Kontrollgruppe mit n = 23 und Medikamentengruppe mit n = 12	63
Abbildung 3.2: Ausschnitte aus einer nativen, unveränderten Lunge; A: HE-Färbung,	
B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	65/66
Abbildung 3.3: Anschnitt eines Bronchiolus aus einer linken, allogen transplantierten	
Lunge eines POD 20-Kontrolltieres, HE-Färbung	67/68
Abbildung 3.4: Gefäßanschnitt eines POD 20-Kontrolltieres, HE-Färbung	68/69
Abbildung 3.5: Bronchioli aus linken, allogen transplantierten Lungen von Kontroll-	
tieren am POD 20, Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	70/71
Abbildung 3.6: Gefäßausschnitte von POD 20-Kontrolltieren; A und B: Resorcin-	
Fuchsin-Sirius-Red Färbung	71/72

Abbildung 3.7: Bronchiolenanschnitte aus allogen transplantierten, linken Lungen von POD 60-Kontrolltieren; A: Masson-Goldner-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	73/74
Abbildung 3.8: Gefäße aus POD 60-Kontrolltieren; A: Masson-Goldner-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung.....	75/76
Abbildung 3.9: Vergleich der Schweregrade der akuten bronchialen Abstoßung (ISHLT-B) nach LTx bei Medikamenten- und Kontrolltieren am POD 20	77
Abbildung 3.10: Vergleich der Schweregrade der akuten Gefäßabstoßung (ISHLT-A) nach LTx bei Nintedanib- und Kontrolltieren am POD 20	78
Abbildung 3.11: Histologisches Präparat einer allogen transplantierten und mit dem RTK-Inhibitor Nintedanib behandelten Lunge am POD 20, HE-Färbung.....	79
Abbildung 3.12: Vergleich der Schweregrade der chronischen Bronchialabstoßung (ISHLT-C) nach LTx bei Medikamenten- und Kontrolltieren am POD 20	80/81
Abbildung 3.13: Anschnitt eines Bronchiolus aus einer linken Lunge eines POD 20-Medikamententieres, HE-Färbung	81
Abbildung 3.14: Identischer Bronchiolus aus der linken Lunge eines Nintedanib-Tieres am POD 20 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	82/83
Abbildung 3.15: Vergleich der Schweregrade der chronischen Gefäßabstoßung (ISHLT-D) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 20. postoperativen Tag	83/84
Abbildung 3.16: Gefäßanschnitt aus einer allogen transplantierten, linken Lunge eines Medikamententiers am 20. postoperativen Tag, HE-Färbung	84
Abbildung 3.17: Identischer Gefäßanschnitt aus der linken Lunge eines Medikamententieres am POD 20 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	85/86
Abbildung 3.18: Vergleich der Schweregrade der chronischen Bronchialabstoßung (ISHLT-C) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 60. postoperativen Tag	87
Abbildung 3.19: Identischer Bronchiolusanschnitt aus einem Nintedanib-Tier am POD 60 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung,	

B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung.....	88/89
Abbildung 3.20: Vergleich der Schweregrade der chronischen Gefäßabstoßung (ISHLT-D) nach LTx bei Nintedanib-Tieren und unbehandelten Kontrollen am 60. postoperativen Tag.....	89
Abbildung 3.21: Identischer Gefäßanschnitt aus einem Nintedanib-Tier am POD 60 in zwei unterschiedlichen Färbungen dargestellt; A: HE-Färbung, B: Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung.....	90/91
Abbildung 3.22: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 bei unbehandelten Kontrolltieren und Nintedanib-Tieren am postoperativen Tag 20.....	92/93
Abbildung 3.23: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 bei unbehandelten Kontrolltieren und Nintedanib-Tieren am postoperativen Tag 20 und 60.....	96
Abbildung 3.24: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den in situ verbliebenen, rechten Lungen am postoperativen Tag 20 und 60.....	100
Abbildung 3.25: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den rechten und linken Lungen am postoperativen Tag 20	101
Abbildung 3.26: Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFA und VEGFA sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 in den rechten und linken Lungen am postoperativen Tag 60	102
Abbildung 4.1: Pathomechanismus eines Bronchiolitis obliterans-Syndroms	109/110
Abbildung 4.2: Gegenüberstellung des Pathomechanismus von BO und ILF	114
Abbildung 4.3: Hypothetisches Schema der idiopathischen Lungenfibrose	114/115

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Klinische Stadieneinteilung des Bronchiolitis obliterans Syndroms anhand der spirometrisch erfassten Kriterien von FEV ₁ und FEF _{25-75%}	17/18
Tabelle 1.2: Risikofaktoren für die Entstehung einer Bronchiolitis obliterans	18
Tabelle 1.3: Therapieoptionen für das BOS	19/20
Tabelle 2.1: Übersicht über die Versuchsgruppen mit Tötungszeit, Anzahl der Empfängertiere und Medikamentendosierung	27/28
Tabelle 2.2: Übersicht über verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die histologischen Färbungen	39/40
Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien der HE-Färbung	41/42
Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien der Resorcin-Fuchsin-Sirius-Red-Färbung	43
Tabelle 2.5: Verwendete Reagenzien der Masson-Goldner-Färbung	44/45
Tabelle 2.6: Lösungsansatz der Masson-Goldner-Färbelösungen	45/46
Tabelle 2.7: Übersicht über verwendete Antikörper	47
Tabelle 2.8: Verwendete Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von PDGF und VEGF	48
Tabelle 2.9: Histologische Klassifikation des Schweregrades der akuten, vaskulären Abstoßung nach LTx	54/55
Tabelle 2.10: Histologische Klassifikation des Schweregrades der akuten, bronchiolären Abstoßung nach LTx	55/56
Tabelle 2.11: Histologische Klassifikation des Schweregrades der chronischen, vaskulären Abstoßung nach LTx	56/57
Tabelle 2.12: Histologische Klassifikation des Schweregrades der chronischen, bronchiolären Abstoßung nach LTx	58
Tabelle 2.13: Einteilung der Fibrosegrade des interstitiellen Lungenparenchyms nach der sog. Ashcroft-Skala	59/60
Tabelle 3.1: Übersicht über die Intensitätsbestimmung der immunhistochemischen Färbung von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 am postoperativen Tag 20	94/95
Tabelle 3.2: Übersicht über die Intensitätsbestimmung der immunhistochemischen Färbung von PDGFA, PDGFR- α , VEGFA und VEGFR-2 am postoperativen Tag 60	97-99

9. Literaturverzeichnis

- Adams, B.F., Brazelton, T., Berry, G.J. & Morris, R.E., 2000. The role of respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation*, 69(4), pp.661–665.
- Al-Dossari, G.A., Jussurun, J., Bolmann, R.M., Kshettry, V.R., King, M.B., Murry, J.J. & Hertz, M.I., 1995. Pathogenesis of obliterative bronchiolitis: Possible roles of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor. *Transplantation*, 59(1), pp.143–145.
- Alho, H.S., Maasilta, P.K., Vainikka, T. & Salminen, U.-S., 2007. Platelet-Derived Growth Factor, Transforming Growth Factor-B, and Connective Tissue Growth Factor in a Porcine Bronchial Model of Obliterative Bronchiolitis. *Experimental Lung Research*, 33(6), pp.303–320.
- Antoniades, H.N., Bravo, M. a, Avila, R.E., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Maxwell, M. & Selman, M., 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 86, pp.1055–1064.
- Antoniu, S.A., 2012. Nintedanib (BIBF 1120) for IPF: A tomorrow therapy? *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 7(41), pp.1–4.
- Aris, R.M., Walsh, S., Chalermskulrat, W., Hathwar, V. & Neuringer, I.P., 2002. Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(3), pp.417–422.
- Ashcroft, T., Simpson, J.M. & Timbrell, V., 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of Clinical Pathology*, 41(4), pp.467–470.
- Atanasova, S., Hirschburger, M., Jonigk, D., Obert, M., Petri, K., Evers, A., Hecker, A., Schmitz, J., Kaufmann, A., Wilhelm, J., Chakraborty, T., Warnecke, G., Gottlieb, J.,

Padberg, W. & Grau, V., 2013. A relevant experimental model for human bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 32(11), pp.1131–1139.

Aubert, J., Pare, P.D., Hogg, J.C. & Hayashi, S., 1997. Platelet-derived Growth Fador in Bronchiolitis Obliterans-organizing Pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 155, pp.676–681.

Bando, K., Paradis, I.L., Similo, S., Konishi, H., Komatsu, K., Zullo, T.G., Yousem, S. a., Close, J.M., Zeevi, A., Duquesnoy, R.J., Manzetti, J., Keenan, R.J., Armitage, J.M., Hardesty, R.L. & Griffith, B.P., 1995. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 110(1), pp.4–14.

Banerjee, B., Ling, K., Sutanto, E.N., Musk, M., Yerkovich, S.T., Hopkins, P.M.A., Stick, S.M., Kicic, A. & Chambers, D.C., 2011. The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(10), pp.1175–1185.

Battegay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F. & Ross, R., 1990. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*, 63(3), pp.515–524.

Belperio, J. a, DiGiovine, B., Keane, M.P., Burdick, M.D., Ying Xue, Y., Ross, D.J., Lynch, J.P., Kunkel, S.L. & Strieter, R.M., 2002. Interleukin-1 receptor antagonist as a biomarker for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Transplantation*, 73(4), pp.591–599.

Belperio, J. a, Weigt, S.S., Fishbein, M.C. & Lynch, J.P., 2009. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(1), pp.108–121.

Bergmann, M., Tiroke, A., Schäfer, H., Barth, J. & Haverich, A., 1998. Gene Expression of Profibrotic Mediators in Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Lung Transplantation.

Scandinavian Cardiovascular Journal, 32(2), pp.97–103.

Bharat, A., Narayanan, K., Street, T., Fields, R.C., Steward, N., Aloush, A., Meyers, B., Schuessler, R., Trulock, E.P., Patterson, G.A. & Mohanakumar, T., 2007. Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection. *Transplantation*, 83(2), pp.150–158.

Bjoraker, J.A., Ryu, J.H., Edwin, M.K., Myers, J.L., Tazelaar, H.D., Schroeder, D.R. & Offord, K.P., 1998. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(1), pp.199–203.

Blumenstock, D.A. & Lewis, C., 1993. The First Transplantation of the Lung in a Human Revisited. *The Annals of thoracic surgery*, 56(6), pp.1423-1424-1425.

Blumenstock, D.A., Collins, J.A., Hechtman, H.B., Hosbein, D.J., Lempert, N., Thomas, E.D. & Ferrebee, J.W., 1964. Lung Transplantation in the Dog. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 120, pp.677–688.

Boehler, A. & Estenne, M., 2003. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *European Respiratory Journal*, 22(6), pp.1007–1018.

Boehler, A., Kesten, S., Weder, W. & Speich, R., 1998. Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *CHEST Journal*, 114, pp.1411–1426.

Böhm, F., Köhler, U.A., Speicher, T. & Werner, S., 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine*, 2(8), pp.294–305.

Bonella, F., Stowasser, S. & Wollin, L., 2015. Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp.6407–6419.

Bonner, J.C., 2004. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4), pp.255–273.

Border, W.A. & Noble, N.A., 1994. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 331, pp.1286–1292.

Botha, P., Archer, L., Anderson, R.L., Lordan, J., Dark, J.H., Corris, P. a, Gould, K. & Fisher, A.J., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*, 85(5), pp.771–774.

Brunner, E., Lehle, K., Hirt, S.W., Schmid, C. & von Süßkind-Schwendi, M., 2013. Everolimus's Influence on Persistent Acute Rejection After Experimental Lung Transplantation. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22(3), pp.355–359.

Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J. & Lydon, N.B., 2000. Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor ST1571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), pp.139–145.

Burton, C.M., Carlsen, J., Mortensen, J., Andersen, C.B., Milman, N. & Iversen, M., 2007. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 26(7), pp.681–686.

Burton, C.M., Milman, N., Carlsen, J., Arendrup, H., Eliasen, K., Andersen, C.B. & Iversen, M., 2005. The Copenhagen national lung transplant group: Survival after single lung, double lung, and heart-lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 24(11), pp.1834–1843.

Capdevila, J., Carrato, A., Tabernero, J. & Grande, E., 2014. What could Nintedanib (BIBF 1120), a triple inhibitor of VEGFR, PDGFR, and FGFR, add to the current treatment options for patients with metastatic colorectal cancer? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, pp.83–106.

Charpin, J.M., Valcke, J., Kettaneh, L., Epardeau, B., Stern, M. & Israël-Biet, D., 1998. Peaks

of transforming growth factor-[beta] mRNA in alveolar cells of lung transplant recipients as an early marker of chronic rejection. *Transplantation*, 65(5), pp.752–755.

Cook, R.C., Fradet, G., Müller, N.L., Worsely, D.F., Ostrow, D. & Levy, R.D., 2003. Noninvasive investigations for the early detection of chronic airways dysfunction following lung transplantation. *Canadian Respiratory Journal*, 10(2), pp.76–83.

Cooper, J.D., 1990. The evolution of techniques and indications for lung transplantation. *Annals of surgery*, 212(3), pp.249–255.

Copeland, C.A.F., Snyder, L.D., Zaas, D.W., Jackson Turbyfill, W., Davis, W.A. & Palmer, S.M., 2010. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(6), pp.784–789.

Craig, V.J., Zhang, L., Hagood, J.S. & Owen, C.A., 2015. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), pp.585–600.

Dalton, M.L., 1995. The First Lung Transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery*, 60(5), pp.1437–1438.

Daniels, C.E., Wilkes, M.C., Edens, M., Kottom, T.J., Murphy, S.J., Limper, A.H. & Leof, E.B., 2004. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin mediated lung fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 5(9), pp.1308–1316.

Davis, R.D. & Pasque, M.K., 1995. Pulmonary transplantation. *Annals of surgery*, 221(1), pp.14–28.

DerHovanessian, A., Weigt, S.S., Palchevsky, V., Shino, M.Y., Sayah, D.M., Gregson, A.L., Noble, P.W., Palmer, S.M., Fishbein, M.C., Kubak, B.M., Ardehali, A., Ross, D.J., Saggar, R., Lynch, J.P., Elashoff, R.M. & Belperio, J.A., 2016. The role of TGF- β in the association between primary graft dysfunction and bronchiolitis obliterans syndrome.

American Journal of Transplantation, 16(2), pp.1–21.

DiGiovine, B., Ill, J.P., Martinez, F.J., Flint, A., Whyte, R., Mark, D., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Glass, M.C., Wilke, C.A., Morris, S.B. & Strieter, R.M., 1996. Bronchoalveolar Lavage Neutrophilia Is Associated with Obliterative Bronchiolitis After Lung Tranplantation. *The Journal of Immunology*, 157(9), pp.4194–202.

Ding, L., Dolgachev, V., Wu, Z., Liu, T., Nakashima, T., Wu, Z., Ullenbruch, M., Lukacs, N.W., Chen, Z. & Phan, S.H., 2013. Essential role of stem cell factor – c-Kit signalling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of Pathology*, 230(2), pp.205–214.

Douglas-Denton, R., Moritz, K.M., Bertram, J.F. & Wintour, E.M., 2002. Compensatory renal growth after unilateral nephrectomy in the ovine fetus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(2), pp.406–410.

Dutly, A.E., Andrade, C.F., Verkaik, R., Kugathasan, L., Liu, M., Waddell, T.K., Stewart, D.J. & Keshavjee, S., 2005. A Novel Model for Post-Transplant Obliterative Airway Disease Reveals Angiogenesis from the Pulmonary Circulation. *American Journal of Transplantation*, 5, pp.248–254.

Ebina, M., Shimizukawa, M., Shibata, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Endo, M., Sasano, H., Kondo, T. & Nukiwa, T., 2004. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(11), pp.1203–1208.

Eisner, A., 2018. Mikroskopische Färbemethoden, Farbstoffdaten, Fixiermittel, Rezepturen - Masson-Goldner-Färbung. URL: <http://www.aeisner.de/methoden/farb36.html> [letzter Aufruf: 14.04.2020]

El-Gamel, A., Sim, E., Hasleton, P., Hutchinson, J., Yonan, N., Egan, J., Campbell, C., Rahman, A., Sheldon, S., Deiraniya, A. & Hutchinson, I. V, 1999. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) and Obliterative Bronchiolitis Following Pulmonary Transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation*, 2498(99), pp.828–837.

Elssner, A., Jaumann, F., Dobmann, S., Behr, J., Schwaiblmaier, M., Reichenspurner, H., Fürst, H., Briegel, J. & Vogelmeier, C., 2000. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation*, 70(2), pp.362–367.

Estenne, M. & Hertz, M.I., 2002. Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(4), pp.440–444.

Estenne, M., Maurer, J.R., Boehler, A., Egan, J.J., Frost, A., Hertz, M., Mallory, G.B., Snell, G.I. & Yousem, S., 2002. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: An update of the diagnostic criteria. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 21(3), pp.297–310.

Fagin, J.A. & Melmed, S., 1987. Relative Increase in Insulin-Like Growth Factor I Messenger Ribonucleic Acid Levels in Compensatory Renal Hypertrophy. *Endocrinology*, 120(2), pp.718–724.

Farkas, L., Farkas, D., Ask, K., Möller, A., Gauldie, J., Margetts, P., Inman, M. & Kolb, M., 2009. VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), pp.1298–1311.

Frost, A.E., Keller, C.A., Noon, G.P., Short, H.D. & Cagle, P.T., 1995. Outcome of the native lung after single lung transplant. *Chest*, 107(4), pp.981–984.

Fuehrer, N.E., Marchevsky, A.M. & Jagirdar, J., 2009. Presence of c-KIT-positive mast cells in obliterative bronchiolitis from diverse causes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 133(9), pp.1420–1425.

Gathmann, I., Sc, M., Kantarjian, H., Gattermann, N., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Ph, D., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K.,

- Baccarani, M., So, C., Pharm, D., Letvak, L., Larson, R.A. & Investigators, I., 2006. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 355(23), pp.2408–2417.
- Genden, E.M., Boros, P., Liu, J., Bromberg, J.S. & Mayer, L., 2002. Orthotopic tracheal transplantation in the murine model. *Transplantation*, 73(9), pp.1420–1425.
- Glanville, A.R., 2006. The role of bronchoscopic surveillance monitoring in the care of lung transplant recipients. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 27(5), pp.480–491.
- Glanville, A.R., Gencay, M., Tamm, M., Chhajed, P., Plit, M., Hopkins, P., Aboyoun, C., Roth, M. & Malouf, M., 2005. Chlamydia pneumoniae infection after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 24(2), pp.131–6.
- Gross, T.J. & Hunninghake, G.W., 2001. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 345(7), pp.517–525.
- Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S.N., 1995. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Experimental lung research*, 21(5), pp.791–808.
- Hamada, N., Kuwano, K., Yamada, M., Hagimoto, N., Hiasa, K., Egashira, K., Nakashima, N., Maeyama, T., Yoshimi, M. & Nakanishi, Y., 2005. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *The Journal of Immunology*, 175(2), pp.1224–1231.
- Hardy, J.D., 1999. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplantation Proceedings*, 31, pp.25–29.
- Hardy, J.D., Eraslan, S. & Webb, W.R., 1964. Transplantation of the Lung. *Annals of Surgery*, 160(3), pp.440–448.

Hayes, D., 2011. A review of bronchiolitis obliterans syndrome and therapeutic strategies. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 6(92), pp.1–9.

Heldin, C.-H. & Westermark, B., 1999. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews*, 79(4), pp.1283–1316.

Hertz, M.I., Henke, C. a, Nakhleh, R.E., Harmon, K.R., Marinelli, W. a, Fox, J.M., Kubo, S.H., Shumway, S.J., Bolman, R.M. & Bitterman, P.B., 1992. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), pp.10385–10389.

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. *The American journal of pathology*, 142(6), pp.1945–1951.

Herzog, E.L. & Bucala, R., 2010. Fibrocytes in health and disease. *Experimental Hematology*, 38(7), pp.548–556.

Hilberg, F., Roth, G.J., Krssak, M., Kautschitsch, S., Sommergruber, W., Tontsch-Grunt, U., Garin-Chesa, P., Bader, G., Zoepf, A., Quant, J., Heckel, A. & Rettig, W.J., 2008. BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Research*, 68(12), pp.4774–4782.

Hirschburger, M., Greschus, S., Kuchenbuch, T., Plötz, C., Obert, M., Traupe, H., Padberg, W. & Grau, V., 2007. Lung transplantation in the Fischer 344→Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans. *Journal Heart Lung Transplant*, 26, pp.390–398.

