

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MARIETTA VON SÜSSKIND-SCHWENDI
EXPERIMENTELLE HERZCHIRURGIE

WIRKUNG VON TYROSINKINASE-INHIBITOREN IMATINIB UND VATALANIB MIT
EINEM mTOR-INHIBITOR AUF DIE AUSBILDUNG EINER CHRONISCHEN TRANS-
PLANTATABSTOSSUNG NACH EXPERIMENTELLER
LUNGENTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Anna-Lena Schaub

2022

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MARIETTA VON SÜSSKIND-SCHWENDI
EXPERIMENTELLE HERZCHIRURGIE

WIRKUNG VON TYROSINKINASE-INHIBITOREN IMATINIB UND VATALANIB MIT
EINEM mTOR-INHIBITOR AUF DIE AUSBILDUNG EINER CHRONISCHEN TRANS-
PLANTATABSTOSSUNG NACH EXPERIMENTELLER
LUNGENTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Anna-Lena Schaub

2022

Dekan: Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2021

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner besten Freundin
Katharina gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	9
1.1 Historischer Rückblick.....	9
1.2 Lungentransplantation heute	10
1.2.1 Indikationen zur Lungentransplantation.....	10
1.2.2 Spenderoperation.....	11
1.2.3 Empfängeroperation	12
1.3 Postoperativer Verlauf und CLAD (chronic lung allograft disease).....	13
1.4 Therapiemöglichkeiten.....	16
1.4.1 Konventionelle Immunsuppression.....	17
1.4.2 mTOR-Inhibitor	18
1.4.3 Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren.....	20
1.5 Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe	24
1.6 Ziel und Design des Experiments	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Tiermodell.....	29
2.2 Versuchsgruppen.....	30
2.3 Narkose und Beatmung	32
2.4 Spenderoperation	32
2.5 Empfängeroperation.....	34
2.6 Postoperativer Verlauf	36
2.7 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	36
2.8 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	37
2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	37
2.8.2 Sirius-Elastika-Färbung.....	38
2.8.3 Immunfärbung.....	38
2.9 Auswertung der konventionellen Histologie.....	41
2.9.1 Histologischer Aufbau einer Rattenlunge	41
2.9.2 Akute und chronische Abstoßung	44
2.9.3 Interstitielle Fibrose.....	46
2.10 Auswertung der Immunfärbung	47

2.10.1	CD117	48
2.10.2	PDGF-A und PDGFR- α	50
2.10.3	VEGF-A und VEGFR-2	50
2.10.4	Bestimmung der Intensität	52
2.11	Statistische Auswertung	52
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Allgemeinbefinden und postoperativer Gewichtsverlauf.....	54
3.2	Ergebnisse der konventionellen Histologie.....	56
3.2.1	Kontrollgruppe	56
3.2.2	Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe	60
3.3	Ergebnisse der Immunhistologie.....	67
3.3.1	Expression von CD117 (c-Kit).....	67
3.3.1.1	Rechte Lunge	67
3.3.1.2	Linke Lungen.....	68
3.3.2	Expression von PDGF-A und PDGFR- α	69
3.3.2.1	Rechte Lunge	70
3.3.2.2	Linke Lunge.....	72
3.3.3	Expression von VEGF-A und VEGFR-2	75
3.3.3.1	Rechte Lunge	75
3.3.3.2	Linke Lunge.....	77
3.3.4	Intensität	81
4	Diskussion und Stand der Arbeit	84
5	Ausblick	99
6	Zusammenfassung	100
7	Literaturverzeichnis	102
8	Anhang.....	113
8.1	Abbildungsverzeichnis	113
8.2	Tabellenverzeichnis	115
8.3	Tabellarischer Anhang	116
9	Publikation und Posterpräsentation	130
	Danksagung.....	161

Abkürzungsverzeichnis

Sämtliche Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet werden, werden nach Ihrer ersten Nennung im Text erklärt. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden erwähnt.

Abkürzungen	Erklärungen
AR	Acute Rejection, Abstoßung
AK	Antikörper
BO	Bronchiolitis obliterans
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
CD	Cluster of Differentiation
CLAD	Chronic lung allograft disease
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CR	Chronic Rejection, chronische Abstoßung
et al.	et alii, und andere
F344[RT1]^{lv1}-Ratten	Fischer-Rattenstamm (Spenderratten)
G	Gramm
GMCSF	granulozyte/macrophage colony stimulating factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human leukocyte antigen, HL-Antigen
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IFN	Interferon
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LTx	Lungentransplantation
Mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex, Hauptkompatibilitätskomplex
Min	Minute
ml	Milliliter
mTOR	Mammalian Target of rapamycin
PBS-Lösung	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
POD	Postoperative day, postoperativer Tag
RAD	Rapamycin-Derivat, Synonym: Everolimus
RAS	Restrictive allograft syndrom
RTKI	Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor
Sec	Sekunde
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WKY[RT1]^l-Ratte	Wistar-Kyoto-Rattenstamm (Empfängerstamm)

1 Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Die Lungentransplantation entwickelte sich im Laufe der letzten drei Jahrzehnte von einem experimentellen Verfahren zu einer effektiven Therapie von Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium (Verleden et al., 2016a). Nach experimentellen Versuchen an Hunden führte Dr. James D. Hardy an der University of Mississippi Medical Center der Vereinigten Staaten von Amerika die erste erfolgreiche Lungentransplantation am Menschen durch. Der Patient war ein 58-jähriger Mann mit den Diagnosen: Linksseitiges Lungenkarzinom, sekundäre obstruktive Atelektase und Pneumonitis. Der Spender verstarb kurz vor der Operation an einem Myokardinfarkt, so dass seine linke Lunge transplantiert werden konnte. Der Empfänger überlebte bis zum 18. postoperativen Tag und starb an einem Nierenversagen (Dalton, 1995; Davis, JR & Pasque, 1995). Zwischen 1968 und 1971 erfolgten drei Herz-Lungen-Transplantationen durch Cooley, Lillehei und Barnard. Langzeitergebnisse waren allerdings rar, da es an der Möglichkeit einer effektiven Immunsuppression mangelte. Unter Kortisongabe erwies sich die Bronchusnaht als infektanfällig und limitierend (Reichart, 1995). Von den mehr als 40 Patienten, welche von 1963 bis Mitte der 80er Jahre transplantiert wurden, verließ nur ein Patient das Krankenhaus lebend, um zehn Monate später zu versterben (Davis, JR & Pasque, 1995). Der Durchbruch gelang, als ein Ärzteteam der University of Toronto eine zu der Zeit neuartige Technik der Bronchusanastomose mit Hilfe eines Omentumlappens entwickelte. 1983 führten die Lungenchirurgen mit dieser Technik eine einseitige Lungentransplantation bei einem Patienten mit Lungenfibrose durch. Der Patient wurde nach sechs Monaten aus dem Krankenhaus entlassen und starb sechs Jahre später im Alter von 65 Jahren an Nierenversagen (Cooper D. Joel, 1986). Das Langzeitüberleben war drastisch eingeschränkt durch Probleme wie inadäquate Spenderorgane oder Anastomoseninsuffizienzen. Trotz der Verbesserung der Immunsuppression durch Cyclosporin war das Medikamentenregime nicht perfekt (Kamholz, 1988). Am Klinikum Großhadern, München, wurden zwischen 1991 und 1994 bei 24 Patienten 25 Transplantationen durchgeführt. Die Frühletalität (<60 Tage) lag in diesem Patientengut bei 12 Prozent. Die 1- Jahres-Letalität betrug ebenfalls 12 Prozent.

Die 1-Jahres-Überlebensrate betrug 76 Prozent und nach zwei Jahren 72 Prozent (Reichart, 1995). 1985 waren es noch fünf durchgeführte Lungentransplantationen und die Zahl stieg stetig an, bis im Jahre 2016 4554 Operationen weltweit am erwachsenen Menschen stattfanden. Die ISHLT, International Society of Heart and Lung Transplantation, sammelt und wertet

Fakten zu den Transplantationen aus (The International Society for Heart and Lung Transplantation, 2018).

1.2 Lungentransplantation heute

1.2.1 Indikationen zur Lungentransplantation

In der heutigen Zeit stellt die Lungentransplantation ein etabliertes therapeutisches Verfahren bei Lungenerkrankungen im Endstadium dar (Verleden et al., 2014). Indikationen zur Transplantation sind alle nicht-malignen parenchymatösen oder vaskulären Lungenerkrankungen, welche durch alternative chirurgische oder konservative Maßnahmen nicht oder nur unzureichend behandelt werden können oder unter optimaler Therapie progredient verlaufen (Müller et al., 2016). Als Hauptindikationen sind die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD, 38%), die interstitielle Lungenerkrankung (24%), gefolgt von der zystischen Fibrose (16%) zu nennen. Weitere Krankheiten, bei welchen eine Transplantation die ultima ratio darstellt, sind die Sarkoidose (2,5%) oder die pulmonale Hypertension (3,8%, siehe Tabelle 1). Bis zum Juni 2013 wurden 47647 Lungentransplantationen an Erwachsenen von der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantationen (ISHLT) registriert (Yusen et al., 2014).

Ogleich Lungentransplantationen seit fast 60 Jahren durchgeführt werden, bleibt das Langzeitüberleben jedoch hinter dem anderer Organe zurück. Die 5-Jahres-Überlebensrate beläuft sich nach einer Lungentransplantation auf 53% (Yusen et al., 2014).

Tabelle 1: Indikationen (Auszug) für eine Lungentransplantation

Mögliche Indikationen für die Lungentransplantation
COPD (chronische obstruktive Lungenerkrankung)
Interstitielle Lungenerkrankung/Lungenfibrose
Emphysem
Zystische Fibrose
A1-Antitrypsinmangel
Sarkoidose
Pulmonale Hypertension
Bronchiektasien

Quelle: Müller et al., 2016; Sabiston, Sellke, Del Nido, & Swanson, 2010; Yusen et al., 2014.

1.2.2 Spenderoperation

Die Organentnahme bei einem hirntoten Patienten erfolgt über eine mediane Sternotomie, die Pleura wird eröffnet und beide Lungen inspiziert. Die obere und die untere Vena cava werden mit einem Band angeschlungen, die Arteria pulmonalis und die Aorta (siehe Abbildung 1) werden dargestellt. Eine Kanüle zur Instillation der Organspüllösung wird in der Pulmonalarterie platziert, während die Aorta abgeklemmt ist. Die Spülung kann nun beginnen. Hierfür wird eine gekühlte kristalloide Lösung, welche der Zusammensetzung des Extrazellularraums entspricht, eingesetzt (Kaiser, 1997). Zuerst wird das Herz des Spenders entnommen und das Perikard bis zum Zwerchfell inzidiert, das Ligamentum pulmonale mobilisiert und die Trachea ventral entlang des Ösophagus frei präpariert (Müller et al., 2016). Die Trachea wird mit einem Linearstapler abgesetzt. Der Pleuraraum wird währenddessen mit geeister Kochsalzlösung gespült, um die Lunge zu kühlen. Nach Freilegung wird die Lunge mit Ösophagus, Aorta und hinterem Perikard en bloc entfernt. Die Lunge wird ex situ zur Implantation vorbereitet. Hier werden die Bifurkation der Pulmonalarterie dargestellt und die Hauptbronchien präpariert. Nun sind die Lungen bereit zur Transplantation (Kaiser, 1997). Zum Transport werden die Lungen getrennt und separat in 4°C kalter Perfusionslösung in das Transplantationszentrum transportiert. Die Lunge toleriert eine Ischämie von bis zu acht Stunden (Perrot, Liu, Waddell, & Keshavjee, 2003).

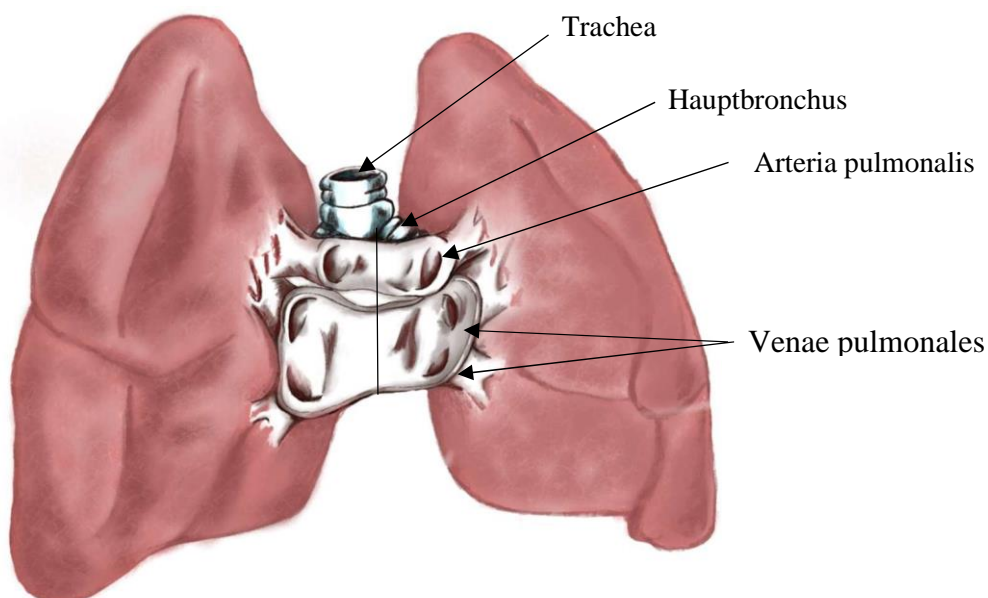


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Anatomie der Lunge, Frontalansicht
Quelle: modifiziert nach Kaiser 1997

1.2.3 Empfängeroperation

Der Zugangsweg für die Lungentransplantation ist entweder die posterolaterale Thorakotomie oder eine muskelschonende Inzision. Nun folgt die Pneumektomie (Kaiser, 1997). Verwachsungen werden gelöst, das Ligamentum pulmonale wird abpräpariert und die Hilusgefäße dargestellt. Die Gefäße werden mit Staplern abgesetzt und der Bronchus offen durchtrennt (Müller et al., 2016). Nachdem die Empfängerlunge entfernt wurde, wird die Spenderlunge, weiterhin stetig gekühlt, zur Orientierung ins Operationsgebiet gelegt. Zunächst wird die bronchiale Anastomose rekonstruiert (siehe Abbildung 2). Um zu testen, ob die Anastomose luftdicht ist, füllt der Anästhesist die Lunge mit Luft. In der Regel folgt nun die arterielle Anastomose. Die Längen der Arterienstümpfe werden angepasst und die Klammernahtreihe entfernt. Nachdem die Pulmonalarterie anastomosiert wurde, werden die Klemmen belassen und erst nach Fertigstellung der Venenanastomose entfernt (Kaiser, 1997). Die Pulmonalvenen werden mittels Klemmen exponiert und der linke Vorhof zentral geklemmt. Die Venenstümpfe werden eröffnet und die beiden Vorhöfe mit fortlaufender Naht anastomosiert (siehe Abbildung 2). Daraufhin wird die Lunge retrograd entlüftet, um im Anschluss anterograd durch die Entfernung der Klemmen reperfundiert zu werden. Eine vorsichtige Beatmung kann nun beginnen (Müller et al., 2016)

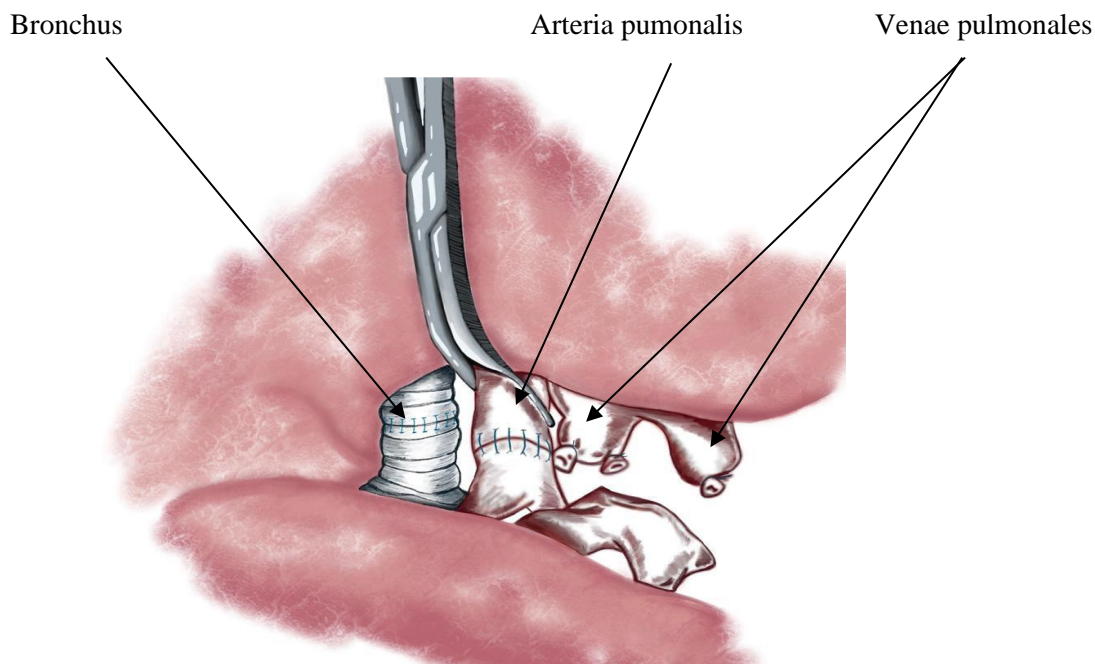


Abbildung 2: Anastomosen des Hauptbronchus und der A. pulmonalis
Quelle: modifiziert nach Kaiser, 1997

1.3 Postoperativer Verlauf und CLAD (chronic lung allograft disease)

Seit der ersten erfolgreichen Lungentransplantation in den 1980er Jahren und heute wurden erhebliche Verbesserungen hinsichtlich der Operationstechnik, der Diagnose und des Medikamentenregimes zur Immunsuppression erzielt. Trotz diesen Optimierungen bleibt die CLAD, Chronic Lung Allograft Dysfunction, eine ernstzunehmende postoperative Komplikation und schränkt das Langzeitüberleben nach einer Lungentransplantation deutlich ein (Verleden et al., 2016a). Im Moment gibt es kein allgemein anerkanntes pharmakologisches Schema zur Immunsuppression (Afshar, 2014). Gemäß der aktuellen Daten der International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) betragen die 1-Jahres-Überlebensrate 70,9% - 82,9% und die 5-Jahres-Überlebensrate nach Lungentransplantation 46,9%-59,6%. Zu den postoperativen Komplikationen zählen die akute (3,4%) und chronische Abstoßung (29,0%), Infektionen (38,0%), Transplantatversagen (24,7%), Atemwegskomplikationen (15,0%), maligne Tumoren (15,0%), kardiovaskuläre Ereignisse (10,9%) sowie weitere extrapulmonale Folgeerkrankungen (29,8%) (Hartert et al., 2014).

Abstoßungsreaktionen zählen zu den häufigsten Komplikationen nach einer Lungentransplantation. Es wird zwischen einer akuten (AR) und einer chronischen Reaktion (CR) unterschieden (Wohlschläger et al., 2011; Yusen et al., 2014). Ein wichtiger Grund für das Auftreten akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen in der Lunge besteht darin, dass die Lunge das einzige Organ ist, das über die Luftzufuhr in direktem Kontakt zu äußeren Umwelteinflüssen steht und somit über die Atemwege schädliche Stoffe und Erreger aufnehmen kann (Knoop & Estenne, 2006). Durch die Verbesserung der operativen und medikamentösen Möglichkeiten auf dem Gebiet der Lungentransplantationen überleben heute zwischen 70% und 80% der Patienten das erste postoperative Jahr (Knoop & Estenne, 2006). In diesem Zeitraum tritt bei vielen Patienten eine akute Reaktion auf (Yusen et al., 2014). Die AR (akute Reaktion) geht mit perivaskulären mononukleären Infiltraten und lymphozytischer Bronchiolitis einher (Yousem et al., 1996). Zur Diagnostik dienen transbronchiale Biopsien als Goldstandard, die im Anschluss histologisch aufgearbeitet werden (Knoop & Estenne, 2006). Aus mehreren Studien geht hervor, dass bereits das Auftreten einer minimalen AR ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung eines BOS darstellt, das jedoch bei frühzeitiger Behandlung reduziert werden kann (Hachem et al., 2005; Hopkins et al., 2004).

Derzeit sind eine Vielzahl von chronischen Abstoßungsreaktionen bekannt. Der Terminus CLAD (chronic lung allograft dysfunction) wurde als übergreifender Begriff eingeführt, um

eine chronische Reaktion nach einer Lungentransplantation näher zu beschreiben. CLAD wurde zwar schon früher in der Literatur verwendet, aber erst im Jahr 2014 definierten Verleden et al. die CLAD als eine Abnahme der Lungenfunktion von über 20% des Basiswertes, gemessen an den Parametern FEV1 (expiratorische Einsekundenkapazität) und FVC (forcierte Vitalkapazität), die mindestens über einen Zeitraum von drei Wochen besteht und meist ohne erkennbare Ursache auftritt (Verleden et al., 2014). Der Basiswert entspricht dem Durchschnittswert der beiden besten posttransplantär gemessenen FEV1- und FVC-Werte, die in einem Abstand von mindestens drei Wochen erhoben wurden (Verleden et al., 2014). Die nicht-reversible CLAD umfasst zwei Typen (siehe Abbildung 3), die nicht-reversible Form des Bronchiolitis obliterans-Syndroms und das RAS (restrictive allograft syndrom) (Verleden et al., 2015a).

Die BO (Bronchiolitis obliterans) wird definiert als histologisches Korrelat des Bronchiolitis obliterans-Syndroms (BOS) und somit als entzündliche und fibroproliferative Gewebeeränderung der kleinen Atemwege (Stewart et al., 2007; Tikkanen et al., 2006). Die chronische Abstoßung manifestiert sich sowohl auf bronchialer wie auch auf vaskulärer Ebene in Form einer BO oder einer vaskulären Sklerose (Yousem et al., 1996). Bei der BO kommt es im Verlauf zu einer Vernarbung der Bronchioli ausgehend von der Tunica submucosa. Die chronische vaskuläre Abstoßung geht mit einer fibrointimalen Verdickung der Arterien und Venen einher (Yousem et al., 1996). Dabei spielt der Prozess des vaskulären Remodelings eine Rolle, der sowohl durch immunologische als auch durch nicht-immunologische Prozesse ausgelöst werden kann (Schuurman et al., 1997). Der genaue Mechanismus, der dem vaskulären Remodeling zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich aus einem Kreislauf, bestehend aus Gefäßdestruktion und Reperaturversuchen zusammensetzt. Dem vaskulären Remodeling geht eine Schädigung des vaskulären Endothels voraus, was im Verlauf zu Ausschüttung vasoaktiver Hormone, Epithelabtragung, Aktivierung des Gerinnungssystems und Hochregulierung von Wachstumsfaktoren führt. Die Folgen sind Vasokonstriktion, Proliferation glatter Muskelzellen und Vernarbung des Gefäßes (Laine, Holmberg, & Häyry, 1996). Belperio et al. (2009) kamen zu dem Ergebnis, dass eine mikrovaskuläre Verletzung der Atemwege zu einer lokalen Ischämie führt, aus welcher eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine/Chemokine resultiert, die inflammatorische Zellen rekrutieren (Belperio, Weigt, Fishbein, & Lynch, 2009).

Ein wichtiger Hinweis auf ein BOS ist der Abfall der Werte der Lungenfunktionstests, zum Beispiel die Messung der Einsekundenkapazität FEV1 (Estenne et al., 2002; Sato & Keshavjee, 2008). In Abhängigkeit von einer prozentualen Abnahme des FEV1 im Vergleich zu einem

definierten Basiswert wurde das BOS in vier Schweregrade eingeteilt (siehe Tabelle 2) (Gottlieb, Welte, Hoper, Struber, & Niedermeyer, 2004). Der pathogenetische Mechanismus, der zur BO führt, ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass am Beginn der Entwicklung der BO eine Schädigung des Epithels vorliegt (Angel, Homma, & Levine, 2000). Yousem beschrieb 1993 die lymphozytische Bronchiolitis als einen möglichen Auslöser der BO (Yousem, 1993). Hierbei durchwandern inflammatorische Infiltrate in der Submukosa die Basalmembran des Epithels bis hin zu den Epithelzellen (Yousem, 1993). Die exzessive Fibroproliferation, die bei der BO beobachtet werden kann, ist somit Folge einer Schädigung der bronchialen Epithelzellen und der subepithelialen Strukturen durch entzündliche Prozesse (Barker, Bergeron, Rom, & Hertz, 2014). Chronische Inflammation aufgrund fortdauernder Schädigung des respiratorischen Epithels durch verschiedene Noxen und Infektionen mit anschließender unkontrollierter Gewebereparatur und übermäßiger Fibroblastenproliferation sind pathologischer Prozesse, die als bronchiales Remodeling bezeichnet werden (Pain et al., 2014).

Tabelle 2: Bronchiolitis-obliterans-Syndrom: Klassifikation der ISHLT 2002

BOS 0	FEV1 > 90% des besten Werts
BOS 0-p („probable“)	FEV1 81–90% des besten Werts
BOS 1	FEV1 66–80% des besten Werts
BOS 2	FEV1 51–65% des besten Werts
BOS 3	FEV1 ≤ 50% des besten Werts

(FEV1= forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde)

Quelle: Gottlieb et al., 2004

Jüngste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass auch andere Ursachen zu einer chronischen Verschlechterung der FEV1 nach einer Lungentransplantation führen können, die sich nicht mit der Definition des BOS in Einklang bringen lassen (Verleden et al., 2014). Das Restrictive Allograft Syndrom (RAS) wird histologisch charakterisiert durch verschiedene Stadien eines Alveolarschadens und einer extremen Fibrosierung des Interstitiums. Erstmals wurde das RAS von Sato et al. im Jahr 2011 als Unterform der CLAD beschrieben. Sie definieren das RAS als eine irreversible Abnahme der FEV1 unter 80% und der totalen Lungkapazität (TLC, total lung capacity) unter 90% des Basiswertes (Sato et al., 2011).

Eine Differenzierung zwischen verschiedenen CLAD-Phänotypen ist in vielerlei Hinsicht von klinischer Bedeutung (Todd et al., 2014). Während für das klassische BOS histopathologisch das Bild der BO kennzeichnend ist (Verleden et al., 2014), findet man beim RAS eine Fibrose

im Interstitium, in der viszeralen Pleura und den interlobulären Septen (Sato et al., 2011). Als mögliche Ursache für die Entstehung einer CLAD führen Verleden und seine Mitarbeiter 2014 das akute Transplantatversagen an, dem unter anderem eine akute Infektion, eine akute Abstoßung oder eine Lungenembolie zugrunde liegen kann (Verleden et al., 2014).

Eine Vielzahl von alloimmunen und nicht-alloimmunen Risikofaktoren für die Entwicklung einer BO wurden bereits beschrieben (Nakajima, Palchevsky, Perkins, Belperio, & Finn, 2011). Der derzeitige Schwerpunkt liegt auf der Steuerung und Inhibierung der akuten Reaktion. Die Grundsätze der Immunsuppression, speziell der neueren Immunsuppressiva sollen im Folgenden erläutert werden.

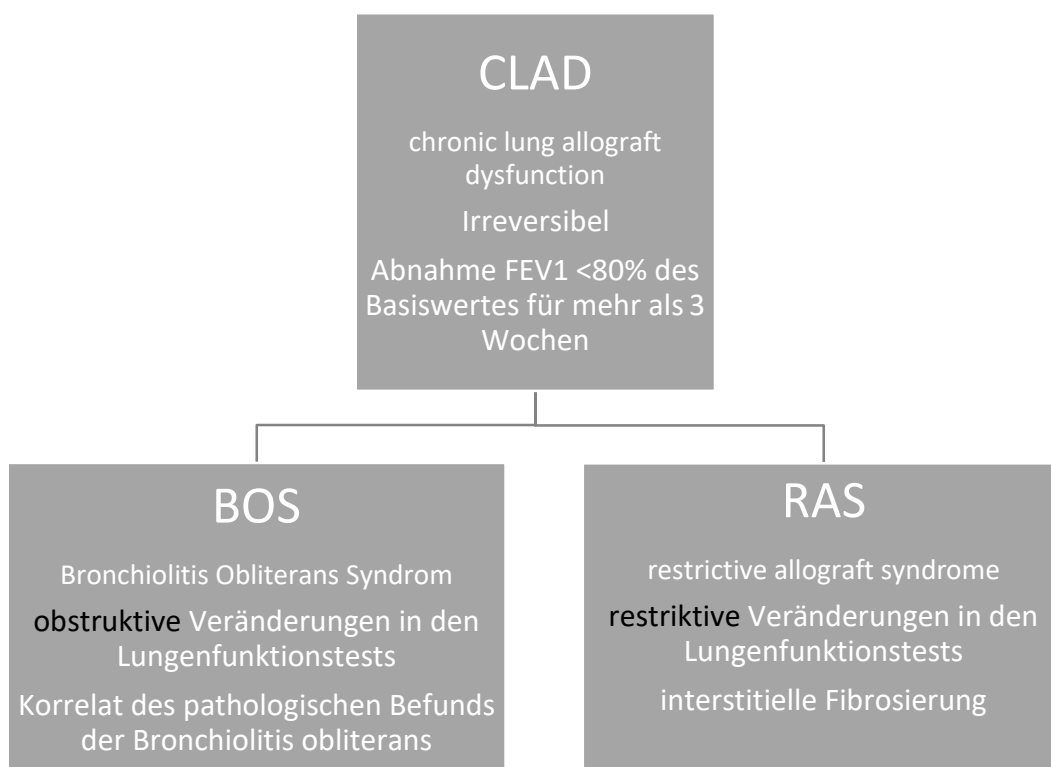


Abbildung 3: Die Formen der CLAD

Quelle: modifiziert nach Sato et al., 2011; Verleden et al., 2015a

1.4 Therapiemöglichkeiten

Die Immunsuppression nach einer Lungentransplantation dient der Prävention von Abstoßungsreaktionen (Scheffert & Raza, 2014). Die Tatsache, dass die Entwicklung einer BO in enger Beziehung mit einer vorangehenden akuten Abstoßungsreaktion während des postoperativen Verlaufs steht, unterstreicht die Bedeutung der Immunsuppression (Knoop & Estenne, 2006). Die Optimierung der medikamentösen Therapie ist von entscheidender Bedeutung, damit das Langzeitüberleben nach einer Lungentransplantation künftig verbessert werden kann

(Knoop, Haverich, & Fischer, 2004). Ziel einer postoperativen Immuntherapie, die aus mehreren Medikamenten zusammengesetzt ist, muss es sein, die maximale therapeutische Effektivität zu erreichen und parallel Toxizität und Nebenwirkungen der einzelnen Medikamente möglichst gering zu halten (Reis et al., 2002).

1.4.1 Konventionelle Immunsuppression

Während der Anfänge der Lungentransplantationen mangelte es an einer ausreichenden nebenwirkungsarmen Immunsuppression. Eine verbesserte Situation war erst ab Ende der siebziger Jahre gegeben, als der Schweizer Borel das Cyclosporin A entdeckte, ein Polypeptid, das durch seine neuartigen Eigenschaften keinen Effekt auf die Wundheilung aufwies (Reichart, 1995). Trotz dieses Medikaments sind im Moment keine effektiven Therapien für eine CLAD/BOS verfügbar, da das BOS ein sehr heterogenes Syndrom mit alloimmunen und nichtalloimmunen Mechanismen ist (Tikkanen et al., 2006). Das Ausmaß ist von Patient zu Patient unterschiedlich, weswegen eine individuell abgestimmte Therapie erfolgen sollte (Esterne et al., 2002). Derzeitige Behandlungskonzepte konzentrieren sich auf die Variation, Modulation oder Steigerung der immunsuppressiven Medikation (Al-Githmi et al., 2006). Meist wird initial eine immunsuppressive Therapie mit einer Dreierkombination aus einem Kortikosteroid, einem Calcineurin-Inhibitor wie Cyclosporin oder Tacrolimus und Antimetaboliten wie Azathioprin oder Mycophenolat durchgeführt (Nakajima et al., 2011). Calcineurin-Inhibitoren, Cyclosporin und Tacrolimus bilden dabei einen Grundstein in der Erhaltungstherapie nach Lungentransplantation. Durch die Hemmung von Calcineurin wird die Transkription von verschiedenen Zytokinen wie Interleukin (IL)-2,-3,-4,-5, Interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α und granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) gehemmt. Außerdem spielt Calcineurin für die Aktivierung der T-Zellen eine entscheidende Rolle (Neurohr et al., 2009). Calcineurin-Inhibitoren werden häufig als Langzeit-Immunsuppressiva eingesetzt, besitzen allerdings ein erhebliches Nebenwirkungspotential. Sie erhöhen nicht nur das Risiko für Infektionen und Krebsentstehung, sondern haben auch eine fibrosefördernde Komponente. Dies kann ein chronisches Transplantatversagen induzieren (Kessler, Jay, Molle, & Guillemin, 2006). Mycophenolat hat einen immunsuppressiven Effekt durch das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, welches in die Purinsynthese von T- und B-Lymphozyten involviert ist (Winter et al., 2012). Auch Azathioprin inhibiert die de novo Purinsynthese und hemmt so die Bildung, sowohl von DNA als auch von RNA mit einem antiproliferativen Effekt auf T- und B-Lymphozyten, jedoch ohne die Zytokinproduktion zu beeinflussen (Neurohr et al., 2009). Darüber hinaus kann

eine verbesserte Lungenfunktion durch den Einsatz des Makrolids Azithromycin, welches eine immunmodulatorische Wirkung zeigt, erreicht werden (Verleden et al., 2014). Kortikosteroide werden häufig als drittes Immunsuppressivum gegeben, obwohl von einem erfolgreichen Absetzen in Langzeitstudien nur eingeschränkt berichtet wird (Borro, Solé, La Torre, Pastor, & Tarazona, 2005; Knoop et al., 2004). Dieses Therapieregime ist mit signifikanten Nebenwirkungen assoziiert und es fehlen kontrollierte Studien zur systematischen Steroidreduktion und steroidfreien Immunsuppression (Morton et al., 2006). Eine Verbesserung durch eine Langzeittherapie mit hochdosierten Kortikosteroiden konnte nicht gezeigt werden (Welsh et al., 2015). Borro et al. (2005) berichten von Osteoporose, Diabetes mellitus, Hypertonie, Magenulcera und erhöhten Blutfetten (Borro et al., 2005).

Eine Retransplantation ist aktuell die einzige Therapieform um ein BOS vollständig zu beheben (Al-Githmi et al., 2006). Alle anderen Optionen durch Veränderungen der Medikamentendosierungen bleiben dagegen limitiert und können den Verlust der Atemfunktion lediglich verlangsamen. Eine wichtige Rolle spielen außerdem auch die Prävention und die Behandlung von bekannten Risikofaktoren, wie zum Beispiel eine virale Infektion oder ein gastroösophagealer Reflux, und die frühzeitige Behandlung eines BOS (Hayes, JR, 2011).

Um das Medikamentenregime nach einer Lungentransplantation und das Risiko eines Transplantatversagens weiterhin zu verbessern, ist es nötig, nach neuartigen Substanzen zu forschen, die allein oder zusätzlich verabreicht werden können.

1.4.2 mTOR-Inhibitor

Eine Kombination der drei Arzneimittel Everolimus, Imatinib und Vatalanib wurde in der vorliegenden Arbeit herangezogen, um die Entwicklung der CLAD und der Abstoßungsreaktion im Modell einzuschränken. Everolimus ist ein Immunsuppressivum und wirkt antiproliferativ (Scheffert & Raza, 2014). Seit einigen Jahren ist die Klasse der mTOR-Inhibitoren (Mammalian Target of Rapamycin-Inhibitoren) bekannt. Das 40-0-(2-Hydroxyethyl)-Rapamycin bzw. SDZ RAD, das spätere Everolimus, ist ein Rapamycinderivat (RAD) mit den pharmakologischen Eigenschaften von Rapamycin (Schaffer & Ross, 2010; Schuler et al., 1997a). Zu dieser Klasse gehören Sirolimus und sein Derivat Everolimus. Sirolimus ist ein hydrophobes, makrozyklisches Lakton, das von der Aktinomycete *Streptomyces hygroscopicus* gebildet wird (Knoop et al., 2004). Everolimus dagegen ist ein künstlich hergestelltes Makrolid und besitzt eine höhere Bioverfügbarkeit (Knoop et al., 2004). Everolimus hat eine kürzere Halbwertszeit

(23 Stunden statt 60 Stunden) und benötigt eine geringere Zeit bis zum Erreichen des steady states (4 statt 6 Tage) als Rapamycin (Koch, 2009). Zudem kann es zeitgleich mit Cyclosporin A verabreicht werden, während Rapamycin in einem vierstündigen Abstand gegeben werden muss (Chapman et al., 2007). Everolimus wird aus Rapamycin durch die Ergänzung einer Hydroxylgruppe und Alkylierung in Position 40 erzeugt (Schuler et al., 1997a). Diese kleine Modifikation in der Strukturformel gegenüber Sirolimus ist verantwortlich für unterschiedliche pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften (Chapman et al., 2007).

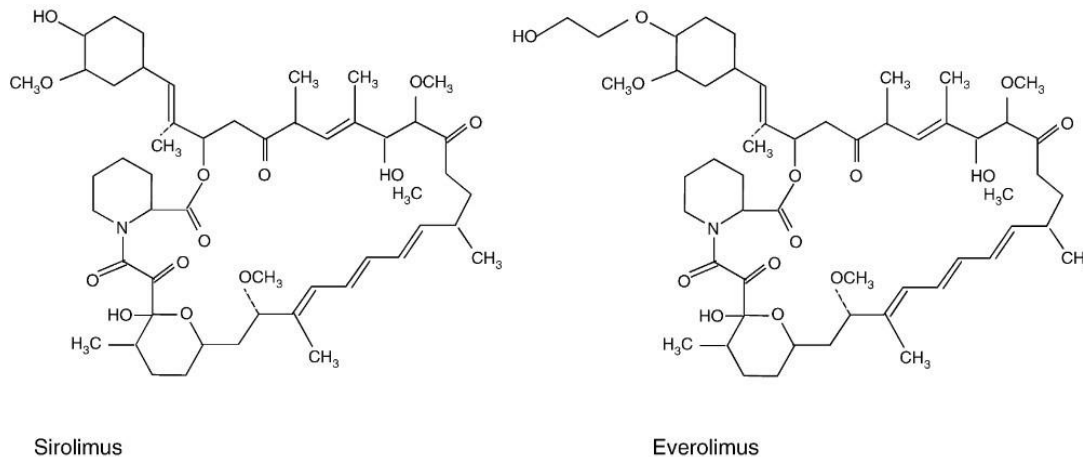


Abbildung 4: Chemische Strukturformel von Everolimus und Sirolimus

Quelle: Taylor, Watson, & Bradley, 2005

Die Wirkung beruht auf der Hemmung der IL-2- und IL-5-induzierten Proliferation von hämatopoetischen (B-, T-Zellen) und nicht-hämatopoetischen Zellen (glatte Muskelzellen), welche von zahlreichen Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Everolimus wird auch nach Organtransplantationen von Niere oder Leber erfolgreich eingesetzt (Nashan, 2002). Die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation von Lymphozyten und mesenchymalen Zellen, welche im Verlauf der zellulären Immunantwort auf ein körperfremdes Antigen eingeleitet wird, wird verhindert (Schuler et al., 1997b). Somit wirken mTOR-Inhibitoren antiproliferativ auf vaskuläre glatte Muskelzellen, auf vaskuläres Remodeling, die Angiogenese und vorallem auf das Immunsystem (Schaffer & Ross, 2010). Schuler et al. (1997) untersuchten die Pharmakologie von RAD in vitro und in vivo in verschiedenen Modellen und stellten fest, dass RAD neben der antiproliferativen auch eine immunsuppressive Wirkung hat (Schuler et al., 1997a). Hierfür bilden Rapamycin und auch sein Derivat einen Komplex mit dem intrazellulären Immunophilin FK506 binding protein-12 (FKBP12) (Taylor et al., 2005). Der Komplex aus RAD/FKBP12 bindet wiederum an das FKBP-Rapamycin-associated-Protein (FRAP), das auch als mTOR (mammalian target of rapamycin) bezeichnet wird, so dass ein trimolekularer Komplex entsteht (Hentges

et al., 2001). Durch diese Interaktion wird die FRAP (mTOR)-gesteuerte Phosphorylierung und Aktivierung der Zellzyklus-spezifischen Kinase p70S6-Kinase sowie die Aktivierung des elongation-factor-4E-bindenden Proteins (4E-BP1) inhibiert. Die p70S6-Kinase stimuliert im aktiven Zustand die Biosynthese von ribosomalen Komponenten und ist somit bedeutend für das Fortschreiten des Zellzyklus und der Zellproliferation (Hentges et al., 2001). Durch die Blockade ist die Induktion der G1- in die S- Phase des Zellzyklus nicht mehr möglich, was eine Hemmung der Zellproliferation zur Folge hat (Nashan, 2002; Vilella-Bach, Nuzzi, Fang, & Chen, 1999).

Die genaue Bedeutung von Everolimus in der Therapie der chronischen Reaktion nach einer Lungentransplantation ist noch nicht ausreichend bestimmt. Allerdings hat dieses Medikament schon eine verbesserte Wirkung von Immunsuppressiva in einer in vitro-Studie aufgezeigt (Strueber et al., 2016). In der Herzchirurgie wird das Medikament zur Hemmung der Proliferation von Lymphozyten und bei allogener Vaskulopathie nach einer Herztransplantation appliziert (Eisen et al., 2003). Azzola et al. untersuchten außerdem die anti-fibroproliferative Wirkung von RAD in einem in vitro-Modell und es zeigte sich eine hohe Wirksamkeit. Es konnte letztendlich eine Fibroblastenreduktion von 50% erreicht werden. Andere Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder Azathioprin zeigten erst bei höheren Dosen eine relevante antifibroproliferative Wirkung (Azzola et al., 2004). Bei Schuler et al. (1997) waren orale Dosen zwischen 1 mg/kg/d und 5 mg/kg/d in vivo in unterschiedlichen Tiermodellen wirkungsvoll (Schuler et al., 1997a). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Everolimus auch fibroproliferative Prozesse in Spenderlungen transplantierte Patienten unterdrücken kann. RAD besitzt einen anderen Angriffspunkt als konventionelle Immunsuppressiva und wurde deshalb in Kombination mit den Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren in unserer Studie eingesetzt.

1.4.3 Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren

Tyrosinkinasen (TK) sind eine wichtige Untergruppe von Proteinkinasen. Sie sind primäre Mediatoren eines Signalwerkes, welches extrazelluläre Signale ins Zellinnere überträgt. Sie katalysieren die Übertragung von Phosphatgruppen von Adenosintriphosphat (ATP) auf Zielproteine. So werden das Zellwachstum und die Zellmigration reguliert. Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren greifen hier an und können somit beispielsweise das Zellwachstum hemmen und wirken antiproliferativ (Dreves & Droll, 2005).

Imatinib

Das Ziel ist eine wirksame Kombinationstherapie zu finden, welche die CLAD als fibroproliferative Erkrankung verhindert. Als vielversprechender Therapieansatz bei der BO, der Vaskulopathie und des RAS, wie bereits in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe untersucht, gelten die Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (RTKI).

In der fibroproliferativen Phase werden Wachstumsfaktoren wie der platelet derived growth factor (PDGF) und der vascular endothelial growth factor (VEGF) freigesetzt. Diese wirken über Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase (Bonner, 2004). Aus mehreren Publikationen geht hervor, dass der PDGF in der Pathogenese fibroproliferativer Lungenerkrankungen und chronisch kardialer und renaler Abstoßungsreaktionen eine Rolle spielt (Kallio, Koskinen, Aavik, Buchdunger, & Lemström, 1999). PDGF stellt ein Hauptmitogen glatter Muskelzellen und Fibroblasten und geht in eine Bindung mit PDGFR- α und PDGFR- β ein, die sich auf glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Makrophagen befinden (Neuringer, Chalermkulrat, & Aris, 2005). Schon im Jahr 1999 wies eine Studie am heterotopen Trachealspangentransplantationsmodell von Kallio et al. nach, dass dem PDGF eine regulatorische Rolle in der Entstehung der BO zukommt und so RTKIs eine neue Behandlungsmöglichkeit in der Therapie der chronischen Lungenabstoßung sein könnten (Kallio et al., 1999). Aono et al. konnte 2005 in einem Tiermodell, mit welchem Bleomycin-induzierte Lungenfibrose bei Mäusen untersucht wurde, die Wirksamkeit von Imatinib bei der Prävention des Fortschreitens der Fibrose zeigen. Die Hemmung von PDGFR mit Imatinib präsentiert eine deutlich niedrigere Produktion von Lungenfibroblasten. PDGFR wird von Mastzellen produziert und ist eng verbunden mit dem c-Kit-Rezeptor (Aono et al., 2005). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit als weiteres Therapeutikum Imatinib gewählt.

Im Jahr 1996 wurde von Buchdunger et al. über das 2-Phenylaminopyrimidinderivat CGP 57148, das spätere Imatinib, das sowohl die Tyrosinkinase c-Abl als auch den PDGFR mit einer hohen Aktivität in vitro und in vivo hemmt, berichtet. In dieser Studie wurde die antiproliferative Wirkung des Vorläufers des Imatinib auf c-Abl- und PDGF-gesteuertes Tumorwachstum beobachtet (Buchdunger et al., 1996). So sah man in diesem RTKI ein potentielles Medikament für die Therapie von chronisch myeloischer Leukämie (CML), aber auch proliferativer Erkrankungen, die im Zusammenhang mit dem PDGFR stehen (Buchdunger et al., 1996). Im Moment gilt Imatinib als Standardtherapie bei CML (Bhamidipati, Kantarjian, Cortes, Cornelison, & Jabbour, 2013). Buchdunger et al. untersuchten die Wirkung von Imatinib in weiteren Studien. 2002 stellten sie fest, dass Imatinib sowohl den PDGF- α -Rezeptor als auch den PDGF- β -

Rezeptor sowie die Tyrosinkinase c-Kit inhibieren kann (Stammzellefaktor, SCF-Rezeptor) (Buchdunger et al., 2000). Auch der c-Kit-Achse scheint eine wichtige Bedeutung bei der pulmonalen Fibrose zuzukommen. Ding et al. (2013) untersuchten dies im Bleomycin-induzierten Fibrosemodell mit Mäusen (Ding et al., 2013). Der inhibierende Effekt von Imatinib beruht darauf, dass es an der ATP (Adenosintriphosphat)-Bindungsstelle innerhalb der Tyrosinkinasedomäne bindet (Buchdunger, O'Reilley, & Wood, 2002). Es zeigte sich, dass Imatinib nicht nur eine antitumorale Aktivität bei CML besitzt, sondern auch eine hohe Wirkung auf PDGF-gesteuerte Tumore, die mit einer Proliferation und Migration glatter Muskelzellen einhergehen (Buchdunger et al., 2002). Dass der Wachstumsfaktor PDGF auch bei BO-Patienten eine bedeutende Rolle spielt, stellten Hertz et al. schon im Jahr 1992 fest, als sie die bronchoalveoläre Lavage untersuchten (Hertz et al., 1992).