Hirt, S.W., 2003. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Rolle spezifischer und unspezifischer Einflussfaktoren bei der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge. *Habilitationsschrift, Universität Kiel*.

Hirt, S.W., Von Süßkind-Schwendi, M., Puehler, T., Schmid, C. & Lehle, K., 2013. Early administration of FTY720 prevents chronic airway as well as vascular destruction in experimental rat lung transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45(2), pp.783–786.

Hirt, S.W., You, X.M. & Mo, F., 1999. Development of Obliterative Bronchiolitis after Allogeneic Rat Lung Transplantation: Implication of Acute Rejection and the Time Point of Treatment. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 18(6), pp.542–548.

Hirt, S.W., You, X.M., Mo, F., Boeke, K., Ernst, M., Starke, M., Spranger, U. & Wottge, H.U., 1998. Early Treatment of Acute Rejection Prevents Chronic Rejection in a Rat Model of Allogenic Left Lung Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 30(4), pp.1005–1006.

Homsi, J. & Daud, A.I., 2007. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control*, 14(3), pp.285–294.

Hosenpud, J.D., Bennett, L.E., Keck, B.M., Edwards, E.B. & Novick, R.J., 1998. Effect of diagnosis on survival benefit of lung transplantation for end-stage lung disease. *THE LANCET*, 351, pp.24–27.

Hostettler, K.E., Papakonstantinou, E., Zhong, J., Karakiulakis, G., Lardinois, D., Tamm, M. & Roth, M., 2014. Nintedanib (BIBF 1120) prevents TGF- β -induced pro-fibrotic effects in primary human lung myofibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 44(58), p.746.

Hostettler, K.E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun, Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C. & Roth, M., 2014. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 15(1), p.157.

Huang, J., Beyer, C., Palumbo-zerr, K., Zhang, Y., Ramming, A., Gelse, K., Distler, O., Schett, G., Wollin, L. & Distler, J.H.W., 2015. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(5), pp.883–890.

Hübner, R.H., Gitter, W., El Mokhtari, N.E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S. & Bewig, B., 2008. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*, 44(4), pp.507–517.

Jaramillo, A., Fernández, F.G., Kuo, E.Y., Trulock, E.P., Patterson, G. a & Mohanakumar, T., 2005. Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Pediatric transplantation*, 9(1), pp.84–93.

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. *European Respiratory Journal*, 35(6), pp.1354–1363.

Kallio, E.A., Koskinen, P.K., Aavik, E. & Buchdunger, E., 1999. Role of Platelet-derived Growth Factor in Obliterative Bronchiolitis (Chronic Rejection) in the Rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, pp.1324–1332.

Kapanci, Y., Desmouliere, A., Pache, J.-C., Redard, M. & Gabbiani, G., 1994. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med.*, 152, pp.2163–2169.

Kapila, A., Baz, M. a., Valentine, V.G. & Bhorade, S.M., 2015. Reliability of diagnostic criteria for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation: A survey. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(1), pp.65–74.

Kastelijn, E.A., Rijkers, G.T., Moorsel, C.H.M. Van, Zanen, P., Erp, J.M.K., Graaf, E.A. Van De, Kessel, D.A. Van, Grutters, J.C. & Bosch, J.M.M. Van Den, 2010. Systemic and exhaled cytokine and chemokine profiles are associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 29(9), pp.997–1008.

Keating, G.M., 2015. Nintedanib : A Review of Its Use in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drugs*.

Khalil, N., Whitman, C., Zuo, L., Danielpour, D. & Greenberg, A., 1993. Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor-beta secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 92(4), pp.1812–8.

Kim, D.S., Collard, H.R. & King Jr., T.E., 2006. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 3(4), pp.285–292.

King, C.S., Khandhar, S., Burton, N., Shlobin, O.A., Ahmad, S., Lefrak, E., Barnett, S.D. & Nathan, S.D., 2009. Native Lung Complications in Single-lung Transplant Recipients and the Role of Pneumonectomy. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 28(8), pp.851–856.

King, T.E., Pardo, A. & Selman, M., 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 378, pp.1949–1961.

King, T.E., Schwarz, M.I., Brown, K., Tooze, J.A., Colby, T. V., Waldron, J.A., Flint, A., Thurlbeck, W. & Cherniack, R.M., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: Relationship between histopathologic features and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(6), pp.1025–1032.

Knoop, C., D, P. & Estenne, M., 2006. Acute and Chronic Rejection after Lung Transplantation. *Respiratory and Critical Care Medicine*, 27(5), pp.521–533.

Krebs, R., Tikkanen, J.M., Nykänen, A.I., Wood, J., Jeltsch, M., Ylä-Herttuala, S., Koskinen, P.K. & Lemström, K.B., 2005. Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(12), pp.1421–1429.

Kroshus, T.J., Savik, K., John, R., Hertz, M.I. & Bolman, R.M., 1997. Risk Factors for the Development of Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Lung Transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 114(2), pp.195–202.

Kulasekaran, P., Scavone, C.A., Rogers, D.S., Arenberg, D.A., Thannickal, V.J. & Horowitz, J.C., 2009. Endothelin-1 and transforming growth factor- β 1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(4), pp.484–493.

Kuo, E., Fernandez, F., Patterson, G.A. & Mohanakumar, T., 2005. Animal Models for Bronchiolitis Obliterans Syndrome Following Human Lung Transplantation. *Immunologic Research*, 33(1), pp.69–81.

Kutluk Cenik, B., Ostapoff, K.T., Gerber, D.E. & Brekken, R. a, 2013. BIBF 1120 (nintedanib), a triple angiokinase inhibitor, induces hypoxia but not EMT and blocks progression of preclinical models of lung and pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(6), pp.992–1001.

Lama, V.N., Murray, S., Mumford, J. a., Flaherty, K.R., Chang, A., Toews, G.B., Peters-Golden, M. & Martinez, F.J., 2005. Prognostic value of bronchiolitis obliterans syndrome stage 0-p in single-lung transplant recipients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(3), pp.379–383.

Laohaburanakit, P., Chan, A. & Allen, R.P., 2003. Bronchiolitis obliterans. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 25(3), pp.259–274.

Lapar, D.J., Burdick, M.D., Emaminia, A., Harris, D. a., Strieter, B. a., Liu, L., Robbins, M., Kron, I.L., Strieter, R.M. & Lau, C.L., 2011. Circulating fibrocytes correlate with bronchiolitis obliterans syndrome development after lung transplantation: A novel clinical biomarker. *Annals of Thoracic Surgery*, 92(2), pp.470–477.

Lappi-Blanco, E., Soini, Y., Kinnula, V. & Pääkkö, P., 2001. VEGF and bFGF are highly expressed in intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Journal of Pathology*, 196(2), pp.220–7.

Lee, A.G.L., Wagner, F.M., Chen, M.-F., Serrick, C., Giaid, A. & Shennib, H., 1998. A novel charcoal-induced model of obliterative bronchiolitis-like lesions: implications of chronic nonspecific airway inflammation in the development of posttransplantation obliterative

bronchiolitis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 115(4), pp.822–827.

Lehtonen, S.T., Veijola, A., Karvonen, H., Lappi-Blanco, E., Sormunen, R., Korpela, S., Zagai, U., Sköld, M.C. & Kaarteenaho, R., 2016. Pirfenidone and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 17(14), pp.1–12.

Lin, C.M. & Zamora, M.R., 2014. Update on Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation. *Current Transplantation Reports*, 1, pp.282–289.

Liu, M., Suga, M., Maclean, A., St. George, J. a, Souza, D.W. & Keshavjee, S., 2002. Soluble transforming growth factor- β type III receptor gene transfection inhibits fibrous airway. *American journal of respiratory and critical care*, (13).

Lobo, L.J., Aris, R.M., Schmitz, J. & Neuringer, I.P., 2013. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 32(1), pp.70–77.

Lodish, H., Berk, A. & L., Z.S., 2000. Section 20.4: Receptor Tyrosine Kinase and Ras. In *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman.

Lüllmann-Rauch, R. & Paulsen, F., 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart: Thieme Verlag.

Madill, J., Aghdassi, E., Arendt, B., Hartman-Craven, B., Gutierrez, C., Chow, C.-W. & Allard, J., 2009. Lung transplantation: does oxidative stress contribute to the development of bronchiolitis obliterans syndrome? *Transplantation Reviews*, 23(2), pp.103–110.

Madill, J., Aghdassi, E., Arendt, B.M., Gutierrez, C., Singer, L., Chow, C.W., Keshavjee, S. & Allard, J.P., 2009. Oxidative Stress and Nutritional Intakes in Lung Patients With Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Transplantation Proceedings*, 41(9), pp.3838–3844.

Majhail, N.S., Schiffer, C. a. & Weisdorf, D.J., 2006. Improvement of Pulmonary Function with Imatinib Mesylate in Bronchiolitis Obliterans Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12(7), pp.789–791.

Matsumoto, K. & Nakamura, T., 2001. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney International*, 59(6), pp.2023–2038.

Matsumura, Y., Marchevsky, A., Zuo, X.-J., Kass, R.M., Matloff, J.M. & Jordan, S.C., 1995. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation*, 59(11), pp.1509–1517.

McCormack, P.L., 2015. Nintedanib : First Global Approval. *Drugs*, 75, pp.129–139.

McKane, B.W., Trulock, E.P., Patterson, G.A. & Mohanakumar, T., 2001. Lung Transplantation and Bronchiolitis Obliterans - An Evolution in Understanding. *Immunologic Research*, 24(2), pp.177–190.

Meloni, F., Vitulo, P., Cascina, A., Oggionni, T., Bulgheroni, A., Paschetto, E., Klersy, C., D'Armini, A.M., Fietta, A., Bianco, A.M., Arbustini, E. & Viganò, M., 2004. Bronchoalveolar lavage cytokine profile in a cohort of lung transplant recipients: A predictive role of interleukin-12 with respect to onset of bronchiolitis obliterans syndrome. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 23(9), pp.1053–1060.

Meyer, K.C., 2012. Bronchiolitis obliterans syndrome. *Current Respiratory Care Reports*, 1, pp.147–156.

Meyer, K.C., Cardoni, A.L., Xiang, Z., Cornwell, R.D. & Love, R.B., 2001. Vascular endothelial growth factor in human lung transplantation. *Chest*, 119(1), pp.137–143.

Meyer, K.C. & Glanville, A.R., 2013. *Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation*, New York: Springer Verlag.

Meyer, K.C., Raghu, G., Verleden, G.M., Corris, P. a., Aurora, P., Wilson, K.C., Brozek, J. &

Glanville, a. R., 2014. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *European Respiratory Journal*, 44(6), pp.1479–1503.

Mizobuchi, T., Yasufuku, K., Zheng, Y., Haque, M.A., Heidler, K.M., Woods, K., Smith, G.N., Cummings, O.W., Fujisawa, T., Blum, J.S. & Wilkes, D.S., 2003. Differential Expression of Smad7 Transcripts Identifies the CD4 CD45RC high Regulatory T Cells That Mediate Type V Collagen-Induced Tolerance to Lung Allografts. *The Journal of Immunology*, 171, pp.1140–1147.

Mulroney, S.E., Lumpkin, M.D., Roberts, C.T., LeRoith, D. & Harmati, A., 1992. Effect of a growth hormone-releasing factor antagonist on compensatory renal growth, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptor gene expression after unilateral nephrectomy in immature rats. *Endocrinology*, 130(5), pp.2697–2702.

Nakajima, T., Palchevsky, V., Perkins, D.L., Belperio, J.A. & Finn, P.W., 2011. Lung transplantation: Infection, inflammation, and the microbiome. *Seminars in Immunopathology*, 33(2), pp.135–156.

Nicod, L.P., 2006. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(5), pp.444–449.

Novick, R.J., Stitt, L.W., Al-kattan, K., Klepetko, W., Scha, H., Duchatelle, J., Khaghani, A., Hardesty, R.L., Patterson, G.A. & Yacoub, M.H., 1998. Pulmonary Retransplantation : Predictors of Graft Function and Survival in 230 Patients. *Pulmonary Retransplant Registry*, 65, pp.227–234.

Ofek, E., Sato, M., Saito, T., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Chaparro, C., Waddell, T.K., Singer, L.G., Hutcheon, M. a, Keshavjee, S. & Hwang, D.M., 2012. Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Modern Pathology*, 26(3), pp.350–356.

Pardo, A. & Selman, M., 2002. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(12), pp.1534–

Pardo, A., Cabrera, S., Maldonado, M. & Selman, M., 2016. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 17(23), pp.1–10.

Pasque, M.K., Cooper, J.D., Kaiser, L.R., Haydock, D. a., Triantafillou, A. & Trulock, E.P., 1990. Improved technique for bilateral lung transplantation: Rationale and initial clinical experience. *The Annals of Thoracic Surgery*, 49(5), pp.785–791.

Perrotti, L.I., Russo, S.J., Lagos, F. & Quiones-Jenab, V., 2001. Vendor differences in cocaine-induced behavioral activity and hormonal interactions in ovariectomized Fischer rats. *Brain Research Bulletin*, 54(1), pp.1–5.

Plattner, R., Kadlec, L., Demali, K.A., Kazlauskas, A. & Pendergast, A.M., 1999. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes and Development*, 13(18), pp.2400–2411.

Prasse, A. & Müller-Quernheim, J., 2013. Grundlagen, Epidemiologie und Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie*, 10(2), pp.81–88.

Rademacher, J., Suhling, H., Greer, M., Haverich, A., Welte, T., Warnecke, G. & Gottlieb, J., 2014. Safety and efficacy of outpatient bronchoscopy in lung transplant recipients - a single centre analysis of 3,197 procedures. *Transplantation research*, 3(1), p.11.

Rahmanian, S. & Wood, K.L., 2010. Bronchiolitis obliterans and the risk of pneumothorax after transbronchial biopsy. *Respiratory Medicine CME*, 3(2), pp.87–89.

Ramirez, A.M., Shen, Z., Ritzenthaler, J.D. & Roman, J., 2006. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: TGF- β signaling through Smad3-dependent and -independent pathways. *American Journal of Transplantation*, 6(9), pp.2080–2088.

Rangarajan, S., Kurundkar, A., Kurundkar, D., Bernard, K., Sanders, Y.Y., Ding, Q., Antony,

V.B., Zhang, J., Zmijewski, J. & Thannickal, V.J., 2016. Novel mechanisms for the antifibrotic action of nintedanib. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(1), pp.51–59.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R., 2012. *Biochemie*, Stuttgart: Thieme Verlag.

Reinert, T., Baldotto, C.S. da R., Nunes, F.A.P. & Scheliga, A.A. de S., 2013. Bleomycin-Induced Lung Injury. *Journal of Cancer Research*, 2013, pp.1–9.

Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K.R., Hansell, D.M., Inoue, Y., Kim, D.S., Kolb, M., Nicholson, A.G., Noble, P.W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Disse, B. & Collard, H.R., 2014. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*, 370(22), pp.2071–2082.

Richeldi, L., Cottin, V., Flaherty, K.R., Kolb, M., Inoue, Y., Raghu, G., Taniguchi, H., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Le Maulf, F., Stowasser, S. & Collard, H.R., 2014. Design of the INPULSIS™ trials: Two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, 108(7), pp.1023–1030.

Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V. & Kehrl, J.H., 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), pp.4167–4171.

Rolfo, C., Raez, L.E., Bronte, G., Santos, E.S., Papadimitriou, K., Buffoni, L., van Meerbeeck, J.P. & Russo, A., 2013. BIBF 1120/ nintedanib : a new triple angiokinase inhibitor-directed therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(8), pp.1081–1088.

Romaniuk, A., Pertersen, A.H., Wildevuur, C.R.H. & Nieuwenhuis, P., 1987. Expression of

class II major histocompatibility complex antigens by bronchial epithelium in rat allografts. *Transplantation*, 44, pp.209–214.

Rosenbloom, J., Mendoza, F.A. & Jimenez, S.A., 2013. Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), pp.1088–1103.

Roth, G.J., Binder, R., Colbatzky, F., Dallinger, C., Schlenker-herceg, R., Hilberg, F., Wollin, S. & Kaiser, R., 2014. Nintedanib : From Discovery to the Clinic. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, pp.1053–1063.

Sabri, Y.Y., Ibrahim, I.M.H. & Radman, A.F., 2014. Bronchiolitis obliterans (BO): HRCT findings in 20 patients. *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 45(1), pp.69–73.

Santacruz, J.F. & Mehta, A.C., 2009. Airway complications and management after lung transplantation: ischemia, dehiscence, and stenosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(1), pp.79–93.

Sato, M., Keshavjee, S. & Liu, M., 2009. Translational Research: Animal Models of Obliterative Bronchiolitis after Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 9, pp.1981–1987.

Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U., 2015. *PROMETHEUS Innere Organe*, Stuttgart: Thieme Verlag.

Scotton, C.J. & Chambers, R.C., 2007. Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *CHEST Journal*, 132(4), pp.1311–1321.

Selman, M., King T.E., J. & Pardo, a., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of Internal Medicine*, 134(2), pp.136–151.

Selman, M. & Pardo, A., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*, 3(3), pp.1–8.

Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S. & Wallwork, J., 2002. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 21(2), pp.271–281.

Da Silva, C. a, Adda, M., Stern, M., de Blay, F., Frossard, N. & Israel-Biet, D., 2006. Marked stem cell factor expression in the airways of lung transplant recipients. *Respir Research*, 7(90), pp.1–8.

Sirvent, A., Benistant, C. & Roche, S., 2008. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biology of the cell*, 100(11), pp.617–631.

Siwik, D.A., Pagano, P.J., Colucci, W.S., Deborah, A., Pagano, P.J. & Wilson, S., 2001. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. , 2118, pp.53–60.

Stewart, S., Fishbein, M.C., Snell, G.I., Berry, G.J., Boehler, A., Burke, M.M., Glanville, A., Gould, F.K., Magro, C., Marboe, C.C., McNeil, K.D., Reed, E.F., Reinsmoen, N.L., Scott, J.P., Studer, S.M., Tazelaar, H.D., Wallwork, J.L., Westall, G., Zamora, M.R., Zeevi, A. & Yousem, S. a., 2007. Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 26(12), pp.1229–1242.

Strieter, R.M., 2005. Pathogenesis and Natural History of Usual Interstitial Pneumonia - The Whole Story or the Last Chapter of a Long Novel. *Chest*, 128(5), pp.526–532.

von Süßkind-Schwendi, M., Boxhammer, E., Hirt, S.W., Schreml, S., Schmid, C., Wollin, L. & Lehle, K., 2017. The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. *Experimental Lung Research*, 43(6–7), pp.259–270.

von Süßkind-Schwendi, M., Hirt, S.W., Diez, C., Ruemmele, P., Puehler, T., Schmid, C. & Lehle, K., 2012. Impact of the severity of acute rejection in the early phase after rat lung transplantation on the effectiveness of mycophenolate mofetil to treat chronic allograft

rejection. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 42(1), pp.142–148.

von Süßkind-Schwendi, M., Keil, L., Schaub, A., Schmid, C., Hirt, S. & Lehle, K., 2016. Eine Kombination aus Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und Everolimus reduziert das chronische Transplantatversagen nach experimenteller Lungentransplantation. *Zentralblatt für Chirurgie - Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 141, pp.19–20.

von Süßkind-Schwendi, M., 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. *Experimental Lung Research*, 38(3), pp.111–123.

von Süßkind-Schwendi, M., Valenti, V., Haneya, A., Pühler, T., Bewig, B., Schmid, C., Hirt, S.W. & Lehle, K., 2013. Synergism of imatinib mesylate and everolimus in attenuation of bronchiolitis obliterans after rat LTX. *Histology and Histopathology*, 28(10), pp.1273–1284.

Thannickal, V.J. & Horowitz, J.C., 2012. Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3, pp.350–356.

Tikkanen, J.M., Hollmén, M., Nykänen, A.I., Wood, J., Koskinen, P.K. & Lemström, K.B., 2006. Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(10), pp.1145–1152.

Todd, N.W., Luzina, I.G. & Atamas, S.P., 2012. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5(11), pp.1–24.

Uyama, T., Winter, J.B., Groen, G., Wildevuur, C.R.H., Monden, Y. & Prop, J., 1992. Late airway changes caused by chronic rejection in rat lung allografts. *Transplantation*, 54(5), pp.809–812.

Vanaudenaerde, B.M., De Vleeschauwer, S.I., Vos, R., Meyts, I., Bullens, D.M., Reynders, V., Wuyts, W. a., Van Raemdonck, D.E., Dupont, L.J. & Verleden, G.M., 2008. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation*, 8(9), pp.1911–1920.