In pharmakologischen Studien wurde festgestellt, dass oral verabreichtes Imatinib gut absorbiert wird und eine absolute Verfügbarkeit von 98% aufweist. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei circa 18 Stunden (siehe Abbildung 5) (Peng, Lloyd, & Schran, 2005). Der Metabolismus von Imatinib erfolgt hauptsächlich über CYP3A4 oder CYP3A5, wobei seine Metaboliten anschließend hauptsächlich über die Galle ausgeschieden werden (Peng et al., 2005). Die gleichzeitige Einnahme von Imatinib und anderen Medikamenten, die die Isoenzyme CYP3A4 und CYP3A5 inhibieren oder induzieren, kann zu Wechselwirkungen mit Störungen des Metabolismus oder Veränderungen in der Plasmakonzentration von Imatinib führen (Peng et al., 2005). Gemäß den klinischen Erfahrungen besteht eine gute Verträglichkeit (Hensley & Ford, 2003).

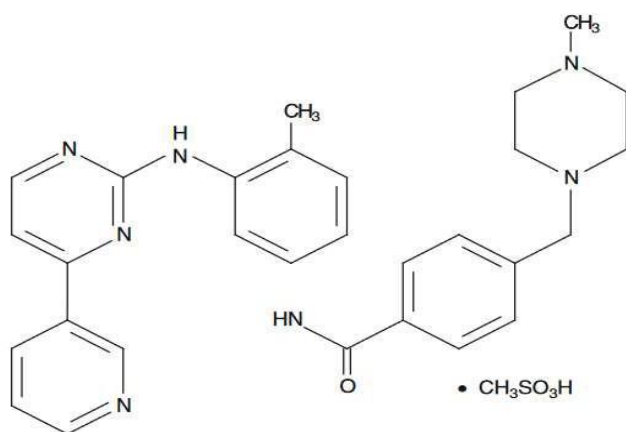


Abbildung 5: Chemische Strukturformel von Imatinib
Quelle: Peng et al., 2005

Vatalanib

VEGF reguliert das Gefäßwachstum und die Gefäßreifung (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Der Wachstumsfaktor ist ebenfalls dafür bekannt, eine vaskuläre Hyperpermeabilität zu induzieren (Dreves et al., 2002). Der angiogene Wachstumsfaktor erhöht die endotheliale Permeabilität und bewirkt die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen. VEGF scheint die luminale Okklusion von Bronchiolen und Gefäßen zu steigern, indem die Produktion von Wachstumsfaktoren und so die inflammatorische Reaktion forciert wird (Krebs et al., 2006). In einem Rattenmodell der heterotopen Trachealimplantation wurde bereits 2006 von Tikkanen beschrieben, dass die Prophylaxe mit einem VEGF-Rezeptor-Hemmstoff wie Vatalanib oder einem PDGF-Rezeptor-Hemmstoff wie Imatinib die Entstehung einer obliterativen Atemwegserkrankung signifikant reduziert. Die kombinierte Gabe von Tyrosinkinaseinhibitoren kann die Entwicklung sogar komplett verhindern (Tikkanen et al., 2006).

Vatalanib (PTK787/ZK 222584) ist ein kleines antiangiogenes Molekül, das reversibel und kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase bindet, um so die Autophosphorylierung zu hemmen (Scott, Meinhardt, Jacques, Laurent, & Thomas, 2007). Die VEGF-Rezeptor-tyrosinkinase-Aktivität und auch die Aktivität anderer Kinasen, wie die PDGF- und die c-Kit-Rezeptor-tyrosinkinase, wird auf diese Weise eingeschränkt (Tikkanen et al., 2006). In zell-basierten Assays wurden die Proliferation, die Migration und das Überleben von Endothelzellen unterbunden (Wood et al., 2000). Das Medikament gehört zu der Klasse der Aminophthalazine (siehe Abbildung 6) und besitzt eine hohe Bioverfügbarkeit (Scott et al., 2007). Es unterbindet alle bekannten VEGFs (VEGFR-1 [Flt-1], VEGFR-2 [KDR] und VEGFR-3 [Flt-4]) mit einer höheren Potenz gegenüber VEGFR-1 und VEGFR-2 (Jost et al., 2006). Über die Inhibition von VEGF-1 und VEGF-2 wird das Blutgefäßwachstum und über VEGF-3 das Wachstum der Lymphgefäße gehemmt (Scott et al., 2007). Vatalanib wurde in verschiedenen Tiermodellen mit einer Vielzahl an verschiedenen soliden Tumoren untersucht. Es wurde ein Stillstand des Tumorwachstums beobachtet (Scott et al., 2007). Wood et al. (2000) kamen in ihrer Studie zur Untersuchung von PTK787/ZK 222584 als potenter Inhibitor des Wachstumsfaktors VEGF zu dem Ergebnis, dass Vatalanib nicht nur bei der Inhibition der Vaskularisierung eines Tumors, sondern auch in Erkrankungen mit VEGF-vermittelte Angiogenese eine bedeutende Rolle spielt (Wood et al., 2000).

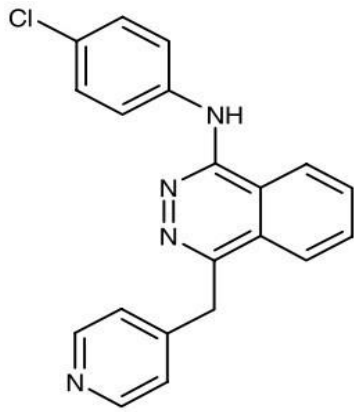


Abbildung 6: Strukturformel von Vatalanib

Quelle: Scott et al., 2007

1.5 Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden unter der Leitung von PD Dr. med. Stephan W. Hirt tierexperimentelle Untersuchungen zur Bestimmung spezifischer und unspezifischer Einflussfaktoren auf die chronische Transplantatabstoßung der Lunge durchgeführt (Hirt, 2003). Dabei verwendete man das Modell der linksseitigen orthotopen Lungentransplantation mit Inzuchtratten. Gewählt wurde eine schwach allogene Rattenstammkombination mit Fischer 344-Ratten (F344[RT1^{lv1}]) als Spender und Wistar-Kyoto-Ratten als Empfängertiere (WKY[RT1^l]) in Anlehnung an eine Vorläuferarbeit von Matsumura et al. im Jahr 1995 (Matsumura et al., 1995b). Das Modell entspricht annähernd der klinischen Situation. Hirt et al. erforschten in diesem Modell 1999 und 2003, inwiefern die akute Reaktion sowie der Zeitpunkt der Behandlung Auswirkungen auf die Entwicklung einer chronischen Reaktion haben (Hirt et al., 1999a; Hirt, 2003). In der Kontrollgruppe, die Gruppe ohne Immunsuppression, zeigte sich am postoperativen Tag (POD) 15 eine moderate bis schwere akute Abstoßung mit hochgradig lymphozytäre Bronchiolitis, welche bis zum POD 60 in einer Bronchiolitis obliterans mit vaskulärer Sklerose endete. Behandelte man die transplantierten Tiere mit einer Triple-Immunsuppression (Cyclosporin A, Azathioprin, Prednisolon), so entwickelten die Ratten in dieser Versuchsreihe weder eine akute noch eine chronische Reaktion. Bei der Beurteilung der Untersuchungs- und Applikationszeiträume schlussfolgerten die Autoren, dass die frühe Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion in diesem Modell einen entscheidenden pathogenetischen Faktor in der Entwicklung einer chronischen Reaktion mit einer BO und einer Vaskulopathie nach einer Lungentransplantation darstellt. Außerdem ergab sich, dass eine Behandlung mit konventionellen Immunsuppressiva die Entstehung der chronischen Abstoßung nur

verhindern kann, wenn es in der Frühphase der akuten Reaktion gegeben wird (Hirt et al., 1999a; Hirt, 2003). Dazu führte Hirt zwei weitere Versuchsreihen durch:

1. Die Tiere wurden zu einem früheren Zeitpunkt (POD 9-11) mit einer konventionellen Abstoßungsbehandlung mittels drei konsekutiver, hochdosierter Kortison-Boli behandelt. Durch diese frühe Kortisongabe konnte die akute Inflammation reduziert und somit der chronische Verlauf abgeschwächt werden.
2. Die Tiere erhielten die gleiche Kortisontherapie, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt (POD 14-16), an welchem sich die akute Abstoßung gerade an ihrem Zenit befand. Dabei war zwar eine Rückbildung des histologischen Grades der akuten Transplantatabstoßung möglich. Die inflammatorische Schädigung des Transplantats war jedoch so weit fortgeschritten, dass daraus bei progredienter Destruktion ein irreversibler Transplantatverlust resultierte.

Es folgten weitere Studien unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung derselben Inzuchtrattenstämme. Hier konnten die Ergebnisse von Matsumura et al. (1995) und Hirt et al. (1999) bestätigt werden (Suesskind-Schwendi et al., 2012). So entstand die Schlussfolgerung, dass dieses Modell es ermöglicht, sowohl die akute als auch die chronische Transplantatabstoßung nach allogener und orthotoper Lungentransplantation zu untersuchen. Daher kann es als ein reproduzierbares und klinisch relevantes Modell angesehen werden (Suesskind-Schwendi et al., 2012).

Des Weiteren wurden mehrere Versuchsreihen mit dem besagten Modell durchgeführt. Die Effektivität von Everolimus als Monotherapie auf die Entstehung einer chronischen Transplantatabstoßung wurde untersucht (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Everolimusgabe ab POD 0 die Entwicklung hochgradig akuter Veränderungen in der Frühphase nach Lungentransplantation signifikant reduziert, was bei einer späteren Applikation ab POD 14 nicht möglich war (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). Ebenfalls im Jahr 2013 wurde eine Studie gestartet, welche die Wirkung von Imatinib allein und in Kombination mit Everolimus untersucht. Die alleinige Gabe des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors hatte keine Wirkung auf die akute Abstoßung. Die Entwicklung der BO und einer vaskulären Sklerose konnte verzögert werden. Durch die Kombination mit dem mTOR-Inhibitor gelang es, Anzeichen einer akuten Reaktion zu reduzieren und eine chronische Reaktion zu verzögern und sogar zu verhindern. Hier zeigte sich eine synergistische Wirkung von Imatinib und Everolimus (Suesskind-Schwendi et al., 2013a).

Im Jahr 2017 wurde von Suesskind-Schwendi et al. an der Wirkung des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Nintedanib auf die Entwicklung der CLAD im allogenen linksseitigen Rattenlungentransplantationsmodell geforscht. Gegenüber der Kontrollgruppe konnten keine Veränderungen an POD 20 oder 60 festgestellt werden. Jedes Tier entwickelte eine chronische Abstoßungsreaktion bis zum POD 60. Nintedanib reduzierte die Expression von den Wachstumsfaktoren PDGF-A und VEGF-A und deren Rezeptoren PDGFR- α and VEGFR-2 60 Tage nach der Transplantation (Suesskind-Schwendi et al., 2017).

Auch die alleinige Applikation von Vatalanib und die Kombination der Medikamente Imatinib und Vatalanib wurden in einer Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Therapie mit Imatinib und Vatalanib zeigte nicht nur eine signifikante Reduktion der chronischen bronchiolären und vaskulären Reaktion, sondern auch der interstitiellen Fibrose. Die Monotherapie mit Vatalanib reduzierte die chronische vaskuläre Reaktion signifikant, welche oft von einer BO begleitet wird (Stewart et al., 2007). Des Weiteren verhinderte die Kombination mit Imatinib die obliterative Bronchiolitis in den Rattenlungen beinahe komplett (Keil et al., 2019).

1.6 Ziel und Design des Experiments

Für viele Patienten mit Lungenerkrankung im Endstadium stellt die Lungentransplantation oftmals die letzte noch bleibende Behandlungsmöglichkeit dar (Verleden et al., 2014). Aufgrund infektiöser und nichtinfektiöser Komplikationen nach der Transplantation kann diese Therapie allerdings nicht als Heilmittel angesehen werden (Belperio et al., 2009). Chronic allograft dysfunction (CLAD) ist ein bedeutendes postoperatives Problem, das den Langzeitverlauf und das Langzeitüberleben einschränkt (Verleden et al., 2015b). Die derzeit nicht zufriedenstellenden klinischen Ergebnisse und die teils schweren Nebenwirkungen der gängigen immunsuppressiven Medikamente verstärken die Nachfrage nach neueren Immunsuppressiva mit einem anderen Wirkmechanismus. Aufgrund dieser Tatsache ist es nötig, einen neuen therapeutischen Ansatz zu finden, der den Prozess der Transplantatabstoßung, der sich aus der akuten und der chronischen Abstoßung zusammensetzt, verhindern kann. Im Zentrum unserer Untersuchung steht die Kombinationstherapie von Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Vatalanib zusammen mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus. Hier zeigt sich ein anderer Angriffspunkt als bei den konventionellen Immunsuppressiva. Ein antiinflammatorischer und antiproliferativer Effekt wird erwartet. Die Studie baut auf den bereits vorliegenden tierexperimentellen Ergebnissen von Hirt et al. (1998, 1999) auf und wird, wie die vorhergehenden Versuche, in einem Modell der unilateralen Lungentransplantation der Inzuchtratte durchgeführt. Die Ergebnisse

von Hirt et al. unterstreichen die Notwendigkeit einer effektiven Therapie der akuten Abstoßung, um eine chronische Reaktion zu vermeiden.

Der Zeitpunkt des Therapiebeginns der einzelnen Substanzen ergab sich aus vorhergehenden Versuchen (Suesskind-Schwendi et al., 2013b; Suesskind-Schwendi et al., 2013a). Die Therapie mit Imatinib und Vatalanib beginnt einen Tag vor der Transplantation und endet mit dem Zeitpunkt der Organentnahme. Everolimus wird ab dem postoperativen Tag 7 appliziert. Damit wird sichergestellt, dass sich eine akute Abstoßung entwickelt hat, welche ausschlaggebend für die Entwicklung der chronischen Transplantatabstoßung ist. Die Wundheilung ist hier bereits abgeschlossen, da diese als unerwünschte Wirkung durch Everolimus beeinflusst werden könnte (Suesskind-Schwendi et al., 2013b).

Die Dosierungen für Imatinib (20 mg/kg KG) und Everolimus (2,5 mg/kg KG) ergeben sich aus eigenen Vorarbeiten (Suesskind-Schwendi et al., 2013b; Suesskind-Schwendi et al., 2013a). Die Dosierung von Vatalanib (100 mg/kg KG) basiert auf der Arbeit von Tikkanen et al. (2006) in einem Rattenmodell zur Behandlung der obliterativen Atemwegserkrankung in der Ratte (Tikkanen et al., 2006).

Die zu untersuchenden Zeitpunkte resultierten aus der Fragestellung zur Untersuchung des Wirkmechanismus sowie der Langzeitwirkung der Substanzen auf die allogenen transplantierten Lungen. Diese Zeitpunkte basieren auf Vorarbeiten mit diesem Modell und ähnlicher Fragestellung (Suesskind-Schwendi et al., 2013a). In dem Versuchsvorhaben sollen sowohl die Wirkmechanismen von Imatinib, Vatalanib und Everolimus sowie auch die Wirkung im Langzeitverlauf auf die chronische Transplantatabstoßung untersucht werden. Dazu sind zwei Untersuchungszeitpunkte notwendig, welche immer mit der Tötung des Tieres einhergehen.

Da die akute Transplantatabstoßung ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung der chronischen Transplantatabstoßung ist, ist ein hierfür geeigneter Untersuchungszeitpunkt unerlässlich. Der erste Zeitpunkt ist demnach der POD 20. Am POD 20 ist in unserem Modell der Höhepunkt der akuten Abstoßung erreicht. Hier soll der Einfluss der Kombinationstherapie auf die akute Transplantationsabstoßung untersucht werden. Des Weiteren erscheint dieser Tötungszeitpunkt notwendig, um den Pathomechanismus der chronischen Transplantatabstoßung besser beobachten und verstehen zu können. Die Untersuchung spezifischer Wachstumsfaktoren c-Kit, PDGF und VEGF kann ebenfalls Aufschluss über die chronische Reaktion geben. Als zweiter Untersuchungszeitpunkt wurde der POD 60 herangezogen. Hier zeigte sich in unserem Modell in den allogenen transplantierten, unbehandelten Kontrolltieren eine komplette chronische Abstoßung.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von RTK-Inhibitoren Imatinib und Vatalanib und die Kombination mit einem mTOR-Inhibitor auf die chronische Transplantatabstoßung, einer Bronchiolitis obliterans (BO), einer vaskulären Sklerose und eines restrictive allograft syndrome (RAS) durch Imatinib, nach experimenteller orthotroper Lungentransplantation in der Ratte zu untersuchen.

Folgende Fragen wurden dabei gestellt:

- Kann die dreifache Medikation mit einer antiinflammatorischen Wirkung die entzündlichen Prozesse, die während der akuten Reaktion entstehen, inhibieren oder reduzieren?
- Kann die chronische Transplantatabstoßung (vaskuläre Sklerose, BO, RAS) im Rattenlun-
gentransplantationsmodell durch die Kombinationstherapie mit antifibrotischer und anti-
proliferativer Wirkung reduziert oder verhindert werden?
- Welche Wirkung lässt sich in Bezug auf die Expression der Wachstumsfaktoren PDGF und
VEGF sowie deren Rezeptoren erzielen?
- Welche Rolle spielt die Rezeptortyrosinkinase CD117 (c-Kit), die die Wachstumsfaktoren
durch Phosphorylierung aktiviert?

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Mit einem bereits etablierten allogenen Rattentransplantationsmodell wurde der Effekt der Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, Imatinib und Vatalanib, in Kombination mit einem mTOR-Inhibitor, Everolimus geprüft. Hierfür wurde eine linksseitige orthotope Lungentransplantation (LTx) durchgeführt. Als Empfängertiere diente der Wistar-Kyoto-Rattenstamm (WKY[RT1]^l-Ratten) und als Spendertiere der Fischer-Rattenstamm (F344[RT1]^{lv1}-Ratten), welche sich im MHC I-Komplex differenzieren. Dieses Modell wurde gewählt, da es bei lediglich geringer MHC-I-Differenz als schwach allogenes Modell und der Entwicklung einer schwachen akuten Abstoßung der klinischen Situation im Menschen sehr nahe kommt (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Darüber hinaus wird bei lediglich einseitig erfolgter Lungentransplantation die akute Abstoßung vom Versuchstier überlebt und das Modell erlaubt somit Variationen der immunsuppressiven Therapie Untersuchungen zum Einfluss der akuten Abstoßung auf die chronische Transplantatabstoßung der Lunge (Hirt, 2003). Das Ziel war, die chronische Transplantatabstoßung nach einer Lungentransplantation zu reduzieren. Diese entwickelte sich ohne weitere Intervention und lies sich gut darstellen. Es wurden sowohl der gesundheitliche Verlauf der Inzuchttratten, die von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden, als auch die histologische und immunhistologische Auswertung untersucht.

Zum Start des Versuchs waren die Tiere ca. acht Wochen alt und wogen 200-350g. Die Haltung erfolgte in dem Tierlaboratorium der Universität Regensburg bei 22 °C Raumtemperatur, 50-60% Luftfeuchtigkeit und einem ausgeglichenen Tag- und Nachtrhythmus. Es wurden maximal fünf Tiere pro Käfig in einem offenen Euro-Typ IV-Polycarbonatkäfig (595x380x200mm) gehalten, welche mit Kleintiereinstreu (Ssniff GmbH, Soest) gefüllt waren. Die Käfige wurden einmal pro Woche gewechselt und anschließend mit 80°C heißem Wasser gereinigt. Das Hygienekonzept für die Tierlaboratorien der Universität Regensburg und die jeweils zugehörige "Health Monitoring reports" (HMRs) genügen den wissenschaftlichen und tierschutzrechtlichen Anforderungen für den hier beantragten Versuch. Den zuständigen Behörden (Genehmigungs- und Aufsichtsbehörde) liegt das Hygienekonzept der konventionellen Haltung vor.

Zur Flüssigkeitsversorgung stand den Tieren ausreichend Wasser aus der Leitung zur Verfügung. Die Ratten wurden mit Standard-Diäten für Labornager (Ssniff GmbH, Soest, Haltungsfutter V1535) versorgt. Die Adaption an die Haltungsbedingungen betrug mindestens zwei

Wochen vor dem jeweiligen Versuchsbeginn. Der für die Durchführung des Versuches genehmigte Antrag liegt der zuständigen Behörde unter dem Aktenzeichen 55-2-DMS 2532.2. 107 vor.

2.2 Versuchsgruppen

Für die Versuche zur Wirkung der RTK-Inhibitoren zusammen mit einem mTOR-Inhibitor wurden zwei Versuchsgruppen ausgewählt: Eine Studiengruppe, in welcher die Tiere Medikamente Imatinib, Vatalanib und Everolimus verabreicht bekamen und eine unbehandelte Kontrollgruppe. Für die Organentnahme wurde der Tag 20 (POD 20, postoperativer Tag 20) und Tag 60 (POD 60, postoperativer Tag 60) zur Bewertung der chronischen Abstoßung herangezogen.

Am POD 20 wurde in unserem Modell der Höhepunkt der akuten Abstoßung erreicht. Hier sollte der Einfluss von Imatinib, Vatalanib und Everolimus auf die akute Reaktion untersucht werden. Als zweiter Untersuchungszeitraum wurde der POD 60 herangezogen. Hier zeigt sich in der allogenen transplantierten, unbehandelten Kontrollgruppe eine komplette Transplantatabstoßung. Die Zeitpunkte basieren auf Vorarbeiten mit diesem Modell und ähnlicher Fragestellung (Suesskind-Schwendi et al., 2013b).

In der Studiengruppe erfolgte die genaue Medikamentenapplikation der Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren präoperativ, da der positive Effekt in der Literatur beschrieben ist. Everolimus wurde am POD 7, das heißt zum Zeitpunkt der beginnenden akuten Abstoßung appliziert. Hier sollte der antiinflammatorische Effekt dieses Medikamentes auf die initiale, akute Phase untersucht werden. Auch der Einfluss der akuten Abstoßungsreaktion auf eine spätere Entwicklung einer chronischen Abstoßung wurde beobachtet (Tikkanen et al., 2006).

Linke und rechte Lunge aller toten Tiere wurden histologisch und immunhistologisch aufgearbeitet. Neben den zwei Versuchsgruppen wurden auch die rechten, nicht transplantierten Lungen der Spendertiere (Fischer-Rattenstamm, native Lungen) untersucht. Diese wurden explantiert, lediglich mit Euro-Collins-Lösung gespült und dienten als Referenzgruppe für physiologische, gesunde Lungen ohne Transplantationsschädigung.

Kontrollgruppe

Es wurde bei 27 WKY[RTI]¹-Ratten eine linksseitige LTx durchgeführt. Anschließend fand keine prae- oder postoperative medikamentöse Immunsuppression statt. Aus dieser Gruppe wurden zwölf Tiere an POD 20 und 15 Tiere an POD 60 getötet (siehe Tabelle 3).

Studiengruppe

Bei 15 WKY[RTI]¹-Ratten wird analog zur Kontrollgruppe eine Transplantation des linken Lungenflügels durchgeführt (siehe Tabelle 3). Die Applikation von Imatinib (20 mg/kg KG) und Vatalanib (100 mg/kg KG) erfolgt ab dem POD -1 per Schlundsonde (siehe Tabelle 4). Die Dosierungen für Imatinib und Everolimus ergeben sich aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). Die Dosierung von Vatalanib basiert auf der Arbeit von Tikkanen und Mitarbeitern (2006) in einem Rattenmodell zur Behandlung der obliterativen Lungenerkrankung in der Ratte (Tikkanen et al., 2006). Die Applikation per Schlundsonde erfolgt unter einer kurzen Isofluran-Rauschnarkose. Everolimus (2,5mg/kg) wird in der gleichen Sitzung intraperitoneal ab dem postoperativen Tag 7 täglich appliziert (siehe Tabelle 5).