Vanaudenaerde, B.M., Wuyts, W. a., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E., Demedts, M.M. & Verleden, G.M., 2003. Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 22(11), pp.1280–1283.

Verleden, G.M., Dupont, L.J. & Van Raemdonck, D.E., 2005. Is it bronchiolitis obliterans syndrome or is it chronic rejection: a reappraisal? *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 25(2), pp.221–224.

Verleden, G.M., Vanaudenaerde, B.M., Dupont, L.J. & Van Raemdonck, D.E., 2006. Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(5), pp.566–570.

Verleden, G.M., Vos, R., De Vleeschauwer, S.I., Willems-Widyastuti, A., Verleden, S.E., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E.M. & Vanaudenaerde, B.M., 2009. Obliterative bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 22(8), pp.771–779.

Verleden, S.E., Sacreas, A., Vos, R., Vanaudenaerde, B.M. & Verleden, G.M., 2016. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*, 150(1), pp.219–225.

Verleden, S.E., Vos, R., Mertens, V., Willems-Widyastuti, A., Vleeschauwer, S.I. De, Dupont, L.J., Verleden, G.M., Raemdonck, D.E. Van & Vanaudenaerde, B.M., 2011. Heterogeneity of chronic lung allograft dysfunction : Insights from protein expression in

broncho alveolar lavage. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(6), pp.667–673.

Vos, R., Vanaudenaerde, B.M., Verleden, S.E., De Vleeschauwer, S.I., Willems-Widyastuti, a., Van Raemdonck, D.E., Schoonis, a., Nawrot, T.S., Dupont, L.J. & Verleden, G.M., 2011. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *European Respiratory Journal*, 37(1), pp.164–172.

Watanabe, S., Kasahara, K., Waseda, Y., Takato, H., Nishikawa, S., Yoneda, T., Hara, J., Sone, T., Abo, M., Kimura, H. & Nakao, S., 2016. Imatinib ameliorates bronchiolitis obliterans via inhibition of fibrocyte migration and differentiation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 36(2), pp.1–10.

Weigt, S.S., Elashoff, R.M., Huang, C., Ardehali, A., Gregson, A.L., Kubak, B., Fishbein, M.C., Saggar, R., Keane, M.P., Saggar, R., Lynch, J.P., Zisman, D.A., Ross, D.J. & Belperio, J.A., 2009. Aspergillus colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Transplantation*, 9(8), pp.1903–1911.

Welsch, U., Kummer, W. & Deller, T., 2014. *Lehrbuch Histologie*, München: Urban & Fischer in Elsevier.

Willis, B.C. & Borok, Z., 2007. TGF- beta -induced EMT : mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293(3), pp.525–534.

Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M. & Borok, Z., 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, 166(5), pp.1321–1332.

Wilson, M.S. & Wynn, T. a, 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology*, 2(2), pp.103–121.

Wolf, G., Thaiss, F. & Stahl, R.A., 1995. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells. *Transplantation*, 60(3), pp.237–241.

Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V.V., Holweg, A. & Ryffel, B., 2014. Anti-fibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor, nintedanib, in experimental models of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 349(2), pp.209–220.

Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K.E., Stowasser, S. & Kolb, M., 2015. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 45, pp.1434–1445.

Wolters, P.J., Collard, H.R. & Jones, K.D., 2014. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 9(3), pp.157–179.

Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology*, 214(2), pp.199–210.

Xie, S., Sukkar, M.B., Issa, R., Oltmanns, U., Nicholson, A.G., Chung, K.F., Fan, K. & Regulation, C., 2005. Regulation of TGF- β 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288, pp.68–76.

Xu, M., Chen, R. & Dashwood, R.H., 1999. Effect of carcinogen dose fractionation, diet and source of F344 rat on the induction of colonic aberrant crypts by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*, 20(12), pp.2293–2298.

Yasufuku, K., Heidler, K.M., Woods, K.A., Smith Jr., G.N., Cummings, O.W., Fujisawa, T. & Wilkes, D.S., 2002. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation*, 73(4), pp.500–505.

Yi, E.S., Lee, H., Yin, S., Piguet, P., Sarosi, I., Kaufmann, S., Tarpley, J., Wang, N.S. & Ulich, T.R., 1996. Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo. *The American journal of pathology*, 149(2), pp.539–548.

Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., Sakatani, M., Yamamoto, S., Matsumoto, N. & Kaneda, Y., 1995. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), pp.9570–9574.

Yousem, S.A., Berry, G.J., Cagle T., P., Chamberlain, D., Husain, A.N., Hruban, R.H., Marchevsky, A., Ohori, N.P., Ritter, J., Stewart, S. & Tazelaar, H.D., 1996. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 15(1), pp.1–15.

Yusen, R.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Dipchand, A.I., Goldfarb, S.B., Levvey, B.J., Lund, L.H., Meiser, B., Rossano, J.W. & Stehlik, J., 2015. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation : Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report — 2015 ; Focus Theme : Early Graft Failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(10), pp.1264–1277.

Zhao, X.M., Frist, W.H., Yeoh, T.K. & Miller, G.G., 1993. Expression of cytokine genes in human cardiac allografts: correlation of IL-6 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) with histological rejection. *Clinical and Experimental Immunology*, 93(3), pp.448–451.

10. Anhang

10.1 Messwerte und Berechnungen

10.1.1 Berechnung der maximalen Konzentration c_{\max} von Nintedanib im in dieser Arbeit vorliegenden Tiermodell

Berechnung erfolgte anhand eines Auszug aus dem Assessment Report von Nintedanib vom 20. November 2014: EMA/76777/2015-Report über Ofev – S.36 und S.37

Zugriff erfolgte zuletzt über folgende Internetseite am 19.10.2019 um 14:15 Uhr:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/003821/WC500182476.pdf

Study ID Species N	Daily Dose (mg/kg)	AUC (ng.h/ml)		Cmax (ng/mL)	
		♂	♀	♂	♀
Rodents					
U10-1797	10	233	242	42.7	57.3
Mouse	30	1410	1790	197	348
6M/6F	100	6650	5940	1610	1070

U10-1798	10	225	231	57.7	56.2
Mouse	30	1280	1350	262	241
12M/12F	100	5630	3840	1450	600
U06-1063	10	40	20	7	4
Rat	30	274	178	30	20
4M/4F	100	434	85#	46	14#
U10-1799	5	22.7	26.1	4.16	6.48
Rat	20	163	195	24.4	37.6
10M/10F	60	302	446	45.6	33.7
U04-1812	3	12.6	8.46	8.40	5.64
Rat	20	149	119	58.0	46.5
10M/10F	100	1340	1750	256	370
U04-1065	3	2.31	8.38	1.21	3.07
Rat	20	213	220	57.4	67.8
20M/20F	100	1130	2150	147	346
U05-1843	5	16.4	29.2	5.12	9.70
Rat	20	184	316	41.1	78.4
20M/20F	80	1240	1030	173	168
U09-1730 IV	5	388	336	399	317
Rat	10	1130	1230	943	784
10M/10F	20	3000	3150	1800	1980

Auszug einzelner Werte:

100 mg/kg → 256 ng/ml

80 mg/kg → 173 ng/ml

60 mg/kg → 45,6 ng/ml

30mg/kg → 30,0 ng/ml

Molare Masse von Nintedanib: 650 g/mol

Verwendete Formel:

$$\beta = c \times M \rightarrow c = \beta/M$$

für 100 mg/kg: $c = 256 \text{ ng/ml} / 650 \text{ ng/nmol} \approx 400 \text{ nmol/l}$

für 60 mg/kg: $c = 45,6 \text{ ng/ml} / 650 \text{ ng/nmol} \approx 70 \text{ nmol/l}$

für 30 mg/kg: $c = 30,0 \text{ ng/ml} / 650 \text{ ng/nmol} \approx 46 \text{ nmol/l}$

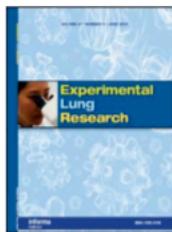
30 mg/kg Nintedanib entspricht einer c_{\max} von **35 nmol/l – 120 nmol/l**

Das c_{\max} -Ergebnis von 35 nmol/l – 120 nmol/l stellt eine relativ realistische Abschätzung der maximalen Konzentration von Nintedanib in diesem Tiermodell dar, denn der rot umrandete Bereich im EMA-Report spiegelt sämtliche Untersuchungen an Ratten wider, denen Nintedanib – wie auch in dieser Studie – p. o. verabreicht wurde.

10.2 Publikationen

10.2.1 Erste Veröffentlichung 2017

von Süßkind-Schwendi, M., Boxhammer, E., Hirt, S.W., Schreml, S., Schmid, C., Wollin, L. & Lehle, K., 2017. The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. *Experimental Lung Research*, 43(6–7), pp.259–270.



The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection

Marietta von Suesskind-Schwendi, Elke Boxhammer, Stephan W. Hirt, Stephan Schreml, Christof Schmid, Lutz Wollin & Karla Lehle

To cite this article: Marietta von Suesskind-Schwendi, Elke Boxhammer, Stephan W. Hirt, Stephan Schreml, Christof Schmid, Lutz Wollin & Karla Lehle (2017): The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection, Experimental Lung Research, DOI: [10.1080/01902148.2017.1354408](https://doi.org/10.1080/01902148.2017.1354408)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01902148.2017.1354408>



Published online: 16 Oct 2017.



Submit your article to this journal 



View related articles 



View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ielu20>

Download by: [93.233.98.17]

Date: 16 October 2017, At: 22:50



ORIGINAL ARTICLE

The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection

Marietta von Suesskind-Schwendi^a, Elke Boxhammer^a, Stephan W. Hirt^a, Stephan Schrem^b, Christof Schmid^a, Lutz Wollin^c, and Karla Lehle^a

^aDepartment of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; ^bDepartment of Dermatology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; ^cBoehringer Ingelheim Pharma, Biberach, Germany

ABSTRACT

Aim of the Study: The prevention and treatment of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) after lung transplantation (LTx) remain unsatisfactory. Growth factors may play an important role in the development of CLAD. This study evaluated the effects of nintedanib, a receptor tyrosine kinase inhibitor, in the treatment of CLAD after experimental LTx. **Materials and Methods:** A rat model of left lung allo-transplantation (Fisher 344 to Wistar Kyoto) was used to evaluate the effect of nintedanib (50 mg/kg per day) on the development of CLAD. Therapy with nintedanib began 2 days before LTx and ended on postoperative day (POD) 20 ($n = 6$) or 60 ($n = 6$). Nontreated animals who underwent LTx ($n = 12$) were used as controls, whereas naïve lungs ($n = 24$) served as reference for physiological healthy organs without transplantation damage or medical effects. Acute and chronic rejection were evaluated on POD 20 and 60, respectively. **Results:** Immunohistologic analysis showed a decrease in growth factors/receptors on POD 60 (nintedanib-treated vs. nontreated controls: platelet-derived growth factor (PDGF) A: [$P \leq 0.001$]; PDGF receptor- α : [$P \leq 0.001$]; vascular endothelial growth factor (VEGF) A: [$P \leq 0.001$]; VEGF receptor-2: [$P \leq 0.001$]). However, no reductions in fibrotic changes were observed in nintedanib-treated allografts compared with nontreated allografts. Although nintedanib treatment started before LTx none of the animals showed impaired wound healing. No dehiscence of the sutures of the bronchus, vessels or skin, or stenosis of the bronchus was found. **Conclusion:** In conclusion, while nintedanib reduced the expression of growth factors/receptors in a rat LTx model, a reduction in fibrotic alterations was not observed at POD 60.

ARTICLE HISTORY

Received 19 January 2017
Accepted 9 July 2017

KEY WORDS
Chronic lung allograft
rejection; CLAD;
immunochemistry; organ
transplant; tyrosine kinase

Introduction

Although lung transplantation (LTx) is a successful clinical therapy for end-stage pulmonary disease, survival is poor compared with other solid organ transplants.^[1] According to a registry report from the International Society for Heart and Lung Transplantation, 5-year survival after LTx is only 58%.^[2] Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is the major cause of late mortality following LTx.^[3] This phenomenon, which develops in 50% of patients 5 years after transplantation, accounts for about 30% of mortality 3–5 years after transplantation.^[2] The term CLAD encompasses a variety of chronic transplant rejections of the lung.^[4] Nonreversible type of CLAD comprises bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and/or restrictive allograft syndrome (RAS).^[3] Both BOS and RAS are associated with fibroproliferative

disorders of lung tissue, which may be caused by increased release of growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor (FGF).^[5–9]

Nintedanib is a tyrosine kinase inhibitor that has been approved for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In clinical trials in patients with IPF, nintedanib has been shown to reduce progression of the disease by reducing the rate of decline in forced vital capacity by 50%.^[10] Nintedanib is an intracellular inhibitor of tyrosine kinases, including PDGF, VEGF, and FGF receptors.^[11,12] Based on this mechanism of action, we hypothesized that nintedanib would reduce the development of bronchiolitis obliterans (BO), the histologic correlate of BOS, and of parenchymal fibrosis, the histologic correlate of RAS, after LTx. As

CONTACT Dr. Marietta von Suesskind-Schwendi  Marietta.Suesskind-von@klinik.uni-regensburg.de  Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, D-93042 Regensburg, Germany.
Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/ielu.

© 2017 Taylor & Francis

nintedanib affects inflammation, fibroblast proliferation and angiogenesis, an influence on wound healing following experimental LTx transplantation could not be excluded. Therefore, we also evaluated the effect of nintedanib on wound healing following LTx.

Materials and methods

Animals and experimental design

All rats were purchased from Charles-River (Sulzfeld, Germany; 280 ± 20 g initial weight) and received care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, No. 85-23, 1985). An orthotopic rat LTx model using moderately histoincompatible strains of Fisher (F344) and Wistar Kyoto (WKY) rats allowed the evaluation of the efficacy of nintedanib to reduce the development of BO and parenchymal fibrosis.^[13,14] Allogeneic [F344(RT1^hl)-to-WKY(RT1^l)] rat orthotopic left LTx were performed as previously described.^[14] Animals were treated with nintedanib ($n = 12$; Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany) once daily by oral gavage at 50 mg/kg starting 2 days before transplantation surgery. The dosage of nintedanib was based on previous studies of nintedanib in rodent models of lung fibrosis and consultation with the manufacturer.^[12,15] A nontreated control group ($n = 12$) received vehicle only. To evaluate the degree of acute rejection, six animals in each group were sacrificed on postoperative day (POD) 20. The remaining six animals in each group were sacrificed on POD 60 to assess the degree of chronic rejection at long-term follow-up. The in situ remained right lungs of the recipients served as medical clarification of potential infections or aspiration of the transplanted lungs, which could be excluded in all histological preparations. The nontransplanted right lungs from the donor rats ($n = 24$)—hereinafter referred to as naïve lungs—were used to exclude any systematic effects of nintedanib and to assess the aberrations between the expression of PDGFA and VEGFA and their receptors PDGFR- α and VEGFR-2.

Histology

Acute rejection and chronic rejection were assessed in allografts and nontransplanted right lungs that

were surgically removed, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned into 5- μ m-thick sections, and stained with hematoxylin-eosin (HE) (mononuclear cell infiltration) and Sirius Red/Elastica-van Gieson (collagen type I and elastic fibers). Histologic scoring was performed by three independent investigators in a blinded fashion. Acute allograft rejection was graded according to the working formulation for the diagnosis of lung rejection from The International Society for Heart and Lung Transplantation.^[16,17] Briefly, acute vascular rejection was graded A0–A4 based on the extent of perivascular and interstitial mononuclear cell infiltrates. The degree of acute airway inflammation was scored B0–B2R based on the extent and intensity of lymphocytic bronchiolitis. Chronic airway and chronic vascular rejection were quantified by assessment of bronchioles and small/medium-sized vessels. The degradation of the bronchioles was classified as none (no chronic alterations; C0), mild (first signs of granulation tissue into the small bronchioles; C1R), or severe (pronounced fibrotic degeneration; C2R).^[14] The same classification system was used for small and medium-sized vessels: no degeneration (no chronic alterations; D0), mild degeneration (obstruction of small vessels with first signs of fibrotic degeneration; D1R), and severe degeneration (vasculopathy including distinct fibrotic degeneration; D2R). The percentages of affected bronchioles (C) and vessels (D) relative to the total number of bronchioles/vessels per tissue section were used to quantify the degree of chronic airway and chronic vascular rejection, respectively.^[17] To evaluate parenchymal fibrosis, which reflects RAS in this model, we evaluated histologic samples using the Ashcroft-scale, modified by Hübner and coworkers (Table 1), which was adapted to the degeneration in CLAD.^[18]

Immunohistopathology

The expression of PDGFA and its receptor PDGFR- α and of VEGFA and its receptor VEGFR-2, were assessed by immunohistochemistry using rabbit anti-human primary antibodies (PDGFA: Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany (E-10) sc-9974, diluted 1:500; PDGFR- α : Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany (c-20) sc338, diluted 1:1000; VEGFA: BioLogo, Kronshagen, Germany VEGA03, diluted 1:150; VEGFR-2: Dianova, Hamburg,

Table 1. Characterization of parenchymal lung fibrosis after experimental lung transplantation.

Grade of fibrosis	Characterization of the modified scale	
0	Alveolar septa:	No fibrotic alveolar walls
	Lung structure:	Normal lung
1	Alveolar septa:	Clearly visible fibrotic changes with knot-like formation, not connected to each other
	Lung structure:	Alveoli partly enlarged no fibrotic masses or <10% of microscopic field
2	Alveolar septa:	Variable
	Lung structure:	Single fibrotic masses (>10% of microscopic field)
3	Alveolar septa:	Variable, mostly nonexistent
	Lung structure:	Large contiguous fibrotic masses (>50% of the microscopic field). Lung architecture mostly not preserved
4	Alveolar septa:	Nonexistent
	Lung structure:	Alveoli nearly obliterated with fibrotic masses or complete obliteration with fibrotic masses

Germany; DLN-12437, diluted 1:200). After deparaffinization, tissue sections were heated for 20 min in 1× Target Retrieval Solution (Dako, Hamburg, Germany, S 2369) and treated with hydrogen peroxide to quench nonspecific peroxidases. Thereafter, tissue sections were incubated in 10% normal rabbit serum for 30 min at room temperature to block nonspecific binding sites. After rinsing with phosphate buffer saline, the sections were incubated with primary antibody, PDGFR- α overnight at 4°C. After rinsing, sections were incubated with biotinylated secondary goat antirabbit antibody (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA, BA-1000, diluted 1:300) for 1 h at room temperature and then with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (Vectastain, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA, ABC kit, PK-6100). HistoGreen (Linaris-Biologische Produkte, Wertheim-Bettingen, Germany) was used as a specific substrate chromogen.^[19] Normal rabbit immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used as an isotype control. The number of positive cells was counted in a blinded fashion by two independent operators using five randomly selected microscopic power fields (200 \times , diameter 1.1 mm) per graft.

Collagen measurement

To evaluate the amount of connective tissue in naïve lungs and allografts, we quantified lung collagen (hydroxyproline) content using a multiplex-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system (BlueGene; Rat Hydroxyproline Elisa kit). Briefly, frozen

lung tissue was homogenized using Tissue Lyser LT (Qiagen, Valencia, CA) and hydrolyzed with 6M hydrochloric acid. Hydroxyproline content was determined according to the manufacturer's instructions. The total amount of collagen was calculated assuming that lung collagen contains 12.2% w/w hydroxyproline, and expressed as μ g collagen per mg lung tissue.^[20,21]

Data requisition and analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The Kruskal-Wallis test was used to compare the nontreated groups with the nintedanib-treated groups and the naïve lungs on POD 20 and POD 60. A Wilcoxon-Mann-Whitney U-test was used as a nonparametric statistical test to assess whether the nintedanib-treated group tended to have improved during therapy compared with the nontreated group on the same day (POD 20 or POD 60). This test was also used to test the differences between naïve lungs and transplanted altered lungs. Statistical package SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Survival and general health

All successfully transplanted rats showed good general condition with normal social and grooming behavior, acceptable food consumption, and inconspicuous defecation. Nintedanib was well tolerated. Independent of drug treatment, early after LTx, food intake was lower, resulting in a significant decrease in weight (days 1–8): mean weight decreased on POD 2 by 8% \pm 1% in nontreated control animals and 7% \pm 3% in nintedanib-treated animals (*P* ≤ 0.05) (Figure 1). Rats in the nontreated control group regained

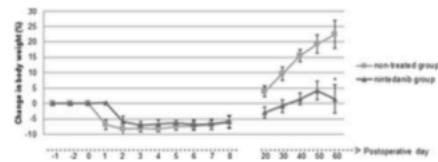


Figure 1. Change in body weight over time. Data are mean \pm SD. The initial weight is shown as zero. *Significant difference in body weight (*P* ≤ 0.005) between nintedanib-treated and nontreated animals.