Tabelle 3: Versuchsgruppen

Versuchsgruppen	Tag der Organentnahme	Anzahl der Tiere
Kontrollgruppe	POD 20	12
	POD 60	15
Studiengruppe (Vatalanib, Imatinib und RAD)	POD 20	6
	POD 60	9

Tabelle 4: Medikamentenschema Imatinib/Vatalanib

POD -1	POD 0	POD1 bis 20/60 täglich
X	x	x

Imatinib (20 mg/kg KG) und Vatalanib (100 mg/kg KG)

Tabelle 5: Medikamentenschema Everolimus

POD -1	POD 0 bis 6	POD7 bis 20/60 täglich
-	-	x

Everolimus (2,5mg/kg)

2.3 Narkose und Beatmung

Die Operationen der Versuchstiere wurden von Frau Eva Lesser und Frau Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi an der Universität Regensburg durchgeführt. In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden die Narkose und die Beatmung vor und während der Transplantation detailliert beschrieben.

Vor der Operation wurden alle Tiere gewogen. Die Spender- und Empfängertiere bekamen unter einer kurzen Isofluran-Rauschnarkose eine Injektion Chloralhydrat (300mg/kg) intraperitoneal (i.p.) sowie ein zentral wirksames Opiat (Buprenorphin 0.05 - 0.1 mg/kg KG sub cutan alle 12h) zur Schmerzvorbeugung. Zur besseren Verteilung des Narkotikums wurde der Bauch danach massiert. Chloralhydrat hat den Vorteil, dass es neben der narkotischen Wirkung atemdepressiv wirkt, so dass das Tier während der Operation weniger mitatmen konnte. Anschließend wurde im thorakalen und abdominalen Bereich rasiert und desinfiziert. Die Isofluran-Rauschnarkose (Baxter, Deutschland) wurde daraufhin für kurze Zeit fortgesetzt. Zur endotrachealen Intubation des Empfängertieres wurde ein 16 G-Abocath-Katheder eingeführt und an das Beatmungsgerät (Harvard Apparatus, March-Huggstetten) angeschlossen. Während der kompletten OP erfolgte die Beatmung mit 100% Sauerstoff mit folgender Einstellung: 40-50 Atemzüge pro Minute und bei einem Atemzugvolumen von 2,5ml. Zur Erhaltung der weiteren Narkose mit Isofluran wird ein Gasfluss von 1,5 l/min eingestellt. In Narkose wurden die Ratten zur Reduktion der bronchialen Sekretion und zum Schutz der vagalen Inhibition während der chirurgischen Manipulation am Brustkorb mit 0,2 mg/kg KG Atropinsulfat intramuskulär prämediziert. Gegebenenfalls wurde das Muskelrelaxans Pancuronium (0,01mg/kg) eingesetzt.

2.4 Spenderoperation

Die Tiere wurden wie oben beschrieben narkotisiert, rasiert und in Rückenlage fixiert (siehe Abbildung 7). Mittels eines medianen Laparatomieschnitts wurde die Bauchdecke eröffnet. Nach Freilegung der Vena cava inferior wurde in diese 1500 I.E. Heparin-Natrium 25000 (Ratiopharm, Ulm) injiziert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und eine Perfusionskanüle über den rechten Ventrikel des Herzens in die Arteria pulmonalis eingebracht (siehe Abbildung 8). Hierüber wurde die Lunge mit 4°C kalter Euro-Collins-Lösung (10 ml) (EC, Fresenius-Pharma, Gräfelng) unter Zusatz von 1,25 µg Prostaglandin (Ilomedin 20 µg/ml) perfundiert, um die Lunge abzukühlen. Dies verbesserte die ischämische Organschädigung und sorgte dafür, dass später die Lunge blutleer transplantiert werden konnte. Nach Beendigung der Perfusion erfolgte die Entnahme der Lunge und der linke Lungenflügel wurde bis zur Empfängeroperation

in 4°C kalter Euro-Collins-Lösung eingelegt. Die Ischämiezeit betrug etwa eine Stunde. Eine weiße Farbe und ein niedriges Gewicht gaben Hinweis auf eine gute Perfusion. Die mitperfundierte rechte Lunge wurde als Kontrolle und zum Ausschluss immanenter Infektionen des Spenders histologisch aufgearbeitet. Das Spendertier starb mit Perfusion der Lunge in tiefer Narkose und schmerzfrei. Die Dauer der Spenderoperation betrug etwa fünf Minuten.

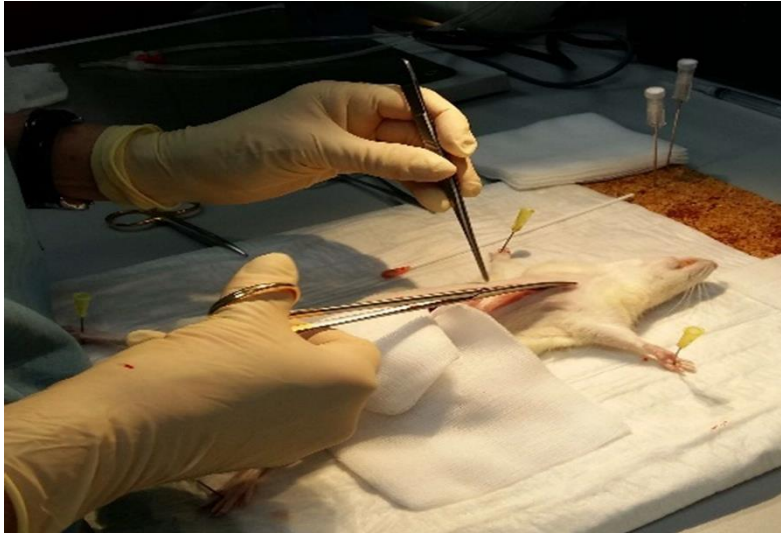


Abbildung 7: Spenderoperation

Diese Abbildung zeigt die Lagerung und die mediane Laparatomie der Bauchdecke des Spendertiers.

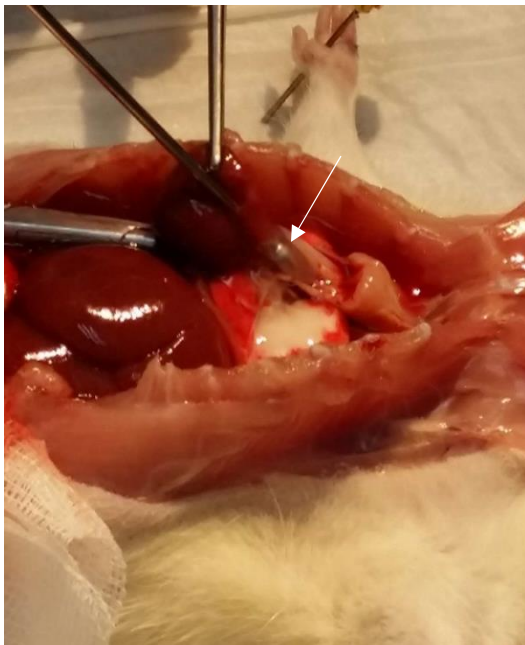


Abbildung 8: Spenderoperation

Hier ist der Thorax bereits eröffnet und das Einbringen der Kanüle (siehe weißer Pfeil) zur Perfusion der Lunge wird gezeigt. Die Lunge erscheint nun weißlich.

2.5 Empfängeroperation

Die Narkose der Empfängertiere wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Der operative Eingriff erfolgte in tiefer Narkose. Das Tier wurde in Linksseitenlage (siehe Abbildung 9) gebracht und es fand die Desinfektion des OP-Gebiets statt. Der laterale Thorax wurde im dritten oder vierten Intercostalraum (ICR) eröffnet und für eine bessere Sicht wurde ein Rippen- Mikrospreizer (Aesculap, Tuttlingen) eingesetzt. Weitere Schritte der Operation erfolgten unter einem speziellen Operationsmikroskop (Wild M650, 16-fache Vergrößerung). Die Lunge wurde anschließend nach extrakorporal verlagert und in eine feuchte Kompresse gebettet (siehe Abbildung 10). So konnte der Lungenhilus gut sichtbar dargestellt werden, der linke Hauptbronchus und die Arteria sowie die Vena pulmonalis konnten freipräpariert werden. Der Bronchus wurde mit einer zentralen Ligatur okkludiert und die vaskulären Strukturen, nachdem eine Klemme nahe am Hilus platziert wurde, abgesetzt. Die Durchtrennung der Gefäße erfolgte weit peripher. Daraufhin wurde die Lunge unter sorgfältiger Darstellung und Schonung des Nervus phrenicus und des Nervus vagus explantiert.

Unmittelbar nach Entnahme der linken Empfängerlunge erfolgte die Implantation der linken Spenderlunge (Ischämiezeit der Lunge: ca. eine Stunde). Die Stümpfe der Gefäße und des Bronchus der Spenderlunge wurden auf die passende Länge gekürzt. Mit einer End-zu-End- Anastomose wurden die Pulmonalvenenstümpfe miteinander verbunden. Die Naht erfolgte fortlaufend und mit monofilen, nicht-resorbierbaren Nahtmaterial aus Polypropylen (10-0 Prolene, Ethicon/Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt). Anschließend wurden auch die Pulmonalarterienstümpfe mit demselben Material und derselben Technik anastomosiert. Um Stichkanalblutungen zu vermeiden, wurden die Anastomosen mit Tabotamp[®] (Ethicon, Norderstedt, siehe Abbildung 11), ein Hämostypticum, umlegt. Es folgt die Öffnung der Gefäßklemme und somit die Reperfusion der bis dahin ischämischen Spenderlunge. Anschließend wurde eine End-zu-End-Anastomose zwischen dem Spenderbronchus und dem Empfängerbronchus angelegt. Hier wurde fortlaufend ebenfalls mit 10-0 Prolene genäht. Zuerst erfolgt die Naht der Bronchushinterwand, um die Empfängerlunge durch die noch offene Anastomose mithilfe einer Kanüle atelektasefrei zu blähen. Daraufhin wurde die Anastomose fertig gestellt und die zentrale Ligatur am Hauptbronchus konnte entfernt werden. Die Anastomosendichtigkeit wurde durch eine Wasserprobe mit der Beobachtung einer Blasenbildung getestet.

Anschließend wurde eine Thoraxdrainage eingelegt (Abocath 16 G, Abbot Diagnostics, Wiesbaden), um den physiologischen Unterdruck im Pleuraspalt wiederherzustellen. Nach dem Verschluss des Thoraxes in vier Schichten wurde die Drainage wieder gezogen. Der Hautverschluss

erfolgte mit einem Hautklammergerät. Bei ausreichender Spontanatmung und vorhandenem Kornealreflex konnte das Tier vom Beatmungsgerät getrennt und anschließend extubiert werden. Die Dauer des Eingriffs betrug etwa 60 Minuten. Die folgenden Abbildungen 9-11 zeigen verschiedene Ausschnitte dieser Operation an der Ratte.



Abbildung 9: Empfängeroperation

Hier sieht man das Empfängertier in linksseitiger Lage fixiert. Eine Mullkomresse wurde zur optimalen Lagerung untergelegt. Das OP-Gebiet ist rasiert und der endotracheale Tubus ist sichtbar.

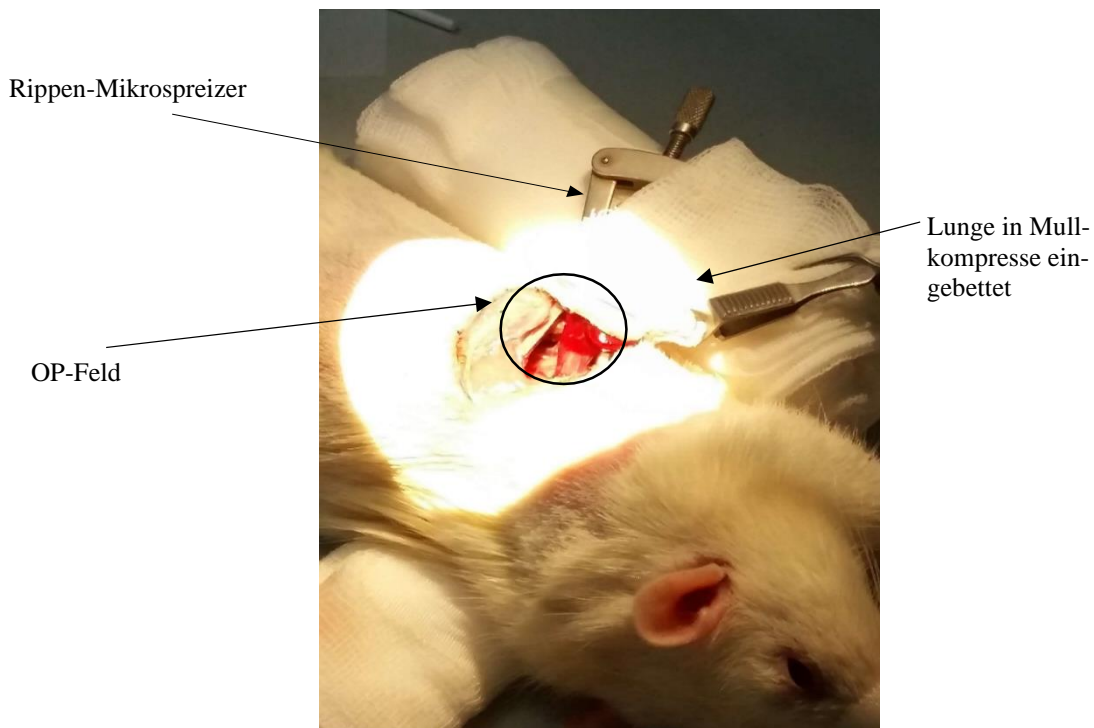


Abbildung 10: Empfängeroperation

Die Lunge ist extracorporal gelagert. Man sieht den Rippen-Mikrospreizer, ein Retraktor, der das OP-Feld offenhält

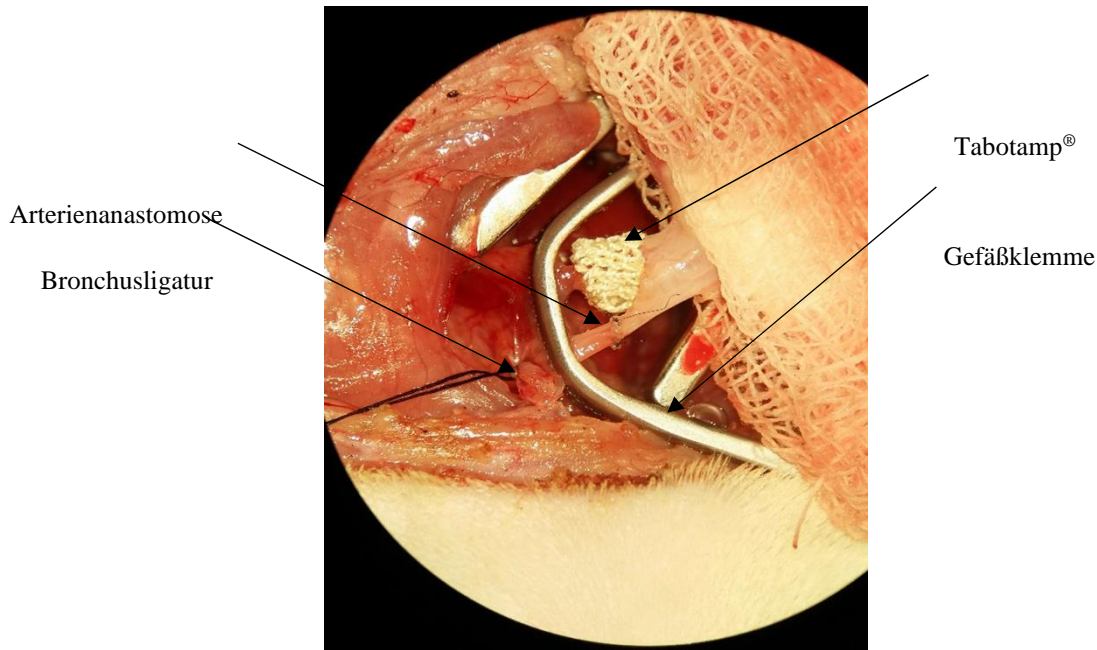


Abbildung 11: Empfängeroperation

Dies zeigt einen perioperativen Bildausschnitt unter dem Mikroskop in 16-facher Vergrößerung. Die Gefäße und der Bronchus sind freipräpariert und die Empfängerlung ist bereits explantiert. Die Spenderlung ist in der Mullkomresse gelagert. Der Bronchus ist zentral ligiert und die Gefäße sind noch geklemmt. Die Arterie und die Vene sind zuvor anastomosiert worden. Auf der venösen Anastomose liegt ein Tabotamp®-Streifen zur Blutstillung.

2.6 Postoperativer Verlauf

Postoperativ verbleiben die transplantierten Tiere noch für einige Stunden unter permanenter Beobachtung und werden dann zunächst einzeln in den Käfigen gehalten. Zur Prophylaxe postoperativer Schmerzen erfolgt eine obligate Analgesie über 3–6 Tage mit zentral wirksamen Opiaten (Buprenorphin 0.05-0.1 mg/kg KG s.c. alle 12h). Ab dem zweiten postoperativen Tag können die Tiere wieder in Gruppen gehalten werden. Eine schnelle Wiedereingliederung in die Gruppe erwies sich als sehr positiv für die Ratten. Der Gesundheitszustand jedes Tieres wird täglich überprüft. Die Hautklammern werden bei per primam erfolgter Wundheilung am 7. postoperativen Tag entfernt.

2.7 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Zur histologischen Aufarbeitung und Beurteilung der implantierten Lungen war die Tötung der Ratten zur Einschätzung der chronischen und akuten Transplantatabstoßung unumgänglich. Die Diagnose der chronischen Transplantatabstoßung ist eine histologische und erfordert im Kleintiermodell die Tötung des Tieres. Eine Verlaufskontrolle durch serielle transbronchiale oder offene Biopsien ist in diesem Modell nicht möglich. Daher wurden die Tiere an den definierten Zeitpunkten (postoperativer Tag 20 und 60) gewogen und unter tiefer Narkose mit analgetischer Wirkung (Dreifachnarkose aus Medetomidin 150µg/kg KG, Midazolam 2 mg/kg KG und

Fentanyl 5µg/kg KG) laparotomiert. Nach der gezielten Blutentnahme aus der Vena cava wird diese durchtrennt und das Tier blutet aus. Die Ratten werden sofort seziiert und beide Lungen, Thymus und Milz entnommen.

Sowohl die transplantierte linke, als auch die rechte Lunge wurden entnommen und makroskopisch nach Größe, Konsistenz und Farbe beurteilt. Nach der Spülung in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl-Lösung) wurden die Transplantate in mehrere Teile geschnitten. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd (4%) und die Einbettung in Paraffin.

2.8 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Mittels eines Paraffinmikrotoms (Leica, Rotationsmikrotom RM 2145) wurden Paraffinschnitte mit einer Stärke von 5µm hergestellt. Diese wurden schließlich verarbeitet und für weitere Analysen verwendet. Im Folgenden werden die verschiedenen Färbungen der Schnitte beschrieben. Von dem linken, transplantierten Lungenflügel und auch von dem rechten, nicht transplantierten Teil der Lunge jedes Tieres wurde je eine der folgenden Färbungen hergestellt: Hämatoxylin-Eosin- (HE-Färbung) und Sirius Elastika-Färbung, CD117-Antikörperfärbung, VEGF-A/VEGFR-2-Antikörperfärbung und PDGF-A/PDGFR- α -Antikörperfärbung. Die gewonnenen Proben wurden histologisch unter Standardfärbungen nach modifizierten Kriterien der ISHLT beurteilt (Suesskind-Schwendi et al. 2012).

2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine konventionelle Methode der Histologie, bei der sich die Kollagenfasern rot und die Kerne sich blau darstellen. Sie wurde hauptsächlich zur Bewertung der akuten Abstoßung herangezogen.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Paraffinschnitte zum Entparaffinieren zunächst zweimal fünf Minuten in Xylol gegeben. Die nächsten Schritte bestanden aus dem Einlegen der Schnitte in eine absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) für je zweimal 2-5 Minuten zur Rehydratisierung. Anschließend erfolgte das Waschen mit VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) für zweimal 2-5 Minuten. Nach der Färbung mit gefiltertem Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für zwei Minuten wurden die Präparate mit VE-Wasser abgespült bis keine Farbwolke mehr entstand. Daraufhin wurden die Präparate kurz in HCl und Ethanol (70%) gedippt, um eine zu starke Färbung zu vermeiden. Bevor die Schnitte mit lauwarmen Leitungswasser gebläut wurden, wurden sie mit VE-Wasser gut abgespült. Das Einlegen in Ethanol 70% und

96% für jeweils zwei Minuten folgte anschließend. Im nächsten Schritt fand die Gegenfärbung für zehn Minuten mit Eosin G statt (ad 200ml Aqua destillata: 1g Eosin G, 50µl Essigsäure) (Merck, Darmstadt), wonach eine Abspülung mit Ethanol 96% folgte. Es wurde mit einer aufsteigenden Ethanolreihe zur Entwässerung fortgefahren. Diese bestand aus dem Einlegen der Schnitte je zweimal für je zwei Minuten in Ethanol 96% und 70% und je zweimal in Xylol für fünf Minuten. Zum Abschluss wurden die gefärbten Schnitten blasenfrei auf Objektträger mit dem Eindeckmittel Entellan® (Merck, Darmstadt) eingebettet.

2.8.2 Sirius-Elastika-Färbung

Ergänzend dazu wurde die Sirius-Elastika-Färbung herangezogen. Hierbei färbt sich insbesondere Kollagen (-I) kräftig rot, was eine Differenzierung der interstitiellen Fibrose in den unterschiedlichen Bereichen der Lunge erleichtert.

Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, einer absteigenden Alkoholreihe (100%-70%) und einer aufsteigenden Reihe (zweimal in 96%) unterworfen. Die elastischen Fasern färbten sich durch die Resorcin-Fuchsin-Lösung schwarz, nachdem die Schnitte für 20 Minuten in ein 60°C heißes Wasserbad gegeben wurden und zehn Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nun fand eine Differenzierung in Ethanol (96%) statt, um den Hintergrund zu entfärben. Anschließend wurden die Präparate mit VE-Wasser gewaschen, 45 Minuten in Picro-Sirius, welches aus Direct Red (0,5g) und gesättigter wässriger Prikrinsäure (500ml) besteht, eingelegt und im Folgenden zweimal in gesäuertem Wasser (0,5% Essigsäure) gewaschen. Mittels dem dreimaligen Einlegen der Schnitte in Ethanol 100% und dem zweimaligen Einlegen in Xylol fand die Entwässerung statt. Nach Abschluss dieser Vorgänge wurden die Präparate mit Entellan® (Merck, Darmstadt) luftfrei unter dem Deckglas eingedeckt.

2.8.3 Immunfärbung

Zusätzlich zur konventionellen Histologie wurden immunhistochemische Färbungen der Lungen ausgewertet. Dazu wurde die Veränderung der Expression der Wachstumsfaktoren PDGF-A und VEGF-A, deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 sowie die Tyrosinkinase CD117 (c-Kit) herangezogen.