Figure 2. Anastomosis of the left main bronchus (BR), pulmonary vein (V), and pulmonary artery (A) in a nintedanib-treated rat on POD 20, (25 \times). No signs of wound healing disorders. Anastomoses were well adapted and without macroscopic visible strictures. The arrow point to the corresponding interface.

their initial weight within 15 ± 1 days and their weight increased further over time. Nintedanib treatment resulted in delayed and significantly reduced weight gain (Figure 1) (mean weight of the nintedanib-group on POD 60 vs. mean weight of the nontreated group on POD 60; $P \leq 0.001$); initial body weight was regained after 29 ± 6 days. None of the animals in either group showed impaired wound healing. No dehiscence of the sutures of the bronchus, vessels or skin, or stenosis of the bronchus was found (Figure 2).

Nintedanib did not affect pathology in the early stage after LTx (POD 20) or chronic rejection at long-term follow-up (POD 60)

Macroscopic findings indicated that the lung allografts at POD 20 after LTx in all animals were slightly enlarged, with pale red to yellowish color and blunt edges. The anastomoses of the bronchus and the vessels were without specific findings at POD 20 (Figure 2) and POD 60. At POD 60, the lung allografts were a yellowish color and showed mild pleural thickening and reduced size (30%–50% of original size). Atelectasis was visible. Nintedanib treatment did not change the macroscopic appearance of the allografts at POD 20 or POD 60 compared with nontreated allografts.

Histologic findings showed that at POD 20 and POD 60, the naïve right lungs of all animals were without inflammatory infiltrations, confirming the absence of infection. All left lung allografts in the nontreated control and nintedanib-treated groups exhibited severe acute vascular rejection (A4) and high-grade

lymphocytic bronchiolitis (B2R) (Figures 3 and 4). Diffuse perivascular, interstitial, and air-space infiltration by mononuclear cells with prominent diffuse alveolar damage and endothelialitis dominated the histologic sections. Focal atelectatic areas and pulmonary hemorrhage were observed. In addition to the acute inflammatory response, almost all rats in the nontreated control group on POD 20 showed the first signs of chronic bronchiolar alterations (C1R: $26\% \pm 18\%$; C2R: $28\% \pm 12\%$) (Figure 5) in addition to the obliteration of small and medium-sized vessels (D1R: $50\% \pm 12\%$; D2R: $33\% \pm 11\%$) (Figure 6), and first signs of interstitial and parenchymal fibrosis (Figure 7). While high-grade severe lymphocytic bronchiolitis (Figure 8) and acute vascular rejection (Figure 9) were no longer prominent at POD 60, pronounced chronic airway rejection (C1R: $10\% \pm 16\%$; C2R: $75\% \pm 9\%$) (Figure 10) in addition to distinct chronic vascular rejection (D1R: $9\% \pm 8\%$; D2R: $76\% \pm 9\%$) (Figure 11) were evident. The grade of interstitial fibrosis increased between POD 20 and POD 60 (Figure 7) and patches of fibrous lung tissue, often accompanied by fibrotic thickening of the serosa, were typical at POD 60.

Allografts from rats treated with nintedanib exhibited no differences compared with the nontreated control group. Severe acute vascular rejection (A4) associated with high-grade lymphocytic bronchiolitis (B2R) and moderate-to-severe interstitial damage dominated the histologic sections. On POD 20, nintedanib did not significantly change the extent of chronic bronchiolar (C1R: $62\% \pm 4\%$, C2R: $16\% \pm 1\%$; Figure 5), chronic vascular (D1R: $70\% \pm 5\%$, D2R: $12\% \pm 3\%$; Figure 6), or interstitial (Figure 7) alterations.

Representative histology of nintedanib-treated allografts at POD 20 is depicted in Figures 3 and 4. There was severe acute vascular rejection (A4) in combination with first signs of chronic vascular rejection of the same vessel and occlusion of the whole vessel by mononuclear cells. The endothelium seemed to be totally destroyed and inflammatory cells could be observed in the perivascular interstitium and alveolar septa. A prominent layer of collagen I surrounded the vessel (D1R-D2R). There was lymphocytic bronchiolitis and chronic bronchiolar rejection in the same terminal bronchiole. As shown in Figure 4a, there was high-grade small airway infiltration (B2R) in addition to an intense peribronchiolar infiltration with

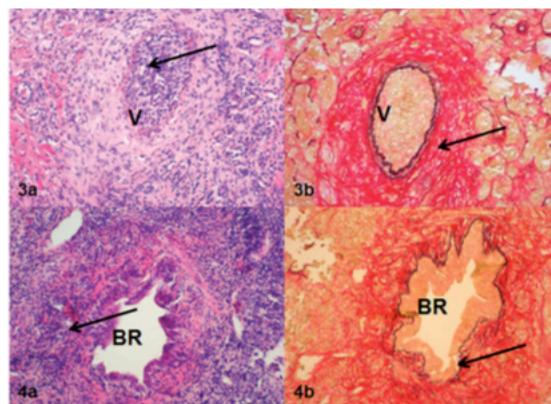


Figure 3 and 4. Representative histology of a medium-size vessel (Figure 3) and a terminal bronchiole (Figure 4) on POD 20 in allografts from nintedanib-treated rats using HE-staining (Figures 3a and 4a) and Sirius red/Elastica staining (Figures 3b and 4b), 100 \times . **Figure 3** shows severe acute vascular rejection (3a; ISHLT-A4) in combination with the first signs of chronic vascular rejection (3b) in the same vessel. **Figure 3a.** Mononuclear cells occluded the whole vessel. The endothelium seemed to be totally destroyed. Inflammatory cells were observed in the perivascular interstitium and the alveolar septa. **Figure 3b.** A prominent layer of collagen I (red fibers) surrounded the vessel (ISHLT-D1R-D2R). **Figures 4** shows lymphocytic bronchiolitis (4a) and chronic bronchiolar rejection (4b) in the same terminal bronchiole. **Figure 4a** shows high-grade small airway infiltration (ISHLT-B2R) in addition to an intense peribronchiolar infiltration with inflammatory cells. Mononuclear cells traversed the muscle layer and migrating into the lamina propria mucosae. Evidence of epithelial damage was seen (ISHLT-B2R). **Figure 4b** shows fibrotic degeneration in the same bronchiole. A distinct formation of collagen I fibers (red) dominated this section (ISHLT-C1R-C2R). (V, vessel; BR, terminal bronchiole).

inflammatory cells, with mononuclear cells traversing the muscle layer and migrating into the lamina propria mucosae. Evidence of epithelial damage was evident (B2R). As shown in **Figure 4b**, there was fibrotic degeneration of the bronchiole with distinct formation of collagen I fibers (C1R-C2R).

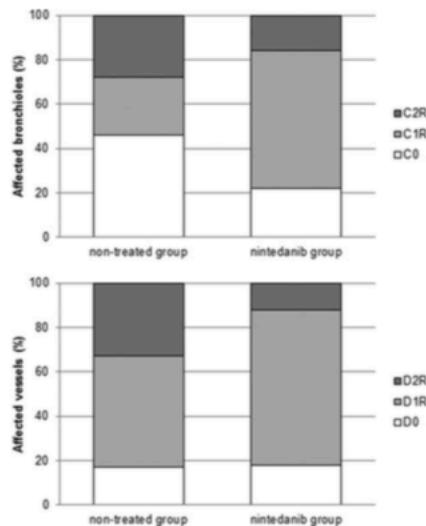
Nintedanib treatment did not improve LTx allograft pathology at POD 60 compared with the nontreated allografts. Severe chronic bronchiolar alterations (C2R) were evident in 86% \pm 7% of the terminal bronchioles and only 9% \pm 4% had mild alterations (**Figure 10**). In addition, 91% \pm 3% of small- and medium-sized vessels in the nintedanib-treated allografts developed severe chronic vascular alterations (D2R) while only 7% \pm 2% of this group showed mild degeneration (D1R) (**Figure 11**). Severe parenchymal damage was seen in more than 50% of the allograft lung sections, irrespective of treatment. This included fibrotic obliteration of the alveoli and complete destruction of the alveolar septa. There was a trend toward reduced interstitial fibrosis in the nintedanib-treated group compared with the nontreated group at POD 60 (**Figure 7**).

Tables 2 and 3 summarize the differential expression pattern and intensity of growth factors PDGFA and

VEGFA and their receptors PDGFR- α and VEGFR-2 on POD 20 and POD 60, respectively, based on analysis of immunohistochemical stained lung sections. **Figure 12** summarizes the number of positive stained cells in lung sections. Terminal bronchioles and vessels were excluded from the analysis.

Receptor and ligand expression in naïve lungs

Both ligands PDGFA and VEGFA and receptors PDGFR- α and VEGFR-2 were expressed in naïve lungs. While the overall expression of VEGFA in cells from naïve lung tissue was weaker than the expression of PDGFA and VEGFR-2, the expression of PDGFR- α was surprisingly strong in the naïve lungs (**Figure 12**). PDGFA and PDGFR- α immunostaining in naïve lungs was strong in bronchiolar epithelium with moderate to strong staining in vascular endothelial cells and macrophages (**Table 2**). Strong PDGFR- α staining of pneumocytes type II was detected in naïve lungs (**Table 2**). Moderate VEGFA staining was demonstrated in the bronchiolar epithelium, type II pneumocytes, macrophages, and vascular endothelial cells (**Table 2**).



Figures 5 and 6. Effect of nintedanib on chronic bronchiolar (Figure 5) and chronic vascular (Figure 6) rejection on POD 20. The bar charts illustrate the percentage of allografts with no (white bar), mild (light grey bar), and severe (dark grey bar) chronic bronchiolar/vascular degeneration in the non-treated control group and the nintedanib-treated group. There were no significant differences between the groups.

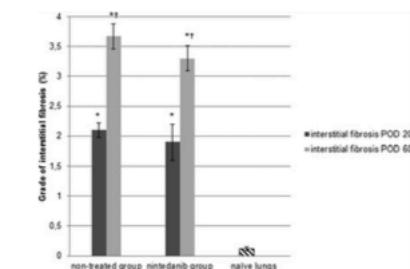


Figure 7. Interstitial fibrosis on POD 20 and on POD 60. Each bar represents the mean \pm SD of evaluated interstitial damage in each group. The evaluation was carried out according to Table 2. The naïve, nontransplanted right lungs of the donors showed no interstitial fibrosis (stripes). A significant increase in interstitial fibrosis at both POD 20 and POD 60 was observed in the allografts of both groups compared with naïve lungs (* $P \leq 0.01$ at POD 20 and $P \leq 0.001$ at POD 60). Significant increases in interstitial fibrosis were observed between POD 20 and POD 60 within the same group ($^{\dagger}P \leq 0.01$).

In contrast, receptor VEGFR-2 showed strong staining in the bronchial epithelium (Table 2). VEGFR-2 staining was moderate in type II cells and vascular endothelial cells, and weak in alveolar macrophages and pneumocytes type I.

Receptor and ligand expression in nontreated LTx allografts

At POD 20, the overall expression of PDGFA, VEGFA, PDGFR- α , and VEGFR-2 was significantly increased in nontreated allografts compared with naïve lungs (Figure 12; PDGFA: $P \leq 0.0001$, VEGFA: $P \leq 0.0001$, VEGFR-2: $P = 0.004$, PDGFR- α $P = 0.029$). However, the increase in PDGFR- α expression, which was high in naïve lungs, was small.

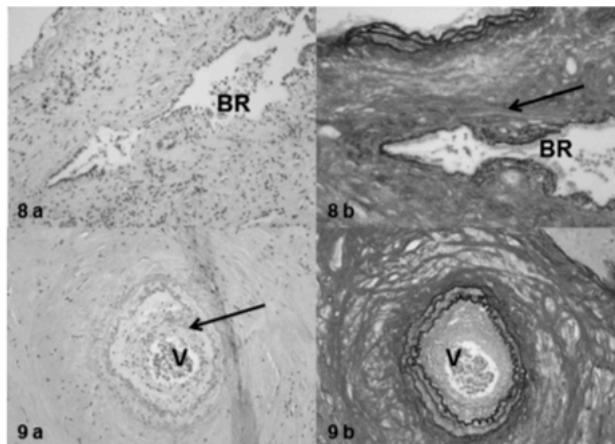
The overall expression of ligands and receptors did not change significantly between POD 20 and POD 60 (Figure 12). Only slight alterations, ± 1 scoring level, were detected in the expression patterns between POD 20 and POD 60 with one exception: the number of PDGFA stained other mononuclear cells increased from weak at POD 20 to strong at POD 60 (Tables 2 and 3).

Receptor and ligand expression in nintedanib-treated LTx allografts

At POD 20, the overall expression of ligands and receptors did not differ significantly between nontreated and nintedanib-treated LTx lung allografts (Figure 12). However, at POD 60, the overall expression of ligands PDGFA and VEGFA and both receptors PDGFR- α and VEGFR-2 in nintedanib-treated LTx allograft cells were significantly reduced compared with nontreated allografts (PDGFA: $P \leq 0.001$, PDGFR- α : $P \leq 0.001$, VEGFA: $P \leq 0.001$, VEGFR-2: $P \leq 0.001$). PDGFR- α expression in nintedanib-treated allograft cells was reduced below the high level in naïve lungs ($P \leq 0.03$). Most striking reductions were detected on bronchial epithelium (PDGFA, PDGFR- α , and VEGFR-2), type II pneumocytes (PDGFR- α), alveolar macrophages (PDGFA and PDGFR- α), and other mononuclear cells (PDGFA) (Table 3).

Analysis of lung collagen content

Lung collagen content in lung allografts of both groups (nontreated group and nintedanib-treated group) was significantly increased compared with



Figures 8 and 9. Chronic bronchiolar rejection (Figure 8) (ISHLT-C2R) and chronic vascular rejection (Figure 9) (ISHLT-D2R) on POD 60 in allografts from rats in the nontreated control group, using HE-staining (Figures 8a and 9a) and Sirius red/Elastica staining (Figures 8b and 9b), 100 \times . **Figure 8a.** Residual infiltration of mononuclear cells was seen in the interstitium. Evidence of epithelial damages was indicative of the terminal bronchioles in these allografts. **Figure 8b.** Peribronchiolar (arrow) and subepithelial fibrosis dominated this histologic section (collagen I-red) (C2R). **Figure 9a.** Fibrointimal thickening (arrow) and perivascular fibrosis (collagen I-red) dominated this section. **Figure 9b.** The strong staining of collagen I confirmed the histologic picture from HE staining.

(nontransplanted right) naïve lungs ($P \leq 0.005$) (Figure 13). The lung collagen content further increased from POD 20 to POD 60 (Figure 13). Nintedanib treatment had no effect on the lung collagen content on POD 20 and POD 60 compared with the nontreated allografts (Figure 13).

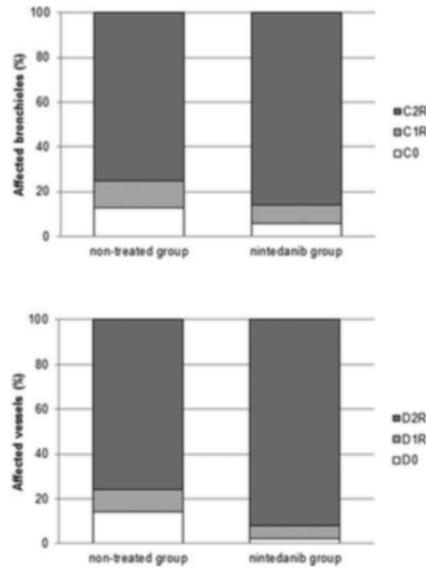
Discussion

The present study describes the effects of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib on the development of CLAD in a rat model of left lung allo-transplantation. Experimental LTx from the F344 to the WKY rat strain results in severe acute rejection and chronic rejection, which can be diagnosed as BO and parenchymatous/interstitial fibrosis, the histologic correlates of BOS and RAS, respectively. Nintedanib did not influence the histopathology of acute rejection early after LTx (POD 20), and did not prevent the development of chronic rejection at long-term follow-up (POD 60). Despite the unchanged histologic pattern in the nintedanib-treated lung allografts compared with the nontreated allografts, significant reductions in the expression of the growth factors PDGFA and VEGFA and their receptors PDGFR- α and VEGFR-2 were

observed in nintedanib-treated allografts compared with nontreated allografts on POD 60. No detrimental effects of nintedanib on wound healing were observed.

Several studies have demonstrated that the growth factor signaling cascades targeted by nintedanib are involved in the pathogenesis of BO after LTx.^[5,17,22-24] Increased concentrations of PDGF were demonstrated in bronchoalveolar lavage fluid from patients with BO and this bronchoalveolar lavage fluid stimulated fibroblast migration, whereas fluid from control patients did not.^[6]

Nintedanib is a tyrosine kinase inhibitor targeting FGF receptor 1, 2, and 3, PDGFR α and β , and VEGF receptor 1, 2, and 3.^[11,12] It also inhibits nonreceptor tyrosine kinases of the Src family.^[11] Nintedanib has been shown to exert antiinflammatory and antifibrotic activity in animal models of lung fibrosis.^[12,15] In our study, nintedanib was used at a dose of 50 mg/kg once daily. Dosing was started 2 days before LTx and continued for 20 or 60 days. At a dose of 50 mg/kg, nintedanib has shown antifibrotic activity in a rat model of bleomycin-induced fibrosis.^[15] The reduced weight gain in the nintedanib-treated animals, and the reduced expression of the growth factors PDGFA, VEGFA and of PDGFR- α and VEGFR-2 at POD 60,



Figures 10 and 11. Effect of nintedanib on development of chronic bronchiolar (Figure 10) and chronic vascular (Figure 11) rejection on POD 60. The bar charts demonstrate the percentage of allografts with no (white bar), mild (light grey bar), and severe (dark grey bar) chronic bronchiolar (C)/vascular (D) degeneration in the non-treated allografts and the nintedanib group. There were no significant differences between groups.

confirm that a pharmacodynamically active dose of nintedanib was used in this study. However, early and sustained treatment with nintedanib after experimental LTx did not decrease the number of rats with histologic signs of chronic allograft rejection (BO and RAS). Based on the results of previous studies, this was unexpected. Monotherapy with the PDGF-inhibitor imatinib showed an inhibitory effect on the development of chronic transplant rejection in animal models, and combination therapy with a VEGFR inhibitor led to an amplification of efficacy in a rat model of tracheal transplantation.^[23-25]

Several findings may help to explain the lack of efficacy of nintedanib in our study. BOS-positive patients have significantly lower concentrations of VEGF in serum and in exhaled breath condensate compared with BOS-negative patients.^[26] VEGF- α is overexpressed in nonobliterated bronchioli from nontransplanted lungs, compared with BO lesions in

transplanted lungs and with nontransplanted controls. Infiltrating macrophages show a strong positivity for VEGF- α staining.^[27] In allografts in experimental obliterative bronchiolitis, a dual role for VEGF has been described. VEGF expression vanished in the epithelium but increased in smooth muscle cells and mononuclear inflammatory cells with progressive loss of epithelium and airway occlusion. Simultaneous VEGF gene transfer and PDGFR inhibition with imatinib preserved respiratory epithelium and prevented luminal occlusion.^[28] Hence, inhibition of both VEGFR and PDGFR by nintedanib potentially combines counter-balancing activities. The contradictory finding by Tikkannen et al.^[23] indicating that combined inhibition of PDGFR and VEGFR was effective in an animal model of obliterative airway disease may be explained by the broader specificity of the tyrosine kinase inhibitors used. Imatinib and vatalanib (PTK/ZK) are tyrosine kinase inhibitors with specificity for c-kit, and imatinib has also been reported to inhibit c-Abl.^[29,30] It can be assumed that c-kit and c-Abl were effectively inhibited in the experiments reported by Tikkannen. The presence of c-kit positive mast cells in obliterative bronchiolitis and consequently the beneficial role of c-kit and c-Abl inhibitors for therapy of chronic fibrosing disease has already been described by Fuehrer and coworkers.^[31] Further evidence for the role of c-kit and c-abl in fibrotic diseases was described by Daniels et al.^[32] and Ding et al.^[33] and was reviewed by Beyer and Distler.^[34] However, c-kit and c-Abl are not reported to be affected by nintedanib.