Die 5µm dicken Paraffinschnitte wurden hierfür auf einen StarFrost® Advanced-Objektträger und über Nacht bei 50°C getrocknet. Zur Entparaffinierung folgte die absteigende Alkoholreihe mit Xylol für zweimal zehn Minuten, jeweils Ethanol 100% und 96% für zweimal fünf Minuten

und anschließend 70%-iges Ethanol für einmal fünf Minuten. Danach wurden die Schnitte mit VE-Wasser gewaschen. Zur Beseitigung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Präparate in Wasserstoffperoxid (3%) für zweimal fünf Minuten gegeben und anschließend mit VE-Wasser gespült. Zur Eröffnung der Antigen-Bindungsstellen wurden die Schnitte für 20 Minuten in einer Demaskierungslösung, die aus Target Retrieval Solution Citrate (10x, pH 6, Dako, Hamburg) in Verdünnung mit Aqua destillata (1:10) bestand, gelegt. Nach der Abkühlung für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte ein weiteres Mal mit VE-Wasser gewaschen und vorsichtig getrocknet. Die Präparate wurden mit einem Fettstift umrandet und wieder in VE-Wasser gelegt. Es folgte die dreimalige Spülung für je fünf Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl. phosphate buffered saline). Anschließend wurden auf die Schnitte innerhalb der Fettumrandung 70µl NGS-Lösung 10% (Sigma, München, engl. normal goat serum, verdünnt mit PBS) gegeben, um unspezifische Bindungen mit Proteinen zu blocken. Alle Präparate wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abklopfen des Serums konnte der jeweilige Primärantikörper (siehe Tabelle 6, 70µl pro Schnitt) in einer Lösung mit PBS und NGS 5% aufgebracht werden. Dieser hat sich spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe gebunden. Zur Inkubation wurden die Präparate über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer belassen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimalig für fünf Minuten mit PBS gespült. Nun folgte die Zugabe von 70µl (Verdünnung 1:300 in PBS mit NGS 5%) des sekundären Antikörpers und die anschließende Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für eine Stunde. Durch das Aufbringen des Brückenantikörpers mit gebundenem Peroxidase-Markermolekül gelang es die Antigen-Antikörperbindungsstellen und somit die Primärantikörper sichtbar zu machen. Nach diesem Schritt folgte die Zugabe von 70µl Avidin-Biotin-Komplex (VECTASTAIN Elite ABC-Peroxidase Standard-Kit, BioLogo, Kronshagen) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Da Avidin, ein Glykoprotein, zu Biotin, einem Vitamin, eine hohe Affinität aufweist, bindet der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an den Biotin-gekoppelten-Brückenantikörper (siehe Abbildung 12, Ramos-Vara et al., 1999). In den nächsten Schritten konnte dieser Komplex schließlich sichtbar gemacht werden. Nun fand das dreimalige Waschen für jeweils fünf Minuten mit PBS statt. Nach der Präinkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten wurde das Substrat Histogreen (Linaris, Dossenheim) 100µl (zwei Tropfen Substrat und 1ml Pufferlösung) aufgebracht. Nach einer weiteren Inkubation von zwei Minuten bei Raumtemperatur folgte eine Lösung aus zwei Tropfen Substrat, 1ml Pufferlösung und zwei Tropfen Wasserstoffperoxid. Zum Abstoppen der Reaktion wurde wiederum dreimal für fünf Minuten mit VE-Wasser gespült.

Zur Gegenfärbung wurde Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) herangezogen. Anschließend wurde mit VE-Wasser gewaschen, mit HCl-Ethanol (70%) differenziert und mit warmem Leitungswasser gebläut. Zum Abschluss folgte das kurze Dippen in 100%-igen Alkohol und zweimal in Xylol. Daraufhin wurden die Schnitte baldmöglichst mit Entellan (Merck Millipore, Darmstadt) blasenfrei eingedeckt.

Von allen Schnitten wurde unter Weglassen des Primärantikörpers eine Negativkontrolle angelegt, um nicht spezifisch auf den Primärantikörper zurückzuführende Effekte als Referenz zu erfassen.

Bei der oben beschriebenen immunhistochemischen Färbetechnik handelt es sich um ein indirektes Zwei-Schritt-Verfahren, bei welchem im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (AK, siehe Abbildung 12) aufgebracht wird, der an das gesuchte Antigen-Epitop bindet. Im zweiten Schritt erfolgt das Auftragen des Brückenantikörpers, der sich gegen den Primärantikörper richtet und mit Biotin gekoppelt ist. Nach Substratzugabe löst das Enzym Immunperoxidase eine Farbentstehung mit Hilfe einer Enzym-Substrat-Reaktion aus.

Avidin-Biotin-Peroxidase-Enzymkomplex

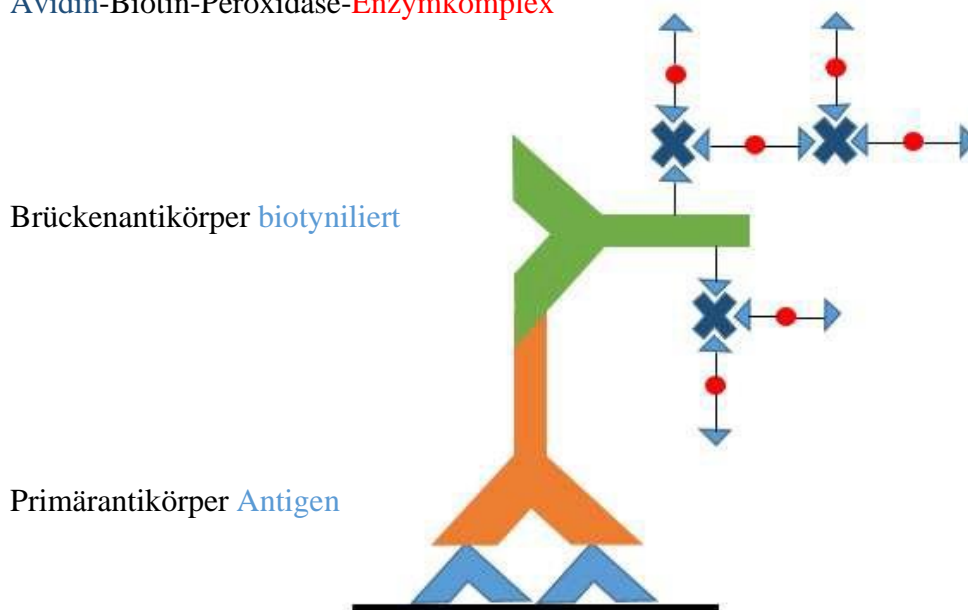


Abbildung 12: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex

Durch die hohe Affinität zwischen Biotin und Avidin bindet der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an den Biotin-gekoppelten-Brückenantikörper modifiziert nach Ramos-Vara et al., 1999.

Tabelle 6: Übersicht zu Primärantikörper

Primärantikörper	Herkunft/Isotyp	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
CD 117	Kaninchen IgG	polyklonal	1:150	ThermoFischer, Dreieich
VEGF-A	Kaninchen IgG	polyklonal	1:80	Biologo, Kronshagen
VEGFR-2	Kaninchen IgG	polyklonal	1:200	Dianova, Hamburg
PDGF-A	Kaninchen IgG	polyklonal	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PDGFR-α	Kaninchen IgG	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

(Verdünnung mit PBS und NGS 5%)

2.9 Auswertung der konventionellen Histologie

2.9.1 Histologischer Aufbau einer Rattenlunge

Nachdem die Präparate in verschiedenen Techniken gefärbt wurden, konnte nun die Auswertung erfolgen, zu welcher Kenntnisse über den anatomischen, makroskopischen (siehe Abbildung 13) und histologischen Aufbau einer unveränderten Rattenlunge nötig waren. Hierzu folgt in diesem Abschnitt eine nähere Beschreibung.

Hilus Herz

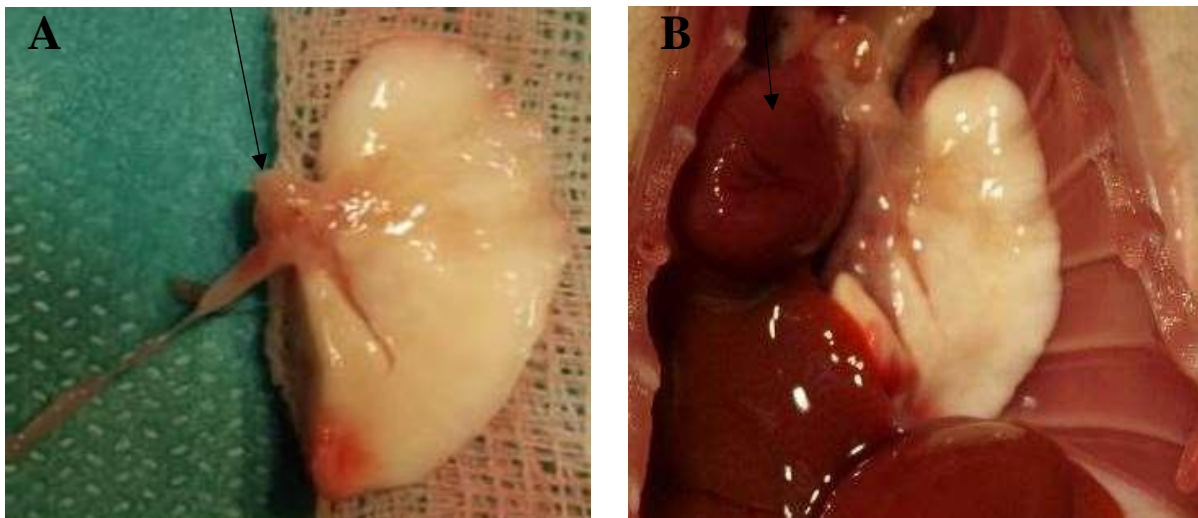


Abbildung 13: Makroskopische Rattenlunge

Hier ist eine linke Rattenlunge eines Spendertieres abgebildet. Bild A zeigt den entnommenen linken Lungenflügel. Auch der Hilus ist zu erkennen. Das zweite makroskopische Foto zeigt denselben linken Lungenflügel in situ. Die Lunge wurde mit Euro-Collinis-Lösung perfundiert, daher erscheint sie weißlich.

Atemwege

Die unteren Luftwege, Trachea und Hauptbronchien, besitzen ein Stützgerüst aus Knorpelspannen und sind innen mit respiratorischem Flimmerepithel ausgekleidet. Die Zweige der Hauptbronchien teilen sich schließlich weiter auf, über die Segmentbronchien in die Bronchien und weiter in die Bronchiolen. Ein wichtiger Unterschied zwischen Bronchien und Bronchiolen (Kaliber < 1mm) ist das Fehlen von Knorpel und Drüsen (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die letzten Zweige der Bronchioli sind die Bronchioli terminales, die den rein konduktiven Luftraum zur Respiration darstellen. Es folgen die Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und Sacculi alveolares, die Vorräume der Alveolen (Lüllmann-Rauch, 2009).

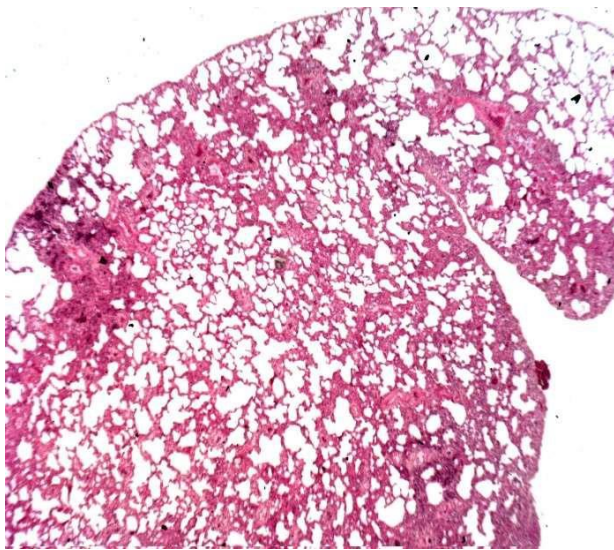


Abbildung 14: Mikroskopische Übersichtsaufnahme einer Rattenlunge

Diese Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme einer linken Rattenlunge eines Spendertiers. In der HE-Färbung mit 20-facher Vergrößerung erkennt man die organspezifische Alveolenstruktur.

Da sich die ISHLT-Klassifikation hauptsächlich auf die pathologischen Veränderungen der kleinen Bronchiolen bezieht, wird vorrangig der Wandaufbau dieser Bronchiolen (von innen nach außen) beschrieben. Die Tunica mucosa besteht aus der Lamina epithelialis und der Lamina propria. Das Epithel rund um das sternförmige Lumen ist einschichtig, prismatisch und enthält vor allem Flimmerzellen und zilienfreie Clara-Zellen. Becher- und Knorpelzellen sind in diesem Abschnitt der Luftwege nicht zu finden (Sobotta & Welsch, 2009). Die bindegewebige Lamina propria ist reich an elastischen Fasern und kann freie Abwehrzellen enthalten (z.B. Makrophagen, Lymphozyten). Außen liegt die Tunica muscularis an, ein Netzwerk aus glatter Muskulatur (Sobotta & Welsch, 2009). Das peribronchiale Bindegewebe ist mit den Alveolarwänden verbunden. So entsteht ein radiärer Zug auf die Bronchien, der diese offenhält. Der eigentliche Ort des Gasaustausches sind die Alveolen, die durch dünne Interalveolarsepten

voneinander getrennt sind. Die Alveolarwände (Dicke ca. 5µm) sind mit Alveolarepithel ausgekleidet, welches aus Pneumozyten Typ I mit großflächigen, dünnen Zellkörper und Pneumozyten Typ II, die kubisch in Nischen sitzen und den Surfactant-Faktor bilden, besteht. Ein dichtmaschiges Kapillarnetz des kleinen Kreislaufs zieht durch die Alveolarwände, welche aus Kollagenfibrillen und elastischen Fasern bestehen (Lüllmann- Rauch, 2009).

Blutgefäße

Die Lunge ist an beide Körperkreisläufe der Blutversorgung angeschlossen. Sie besitzt Vasa publica für den kleinen Kreislauf (Äste der A. pulmonalis und der Vv. pulmonales). Die Vasa privata, als Rr. bronchiales und Vv. bronchiales, sind Teil des großen Kreislaufs und dienen zur Versorgung des Bronchial- und Gefäßbaumes sowie der Pleura (Lüllmann-Rauch, 2009).

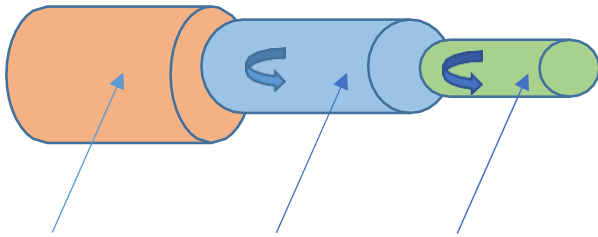
Die Äste der A. pulmonalis folgen bis in die Peripherie den Aufteilungen des Bronchialbaumes. Bei den Vv. pulmonales stellt sich das anders dar. Diese verlaufen unabhängig von den Arterien in Bindegewebsstraßen und treten erst weiter proximal in das peribronchiale Bindegewebe ein (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die Wände der Gefäße sind wie folgt (von innen nach außen) aufgebaut (siehe Abbildung 15):

- Tunica intima (Intima): Endothel und subendotheliale Schicht
- Tunica media (Media): glatte Muskulatur
- Tunica adventitia (Adventitia): Bindegewebe mit kollagenen und elastischen Fasern (Lüllmann-Rauch, 2009).

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel mit einer Basallamina und flachen Zellen. Tight junctions bilden hier eine Barriere zwischen Intra- und Extravasalraum. An den Grenzen zwischen Intima und Media oder Media und Adventitia kann eine Membrana elastica, eine elastische Lamelle liegen (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Media ist die breiteste Schicht der Arterienwand und besteht aus glatten Muskelzellen. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß in die Umgebung einbettet und aus Fibroblasten, elastischen Fasern und Kollagenfasern besteht (siehe Abbildung 15). Auch in der Venenwand lassen sich drei Schichten erkennen, doch dies weniger deutlich. Die Media der Arterie ist dicker und kompakter als die der Venen (Kühnel, 2014).

Tunica adventitia Tunica media Tunica intima



Bindegewebe Glatte Muskulatur Endothel

Abbildung 15: Wandschichten einer Arterie

Intima (grün), Media (blau), Adventitia (orange), elastische Membranen und Fasern (blaue dicke Pfeile), modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2009.

2.9.2 Akute und chronische Abstoßung

Der physiologische Aufbau einer Rattenlunge wurde dargestellt, um den Unterschied zu einer akuten oder chronischen Reaktion in der Lunge nach einer Transplantation aufzuzeigen. Die HE- und Sirius-Elastika-Schnitte wurden zur modifizierten Klassifikation der International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT, siehe Tabelle 8-11) herangezogen (Stewart et al., 2007). Voraussetzung für die Beurteilung war der Ausschluss einer Infektion. Dies erfolgte durch die Untersuchung der Präparate der nativen Lungen.

Akute Transplantatabstoßung (AR = acute rejection)

Die akute zelluläre Abstoßungsreaktion wurde anhand der perivaskulären und der interstitiellen mononukleären Infiltration (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen) in fünf Schweregrade (A = akute vaskuläre Abstoßung) eingeteilt. In der Gruppe A0 zeigte sich keine akute Reaktion, bei A1 eine minimale, bei A2 eine leichte, bei A3 eine mäßige und bei A4 eine schwere akute Abstoßung mit diffusen Infiltraten mononukleärer Zellen und einer Schädigung des Endothels (siehe Tabelle 8, siehe Abbildung 16).

Zusätzlich wurde auch das Ausmaß der Entzündungsreaktion der Luftwege, speziell der Bronchiolen beurteilt, und in drei Gruppen (B = akute bronchiale Abstoßung) unterteilt. Bei Schweregrad B0 liegt keine Entzündung der Luftwege vor, bei B1R eine geringgradige und bei B2R eine hochgradige (siehe Tabelle 9). Die mononukleären Zellen in der Submukosa nahmen

zu und eine Epithelschädigung in Form einer Nekrose oder Metaplasie konnte in der Gruppe B2R beobachtet werden. Hier konnte man auch eine lymphozytäre Infiltration des Epithels und fibrinös-eitriges Exsudat als Zeichen einer lymphozytären Bronchiolitis sehen.

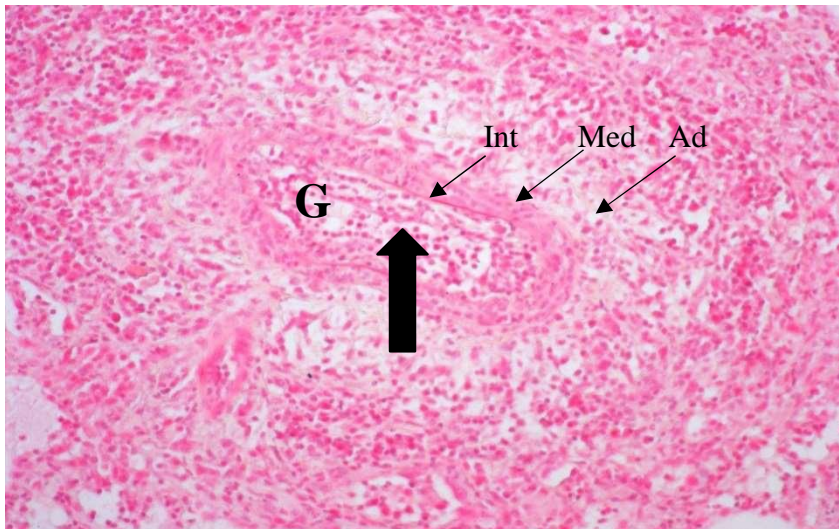


Abbildung 16: Beispiel einer HE-Färbung

In der Abbildung sieht man einen Ausschnitt eines Präparates der Kontrollgruppe am POD 20. In der Mitte befindet sich ein zentrales Gefäß, welches in die Kategorie A4 eingruppiert wurde. Die Wand ist bereits verdickt und es zeigt sich eine beginnende Okklusion. Die Entzündungszellen haben die Tunica intima (Int) und die Tunica media (Med) bereits durchbrochen und sind in das Lumen eingewandert (dicker schwarzer Pfeil). In der Tunica adventitia (Ad) und im interstitiellen Raum findet eine diffuse Infiltration mononukleärer Zellen statt.

Chronische Transplantatabstoßung (CR = chronic rejection)

Die chronische Reaktion ist durch eine progrediente Destruktion der Gefäß- und Bronchialwände und Obstruktion der Lumina gekennzeichnet. Hier ist eine inhomogene Verteilung zu finden und vorwiegend sind kleinere vaskuläre und bronchioläre Strukturen betroffen. Die Fibrosierung schritt im weiteren Verlauf fort und griff auf das Parenchym über.

Entsprechend der Kriterien der ISHLT, welche im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion an Atemwegen und Gefäßen auftreten, werden histologisch als C (C = chronische bronchiale Abstoßung) und D (D = chronische vaskuläre Abstoßung) klassifiziert (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Diese führen im Verlauf zu einer progredienten fibrotischen Umwandlung mit letztendlicher Ausbildung einer Narbe.

In Bezug auf diese Klassifikation zur Beurteilung der chronischen Transplantatabstoßung nach einer Lungentransplantation wurden die histologischen Veränderungen der Atemwege in drei Schweregrade eingeteilt. D0 bezeichnet normales Lungengewebe, in der Gruppe D1R lag eine beginnende Gefäßobstruktion durch am Endothel haftende Leukozyten vor und bei D2R fand

man eine hochgradig chronische Abstoßung (siehe Tabelle 10). Hier war die Intima verdickt und die perivaskuläre Fibrose breitete sich aus.

Die chronische Abstoßung der Luftwege wurde in drei Grade eingruppiert. Im Schweregrad C0 waren keine Zeichen einer Bronchiolitis obliterans zu finden, C1R zeigte Fibroblasten und Fibrinfilamente um terminale Bronchien und C2R stellte sich als hochgradige BO dar (siehe Tabelle 11). Anzeichen hierfür waren eine peribronchiale Fibrose mit teilweise oder komplettem Verschluss des Lumens, Schädigung des Epithels und einer Ausbreitung des Narbengewebes (siehe Abbildung 17).

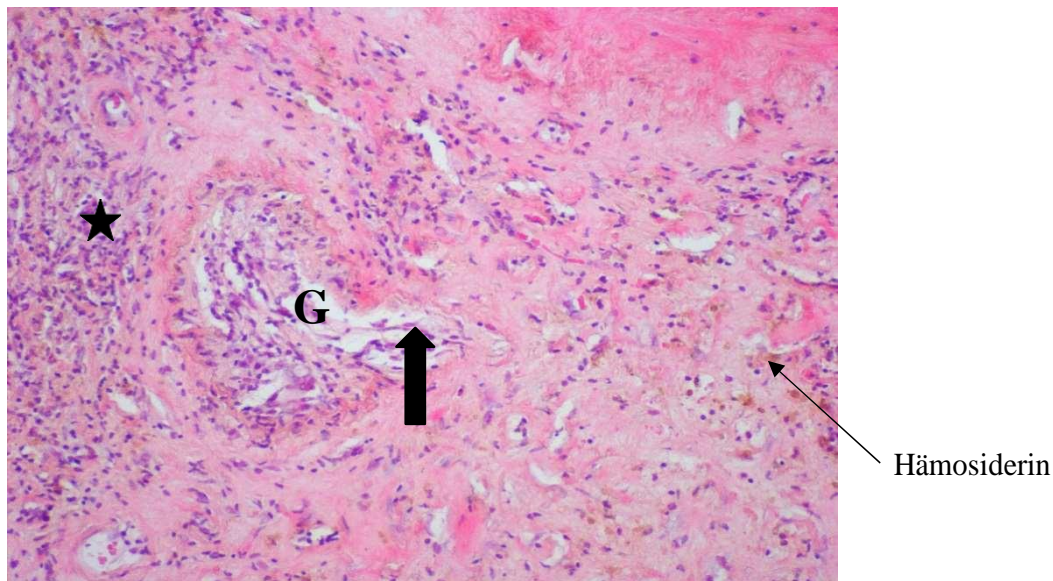


Abbildung 17: Beispiel einer HE-Färbung

In dieser Abbildung ist ein destruiertes Gefäß (schwarzer dicker Pfeil, G) einer Lunge der Kontrollgruppe an POD 60 zu sehen. Die Wandschichten sind an der mit dem dicken schwarzen Pfeil markierten Stelle vollständig zerstört. Weiterhin kann die mononukleäre Infiltration (schwarzer Stern) gezeigt werden. Diese ist allerdings weniger ausgeprägt als bei einer akuten Reaktion. Eine leichte beginnende fibrotische Veränderung um das Gefäß ist zu sehen. Rechts im Bild kann man Häm siderinablagerungen erkennen.

2.9.3 Interstitielle Fibrose

Die interstitielle Fibrose stellt eine diffuse, narbige Veränderung des Lungenparenchyms dar. Der Goldstandard für die Diagnose und Einteilung der Lungenfibrose ist die histopathologische Untersuchung. Die Beurteilung fand anhand der Sirius-Elastika-Färbung statt, da hier die Kollagenfasern stark rot angefärbt werden (siehe Abbildung 18).

Mittels der modifizierten Gradeinteilung nach Hubner (Hubner et al., 2008) wurde jedes Lungenpräparat der Ratte herangezogen und in Kategorie 0-8 eingeordnet. Grad 0 entsprach keiner fibrotischen Veränderung. Das Lungenparenchym wurde als normal bezeichnet. Von Schweregrad 1-8 nahmen die fibrotischen Merkmale zu: Die Alveolarsepten wurden breiter, fibrotische

Knoten waren zu finden, die Lungenarchitektur war schwer beschädigt, bis hin zur kompletten Obliteration von Alveolen.

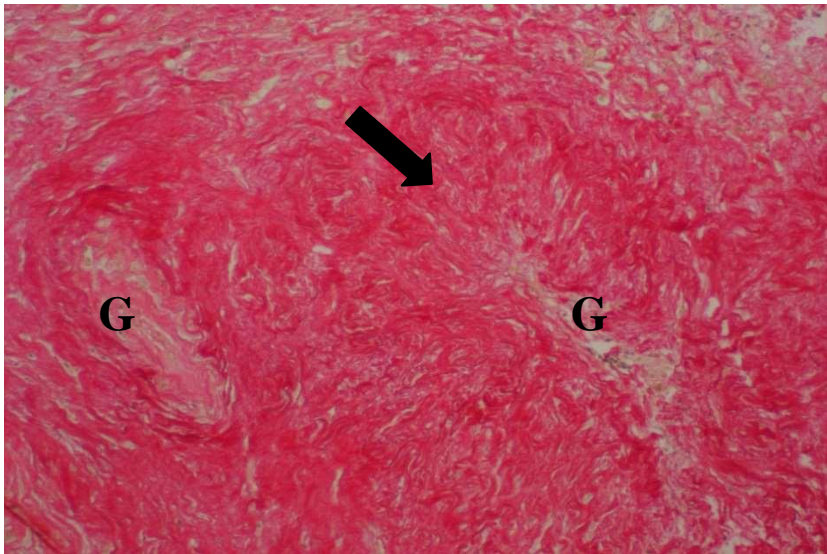


Abbildung 18: Beispiel einer Sirius-Elastika-Färbung

Dies ist ein Beispiel einer Sirius-Elastika-Färbung einer Lunge eines Kontrolltieres an POD 60. Die interstitielle Fibrose ist deutlich zu erkennen. Die Farbe Rot, welche die Kollagenfasern darstellt, dominiert hier. Die beiden Gefäße (G) sind komplett fibrotisch umgebaut, es sind keine Wandschichten mehr zu erkennen (dicker schwarzer Pfeil) und das Lumen ist okkludiert.

2.10 Auswertung der Immunfärbung

Zusätzlich zur Auswertung der konventionellen Histologie (HE, Sirius-Elastika) erfolgte die Beurteilung der immunhistochemisch angefärbten Rattenlungen. Dabei wurden spezifische Antikörper auf das Lungengewebe aufgetragen, um das Ausmaß der Verbreitung der Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und der Rezeptortyrosinkinase CD117 zu ermitteln. Für die mikroskopische Auswertung wurden jeweils fünf zufällig gewählte Gesichtsfelder der immunhistologischen Schnitte bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leica DMRBE) untersucht. Zunächst erfolgte stets die Beurteilung der Negativkontrolle. Die positiv angefärbten Zellen der linken, rechten sowie der nativen Lunge jedes Präparats wurden pro Gesichtsfeld ausgezählt. Anschließend wurde für jeden Schnitt der linken, rechten sowie der nativen Lunge jedes Tieres ein Mittelwert mit Standardabweichung errechnet. Es wurden nur Areale ohne größere Bronchus- und Gefäßanschnitte ausgewertet. Diejenigen Zellen wurden als positiv bewertet, bei welchen Zytoplasma und Nukleus zumindest teilweise angeschnitten wurden. Nach diesem Auszählungsschema wurde bei allen immunhistologischen Färbungen vorgegangen.

2.10.1 CD117

CD117 (c-Kit, CD: Cluster of differentiation) ist eine transmembranöse Rezeptortyrosinkinase (siehe Abbildung 19), an welche der Ligand „stem cell factor“ bindet (Lennartsson, Jelacic, Linnekin, & Shivakrupa, 2005). C-Kit wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, beispielsweise Mastzellen, Melanozyten und Tumorzellen (Arber, Tamayo, & Weiss, 1998). Hierdurch wird eine Signaltransduktion ausgelöst. Intrazelluläre Kinasen bewirken somit die Phosphorylierung der Zielsubstrate, welche ihrerseits über verschiedene Signalwege Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben indizieren (siehe Abbildung 19, Curtin et al., 2005).

Die Quantifizierung der im Lungengewebe präsenten CD117-Rezeptoren erfolgt durch das Auftragen spezifischer Antikörper auf die Gewebeschnitte. Hierzu wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet, welcher an das passende Epitop bindet. Die Zellen, an welchen der Rezeptor sitzt, färben sich nach dem oben genannten indirekten 2-Schritt-Verfahren blau (siehe Abbildung 20 und 21).

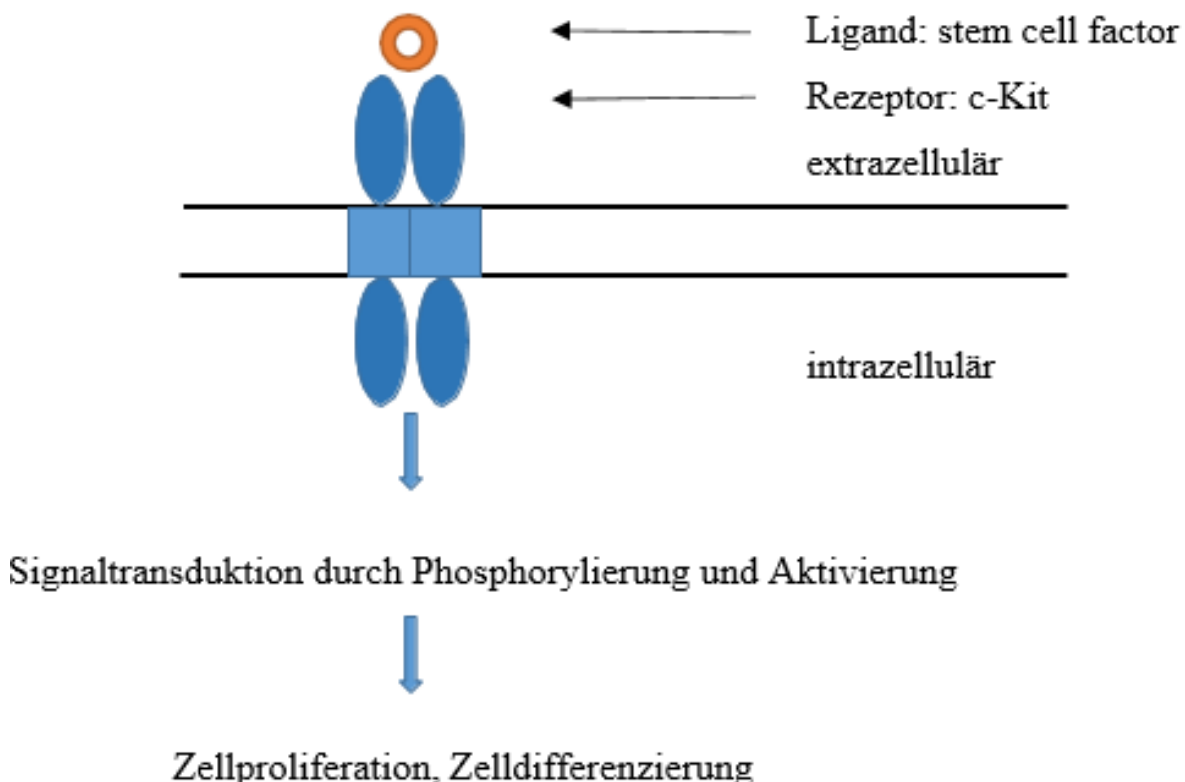
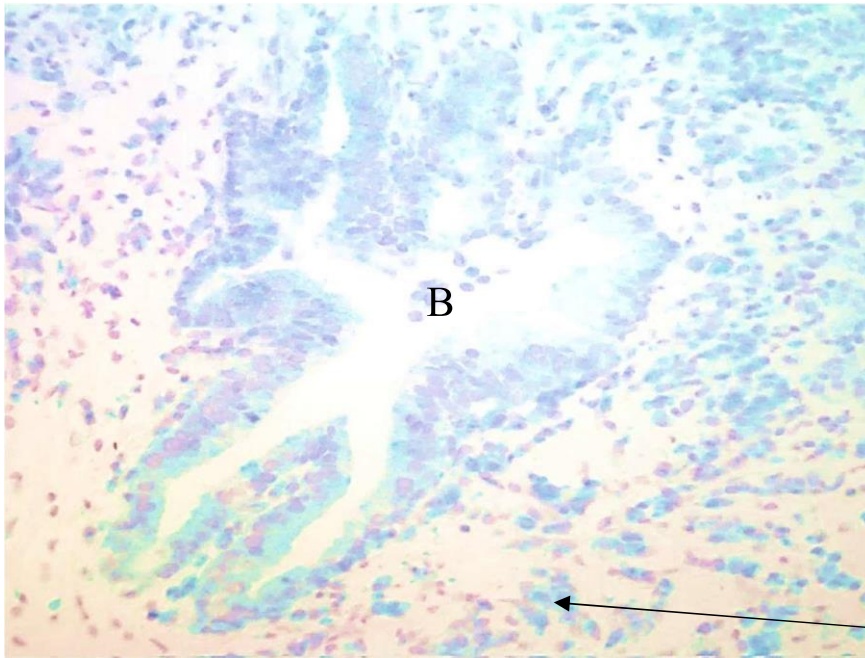


Abbildung 19: Schematische Darstellung der CD117-Rezeptortyrosinkinase



CD117-positiv gefärbte Zelle

Abbildung 20: Beispiel für eine CD 117-Färbung

Hier ist ein Bronchiolus (B) einer linken Lunge eines Kontrolltieres mit 20-facher Vergrößerung an POD 60 zu sehen. Zur Darstellung von c-Kit wurde hier die CD117-Färbung durchgeführt. Die bläulich angefärbten positiven Zellen sind homogen im Bronchialepithel verteilt. Auch in der Peripherie sind positive Zellen zu sehen (schwarzer Pfeil).

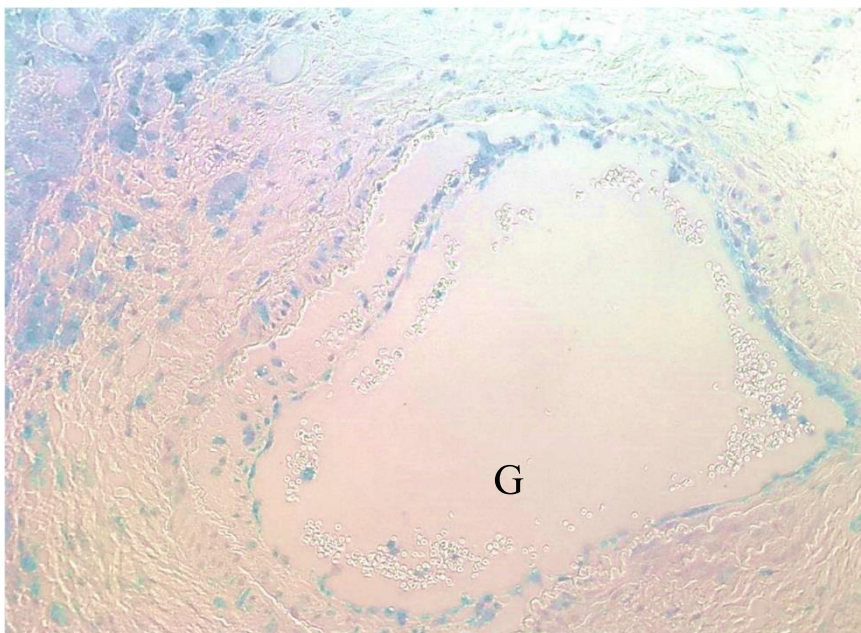


Abbildung 21: Beispiel für eine CD 117-Färbung

In der Mitte des Bildes ist ein Gefäß (G) in 20-facher Vergrößerung zu sehen. Das Präparat ist von einer behandelten Lunge und wurde an POD 60 entnommen. CD-117-positive Zellen sind vor allem am linken Bildrand und am Endothel des Gefäßes zu erkennen.

2.10.2 PDGF-A und PDGFR- α

PDGF-A (platelet-derived growth factor A) stimuliert die Mitose von mesenchymalen Zellen, zu welchen die glatten Muskelzellen gehören (Tikkanen et al., 2006). Der Wachstumsfaktor spielt eine große Rolle bei der Stimulation der Replikation und dem Überleben von Myofibroblasten während der Entstehung einer fibrotischen Veränderung (Bonner, 2004). PDGFR- α ist der entsprechende Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase. Als Ligand bindet PDGF-A an den Rezeptor, welcher dimerisiert und dadurch die Signaltransduktion auslöst (Yamamoto et al., 2008). Die PDGF-A- oder PDGFR- α -positiven Zellen erscheinen nach der Immunfärbung blau (siehe Abbildung 22).

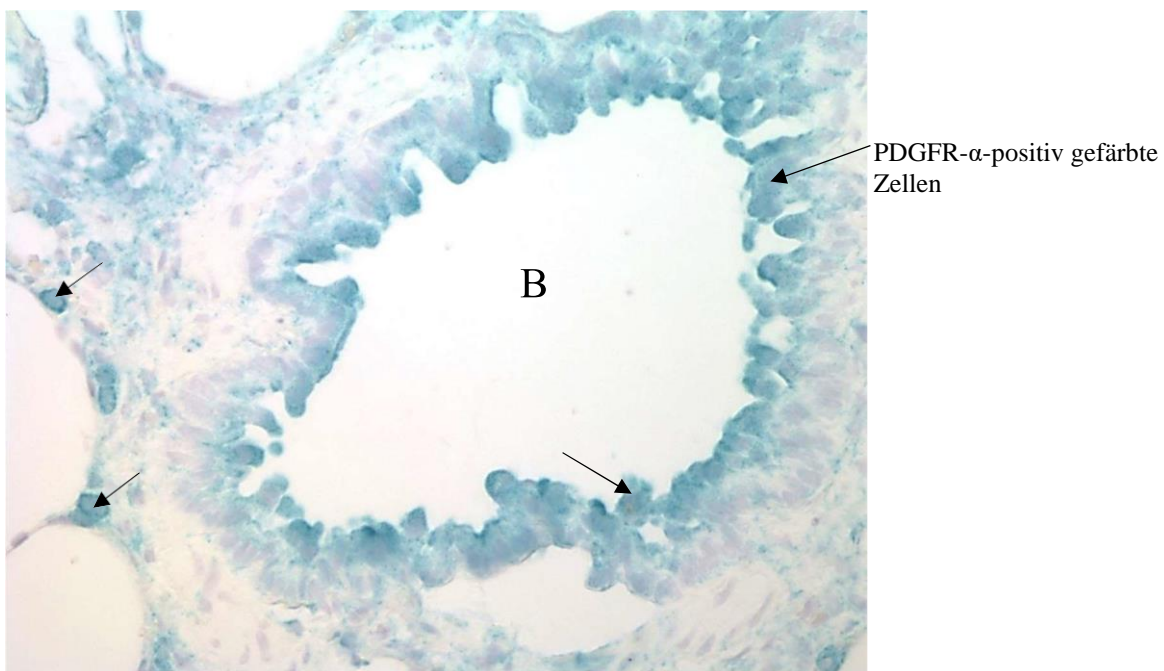


Abbildung 22: Beispiel für eine PDGFR- α -Färbung

Das Präparat zeigt einen Ausschnitt aus einer PDGFR- α -Färbung in 40-facher Vergrößerung. Hierbei handelt es sich um eine unbehandelte rechte Lunge am POD 60. Die Epithelzellen des Bronchiolus (B) sind deutlich positiv gefärbt. Die Pfeile markieren positiv gefärbte Zellen auch in der Peripherie an den Alveolen.

2.10.3 VEGF-A und VEGFR-2

VEGF-A ist eine der dominierenden unter den Isoformen des vascular endothelial growth factor (VEGF), welcher eine ähnliche Struktur wie der PDGF aufweist (Tischer et al., 1991). Ein Hauptort der Bildung dieses Wachstumsfaktors ist die Gefäßmuskelzelle (Meyer, Cardoni, Xi-ang, Cornwell, & Love, 2001). VEGF ist ein wichtiger Stimulator der Angiogenese. Er aktiviert das Endothelzellüberleben, die Proliferation und die Migration. (Krebs et al., 2005). Der Ligand VEGF-A bindet an den Rezeptor VEGFR-2. Wie jeder Tyrosinkinase-Rezeptor (siehe

Abbildung 19) ist VEGFR-2 dadurch gekennzeichnet, dass er extrazellulär eine Ligandenbindungsstelle und am zytostolischen Proteinteil eine Domäne mit Eigenschaft einer Tyrosinkinase hat (Mutschler, 2013). In den histologischen Präparaten sind die positiven VEGF-A oder VEGFR-2 blau gefärbt (siehe Abbildung 23 und 24).

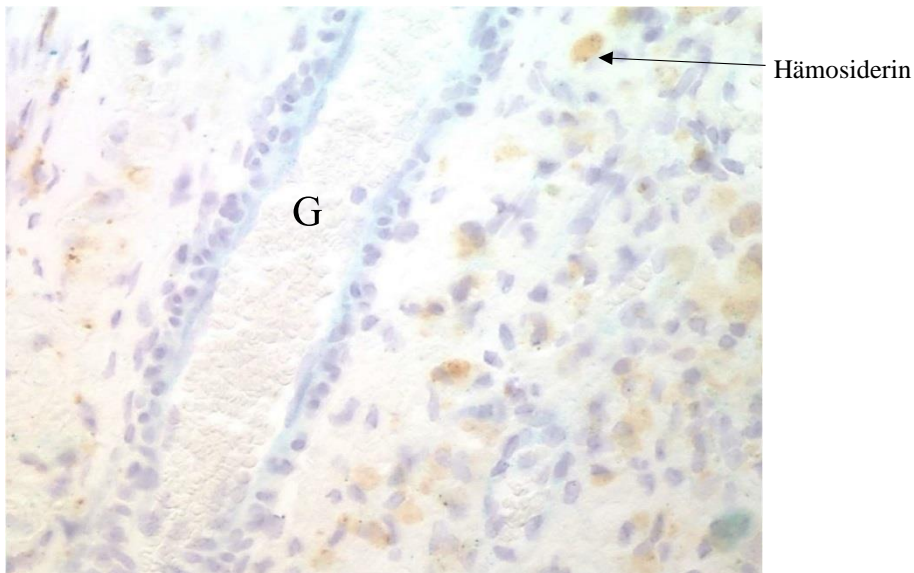


Abbildung 23: Beispiel für eine VEGFR-2-Färbung

Auf diesem Bild ist ein Beispiel für eine VEGFR-2-Färbung in 40-facher Vergrößerung zu sehen. Das Foto zeigt einen Ausschnitt einer linken unbehandelten Lunge mit einem zentralen Gefäß am POD 60. Hier fällt vor allem die starke Hämösiderinablagerung und die positiven Endothelzellen auf (G = Gefäß).

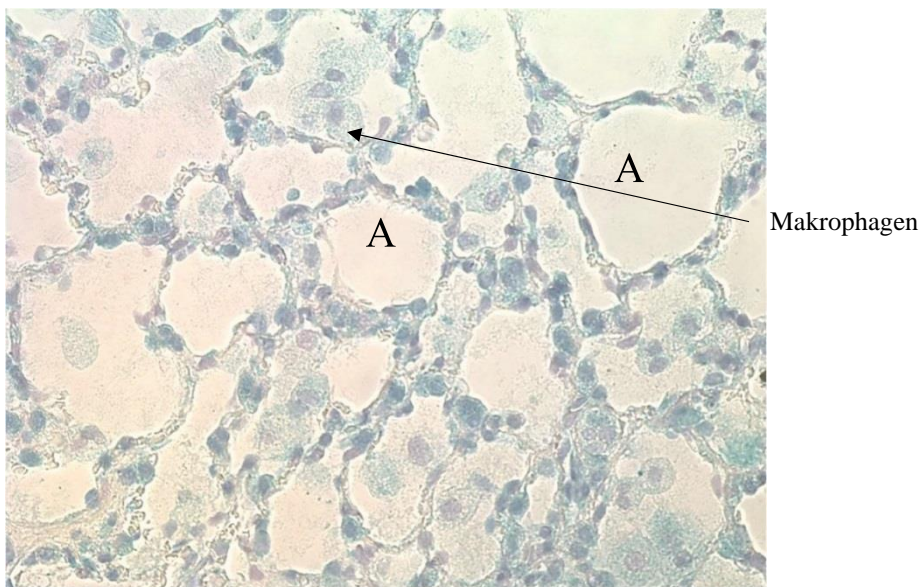


Abbildung 24: Beispiel für VEGFR-2-Färbung

Dies ist ein Ausschnitt einer linken Lunge eines behandelten Tieres am POD 60 in 40-facher Vergrößerung. Zu sehen ist eine gut erhaltene Alveolenstruktur (A) mit vielen Makrophagen.

2.10.4 Bestimmung der Intensität

Die immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF-A und deren Rezeptoren VEGFR-2 und PDGFR- α und die Rezeptortyrosinkinase CD117 wurde in den verschiedenen Zellen der Lunge an POD 20 und POD 60 bewertet (siehe Tabelle 18 und 19). Hierfür wurden die Bronchialepithelzellen, Pneumozyten Typ-I und Typ-II-Zellen, interstitielle Zellen, Gefäßendothelzellen, Alveolarmakrophagen, andere mononukleäre Zellen und metaplastische Zellen herangezogen. “+++” stand für eine starke, “++” für eine mäßige, “+” für eine schwache und “-“ für keine immunhistologische Färbung der Zellen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war die Einteilung in die linke, behandelte Lunge, die rechte, unbehandelte Lunge und in die native Lunge. Die Präparate wurden in der Übersichtseinstellung betrachtet und es wurde nach den einzelnen Zellarten gesucht, welche anschließend in die Tabellen eingruppiert wurden (siehe Tabelle 18 und 19).

2.11 Statistische Auswertung

Jedes histologische Präparat wurde gemäß der modifizierten Kriterien der ISHLT im Hinblick auf den Schweregrad der akuten und chronischen Transplantatabstoßung klassifiziert (Stewart et al., 2007; Yousem, 1993). Die Einteilung der interstitiellen Fibrose erfolgte nach der Klassifikation nach Hubner et al. (Hubner et al., 2008). Im Anhang in Tabelle 8 sind die Kriterien für die akute Abstoßung der Gefäße, in Tabelle 9 für die Entzündung der Luftwege, in Tabelle 10 für die chronische Gefäßabstoßung, in Tabelle 11 für die chronische Abstoßung der Luftwege und in Tabelle 12 die Merkmale der interstitiellen Fibrose aufgeführt (siehe 8.2 Tabellenverzeichnis). Alle Gefäße und Luftwege der histologischen Präparate der linken Lunge wurden eingruppiert und anschließend wurde für jede Kategorie ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet.