In contrast to the lack of efficacy of nintedanib on the pathologic features in this model, the immunohistology of the growth factors PDGFA and VEGFA and the receptors PDGFR- α and VEGFR-2 at POD 60 showed decreased expression of these markers in lung allografts treated with nintedanib compared with controls. This reduction was not detected at POD 20. These results indicate that the expression rate of growth factors and receptors is significantly elevated early in the pathogenesis process. In the non-treated lung allografts, the expression of these ligands and receptors remained high at POD 60. Nintedanib treatment did not influence the early increase in the expression of these ligands and receptors, but reduced the increased expression to near-normal levels at POD 60. The overall reduction in the expression of these ligands and receptors resulted prominently from

Table 2. Immunohistology of various lung cells revealed a differential pattern and intensity of growth factors and receptors on POD 20. (Intensity of staining of the specific cells: absent [−], weak [+], moderate [++], and strong [+++].)

	PDGFA			PDGFR- α		
	Naive lung	Nontreated allografts	Nintedanib-treated allografts	Naive lung	Nontreated allograft	Nintedanib-treated allografts
Bronchial epithelium	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Type I cells	−	+	+	+	+	(+)−
Type II cells	+	++	++	+++	++	++
Interstitial cells	−	+	+	−	+	+
Vascular endothelium	++	+	+	++−++	+	+
Alveolar macrophages	++−(++)	++	+	++	++	++−++
Other mononuclear cells	−	+	+	−	+	+
Metaplastic epithelial cells	−	+	+	−	+	+
VEGFA						
	Naive lung			Naive lung		
	Naive lung	Nontreated allograft	Nintedanib-treated allografts	Naive lung	Nontreated allograft	Nintedanib-treated allografts
Bronchial epithelium	++	+++	+++	+++	+++	+++
Type I cells	−	−	−	+	−	−
Type II cells	++	+++	+++	−	+	+
Interstitial cells	−	+	+	++	+	+
Vascular endothelium	++	++	++	++	+	+
Alveolar macrophages	++	+++	+++	+	++	++
Other mononuclear cells	−	++	++	−	++	++
Metaplastic epithelial cells	−	++	++	−	+	+

reduced PDGFA, PDGFR- α , and VEGFR-2 expression on bronchial epithelium, decreased expression of PDGFR- α on type II cells, diminished expression of PDGFA and PDGFR- α on alveolar macrophages, and of PDGFA on other mononuclear cells. The delayed kinetics of the downregulation of the expression of ligands and receptors by nintedanib suggests that blocking target kinases with nintedanib might

indirectly influence the expression of these ligands and receptors.

LTx is a surgical procedure with a severe impact on the patient. Bleeding complications and wound healing impairments would increase risk and impede recovery. As nintedanib is approved for the treatment of patients with IPF, and LTx is the ultima ratio in patients with end-stage IPF, the outcome of the study might give

Table 3. Immunohistology of various lung cells revealed a differential pattern and intensity of growth factors and receptors on POD 60. (Intensity of staining of the specific cells: absent [−], weak [+], moderate [++], and strong [+++].)

	PDGFA			PDGFR- α		
	Naive lung	Nontreated allografts	Nintedanib-treated allografts	Naive lung	Nontreated allograft	Nintedanib-treated allografts
Bronchial epithelium	+++	+++	+	+++	+++	+
Type I cells	−	+	−	+	+	(+)−
Type II cells	+	++	+	+++	+++	+
Interstitial cells	−	+	−	−	+	−
Vascular endothelium	++	++	+	+	+	−
Alveolar macrophages	++−(++)	+++	+	++	+++	+
Other mononuclear cells	−	+++	+	−	++	+
Metaplastic epithelial cells	−	+	+	−	++	+
VEGFA						
	Naive lung			Naive lung		
	Naive lung	Nontreated allografts	Nintedanib-treated allografts	Naive lung	Nontreated allografts	Nintedanib-treated allografts
Bronchial epithelium	++	+++	+++	+++	+++	+
Type I cells	−	−	−	+	+	−
Type II cells	++	+++	+++	++	++	+
Interstitial cells	−	−	−	−	−	−
Vascular endothelium	++	+++	++	++	++	+
Alveolar macrophages	++	++	++	+	+	++
Other mononuclear cells	−	++	++	−	+	+
Metaplastic epithelial cells	−	++	+	−	++	+

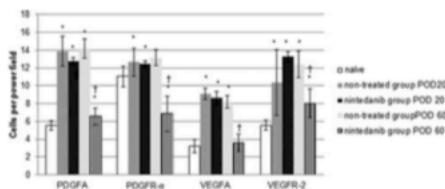


Figure 12. Expression of growth factors and their receptors. Immunohistologic evaluation. Number of PDGFA, PDGFR- α , VEGFA, and VEGFR-2 positive stained cells on POD 20 and POD 60. Cells were counted per power field ($200\times$). Each bar represents the mean \pm SD of positive stained cells in each group. On POD 20, PDGFA, PDGFR- α , VEGFA, and VEGFR-2 were significantly increased in both transplanted, (nontreated (grey bars) and nintedanib-treated (black bars) groups compared to the nontransplanted native lungs (white bars) ($^*P \leq 0.02$). While the number of positively stained cells in allografts from the nontreated group remained high on POD 60 (angled striped bars), a significant reduction of growth factors and their receptors between the nontreated group and the nintedanib-group could be observed (vertically striped bars) ($^{\dagger}P \leq 0.001$).

some insights into the question of whether nintedanib treatment shortly before LTx might impact outcome due to its antiangiogenic activity. Previous studies have linked inhibition of the VEGF/VEGFR signaling cascade to bleeding and wound healing impairment.^[35] In our study, nintedanib treatment started 2 days before surgical LTx and maintained for 20 or 60 days had no obvious detrimental effects on

bleeding or wound healing. This is in accordance with the results of a postoperative wound healing study in rats, in which no effect on gross wound healing, no impairment of histologic healing, and no decrease in wound tensile strength were seen.^[36]

In our animal model of allogenic left LTx, we demonstrated pathologic alterations resembling aspects of acute and CLAD. Nintedanib did not influence the pathologic changes in the lung 20 or 60 days after transplantation. Nintedanib reduced the expression of the growth factors PDGFA and VEGFA and of the receptors PDGFR- α and VEGFR-2 60 days after LTx. No obvious impairment in wound healing was detected in animals treated with nintedanib. While nintedanib has been shown to have antifibrotic activity in several animal models of lung fibrosis, the activity in our left LTx model seems marginal. Experiments with a combination of nintedanib and immunosuppressive drugs might demonstrate improved efficacy.

Acknowledgments

Editorial assistance, supported financially by Boehringer Ingelheim, was provided by Julie Fleming of FleishmanHillard Fishburn, London, UK, during the preparation of this article. The authors were fully responsible for all content and editorial decisions, were involved at all stages of manuscript development, and have approved the final version of the manuscript, which reflects the authors' interpretation and conclusions.

Declaration of interest

Lutz Wollin is an employee of Boehringer Ingelheim the inventor of nintedanib used in this study.

Funding

The study was supported by Boehringer Ingelheim Pharma, Germany.

References

- [1] Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later—progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2761–2766.
- [2] Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report—2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(10):1009–1024.

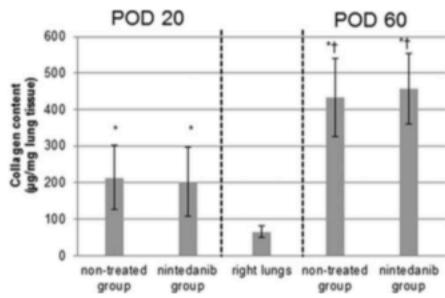


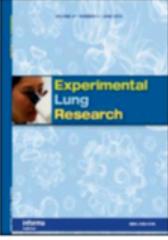
Figure 13. Collagen content in native lungs and lung allografts on POD 20 and POD 60. Each bar presents the mean \pm SD of collagen (μg) in one mg lung tissue from each group (native lungs, $n = 6$; nontreated group: POD 20, $n = 6$; POD 60, $n = 6$; nintedanib group: POD 20, $n = 6$; POD 60, $n = 6$). The collagen content in lung allografts in each group was significantly higher than that in the native lungs on POD 20 and POD 60 ($^*P \leq 0.005$). Nintedanib treatment did not reduce collagen content. A significant increase in collagen content on POD 60 compared with POD 20 was observed within each group ($^{\dagger}P \leq 0.005$).

- [3] Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(2):127–133.
- [4] Todd JL, Palmer SM. Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. *Chest*. 2011;140(2):502–508.
- [5] Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, Hathwar V, Neuringer IP. Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(3):417–422.
- [6] Hertz MI, Henke CA, Nakhleh RE, Harmon KR, Marinelli WA, Fox JM et al. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10385–10389.
- [7] Kallio EA, Koskinen PK, Aavik E, Buchdunger E, Lemström KB. Role of platelet-derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1324–1332.
- [8] Krebs R, Tikkainen JM, Ropponen JO, Jeltsch M, Jokinen JJ, Ylä-Hertuala S et al. Critical role of VEGF-C/VEGFR-3 signaling in innate and adaptive immune responses in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Pathol*. 2012;181(5):1607–1620.
- [9] Sato M, Hwang DM, Waddell TK, Singer LG, Keshavjee S. Progression pattern of restrictive allograft syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(1):23–30.
- [10] Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2071–2082.
- [11] Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U et al. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*. 2008;68(12):4774–4782.
- [12] Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(2):209–220.
- [13] Hirt SW, You XM, Möller F, Boeke K, Starke M, Spranger et al. Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: implication of acute rejection and the time point of treatment. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(6):542–548.
- [14] von Süßkind-Schwendi M, Ruemmele P, Schmid C, Hirt SW, Lehle K. Lung transplantation in the fischer 344-wistarkyoto 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.
- [15] Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1434–1445.
- [16] Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM et al. 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.
- [17] von Süesskind-Schwendi M, Valenti V, Haneya A, Pühler T, Bewig B, Schmid C et al. Synergism of imatinib mesylate and everolimus in attenuation of bronchiolitis obliterans after rat LTX. *Histol Histopathol*. 2013;28(10):1273–1284.
- [18] Hübner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolt H et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008;44(4):507–511, 514–517.
- [19] Thomas MA, Lemmer B. HistoGreen: a new alternative to 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB) as a peroxidase substrate in immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2005;14(2):107–118.
- [20] Laurent GJ. Rates of collagen synthesis in lung, skin and muscle obtained in vivo by a simplified method using [³H]proline. *Biochem J*. 1982;206(3):535–544.
- [21] Mutsaers SE, Marshall RP, Goldsack NR, Laurent GJ, McAnulty RJ. Effect of endothelin receptor antagonists (BQ-485, Ro 47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998;11(2–3):221–225.
- [22] al-Dossari GA, Jessurun J, Bolman RM 3rd, Kshettry VR, King MB, Murray JJ, Hertz MI. Pathogenesis of obliterative bronchiolitis. Possible roles of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor. *Transplantation*. 1995;59(1):143–145.
- [23] Tikkainen JM, Hollmén M, Nykänen AI, Wood J, Koskinen PK, Lemström KB. Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(10):1145–1152.
- [24] Alho HS, Maasila PK, Vainikka T, Salminen US. Platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β , and connective tissue growth factor in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Exp Lung Res*. 2007;33(6):303–320.
- [25] Verleden SE, Vos R, Mertens V, Willems-Widyastuti A, De Vleeschauwer SI, Dupont LJ et al. Heterogeneity of chronic lung allograft dysfunction: insights from protein expression in bronchoalveolar lavage. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(6):667–673.
- [26] Kastelijn EA, Rijkers GT, Van Moorsel CH, Zanen P, Kwakkel-van Erp JM, Van De Graaf EA et al. Systemic and exhaled cytokine and chemokine profiles are associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(9):997–1008.
- [27] Jonigk D, Theophile K, Hussein K, Bock O, Lehmann U, Bockmeyer CL et al. Obliterative airway remodelling in transplanted and non-transplanted lungs. *Virchows Arch*. 2010;457(3):369–380.
- [28] Krebs R, Tikkainen JM, Nykänen AI, Jeltsch M, Jokinen JJ, Ylä-Hertuala S et al. Dual role of vascular

- endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(12):1421–1429.
- [29] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor ST1571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(1):139–145.
- [30] Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* 2000;60(8):2178–2189.
- [31] Fuehrer NE, Marchevsky AM, Jagirdar J. Presence of c-KIT-positive mast cells in obliterative bronchiolitis from diverse causes. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(9):1420–1425.
- [32] Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH et al. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1308–1316.
- [33] Ding L, Dolgachev V, Wu Z, Liu T, Nakashima T, Wu Z et al. Essential role of stem cell factor-c-Kit signalling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2013;230(2):205–214.
- [34] Beyer C, Distler JH. Tyrosine kinase signaling in fibrotic disorders: translation of basic research to human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):897–904.
- [35] Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Curr Clin Pharmacol.* 2008;3(2):132–143.
- [36] Roman CD, Choy H, Nanney L, Riordan C, Parman K, Johnson D et al. Vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis inhibition and postoperative wound healing in rats. *J Surg Res.* 2002;105(1):43–47.

10.2.2 Zweite Veröffentlichung 2020

Boxhammer, E., Lehle, K., Schmid C. & von Süßkind-Schwendi, M., 2020. Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction? *Experimental Lung Research*, 46(5), pp.128–145



Experimental Lung Research

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ISSN: 0190-2148 (Print) 1521-0499 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ielu20>

Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction?

Elke Boxhammer, Karla Lehle, Christof Schmid & Marietta von Suesskind-Schwendi

To cite this article: Elke Boxhammer, Karla Lehle, Christof Schmid & Marietta von Suesskind-Schwendi (2020): Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction?, *Experimental Lung Research*, DOI: [10.1080/01902148.2020.1738594](https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1738594)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1738594>

 Published online: 13 Mar 2020.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ielu20>



Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction?

Elke Boxhammer, Karla Lehle, Christof Schmid and Marietta von Suesskind-Schwendi

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

ABSTRACT

Background: The long-term survival after lung transplantation (LTx) is often limited by the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). Increased oxidative stress has been found to occur in chronic lung allograft dysfunction because of several risk factors, e.g. immunological factors or drug related factors. The aim of this study was to investigate the anti-oxidative effect of the receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor nintedanib on immunologically induced oxidative stress and on drug induced oxidative stress.

Methods: In-vivo studies were used for investigation of immunologically induced oxidative stress: Immunohistochemistry of transglutaminase-2 (TGM-2) was used to figure out a potential anti-oxidative effect of receptor tyrosine kinase inhibitor nintedanib in a rat model of allogeneic left LTx. In-vitro studies were used for investigation of drug induced oxidative stress: Cell viability assay, 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) and immunofluorescence of transglutaminase-2 were disposed to examine the potential impact of nintedanib on cyclosporin A (CsA) treated lung fibroblasts of the rat.

Results: In-vivo studies: Allogeneic transplanted animals without drug interaction showed severe chronic rejection and an excessive expression of TGM-2, whereas the application of nintedanib significantly decreased the number of TGM-2 positive cells. In-vitro studies: Concentrations of CsA ranging from 250 ng/ml to 500 ng/ml demonstrated oxidative stress caused by an increased production of reactive oxygen species (ROS) and an overexpression of TGM-2 without inducing apoptosis in cells. Concentrations of more than 1000 ng/ml led to a considerable decrease of cellularity. 30 min-pre-incubation with nintedanib at a concentration between 25 and 100 nM reduced generation of intracellular ROS and expression of TGM-2.

Conclusion: These results demonstrate a downregulation of ROS and TGM-2 by pretreatment with the receptor tyrosine kinase inhibitor nintedanib and present its potential anti-oxidative and immunomodulatory effect in the treatment of chronic lung allograft dysfunction.

ARTICLE HISTORY

Received 5 April 2019

Accepted 2 March 2020

KEYWORDS

Cyclosporin A; chronic lung allograft dysfunction; nintedanib; oxidative stress; transglutaminase-2

Introduction

Long term survival after lung transplantation is still far behind other organ transplants. This is mainly due to the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD), with bronchiolitis obliterans (BO) being the most frequent manifestation and restrictive allograft syndrome (RAS) being a rather novel distinct entity.¹ Current treatment of BO-syndrome (BOS), the clinical correlate of BO, is disappointing despite advances in surgical techniques and improvements in immunosuppressive therapies.² The pathohistology of both entities is dominated by uncontrolled

scarring processes, either of small airways (BO) or of interstitial lobe tissue (RAS).³

The exact pathomechanism of BO still remains unclear. It is widely perceived as the physiological surrogate of immunologically-mediated phenomena² due to many observations that include its association with alloimmune processes,⁴ non-alloimmune processes,⁵ and autoimmune processes.⁶ Unfortunately, various interventions, including intensified immunosuppression, may have little or no effect on the progressive loss of allograft.² To make matters worse, there is evidence in experimental models that treatment

with the calcineurin-inhibitor cyclosporine A (CsA) mediates chronic airway rejections.⁷

There are indications that oxidative stress (OS) is involved in the development and severity of CLAD occurring in post-transplant patients.^{8,9} Oxidative stress in lungs and airways is described as a result of an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the functioning status of antioxidant systems.⁹ Oxidative stress is a phenomenon, which is involved in a wide spectrum of fibrotic lung diseases, e.g. chronic obstructive pulmonary disease,¹⁰ lung fibrosis,¹¹ and lung cancer.^{12,13} Jeon et al.¹⁴ described an increased production of ROS in bronchial epithelial cells by CsA introduction. In addition, Lee et al.¹⁵ demonstrated a significant upregulation of ROS in conjunction with elevated transglutaminase-2 (TGM-2) expression in human gingival fibroblasts.

TGM-2 is a widely distributed member of the transglutaminase families that stabilizes extracellular matrix proteins by cross-linking and making them highly resistant to protease degeneration.¹⁶ Furthermore, Philip et al.¹⁷ described a strong expression of TGM-2 in tissue and fibroblasts of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Therefore, TGM-2 might be a good marker for oxidative stress in chronic allograft lung disorders. However, data regarding TGM-2 expression after LTx are missing.

The present study was undertaken to investigate expression of TGM-2 in an in-vivo LTx animal model and in-vitro studies with lung fibroblasts. Besides verifying TGM-2 expression, we wanted to prove, whether the receptor tyrosine kinase inhibitor nintedanib shows anti-oxidative properties by reducing TGM-2 expression after experimental LTx or after drug induced (CsA) stimulated ROS activation of fibroblasts. Nintedanib is effective in fibrotic disorders, such as idiopathic lung fibrosis,¹⁸ and interacts as an intracellular inhibitor of the receptors of the profibrotic mediators platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor (FGF).^{19,20}

A previous study of our working group²¹ with exactly the same experimental in-vivo setting (LTx model) could demonstrate a downregulation of growth factors/receptors (VEGF, PDGF) by

nintedanib, but without relevant effects regarding fibrotic alterations in CLAD. With the following experimental study, we want to deal with oxidative stress in context to chronic lung rejection processes and with anti-oxidative properties of receptor tyrosine kinase inhibitor nintedanib as a potential therapeutic starting point against fibrotic disorders.

Material and methods

In-vivo studies

Animals and experimental design

For the in-vivo studies an allogeneic orthotopic left LTx animal model using moderately histoincompatible strains of Fisher (F344) and Wistar Kyoto (WKY) rats was performed as described previously.²² Rats were purchased from Charles-River (Sulzfeld, Germany, 280±20g initial weight) and received care in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, No. 85-23, 1985). The animals (n=6) were treated with nintedanib (Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany) once daily by oral gavage at 50 mg/kg starting 2 days before transplantation surgery. The dosage was based on previous studies of nintedanib in rodent models of lung fibrosis.^{23,24} A non-treated control group (n=6) received vehicle only. The animals were sacrificed on post-operative day (POD) 60 to evaluate the anti-oxidative effect of nintedanib on the development of chronic rejection.

TGM-2 immunohistochemistry

The expression of TGM-2 was analyzed by immunohistochemical staining. On POD 60, allografts and naïve right lungs from donor rats were surgically removed, fixed in 10% buffered paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), embedded into paraffin, and sliced into 5 µm sections. Tissue sections were blocked with 3% hydrogen peroxide solution (Merck, Darmstadt, Germany) and heated for 20 minutes in 1x Target Retrieval Solution (Dako, Hamburg, Germany). The sections were incubated with 10%

normal goat serum (Sigma-Aldrich) (30 minutes, room temperature, RT), rinsed with phosphate buffered saline (PBS), and incubated with primary TGM-2-antibody (Novus Biologicals NBP2-44595, Littleton, US; diluted 1:50, 16 hours, 4 °C). After another rinsing procedure, the sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (Vector, Burlingame, US; diluted 1:300, 1 hour, RT) and visualized with streptavidin-alkaline phosphatase (Vector) with Fast Red TR (Sigma-Aldrich) as a specific substrate. Finally, the sections were covered with VectaShield (Vector). The number of positive-stained cells was counted in a blinded fashion by two independent examiners using 10 randomly selected microscopic power fields (magnification 200x) per graft.

Double immunofluorescence staining using

Vimentin, CD 31 and ED 2 in comparison to TGM-2

Tissue sections were fixed, blocked, and heated as mentioned above. Afterwards sections were incubated with tris-buffered saline (TBS) buffer containing 2% normal donkey serum (NDS) (60 min, RT). After a rinsing process with TBS, primary antibodies were incubated for 16 hours at 4 °C. Therefore, Vimentin- (Santa Cruz sc6260, Dallas, US; diluted 1:400) and ED 2/CD 163-antibody (BioRad MCA342GA, Hercules, US; diluted 1:100) were combined with TGM-2-antibody (Novus Biologicals NBP2-44595, Littleton, US; diluted 1:50), whereas CD 31-antibody (Novus Biologicals NB100-2284; diluted 1:100) was merged with TGM-2-antibody (Invitrogen PA5-95256, Carlsbad, US; diluted 1:200). Tissue sections again were washed a few times with TBS and subsequently treated with fluorescent secondary antibodies (Dianova Alexa-Fluor 594 711-585-152, Alexa-Fluor 488 711-545-152, Alexa-Fluor 488 715-585-150, Alexa Fluor 594 715-545-15-1, Hamburg, Germany; diluted 1:300). Staining with DAPI in a dilution of 1:200 was done. Finally, the slides were covered in fluoromount and examined under fluorescent light.

In-vitro studies

Fibroblast cultures and cell treatment

In-vitro experiments were carried out on the culture of pulmonary fibroblasts in WKY-rats.

Non-transplanted right lungs were subjected to mechanical disaggregation, treated with collagenase (15 min, 37 °C), washed with PBS, resuspended in culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal calf serum (FCS) + glutamine, gentamycin and amphotericin (Sigma-Aldrich), and transferred to culture flasks. Fibroblasts were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 9% CO₂. Three different preparations of fibroblasts were used (passage 4 to 8).

Cell viability assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) assay (Promega, Mannheim, Germany) was used for the detection of a potential cytotoxicity.^{25,26}

For this purpose, fibroblasts (2.5 – 5.0 × 10³ cells in 150 µl culture medium) were seeded into flat-bottomed 96-well culture plates (for cell viability assay) for 2 or 3 days to a confluence of 70 – 90%. Medium was replaced with fresh medium containing a serial dilution of CsA (0 – 5000 ng/ml, Novartis, Basel, Switzerland) or nintedanib (0 – 1000 nM). Stock solutions of CsA and nintedanib were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in medium was 0.1% (vol/vol). Cells were incubated for 8 hours. Afterwards, treated cells were washed carefully with PBS and incubated with 100 µl of DMEM (without FCS) and 20 µl of the working solution containing MTT (60 minutes, 37 °C, in the dark). The absorbance (490/650 nm) was measured using a spectrophotometer (60 minutes). The optical density values were expressed as a percentage of formazan formation of non-treated cells.

Measurement of intracellular ROS via DCFDA

The inserted dye 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) (Sigma-Aldrich) was used to measure intracellular levels of ROS^{27,28} and to quantify the effect of CsA and nintedanib on the development of oxidative stress.

Fibroblasts (2.5 – 5 × 10³ cells) were plated on 8-ChamberSlides (Thermo Fisher, Munich, Germany) for 2 – 3 days (70 – 90% confluence). Fibroblasts from the intervention group were pre-treated (30 min) with nintedanib (25 – 100 nM),

whereas fibroblasts from the control group received culture medium only. Oxidative stress was induced by adding CsA (250 and 500 ng/ml, 8 hours). Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, Sigma-Aldrich, 10 μ M, 1 hour) – commonly known as a model substance for evaluation of mechanisms of cellular alterations resulting from oxidative stress in cells and tissues²⁹ – was used as positive control. Fibroblasts in culture medium only acted as negative control.

Cells from the different study groups were washed with PBS and treated with DCFDA in FCS-free DMEM (10 μ M, 10 minutes, 37 °C, in the dark). DCFDA was dissolved in ethanol and diluted in culture medium [final concentration of ethanol, 0.1% (vol/vol)]. Fluorescence microscopy was used to visualize the intensity of DCFDA-staining at 490 nm/525 nm (excitation/emission) after 3 seconds of exposure time.

Expression of TGM-2 in immunofluorescence

Fibroblasts were seeded on 8-ChamberSlides and treated with nintedanib, CsA, TBHP, and culture medium as mentioned above. Cells were washed in PBS and fixed in 2% paraformaldehyde (20 minutes, RT). Fibroblasts were washed with 0.1% phosphate buffered saline with tween-20 (PBST) and incubated with normal donkey serum (20 minutes). The TGM-2 antibody (abcam ab176463, Cambridge, UK) was diluted in PBST containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) (1:250) and incubated over night at 4 °C. The second antibody Donkey IgG anti-Rabbit IgG (H + L)-Alexa Fluor 594 (Dianova 711-585-152) (dilution, 1:400 in PBST) was subjoined for 1 hour at RT. Counterstaining with DAPI (Sigma-Aldrich) (diluted 1:200) visualized the nuclei of the cells. The slides were covered in fluoromount. Fluorescence microscopy (TRITC, tetramethylrhodamine, 557 nm/576 nm, excitation/emission) was used to visualize the signals.

The number of positive-stained cells in DCFDA, TGM-2, and DAPI staining was counted in a blinded fashion by two independent examiners using 10 randomly selected microscopic power fields (magnification 100x) per graft.

Data requisition and statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). For the in-vivo studies the Kruskal-Wallis test was used to compare the non-treated group with the nintedanib-treated group. A Wilcoxon-Mann-Whitney U-test was applied as a non-parametric statistical test to assess whether the nintedanib-group tended to have a positive outcome on oxidative stress compared with the non-treated group. The analysis of in-vitro-studies concerning cell viability assay was performed by using the T-test of independent samples. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Nintedanib down-regulated the expression of TGM-2 in transplanted lungs

Representative images of stained lung tissue sections of TGM-2 are shown in Figure 1. The non-transplanted right lungs (Figure 1a) from control and treated animals showed a normal architecture with the characteristic alveolar structure. There was no sign of infection or pathological changes. The amount of TGM-2 positive cells per microscopic field was very low in the control and nintedanib groups (Figures 1a and 2). In contrast, allografts from non-treated control animals (Figure 1b) represented chronic airway and chronic vascular rejection. The tissue sections showed extensive interstitial mononuclear cell infiltrates. Interstitial fibrosis and obliteration of small airways by granulation tissue were omnipresent in all preparations (data not shown). In the same sections, the expression of TGM-2 positive cells was upregulated (Figures 1b and 2). The amount of TGM-2 positive cells in the allograft sections was significantly higher compared to the non-transplanted right lungs (11.4 ± 3.5 vs 0.8 ± 1.0 cells per microscopic field, respectively; $p \leq 0.05$). The application of nintedanib (Figure 1c) did not prevent the development of severe chronic bronchiolar and vascular rejection. However, the amount of TGM-2 positive cells per microscopic field (3.5 ± 1.0 cells per microscopic field) as well as the staining intensity of the positive cells decreased significantly ($p \leq 0.05$).

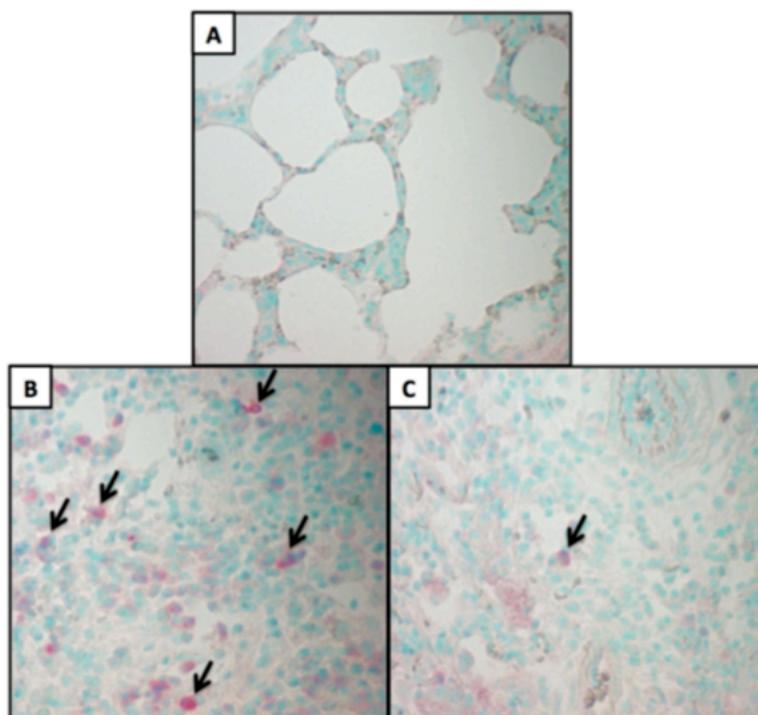


Figure 1. Effect of RTK inhibitor nintedanib on TGM-2 expression in animal model of left allogeneic lung transplantation. (magnification 200x).

Tissue of right, non-transplanted animal lungs (a) demonstrated no signs of TGM-2 positive-stained cells. In contrast, the transplanted left lungs (b) of control animals (no drug administration) showed a clear expression of TGM-2 (arrows). The oral gavage of nintedanib reduced the number of TGM-2 positive cells (arrow) in transplanted lung tissue (c).

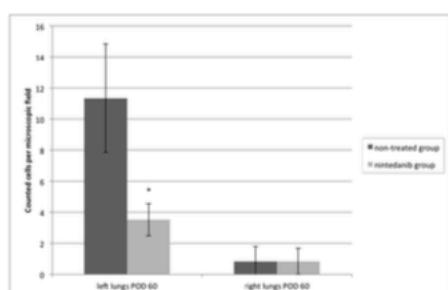


Figure 2. Expression of TGM-2 in immunohistochemistry of in-vivo studies.

Each bar represents the mean \pm SD of positive-stained cells in each group. * describes significant differences ($p \leq 0.05$) from control values (left lung of non-treated group). Application of nintedanib decreased significantly the expression of TGM-2 in comparison to non-treated group. Non-transplanted, right lungs showed low levels of TGM-2 expression.

compared to non-treated allografts (Figures 1c and 2).

Double immunofluorescence detected lung fibroblasts as main target cells of TGM-2 expression

To analyze the target cells of TGM-2 expression, double immunofluorescence staining was used. Representative images of control lung tissue with double staining are shown in Figure 3.

Vimentin antibody was applied to identify lung fibroblasts (Figure 3a,b), CD 31 antibody to highlight endothelial cells (Figure 3c,d), and ED 2/CD 163 antibody to mark alveolar macrophages (Figure 3e,f). For a better overview, TGM-2 expression was continuously outlined with red

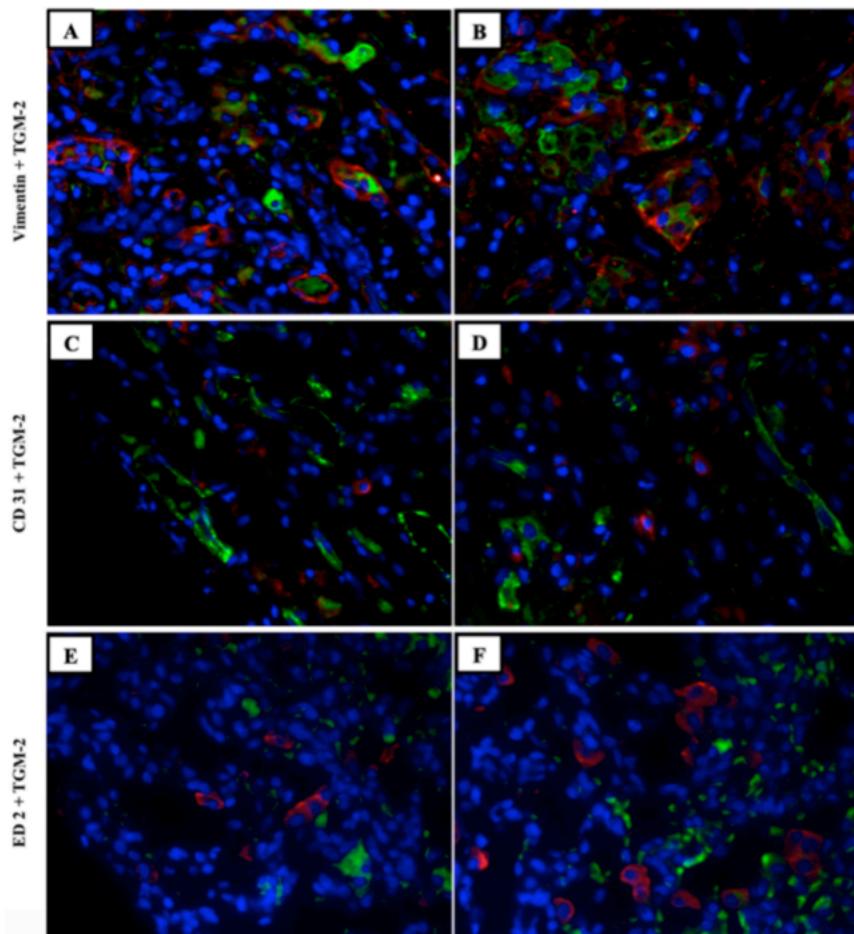


Figure 3. Double immunofluorescence-staining in animal model of left allogeneic lung transplantation. (magnification 100x). Tissue of transplanted left lungs of control animals were stained with TGM-2-antibody (continuously red fluorescence) and a respective other antibody (Vimentin, CD 31 and ED 2 - green fluorescence). In each case, two sample example images were provided (a–f). A combined staining of TGM-2- and Vimentin-antibody – a typical marker of fibroblasts – represent a double marking of cells (3A,B). In a combination of TGM-2- and CD 31-antibody as a marker for endothelial cells (c,d) and TGM-2- with ED 2/CD 163-antibody as a marker for alveolar macrophages (e,f) a double marking of cells could rarely be observed.

fluorescence, whereas the respective other antibody was represented in green color. The entirety of all results could demonstrate a double marking of cells in Vimentin and TGM-2 staining (Figure 3a,b), whereas double marking could be rarely observed in combined coloring of TGM-2 and CD 31 (Figure 3c,d), or TGM-2 and ED 2 (3E,

3F). As Vimentin outlines the main intermediate filament in fibroblasts,³⁰ the double marking of TGM-2 and Vimentin led to the conclusion that in chronic fibrotic processes of the lung fibroblasts represent the main target cells of TGM-2 expression. In this context, lung fibroblasts were applied in in-vitro studies.

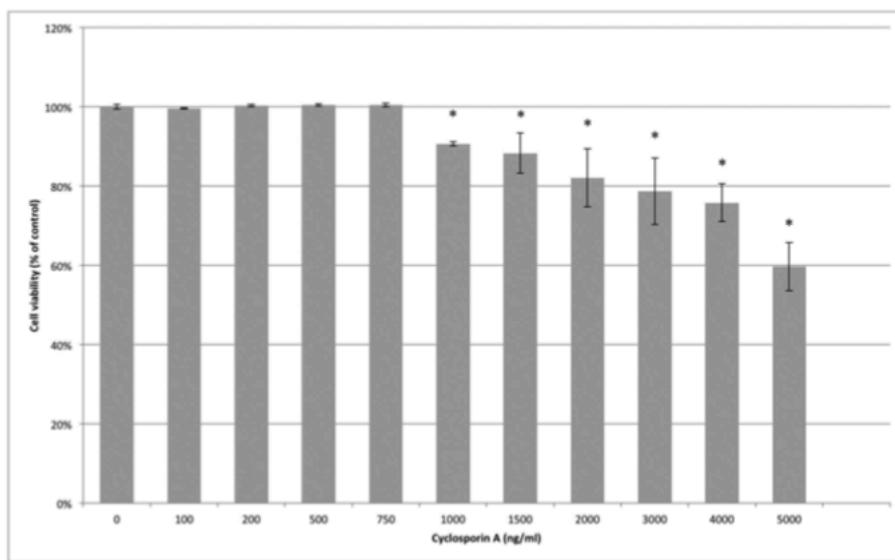


Figure 4. Effects of various CsA-concentrations on cell viability (MTT assay) of lung fibroblasts of the rat. Results are expressed as percentages of absorbance in comparison to the untreated control (0 ng/ml). Each bar represents the mean \pm SD. * describes significant differences ($p \leq 0.05$) from control values. Inserted concentrations up to 750 ng/ml CsA for 8 hours did not cause cytotoxicity to the cells. After reaching 1000 ng/ml, the cellularity decreased significantly compared to control.

CsA induced intracellular ROS and an increased expression of TGM-2 in lung fibroblasts

In this study CsA was used as an inducer of oxidative stress for in-vitro experiments.¹⁵ The cytotoxicity of various concentrations (0 – 5000 ng/ml) of CsA on rat lung fibroblasts by MTT cell viability assay is shown in Figure 4. Treatment of fibroblasts with CsA, at concentrations ranging from 0 to 750 ng/ml, for 8 h had no cytotoxic effect ($p > 0.05$). Higher concentrations than 1000 ng/ml significantly reduced the metabolic activity of the cells ($p \leq 0.05$). Therefore, non-toxic concentrations of CsA (250 and 500 ng/ml) were used to evoke oxidative stress in the cells. TBHP was used as a positive reference. Treatment with culture medium did not induce oxidative stress (Figure 5a,c), while TBHP significantly increased the number of cells with extensive DCF fluorescence (Figure 5b, $p \leq 0.001$) and elevated TGM-2 expression (Figure 5d, $p \leq 0.01$). Due to increased cytosolic ROS production the TBHP-treated cells showed extensive green

staining along with alterations in cell shape. Simultaneously, the application of TBHP led to a distinct thinning of cellular monolayer in comparison to treatment with culture medium (Figure 5e,f, $p \leq 0.01$).

Anti-oxidative effect of nintedanib

Nintedanib was inserted as an antioxidant to reduce the development of oxidative stress in rat lung fibroblasts. The cells were treated with increasing concentrations (0 – 1000 nM) of nintedanib for 8 h. There was no alteration in the MTT cell viability assay (compared to control: 25 nM, 99 \pm 3%; 50 nM, 98 \pm 1%; 100 nM, 96 \pm 4%; 500 nM, 94 \pm 1%; 1000 nM, 94 \pm 4%; not significant). Therefore, cells were preincubated with low concentrations of nintedanib (25,50,100 nM) to protect the cells against CsA-induced oxidative stress.

DCFDA assay was used to demonstrate that both concentrations of CsA upregulated the

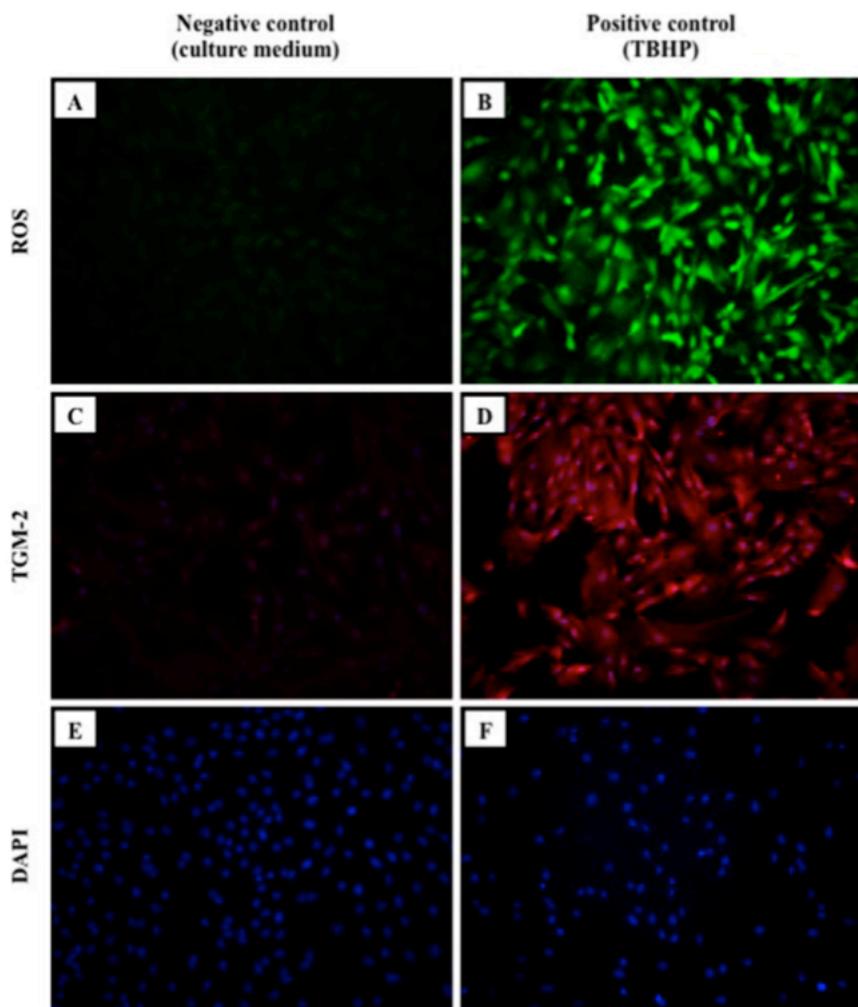


Figure 5. Expression of ROS (via DCFDA assay), TGM-2, and DAPI immunofluorescence by applying culture medium and TBHP in lung fibroblasts of the rat. (magnification 100 \times). Culture medium was used as a negative and TBHP as a positive reference. Use of culture medium did not induce oxidative stress in fibroblasts (4a,c), whereas the application of TBHP increased the number of cells with extensive DCF fluorescence (4b) and TGM-2 expression (4d). Simultaneously, cultivated fibroblasts with culture medium showed in DAPI immunofluorescence a dense cell monolayer (4e), TBHP in contrast reduced considerably cell density (4f).

intracellular ROS generation (Figure 6a,e, $p \leq 0.01$). Doubling of CsA levels significantly increased ROS generation (Figure 9a,b, $p \leq 0.05$). In addition, CsA induced the TGM-2 expression in rat lung fibroblasts (Figure 7a,e, $p \leq 0.05$). The

number of TGM-2 positive cells tended to increase with higher CsA levels ($p = 0.079$).