Auch konnte ein Mittelwert mit Standardabweichung, welche nach dem allgemeinen Auszählungsschema erhoben wurde (wie oben beschrieben), für die rechte, native Fischer- Lunge herangezogen werden. Unabhängig von Gruppeneinteilung und Untersuchungszeitraum ergaben sich für all diese nativen Lungen ähnliche immunhistologische Ergebnisse, so dass der Wert als Standard festgelegt werden konnte. Von den Mittelwerten wurde für jeden Untersuchungstag (POD 20 und 60) jeweils erneut ein Gruppenmittelwert mit Standardabweichung für die linke und rechte Lunge errechnet. Der Wilcoxon-Mann-Whitney- U-Test wurde als nicht-parametrischer statistischer Test mit zwei unabhängigen Stichproben angewendet, um nachzuweisen, ob

bei der behandelten Tiergruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe am postoperativen Tag 20 und 60 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Nach Prüfung des statistischen Testverfahrens durch Frau Dr. Paola Ferrario (Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung am Max-Rubner-Institut Karlsruhe, Arbeitsbereich: Biostatistik) wurde zunächst bei multinominaler Verteilung ein Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest in Betracht gezogen. Allerdings handelt es sich bei den Daten um Prozentangaben mit metrischem Messniveau und eine Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Arbeiten sollte bestehen bleiben. Daher entschieden wir uns den Willcoxon-Mann-Whitney-U-Test beizubehalten. Die gesamte statistische Analyse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 23 (IBM SPSS Inc. Chicago, Illinois) durchgeführt. Als signifikant wurden Werte erachtet, deren p-Wert unter 0,05 lag.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die histologisch-pathologischen Veränderungen der Rattenlungen im postoperativen Verlauf näher beleuchtet. Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse über den histologischen Aufbau einer gesunden Rattenlunge (siehe Abschnitt 2.9.1: Histologischer Aufbau einer Rattenlunge).

Zunächst wird auf das Allgemeinbefinden und den postoperative Gewichtsverlauf der Versuchsratten eingegangen.

3.1 Allgemeinbefinden und postoperativer Gewichtsverlauf

Das Allgemeinbefinden der Kontrollgruppe und der Studiengruppe wurde genau beobachtet und protokolliert, um einen Vergleich ziehen zu können. Eine deutliche Schwäche in den ersten Tagen nach der Operation war den Tieren beider Gruppen anzusehen. Sie bewegten sich wenig, ihre Atmung war schwer und rasselnd, die Nahrungsaufnahme war eingeschränkt und das Fell glanzlos und rau. Die meisten Tiere der Kontrollgruppe erholten sich jedoch schnell, wurden zunehmend lebhafter und erreichten nach wenigen Tagen ihre ursprüngliche Aktivität. Das Fell erhielt seine anfängliche Beschaffenheit, Fressverhalten und Atmung normalisierten sich. Die Ratten der Studiengruppe dagegen hatten sichtlich mehr Schwierigkeiten bei der Regeneration. Die Gewichtsveränderungen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 25 graphisch dargestellt (siehe Tabelle 13 und 14). Als Ausgangswert wurde das präoperative Gewicht herangezogen und gleich 100% gesetzt. Nach der Operation verloren die transplantierten Tiere an Gewicht. Danach erfolgt in der Kontrollgruppe eine kontinuierliche Zunahme, so dass die Tiere an POD 13 ihr präoperatives Gewicht wieder erreichten und am Tag 60 sogar 162% des Ausgangsgewichts auf die Waage brachten (siehe Abbildung 25).

In der Studiengruppe stellte sich ein völlig anderes Bild dar. Hier nahm das Gewicht der Organempfänger bis zum Zeitpunkt der Lungenentnahme im Vergleich zum präoperativen Gewicht bis zu 14% ab. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in welcher schon früh eine Zunahme des Gewichts stattfand, erkennt man im Verlauf der Studiengruppe nach einer minimalen Steigerung einen weiteren Gewichtsverlust nach Beginn der Gabe von RAD ab dem POD 7. Erst ab dem Tag 50 stieg das Gewicht wieder langsam auf 87% an (siehe Tabelle 15 und 16 im Anhang). Das Ausgangsgewicht wurde in der Studiengruppe nicht wieder erreicht (siehe Abbildung 25). Auch die Tiere in dieser Studiengruppe regenerierten sich, allerdings langsamer. Das

Fressverhalten normalisierte sich, die Kotkonsistenz war unauffällig und das Fell kraftvoll und glänzend.

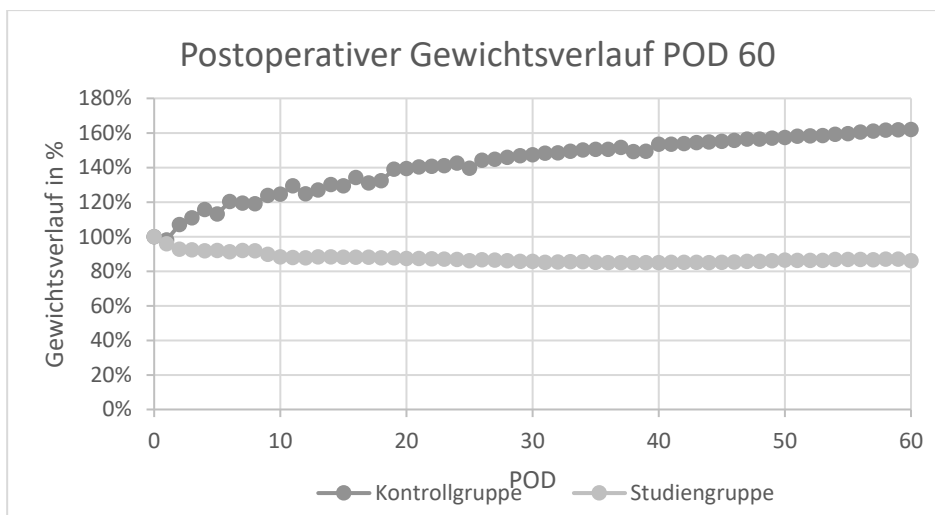
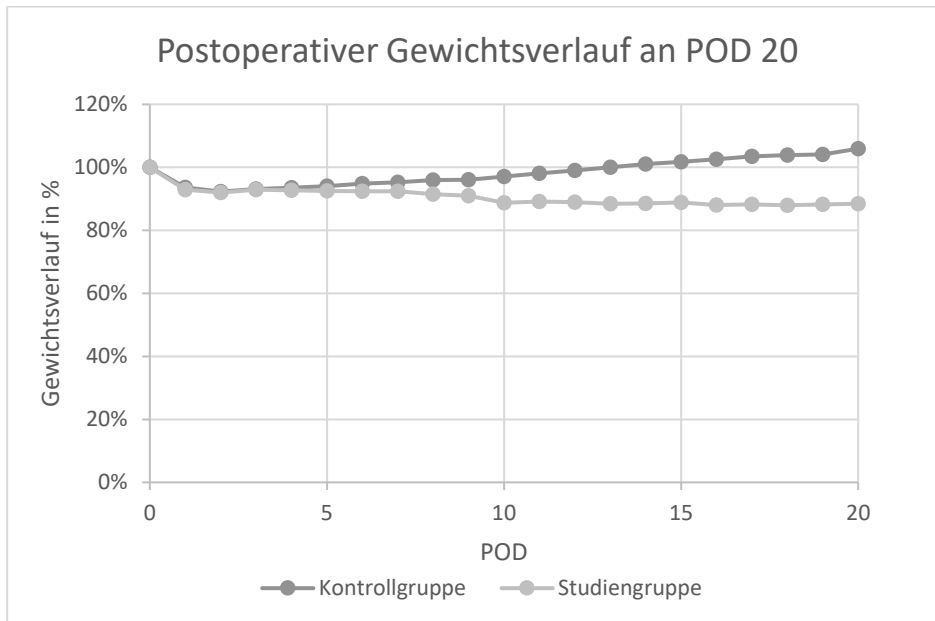


Abbildung 25: Postoperativer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe und Studiengruppe an POD 20/POD 60

Gezeigt ist der prozentuale Mittelwert der Gewichtzu- und abnahme im Verlauf (Kontrollgruppe n=12 und Studiengruppe n=5 an POD 20, Kontrollgruppe n= 15 und Studiengruppe n=9 an POD 60). Das präoperative Ausgangsgewicht ist mit 100% dargestellt.

3.2 Ergebnisse der konventionellen Histologie

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der konventionellen Histologie zusammengefasst und graphisch dargestellt. Der akute und chronische Abstoßungsgrad gemäß ISHLT der Lungen aller Versuchsgruppen wurde ausgewertet. Auch eine Übersicht der Ergebnisse zur Auswertung der interstitiellen Fibrose wurde erarbeitet.

In einigen Gruppen resultierte eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe (Kennzeichnung durch schwarzen Stern) und so konnte die chronische Abstoßung verhindert oder verzögert werden.

3.2.1 Kontrollgruppe

Die nicht-transplantierten **rechten Lungen** der Kontrollgruppe wiesen an **POD 20** und an **POD 60** keine Zeichen einer akuten Reaktion in der lichtmikroskopischen Beurteilung der HE-Färbung auf (siehe Abbildung 26). Das Parenchym war unauffällig. Es ließen sich weder Infiltrate von Entzündungszellen noch Schädigungen des alveolären oder vaskulären Gewebes feststellen. Es wurde gesundes Lungengewebe erkannt.

Das einschichtige Epithel der Bronchioli verlief gleichmäßig in wellenförmiger Struktur. Darunter lag eine durchgehende Lamina propria, welche wie die zirkulär angelegte glatte Muskelschicht keine Unterbrechungen aufzeigte.

Die Arterien wiesen ein unbeschädigtes Endothel und eine kontinuierliche Muscularis auf. Sie waren in der bindegewebigen Adventitia eingebettet. In vereinzelt Präparaten traten geringe Inflammationszeichen auf.

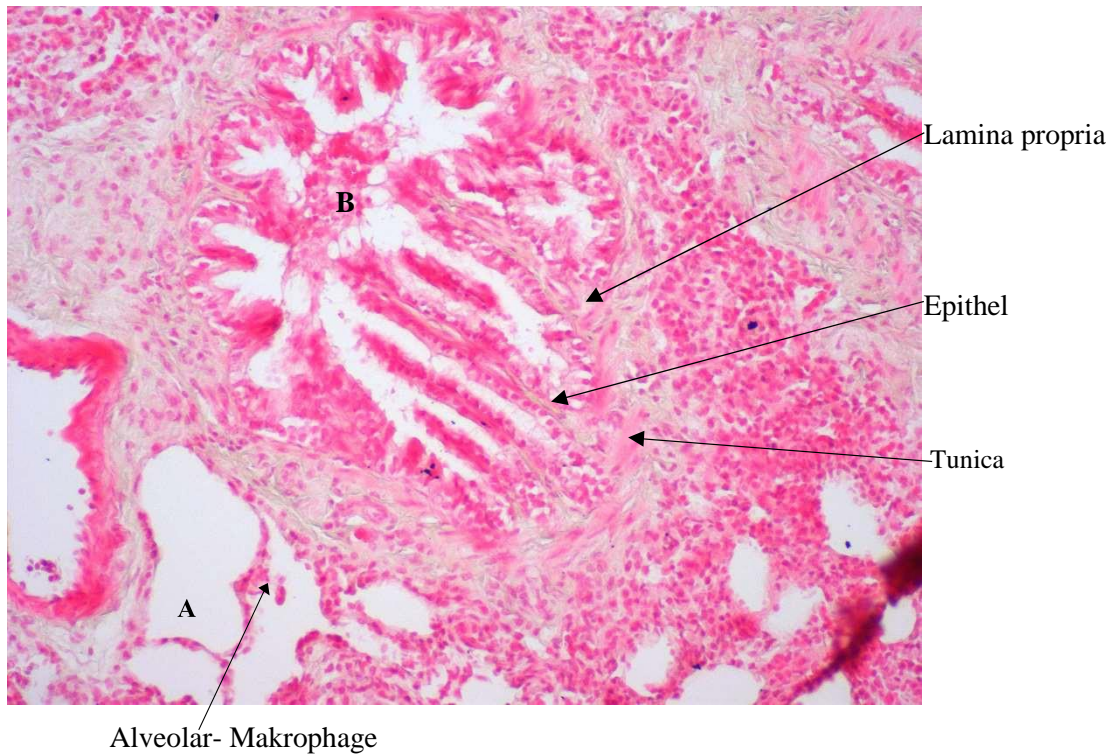


Abbildung 26: Kontrollgruppe, POD 20, HE, rechte Lunge

Der Bronchus (B) besitzt ein sternförmiges Lumen, das von einem einschichtigen Epithel umgeben ist. Angrenzend daran befindet sich die Lamina propria sowie die Tunica muscularis, die aus glatten Muskelzellen besteht. Peribronchiales Bindegewebe umgibt den Bronchiolus und bettet ihn ins Lungenparenchym ein. Das Lungenparenchym besteht aus Alveolen (A) mit dünnen Alveolarsepten und infiltratfreien Lumen, in welchem Alveolarmakrophagen als Vertreter des unspezifischen Abwehrsystems der Lunge zu finden sind.

Die allogenen transplantierten **linken Lungen** zeigten in allen untersuchten Präparaten starke akute Abstoßungserscheinungen (A4/B2R) mit Infiltraten aus mononukleären Entzündungszellen, sowohl perivaskulär als auch peribronchial. Im Parenchym hatte sich bereits in einigen Präparaten ein interstitielles Ödem gebildet. Abbildung 27 bildet ein repräsentatives histologisches Bild von Rattenlungen der Kontrollgruppe am POD 20 ab.

An **POD 20** konnte bereits eine einsetzende deutliche chronische Abstoßung an den Gefäßen beobachtet werden (D1: $72,83\% \pm 9,56\%$; im Anhang in Tabelle 17 sind alle Werte der folgenden Abschnitte aufgeführt). Bei durchschnittlich $22,13\%$ der Gefäße waren indessen keine chronischen Veränderungen festzustellen (MW D0: $22,13\% \pm 10,69\%$). An einigen Stellen der Gefäßwände war die Muscularis bereits durchbrochen und teilweise zerstört. Deutlich zeigten sich infiltrierende Lymphozyten und proliferierende Fibroblasten im Gefäßlumen bis hin zu einer beginnenden Okklusion.

Zusätzlich konnten bei den terminalen Bronchiolen an **POD 20** bereits Zeichen einer chronischen Abstoßung beobachtet werden. Der Schweregrad C1 (MW CO: $4,46\% \pm 10,45\%$, MW C1: $87,20\% \pm 29,35\%$) beherrschte das Bild. Es zeigte sich eine peribronchiale Infiltration.

Bronchiale Epithelzellen waren schon destruiert, was sich in der beginnenden Ablösung der Zellen von der Basalmembran und Lamina propria zeigte. Eine starke chronische Veränderung (C2) war jedoch noch nicht zu beobachten.

Auch eine Bindegewebsvermehrung hatte bis zum **POD 20** bereits stattgefunden. Die intersti-tielle Fibrose schwankte bei den Präparaten zwischen Grad 3 und 4 (siehe Tabelle 17, MW des interstitiellen Fibrosegrads $3,83 \pm 0,58$). Es zeigten sich fibrotische Anhäufungen und verdickte Alveolarsepten.

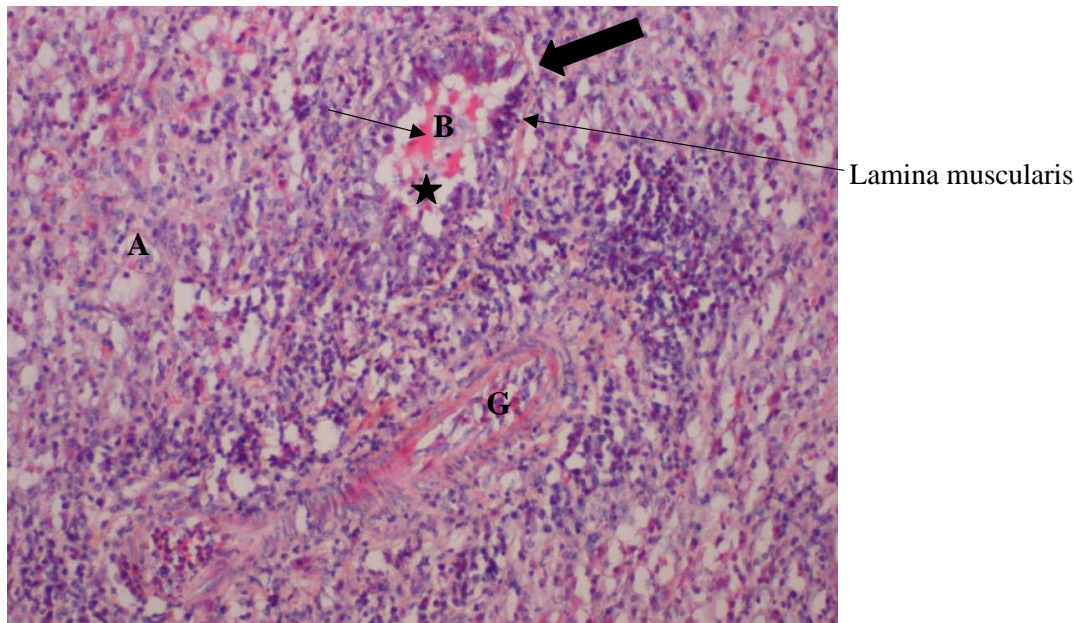


Abbildung 27: Kontrollgruppe, POD 20, HE, linke Lunge

Hier ist eine moderate Abstoßungsreaktion zu sehen. Die Entzündungszellen dominieren diesen Ausschnitt aus einem histologischen Präparat und infiltrieren das Epithel des Bronchiolus (B, dünner, schwarzer Pfeil). Das Bronchialepithel ist an einigen Stellen abgeflacht und destruiert (dicker, schwarzer Pfeil). Im Lumen, welches diffus von Lymphozyten infiltriert ist, beginnt die Bildung von Granulationsgewebe (Stern). Die Lamina muscularis ist noch erhalten (B2, C1). Die Gefäße (G) sind durch mononukleäre Zellen okkludiert und von diesen perivaskulär umgeben (A4, D1). Es zeigen sich außerdem ödematös veränderte Alveolen (A).

In den **linken transplantierten Lungen** dominierten an **POD 60** die Zeichen einer starken chronischen Abstoßung, welche sowohl auf bronchialer als auch auf vaskulärer Ebene zu beobachten waren (siehe Abbildung 27). Im Gegensatz zum POD 20 waren interstitielle, perivaskuläre sowie peribronchiale mononukleäre Infiltrationen kaum noch zu beobachten.

98% der Gefäße konnten in die Kategorie D2 eingeordnet werden (MW D2: $98,43\% \pm 4,40\%$), was bedeutete, dass die Wandschichtung deutlich destruiert und das Lumen vollständig okkludiert war (siehe Abbildung 28).

Auch die Bronchiolen waren stark beeinträchtigt. Alle bronchiolären Strukturen wurden dem Grad C2 der Abstoßungsreaktion zugeordnet (MW C2: 100%). Die Kennzeichen für das

chronische Abstoßungsgeschehen waren starke perivaskuläre und peribronchiale fibrotische Umbauprozesse, die sich häufig auch ins umliegende Interstitium ausbreiteten, wobei noch keine ubiquitäre Bindegewebsnarbe zu verzeichnen war. Die vaskuläre Sklerose und die Bronchiolitis obliterans beherrschten das Bild in allen Transplantatpräparaten.

Bei sieben der 16 Präparate war darüber hinaus eine komplette interstitielle Fibrose abgeschlossen (Fibrosegrad 8; MW 7,38% ± 0,62%, Abbildung 29).

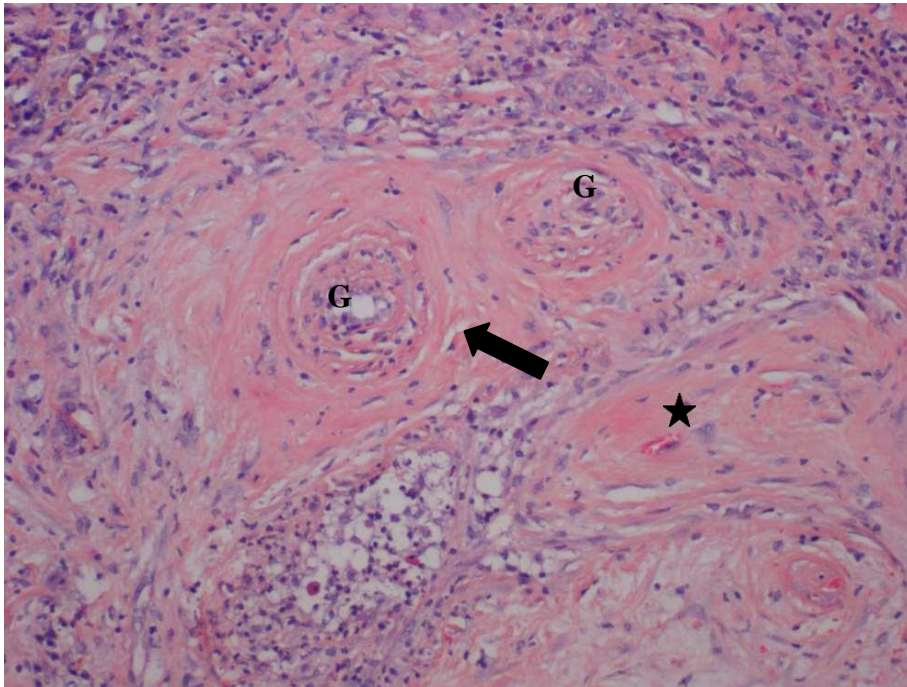


Abbildung 28: Kontrollgruppe, POD 60, HE, linke Lunge

Das histologische Bild zeigt einen deutlichen Rückgang der akuten Abstoßungsreaktion mit fehlender perivaskulärer und peribronchialer Infiltration. Die zwei zentralen Gefäße (G) sind ringsum mit Bindegewebe als Zeichen für den degenerativen Umbau (schwarzer Pfeil) umgeben, welches das gesamte Bild beherrscht. Das Epithel ist geschädigt und es liegt eine fibrointimale Verdickung vor. Die Gefäße sind vollständig okkludiert. Die typische Wandschichtung ist aufgehoben. Auch eine beginnende Fibrosierung des Interstitiums hat bereits stattgefunden (Stern).

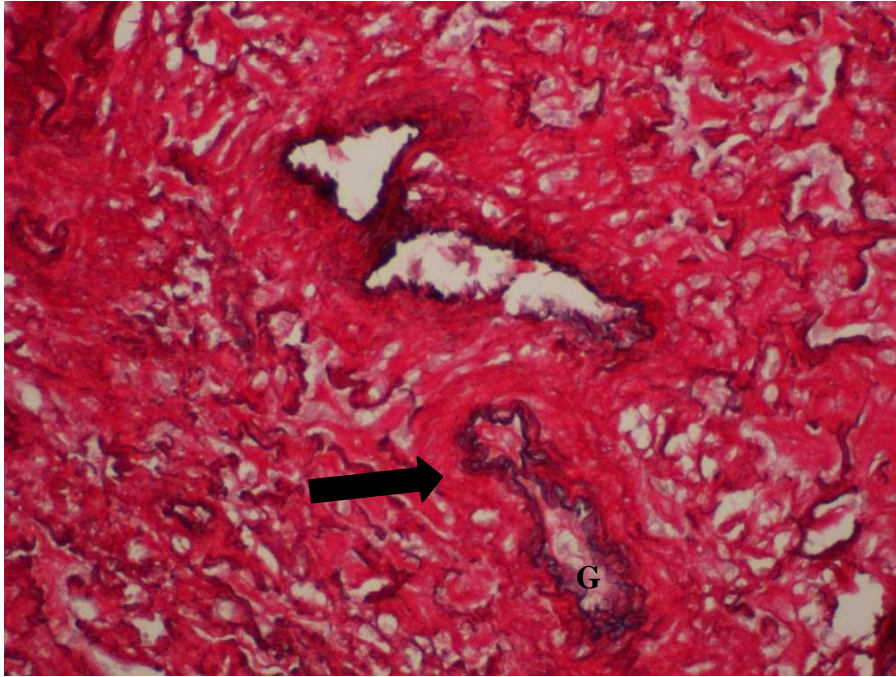


Abbildung 29: Kontrollgruppe POD 60, Sirius Elastika, linke Lunge

Hier dominiert das chronische Abstoßungsgeschehen mit ausgeprägter Fibrosierung um die Gefäße (dicker Pfeil). Das rot angefärbte Kollagen, das in diesem Ausschnitt sehr imponiert, macht dies deutlich. Das Gefäß (G) ist vollständig okkludiert. Die interstitiellen Infiltrationen sind als Zeichen der Chronifizierung rückläufig.