Pretreatment of fibroblasts with nintedanib for 30 min prevented the induction of oxidative stress after adding CsA (Figures 6 and 7). Just 25 nM

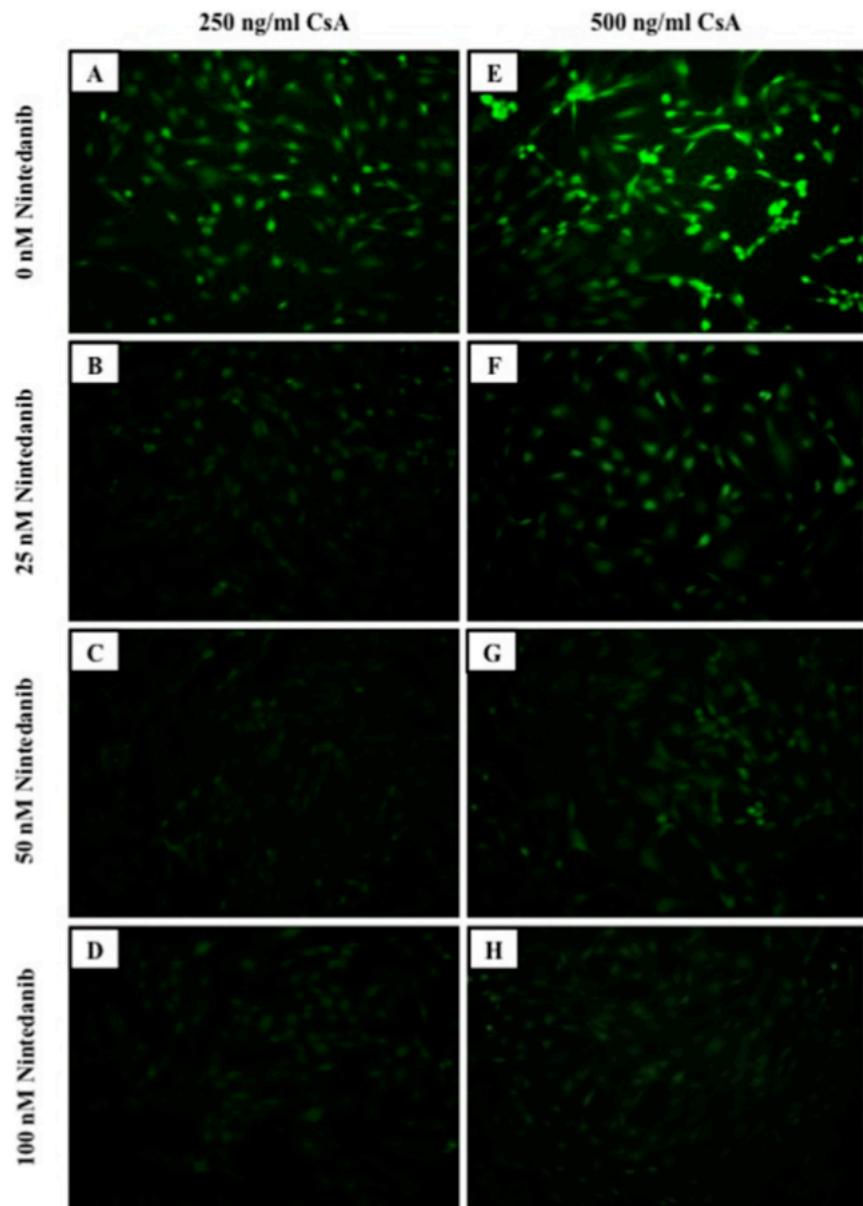


Figure 6. Representative immunofluorescence of the effect of nintedanib on CsA-induced intracellular ROS in lung fibroblasts of the rat. (magnification 100x).

Both applied concentrations of CsA (250 and 500 ng/ml) upregulated the intracellular ROS generation (5a,e). Preincubation of nintedanib with concentrations between 25 and 100 nM (5b-d, f-h) visually reduced the number of ROS positive-stained cells and could protect cells against CsA-induced oxidative stress.

nintedanib already significantly reduced the CsA-induced generation of ROS by a factor of 1.7 ± 0.1 and 1.9 ± 0.1 for 250 ng/ml and 500 ng/ml CsA ($p \leq 0.001$; **Figures 6b,f** and **9a,b**), respectively, and the CsA-induced upregulation of TGM-2 by a factor of 1.7 ± 0.4 and 1.5 ± 0.1 for 250 ng/ml and 500 ng/ml CsA ($p \leq 0.001$; **Figures 7b,f** and **9c,d**), respectively. The concentration-dependent effects of nintedanib allowed the calculation of the EC50. The mean EC50 (DCFDA fluorescence) was 27.1 ± 0.9 nM and 28.3 ± 1.8 nM for 250 ng/ml and 500 ng/ml CsA, respectively (not different). The mean EC50 (TGM-2 expression) was 28.6 ± 7.7 nM and 39.6 ± 1.1 nM for 250 ng/ml and 500 ng/ml CsA, respectively (not different).

In addition, pretreatment with nintedanib not only protected cells from CsA-induced oxidative stress but also maintained the integrity of the cell monolayer. CsA significantly reduced cell density of cultivated fibroblasts (**Figure 8a,e**). The reduction in cell number in this study can't be explained by apoptosis. According to our observations, fibroblasts lost their natural adherence because of several working steps (e.g. washing procedures, addition of culture medium, CsA, DCFDA etc.), so that they were washed up in vital condition. However, pretreatment with 50 and 100 nM nintedanib prevented loss of cells and improved adherence due to CsA treatment (**Figure 6b-d** and f-h). Representative images of DFCDA-, TGM-2-, and DAPI-stained cells are shown in **Figures 6-8**; a graphical overview of all generated data is represented in **Figure 9**.

Discussion

In the present study the anti-oxidative potential of nintedanib was analyzed in an in-vivo rat F344-to-WKY LTx model and in an in-vitro model with cultivated rat lung fibroblasts. Without therapy, histology of lung allografts presented a remarkable increase of TGM-2 expression – an enzyme, which is elevated after increased production of ROS and is responsible for the stabilization of the extracellular matrix in physiological processes (e.g. wound healing) as well as in fibrotic diseases.³¹ Treatment with nintedanib showed a significant reduction of TGM-2

expression. Inducing oxidative stress via CsA in cultivated rat lung fibroblasts resulted in increased ROS levels in conjunction with increased TGM-2 expression. Consistent with the results of the in-vivo study, nintedanib significantly reduces the expression of TGM-2 after ROS stimulation, regardless of the trigger of oxidative stress.

Oxidative stress has been implicated in various fibrotic lung disorders³² including asthma, COPD, cystic fibrosis, and idiopathic pulmonary fibrosis.³³ In addition, it was also documented in acute and chronic lung transplant rejection (CLAD).⁵ As the pathogenesis of CLAD is still unclear and described as multifactorial, oxidative stress is one of the key mechanisms affecting the outcome throughout the course of organ transplantation.³⁴ It is widely believed that the redox balance is dysregulated during ischemia and reperfusion and causes subsequent oxidative injury, resulting from the formation of ROS [5,8,35] Williams et al.³⁶ already demonstrated an oxidative stress situation in serum and BAL of lung transplant recipients prior and post transplantation. This was confirmed by Scholma et al.³⁶ and by Behr et al.³⁷ Scholma and coworkers³⁸ discovered a significant increase of neutrophils, interleukin (IL)-6, and IL-8 in the BAL fluid of BOS patients in comparison to the respective control group. Behr and coworkers³⁷ examined the BAL fluid of BOS patients after lung- and combined heart-lung transplantation. They found evidence that the investigated cohort demonstrated exceeding oxidative stress levels and decreased antioxidant defense systems. Oxidative stress acts as a possible trigger of chronic degenerative changes in the lungs. Unfortunately, intensified immunosuppression has no effect on the progressive loss of allograft.² The calcineurin-inhibitor cyclosporine A is an immunosuppressive substance, which is usually applied to prevent organ rejection after transplantation and to treat autoimmune diseases.³⁹ Nevertheless, CsA is discussed controversially in literature. It is already known that long-term use of CsA induces undesirable side effects, in particular fibrotic alterations in kidneys, heart, and liver⁴⁰ as well as in lungs.⁴¹ Several studies⁴²⁻⁴⁴ attributed these pathological disorders to the CsA

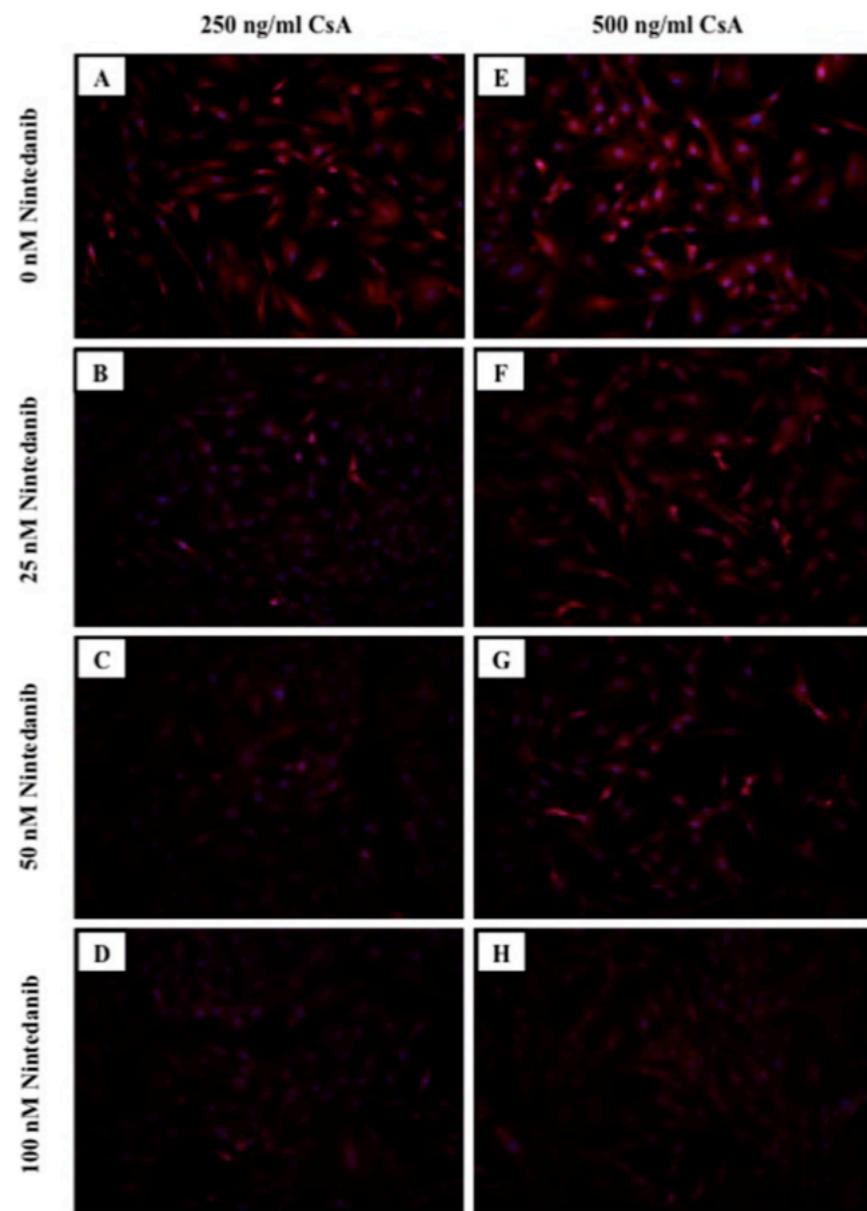


Figure 7. Representative immunofluorescence of the effect of nintedanib on TGM-2 expression in lung fibroblasts of the rat. (magnification 100x).

Applied CsA-concentrations (6a,e) induced an upregulation of TGM-2 positive fibroblasts, whereas preliminary treatment of cells with the RTK-inhibitor nintedanib (6b-d, 6f-h) led to a visual downregulation of TGM-2.

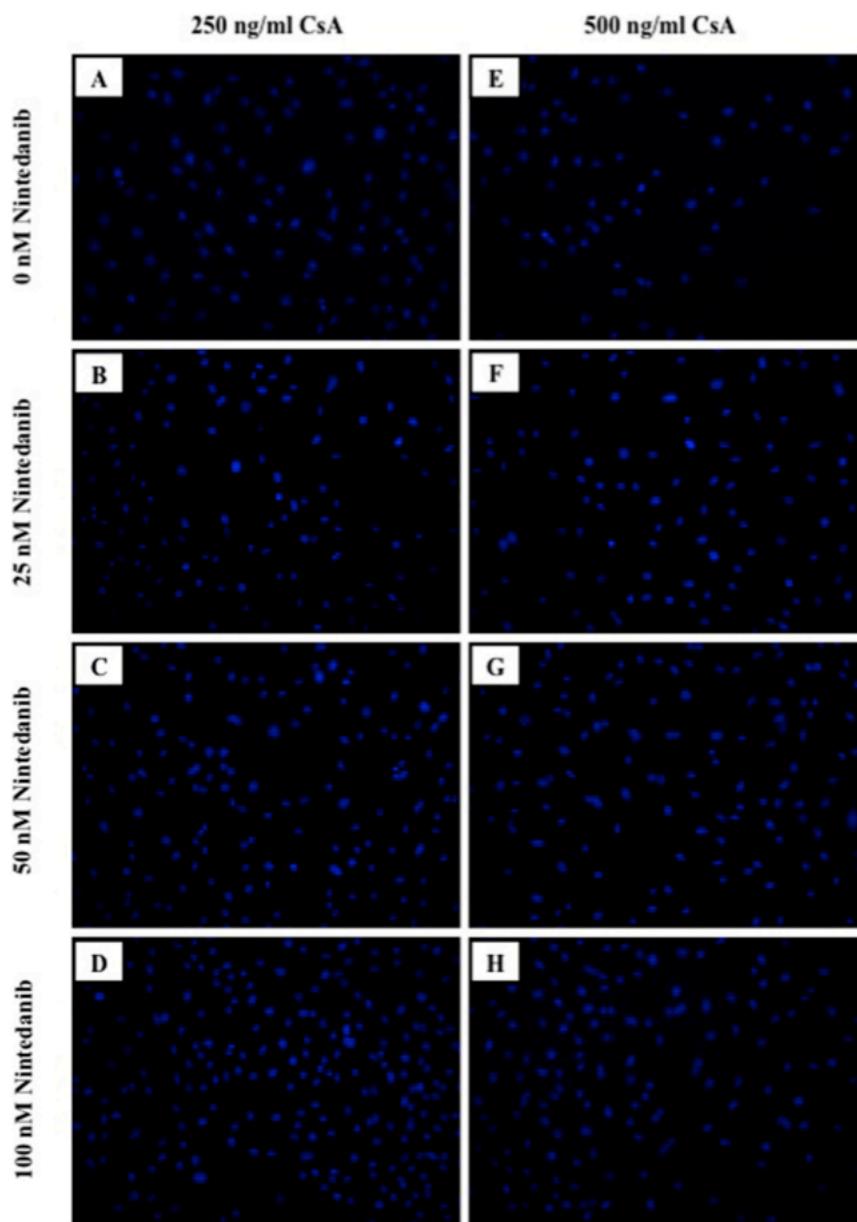


Figure 8. Representative immunofluorescence of the effect of nintedanib on DAPI positive nuclei in lung fibroblasts of the rat. (magnification 100x).

CsA-concentrations of 250 and 500 ng/ml reduced the cell monolayer of cultivated fibroblasts (7a,e). Pretreatment with different concentrations of nintedanib, especially 50 and 100 nM maintained the integrity of the cell layer.

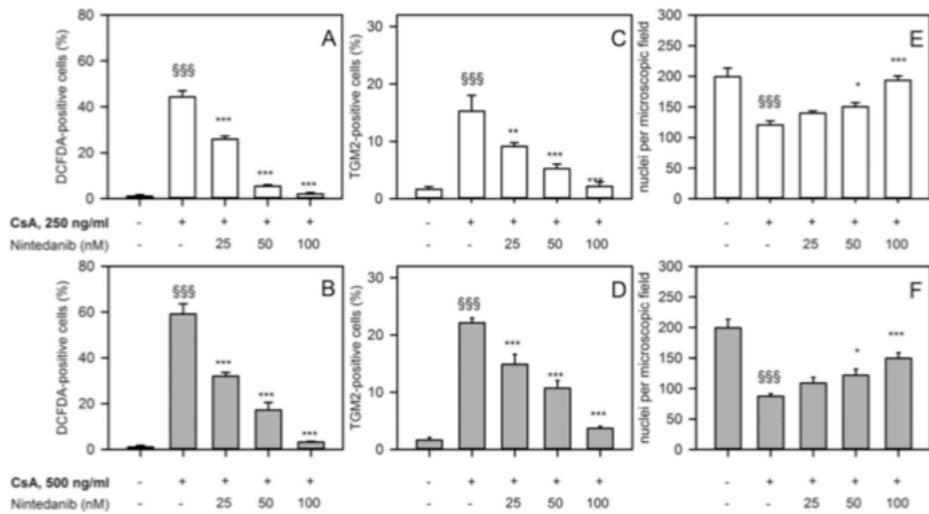


Figure 9. Graphical overview of all generated immunofluorescence data of in-vitro studies: ROS via DCFDA (8a,b), TGM-2 (8c,d), DAPI (8e,f).

Each bar represents the mean \pm SD of positive-stained cells in each group. Significant differences are expressed as * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) and *** ($p \leq 0.001$) from control values (\$\$).

Fibroblasts in culture medium showed low levels of oxidative stress (8a-d) and a dense cell monolayer (8e,f). The application of CsA upregulated the expression of oxidative species both in ROS (8a,b) and TGM-2 (8c,d) in a dose-dependent manner and led to a considerable loss of cell density (8e,f). Pretreatment with nintedanib in different concentrations (25–100 nM) significantly decreased the expression of ROS (8a,b) and TGM-2 (8c,d) in comparison to control values. Simultaneously, preliminary application of 50 and 100 nM nintedanib significantly prevented cell loss due to CsA treatment (8e,f).

induced, concentration-dependent increase of ROS and oxidative stress. Consistent with these observations, Jeon et al.¹⁴ showed an increase of ROS production caused by CsA in human bronchial epithelial cells. It is even known that therapy with CsA may increase chronic rejection phenomena. Lemaître and coworkers⁷ suspected the reason for a refractory post-transplant obliterative airway disease under CsA therapy due to unbalanced T-helper alloreactivity. They did not investigate oxidative stress or the expression of ROS. In our study we initially investigated the incidence of oxidative stress in an experimental orthotopic rat lung model from F344 rats in WKY rats. The LTx model is a relevant model to investigate the development of CLAD after LTx.²² Elevated ROS result from dysfunctional mitochondria. The consequence of ROS overproduction is a decrease of antioxidant levels. As a result of this, cells might be more vulnerable to oxidative damage.⁴⁵ Under prolonged oxidative

stress, repeated cytosolic calcium elevations, even if they are only transient, can lead to the activation of some enzymes. One calcium-activated enzyme with demonstrated pathophysiological importance in mitochondrial disease is TGM-2. TGM-2 is known as a post-translational modification enzyme that is induced by oxidative stress.⁴⁶ Additionally, TGM-2 was previously identified as a multifactorial protein expressed by human lung fibroblasts and as a positive driver of fibrosis. So, the expression of tissue TGM-2 is closely related to alterations of intracellular ROS. In this context, Lee et al.⁴⁷ reported that ROS is a very important effector for the upregulation of tissue TGM-2. TGM-2 catalyzes numerous reactions and is involved in a large amount of different signaling pathways.⁴⁸ Particularly in situations of oxidative cell stress, it modulates repair processes and tissue stability via protein cross-linking.⁴⁹ In fibrotic diseases characterized by excessive formation of extracellular matrix, the

two major structural proteins – collagen and fibronectin – have an increased resistance to protease degradation via TGM-2 cross-linking.^{49,50} Olsen and coworkers⁵⁰ investigated the role of TGM-2 in the context of bleomycin induced pulmonary fibrosis. They demonstrated that TGM-2 expression was increased in histologic lung sections of patients with pulmonary fibrosis and that TGM-2 knockout mice showed reduced lung scarring in a bleomycin fibrosis model. In addition, this working group demonstrated a reduction of TGM-2 expression due to two small electrophilic compounds.⁵¹ They discussed these compounds as potent antifibrotic drugs.

We were able to confirm the results of an increased TGM-2 expression in our chronic rat lung allograft rejection model. As expected, the untreated control group presented an increasing infiltration of inflammatory cells and a massive destruction of bronchioles along with a significant increase of TGM-2 expression ($p \leq 0.05$). The increased oxidative stress level can partly be attributed to the ischemia-reperfusion lesion of the graft and partly to acute rejection. The risk factors oxidative stress and CLAD progress inevitably within this animal transplantation model due to the absence of effective anti-inflammatory drugs.

So far, nintedanib and pirfenidone are the only anti-fibrotic agents approved for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis and therefore potential therapeutic substances for the treatment of CLAD. While pirfenidone has already been shown to have an anti-oxidative effect,⁵² this evidence is missing for nintedanib. For this reason, we wanted to investigate, whether nintedanib also has an anti-oxidative potential. So, in order to reduce oxidative stress in-vivo after experimental LTx and in-vitro after stimulation of lung fibroblasts, we introduced nintedanib as a possible antioxidant substance.

Nintedanib is a tyrosine kinase inhibitor targeting primarily FGF receptor 1-3, VEGF receptor 1-3, and PDGF receptor α and β .²⁰ In future studies, the anti-inflammatory and anti-fibrotic potential of nintedanib could be outlined in different experimental designs of fibrotic lung diseases.^{23,24,53} In addition to previous effects of

nintedanib, our study also demonstrated an anti-oxidative effect of nintedanib.

As we could show in both experimental approaches (in-vivo and in-vitro), nintedanib decreased oxidative stress levels in terms of ROS equivalents and TGM-2 expression. The underlying mechanisms are still unclear. It is known that ROS are excessively released during the rejection processes after organ transplantation and lead to alterations in signal transduction and gene expression.³² In this way, the ROS level substantially influences the increase of growth factor expression, e.g. transforming growth factor (TGF)- β and FGF^{54,55} as an important secondary messenger. Subsequently, a number of growth factors, especially ligands of receptor tyrosine (PDGF, VEGF, FGF) and serine/threonine kinases (TGF- β) have been shown to generate further intracellular ROS in non-phagocytic cells.^{56,57} These radicals again lead to a novel distribution of growth factors. Although therapy with nintedanib did not counteract the development of chronic rejection in our LTx model,²¹ a significant downregulation of VEGF and PDGF in a previous study²¹ as well as a significant decrease in TGM-2 expression in the current study could be observed. This scientific observation leads to the conclusion that nintedanib released its effect on a molecular level, but couldn't break the vicious circle between chronic inflammation⁵⁸ and fibrotic processes.⁵⁹ To what extent a combined treatment with anti-inflammatory and anti-fibrotic drugs could lead to a therapeutic breakthrough will have to be investigated in further studies.

To confirm the results of the antioxidant effect of nintedanib in in-vivo model, we used an in-vitro model with isolated rat lung fibroblasts. Obviously, various cell types (endothelial cells, alveolar macrophages etc.) participate in the process of CLAD. However, special attention should be placed on the role of fibroblasts, because of their primary responsibility for chronic fibrotic disorders.^{31,60} The in-vivo studies clearly confirm via double immunofluorescence staining the importance of lung fibroblasts in the expression of TGM-2. These two factors were essential in using rat lung fibroblasts as the basis of in-vitro studies.

For the in-vitro studies, we used CsA as an inducer of oxidative stress at a concentration of 250 and 500 ng/ml. The oxidative stress induced by CsA reflects a drug-induced oxidative stress. In accordance with the results of Lee and coworkers in gingival fibroblasts,¹⁵ our results demonstrated that treatment of fibroblasts with CsA evoked intracellular ROS and induced TGM-2 expression in a concentration-dependent manner in rat lung fibroblasts. Minimal discrepancies depending on the concentrations of CsA are possibly due to the different organs investigated (gingival vs. lung) and different origins of the fibroblasts (human vs. rat). Treatment of these cells with nintedanib significantly decreased ROS production and TGM-2 expression. There are several possibilities that could contribute to the antioxidant effects of nintedanib.

On the one hand, nintedanib influences oxidative stress indirectly via an inhibition of growth factors. As it was described by Mesquita et al.⁶¹ in smooth muscle cells and is already known for the pathogenesis of fibrotic lung disorders,⁶² growth factors induce NADPH oxidase, which is responsible for an increased ROS production. Blocking growth factor-receptors might indirectly influence NADPH oxidase (isoforms) and therefore reduces ROS expression and TGM-2 production. In this case, further investigations should verify, whether nintedanib also directly influences the NADPH-oxidase pathway. Otherwise there is no explanation for the anti-oxidative effect of nintedanib after CsA stimulation of lung fibroblasts. On the other hand, nintedanib might affect TGM-2 expression, which results in a reduced ROS production. Reducing the ROS level by TGM-2 inhibition was also shown by Basso and coworkers in-vivo and in-vitro after oxidative stress-induced neuronal death.⁶³

It turns out that further investigations are needed to explain the anti-oxidative effects of nintedanib.

Conclusion

CLAD is a major problem after lung transplantation. A possible trigger for a CLAD is oxidative stress. Various causes of oxidative stress can be discussed. Immunological reactions as well as

drug-related factors may play a role in the development of oxidative stress. In an in-vivo rat model of CLAD and an in-vitro model of rat lung fibroblasts, the ability of nintedanib to respond to drug-induced oxidative stress (CsA) and immunologically induced oxidative stress (allogeneic rejection) was investigated. With this work, we could show that regardless of the trigger of the oxidative stress, nintedanib demonstrates anti-oxidative potentials. Further investigations are needed to explain the molecular mechanism.

Acknowledgments

The authors would like to thank Katrin Bielenberg, Karin Hollnberger, Eva Lesser, Christina Leykauf, and Angelika Urbanek for the technical assistance, as well as Heike Norman for providing language assistance. The authors are fully responsible for all content and editorial decisions and have no conflict of interest to declare.

References

1. Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2014; 33(2):127-133. doi:10.1016/j.healun.2013.10.022.
2. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, et al., the ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee, An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1479-1503. doi:10.1183/09031936.00107514.
3. Verleden SE, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Chronic lung allograft dysfunction phenotypes and treatment. *J Thorac Dis*. 2017;9(8):2650-2659. doi:10.21037/jtd.2017.07.81.
4. Burton CM, Iversen M, Carlsen J, et al. Acute cellular rejection is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome independent of post-transplant baseline FEV1. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(9):888-893. doi:10.1016/j.healun.2009.04.022.
5. Madill J, Aghdassi E, Arendt BM, et al. Oxidative stress and nutritional intakes in lung patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplant Proc*. 2009;41(9):3838-3844. doi:10.1016/j.transproceed.2009.04.012.
6. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3498-3506. doi:10.1172/JCI28031.

7. Lemaitre PH, Vokaer B, Charbonnier LM, et al. Cyclosporine A drives a Th17- and Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2013;13(3):611–620. doi:10.1111/ajt.12067.
8. Madill J, Aghdassi E, Arendt BM, et al. Lung transplantation: does oxidative stress contribute to the development of bronchiolitis obliterans syndrome?. *Transplant Rev.* 2009;23(2):103–110. doi:10.1016/j.trre.2009.01.003.
9. Mallol J, Aguirre V, Espinosa V. Increased oxidative stress in children with post infectious Bronchiolitis Obliterans. *Allergol Immunopathol.* 2011;39(5):253–258. doi:10.1016/j.aller.2010.09.003.
10. Van Eeden SF, Sin DD. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease : a lung and systemic process. *Can Respir J.* 2013;20(1):27–29. doi:10.1155/2013/509130.
11. Cheresh P, Kim SJ, Tulasiram S, Kamp DW. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):1028–1040. doi:10.1016/j.bbadi.2012.11.021.
12. Esmi H, Cemelek M, Sezer M, et al. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology.* 2008;13(1):112–116. doi:10.1111/j.1440-1843.2007.01212.x.
13. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer : respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *IJERPH.* 2013;10(9):3886–3907. doi:10.3390/ijerph10093886.
14. Jeon DS, Ha EY, Mun KC. Effects of Cyclosporine on Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cells. *Transplant Proc.* 2012;44(4):988–990. doi:10.1016/j.transproceed.2012.01.091.
15. Lee SS, Tsai CH, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The upregulation of transglutaminase-2 by cyclosporin a in human gingival fibroblasts is augmented by oxidative stress. *J Periodontol.* 2013;84(10):1469–1475. doi:10.1902/jop.2012.120554.
16. Currò M, Ferlazzo N, Risitano R, et al. Transglutaminase 2 and phospholipase A₂ interactions in the inflammatory response in human Thp-1 monocytes. *Amino Acids.* 2014; 46(3):759–766. doi:10.1007/s00726-013-1569-y.
17. Philp CJ, Siebeke I, Clements D, et al. Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(5):594–603. doi:10.1165/rccb.2016-0379OC.
18. Richeldi L, Du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014; 370(22):2071–2082. doi:10.1056/NEJMoa1402584.
19. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, et al. BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* 2008; 68(12):4774–4782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6307.
20. Roth GJ, Binder R, Colbatzky F, et al. Nintedanib : from discovery to the clinic. *J Med Chem.* 2015;58(3):1053–1063. doi:10.1021/jm501562a.
21. von Süßkind-Schwendi M, Boxhammer E, Hirt SW, et al. The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. *Exp Lung Res.* 2017; 43(6-7):259–270. doi:10.1080/01902148.2017.1354408.
22. von Süßkind-Schwendi M, Rümmele 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. *Exper Lung Res.* 2012;38(3):111–123. doi:10.3109/01902148.2012.656820.
23. Wollin L, Maillet I, Quesniaux VV, Holweg A, Ryffel B. Anti-fibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor, nintedanib, in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014; 349(2):209–220. doi:10.1124/jpet.113.208223.
24. Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2015;45(5):1434–1445. doi:10.1183/09031936.00174914.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1/2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
26. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1-2):57–63. doi:10.1016/0022-1759(86)90215-2.
27. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
28. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biol Med.* 1999;27(5-6):612–616. doi:10.1016/S0891-5849(99)00107-0.
29. Kućera O, Endlicher R, Rousar T. The Effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longevity.* 2014; 5:1–12. doi:10.1155/2014/752506.
30. Surolia R, Li FJ, Wang Z, et al. Vimentin intermediate filament assembly regulates fibroblast invasion in fibrogenic lung injury. *JCI Insight.* 2019;4(7):1–17. doi:10.1172/jci.insight.123253.
31. Crestani B, Besnard V, Plantier L, Borensztajn K, Mailleux A. Fibroblasts: the missing link between fibrotic lung diseases of different etiologies?. *Respir Res.* 2013;14(1):81. doi:10.1186/1465-9921-14-81.
32. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are

- they linked?. *Free Radical Biol Med.* 2010;49(11):1603–1616. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006).
33. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009;14(1):27–38. doi:[10.1111/j.1440-1843.2008.01447.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01447.x).
 34. Kuehnel M, Maegel L, Vogel-Claussen J, Robertus JL, Jonigk D. Airway remodelling in the transplanted lung. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):663–675. doi:[10.1007/s00441-016-2529-0](https://doi.org/10.1007/s00441-016-2529-0).
 35. Shi S, Xue F. Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxid Med Cellular Longevity.* 2016;2016:1–9. doi:[10.1155/2016/8678510](https://doi.org/10.1155/2016/8678510).
 36. Williams A, Riise GC, Anderson BA, et al. Compromised antioxidant status and persistent oxidative stress in lung transplant recipients. *Free Radical Res.* 1999;33(5):383–393. doi:[10.1080/1071576990300421](https://doi.org/10.1080/1071576990300421).
 37. Behr J, Maier K, Braun B, Schwablmaier M, Vogelmeier C. Evidence for oxidative stress in bronchiolitis obliterans syndrome after lung and heart-lung transplantation. The Munich Lung Transplant Group. *Transplantation.* 2000;69(9):1856–1860. doi:[10.10007890-200005150-00020](https://doi.org/10.10007890-200005150-00020).
 38. Scholma J, Slobbos DJ, Boezen HM, et al. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2221–2225. doi:[10.1164/ajrccm.162.6.9911104](https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.9911104).
 39. Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1993;24(6):472–495. doi:[10.2165/00003088-19932406-00004](https://doi.org/10.2165/00003088-19932406-00004).
 40. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol.* 2006;21(3):301–316. doi:[10.14670/HH-21.301](https://doi.org/10.14670/HH-21.301).
 41. Hostettler KE, Halter JP, Gerull S, et al. Calcineurin inhibitors in bronchiolitis obliterans syndrome following stem cell transplantation. *Eur Respir J.* 2014;43(1):221–232. doi:[10.1183/09031936.00199312](https://doi.org/10.1183/09031936.00199312).
 42. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, et al. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(3):1328–1334.
 43. Pérez de Horredo J, de Arriba G, Calvino Fernández M, Benito S, Parra CID T. [Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells]. *Nefrologia.* 2007;27(5):565–573.
 44. Rao SR, Subbarayan R, Ajitkumar S, Girija DM. Increased advanced oxidation protein products generation by cyclosporine-a and angiotensin ii in human gingival fibroblasts – Ex-vivo Study. *JCDR.* 2017;11(1):49–52. doi:[10.7860/JCDR/2017/22246.9183](https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22246.9183).
 45. de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T. Cyclosporine A-induced apoptosis in renal tubular cells is related to oxidative damage and mitochondrial fission. *Toxicol Lett.* 2013;218(1):30–38. doi:[10.1016/j.toxlet.2013.01.007](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.01.007).
 46. Lai TS, Lin CJ, Wu YT, Wu CJ. Tissue transglutaminase (TG2) and mitochondrial function and dysfunction. *Front Biosci.* 2017;22(7):1114–1137. doi:[10.2741/4536](https://doi.org/10.2741/4536).
 47. Lee ZW, Kwon SM, Kim SW, et al. Activation of in situ tissue transglutaminase by intracellular reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):633–640. doi:[10.1016/S0006-291X\(03\)00835-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00835-0).
 48. Caccamo D, Currò M, Ferlazzo N, Condello S, Ientile R. Monitoring of transglutaminase 2 under different oxidative stress conditions. *Amino Acids.* 2012;42(2–3):1037–1043. doi:[10.1007/s00726-011-1018-8](https://doi.org/10.1007/s00726-011-1018-8).
 49. Chau DYS, Colligan RJ, Verderio EAM, Addy VL, Griffin M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials.* 2005;26(33):6518–6529. doi:[10.1016/j.biomaterials.2005.04.017](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.017).
 50. Olsen KC, Sapinoro RE, Kottmann RM, et al. Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(6):699–707. doi:[10.1164/rccm.201101-0013OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201101-0013OC).
 51. Olsen KC, Epa AP, Kulkarni AA, et al. Inhibition of transglutaminase 2, a novel target for pulmonary fibrosis, by two small electrophilic molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(4):737–747. doi:[10.1165/rcmb.2013-0092OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0092OC).
 52. Pourgholamhosseini F, Rasooli R, Pournamdar M, et al. Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food Chem Toxicol.* 2018;112:39–46. doi:[10.1016/j.fct.2017.12.034](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.034).
 53. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2014;15(1):157. doi:[10.1186/s12931-014-0157-3](https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3).
 54. Black SM, DeVol JM, Wedgwood S. Regulation of fibroblast growth factor-2 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells involves increased reactive oxygen species generation. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 2008;294(1):345–354.
 55. Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxid Med Cell Longevity.* 2015;2015:1–15. doi:[10.1155/2015/654594](https://doi.org/10.1155/2015/654594).
 56. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol – Lung Cellul Molecul Physiol.* 2000;279(7B):1005–1028.
 57. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Cellular physiology and biochemistry reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(4):173–186. doi:[10.1159/000047804](https://doi.org/10.1159/000047804).
 58. Laohaburakanit P, Chan A, Allen RP. Bronchiolitis obliterans. *CRIAL.* 2003;25(3):259–274. doi:[10.1385/CRIAL:25:3:259](https://doi.org/10.1385/CRIAL:25:3:259).

59. Tikkanen JM, Hollmén M, Nykänen AI, et al. Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(10):1145–1152. 2006doi:[10.1164/rccm.200601-044OC](https://doi.org/10.1164/rccm.200601-044OC).
60. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA, Rauch BH. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5(123):1–13. doi:[10.3389/fphar.2014.00123](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00123).
61. Mesquita FS, Dyer SN, Heinrich DA, et al. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biol Reprod.* 2010;82(2):341–351. doi:[10.1093/biolreprod.108.075887](https://doi.org/10.1093/biolreprod.108.075887).
62. Liu YM, Nepali K, Liou JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: current status, recent progress, and emerging targets. *J Med Chem.* 2017;60(2):527–553. doi:[10.1021/acs.jmedchem.6b00935](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00935).
63. Basso M, Berlin J, Li X, et al. Transglutaminase inhibition protects against oxidative stress induced neuronal death downstream of pathological ERK activation. *J Neurosci.* 2012;32(19):6561–6569. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3353-11.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-11.2012).

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2015 bis Juni 2019 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 gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi. Danke dafür, dass du jederzeit für mich da warst, mich aufgebaut hast und mir geholfen hast, wenn es mal schwerere Phasen gegeben hat. Ich hoffe, ich habe das nie als selbstverständlich angesehen.

Einen speziellen Dank will ich auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle aussprechen. Ich will mich bedanken dafür, dass Sie für mich wie eine zweite Doktormutter waren, mich mit Ihrem unerschöpflichen Wissen immer in die richtige Bahn gelenkt haben und mir jederzeit mit konstruktiven Gesprächen zur Verfügung standen.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe um Frau Katrin Bielenberg, Frau Karin Hollnberger, Frau Eva Lesser, Frau Christina Leykauf und Frau Angelika Urbanek. Danke für die unglaublich warmherzige Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvolle Anregungen und eure stetige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die finale Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich bei meiner ehemaligen Gymnasiallehrerin Frau Ingeborg Anzinger recht herzlich bedanken. Es ist schön, Sie als vertrauensvolle und zuverlässige Begleiterin an meiner Seite zu wissen.

Danke sagen will ich auch meinen Freunden Elisabeth Amann, Ramona Brandhuber, Annette Greisinger, Stefan Hertling, Leonie Reichelt, Kristina Rodner, Ruth Steigleider und Johannes Wendl, dafür dass ihr mich in jeder Minute des Studiums und darüber hinaus moralisch unterstützt habt und mich motiviert habt, nie aufzugeben.

Ganz zum Schluss will ich meinen Eltern und meinem Freund Martin dafür danken, dass ihr mich durch alle Höhen und Tiefen meines Lebens begleitet und immer an mich glaubt. Ihr seid das Wichtigste in meinem Leben.

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Einsatz des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Nintedanib in In-vivo-Studien zur Prävention der chronischen Transplantatabstoßung in der Rattenlunge“ selbstständig verfasst und mich keiner weiteren – außer der angegebenen Hilfsmittel – bedient habe.

Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

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.

Ich versichere außerdem, dass diese Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

13. Lebenslauf