3.2.2 Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die **rechten Lungen** der Studiengruppe wiesen am **POD 20** und an **POD 60** die gleiche unauffällige Erscheinung wie bei der Kontrollgruppe auf. Pathologische Befunde auf bronchialer, vaskulärer oder interstitieller Ebene waren in keiner der rechten Lungen nachweisbar.

Ähnlich wie bei der Kontrollgruppe überwog bei den transplantierten **linken Lungen** der Tiere, die mit Imatinib, Vatalanib und Everolimus behandelt wurden, an **POD 20** eine starke akute Abstoßung. Die Dichte an mononukleären Zellen, welche auch Gefäße und Bronchiolen umgaben und diese stark infiltrierten, war sehr hoch. Aufgrund dieses starken akuten Abstoßungsgeschehens auf vaskulärer und bronchialer Ebene wurden alle Präparate der Studiengruppe in die Schweregrade A4 und B2R eingruppiert.

Parallel zu den akuten Abstoßungszeichen konnte auch bei circa 22% aller Tiere dieser Gruppe eine einsetzende chronische Veränderung der Gefäße bei der näheren Untersuchung festgestellt werden (MW D1: 22,22% ± 18,93%). Dennoch war D0 und somit keine chronische Abstoßung insgesamt durchschnittlich am häufigsten vertreten (MW D0: 77,78% ± 18,93%). Daher konnte eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe bei dem Schweregrad D0 festgestellt werden ($p=0,001$, siehe Abbildung 30).

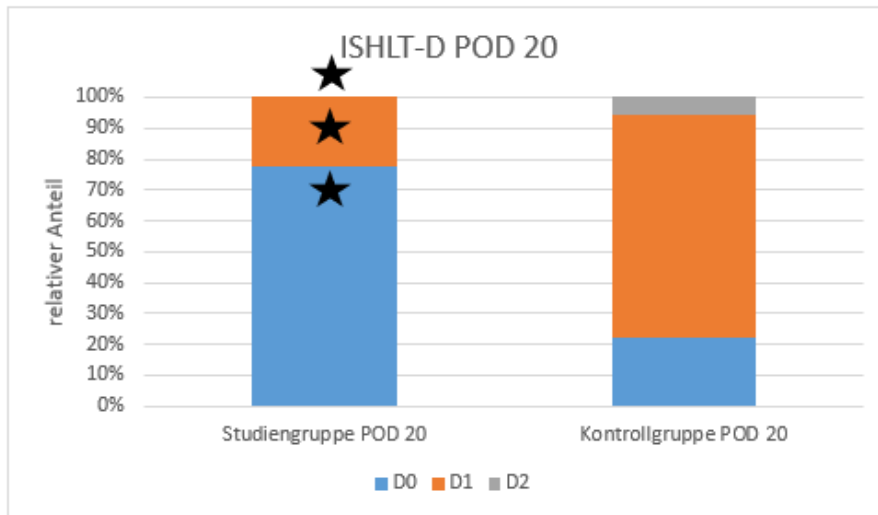


Abbildung 30: Graphische Darstellung der ISHLT-D-Klassifizierung an POD 20

ISHLT-D stellt den Grad der vaskulären chronischen Abstoßung der Studien- und Kontrollgruppe an POD 20 im Vergleich dar. Das Maximum der chronischen Abstoßung wird nur in der Gruppe der Kontrolltiere erreicht. In der Gruppe der behandelten Tiere dominiert der Grad D0. Ein signifikanter Unterschied wird hier wieder bei D0 bis D2 beobachtet (Sterne, $p \leq 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte je Gruppe (siehe Tabelle 17).

Bei den terminalen Bronchiolen aus dieser Versuchsgruppe dominierte der Schweregrad C0 bei ca. 50% der Tiere (MW C0: $53,30\% \pm 35,36\%$, siehe Abbildung 22). Erste Anzeichen einer bronchiolären, chronischen Abstoßungsreaktion waren in ca. 30% der untersuchten Lungen zu finden (MW C1: $30,03\% \pm 28,02\%$). Eine starke Abstoßung (C2) konnte in keiner Lunge festgestellt werden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte auch bei den Bronchiolen am POD 20 ein signifikanter Unterschied im Grad C0 aufgezeigt werden ($p=0,002$, siehe Abbildung 31).

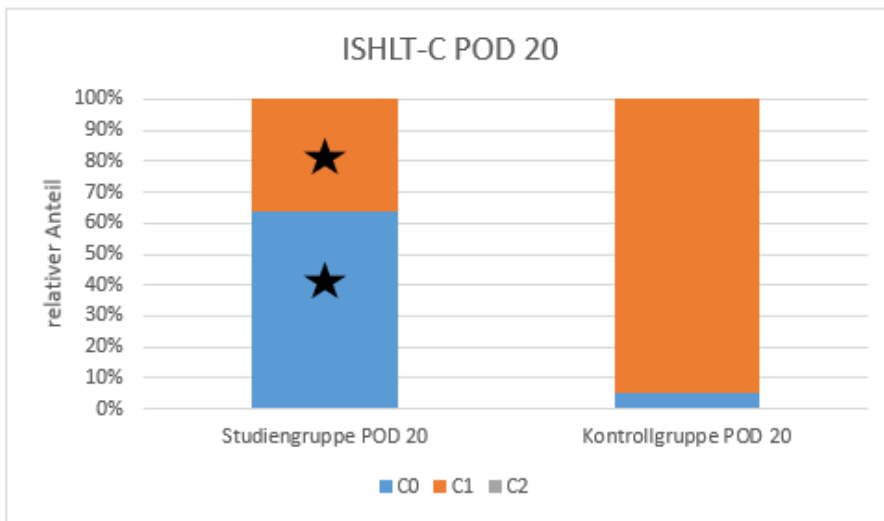


Abbildung 31: Graphische Darstellung der ISHLT-C-Klassifizierung an POD 20

Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlichen Anteil der bronchialen chronischen Abstoßung nach ISHLT-C der verschiedenen Versuchsgruppen an POD 20 im Vergleich. Sowohl bei Schweregrad CO als auch bei C1 konnten signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Sterne, $p=0,002$). In der Studien-Gruppe nimmt der relative Anteil von Grad C0 deutlich zu und der Anteil der moderaten Abstoßungsreaktion C1 deutlich ab. Die Kategorie C2 als maximale Abstoßung ist in keiner Gruppe vorhanden. Dargestellt sind die Mittelwerte je Gruppe (siehe Tabelle 17).

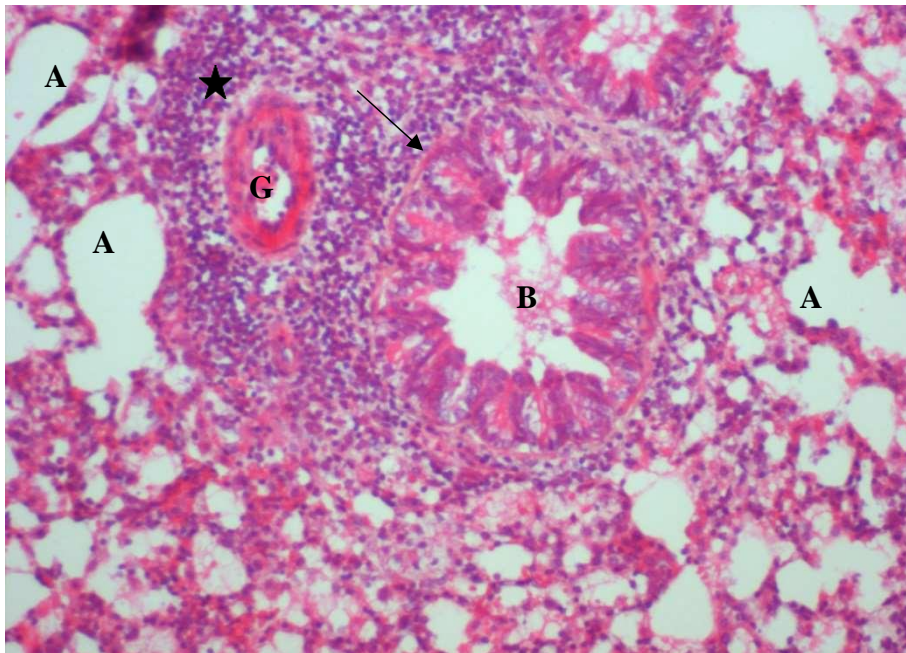


Abbildung 32: Studien-Gruppe, POD 20, HE, linke Lunge

Das Gefäß (G) oben links ist von einem geschlossenen Ring mononukleärer Zellen umgeben (schwarzer Stern), welche sich in die Alveolarsepten ausbreiten (A4). Am Gefäßendothel erkennt man einige Entzündungszellen, die bereits das Lumen einengen. Auch die Gefäßwand ist verdickt. Der zentrale Bronchiolus ist von mehrreihigen Rundzellinfiltraten umgeben, weist eine intakte Lamina muscularis (schwarzer Pfeil) und ein weitgehend unbeschädigtes Epithel auf. Das Interstitium zeigt eine leichte diffuse leukozytäre Infiltration, dennoch sind die Alveolen (A) größtenteils offen.

Am POD 20 konnte keine signifikante interstitielle Bindegewebsvermehrung in den behandelten Lungen der Ratten beobachtet werden (siehe Abbildung 33). Am häufigsten wurde der Fibrosegrad 3 beobachtet, bei einem Tier Grad 2 und bei zwei weiteren Tieren Grad 1 (MW: 2,17% \pm 0,98%). Auch hier zeigte sich eine signifikante Verbesserung ($p=0,01$) gegenüber der Kontrollgruppe an POD 20.

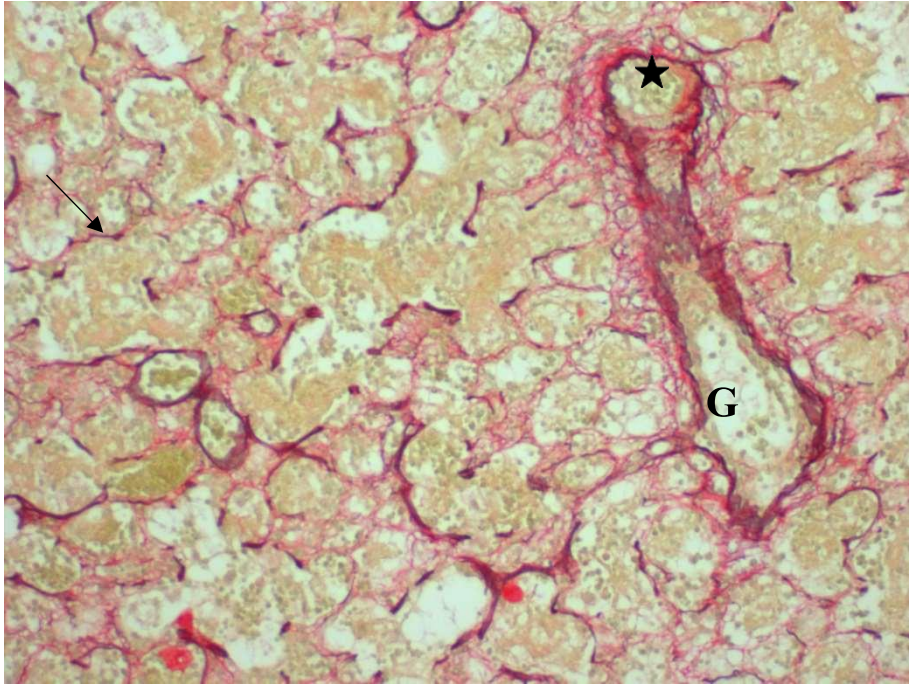


Abbildung 33: Studiengruppe, POD 20, Sirius Elastika, linke Lunge

Mit dieser Bindegewebsfärbung wird deutlich, dass um das zentrale Gefäß (G) keine deutliche Faservermehrung feststellbar ist (Kollagen rot). Hier ist das peribronchovaskuläre Bindegewebe zu sehen, welches das Gefäß in das Parenchym einbettet (Fibrosegrad 1). Das Lumen des Gefäßes ist teilweise mit Entzündungszellen durchsetzt (Stern). Die Alveolarsepten sind nicht verdickt (dünner Pfeil) und es sind keine fibrotischen Anhäufungen zu sehen.

Am **POD 60** waren die **rechten Lungen** wie in allen anderen Versuchsgruppen durchgehend unauffällig.

Die Gefäße der **linken Lungen** an **POD 60** zeigten eine deutlich geringere chronische Abstoßung (MW D2: 7,35% \pm 10,02%, MW D1: 35,51% \pm 23,16%) als die der Kontrollgruppe. Der größte Anteil lag bei D0 (MW D0: 57,13% \pm 30,93%), so dass die Strukturen der Gefäße sehr häufig noch intakt waren. Das akute Geschehen war rückläufig, nur einige leukozytäre Infiltrationen um die Gefäße waren auffällig (siehe Abbildung 36). Auch in dieser Versuchsgruppe konnte eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe im Bereich D0, D1 und D2 festgestellt werden ($p<0,05$, siehe Abbildung 34).

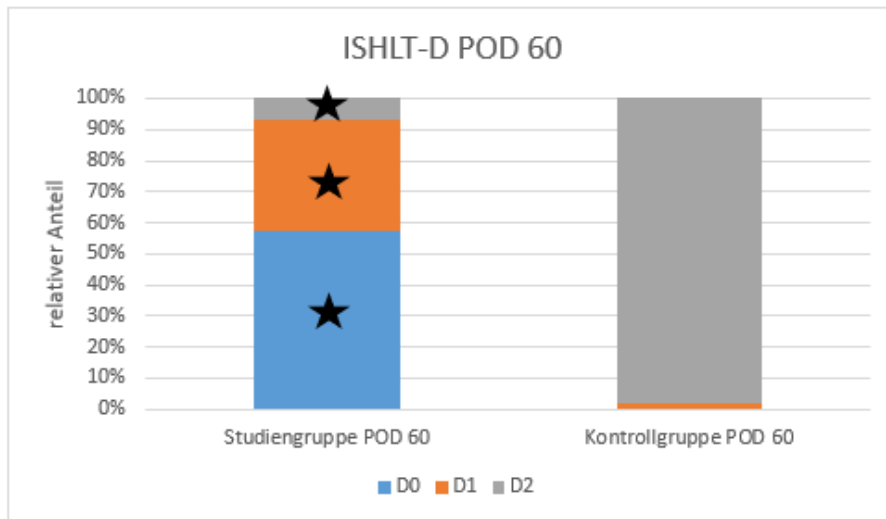


Abbildung 34: Graphische Darstellung der ISHLT-D-Klassifizierung an POD 60

In diesem Diagramm wird der durchschnittliche Anteil der chronischen Abstoßung der Gefäße der verschiedenen Versuchsgruppen an POD 60 im Vergleich gezeigt. Hier konnte ein signifikanter Unterschied bei allen drei Schweregraden festgestellt werden (Sterne, $p \leq 0,05$). Der größte Anteil der Bronchiolen der Studiengruppe befindet sich bei Grad D0 und gibt an, dass keine messbare Abstoßungsreaktion stattgefunden hat. In der Gruppe der unbehandelten Tiere überwiegt der Grad D2. Dargestellt sind die Mittelwerte je Gruppe (siehe Tabelle 17).

Die terminalen Bronchiolen waren an **POD 60** meist von keiner chronischen Veränderung betroffen (MW C0: $60,97\% \pm 30,84\%$). Die Gruppe, die bei C2 eingeordnet wurde, war sehr gering (MW C2: $4,69\% \pm 9,33\%$), so dass nur eine schwache Destruktion der Bronchiolen vorgefunden wurde. Bei allen Schweregraden fand sich ein signifikanter Unterschied gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren ($p < 0,05$, siehe Abbildung 35).

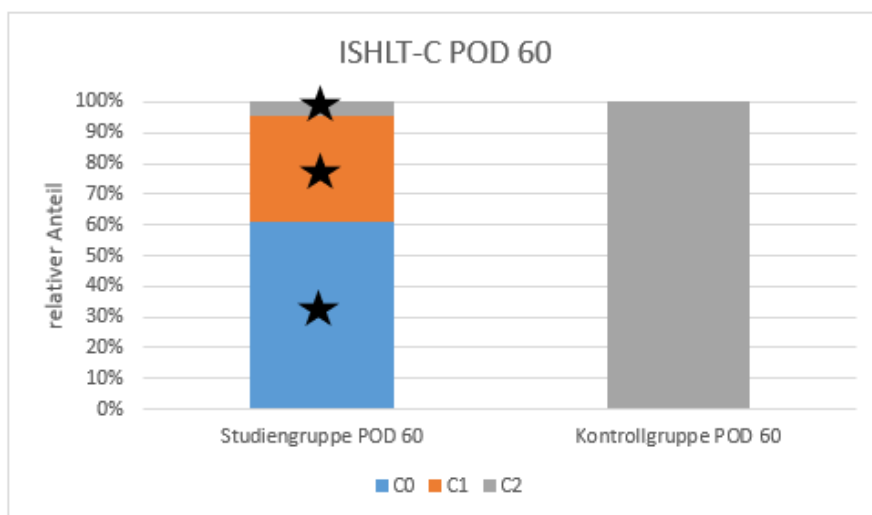


Abbildung 35: Graphische Darstellung der ISHLT-C-Klassifizierung an POD 60

Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlichen Anteil der chronischen Abstoßung der Bronchiolen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit Imatinib, Vatalanib und Everolimus behandelt wurden an POD 60 im Vergleich. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe konnte von C0 bis C2 festgestellt werden (Sterne, $p \leq 0,05$). Dies zeigt sich sehr deutlich, da in der Kontrollgruppe alle Bronchiolen in den Grad C2, mit einer massiven Abstoßungsreaktion, eingeteilt werden und in der Studiengruppe der Grad C0 überwiegt. Dargestellt sind die Mittelwerte je Gruppe (siehe Tabelle 17).

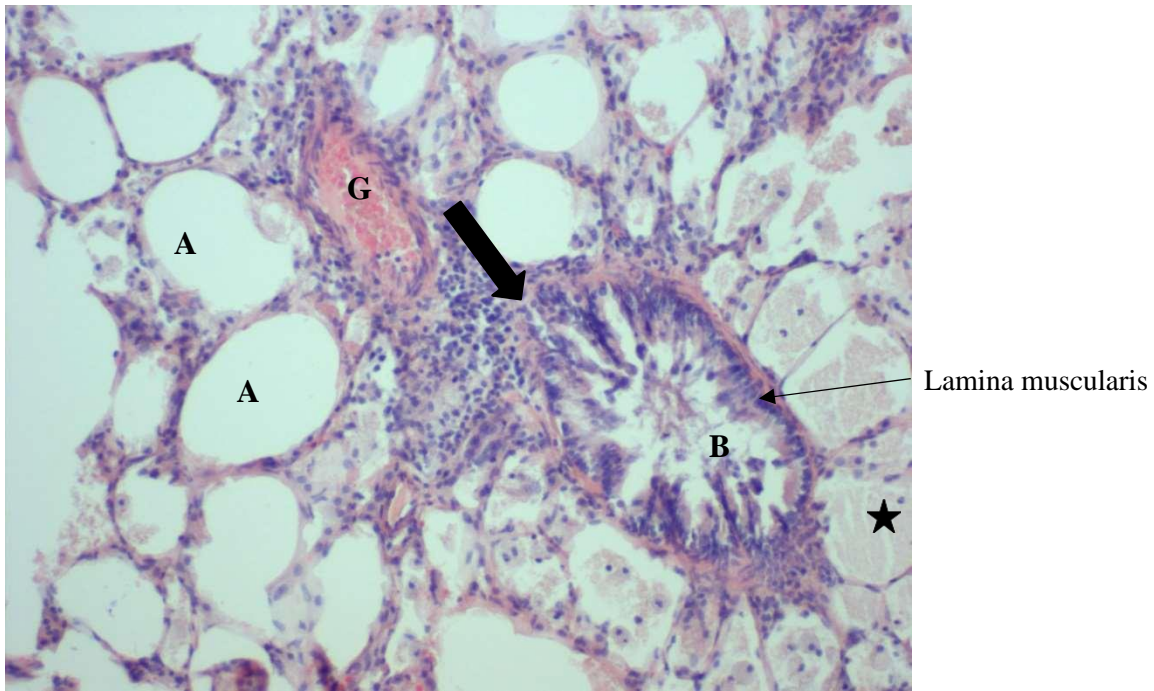


Abbildung 36: Studiengruppe, POD 60, HE, linke Lunge

Zentral ist ein Gefäß (G) und ein Bronchiolus (B) zu sehen. Die Lamina muscularis des Bronchiolus ist teilweise mit mononukleären Zellen infiltriert und ist nicht durchgängig zu sehen (dicker schwarzer Pfeil). Gleichzeitig zeigen sich keine Anzeichen einer Fibrose. Die Alveolarsepten sind nicht verdickt und es sind keine fibrotischen Anhäufungen zu sehen. Die angrenzenden Alveolen (A) sind mit Exsudat (Stern) gefüllt. Es sind teilweise Entzündungszellen zu erkennen, welche auch die Septen durchsetzen.

Die interstitielle Bindegewebsvermehrung wurde in den einzelnen Lungen sehr unterschiedlich beobachtet (siehe Abbildung 37). Ein Präparat wurde dem Fibrosegrad 1 und zwei Präparate dem Fibrosegrad 6, mit einer teilweise sehr ausgeprägten Fibrosierung, zugeteilt. Auch Grad 2, 3 und 4 wurden vorgefunden. Somit ergab sich ein Mittelwert von $3,56 \pm 1,81$. Unter diesen Umständen zeigte sich eine signifikante Verbesserung ($p=0,01$) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 38).

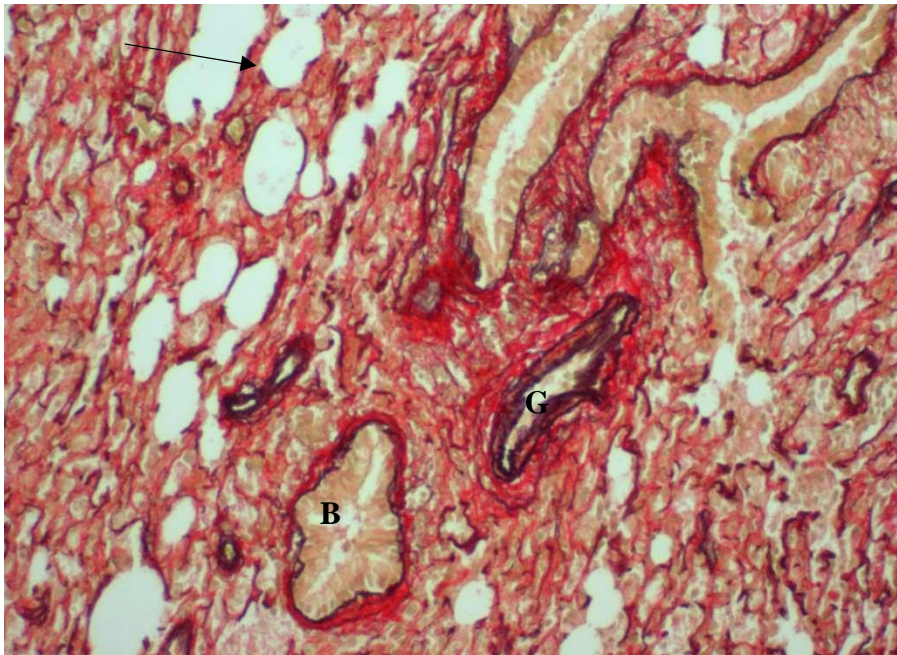


Abbildung 37: Studiengruppe, POD 60, Sirius Elastika, linke Lunge

Hier erkennt man eine leichte Zunahme des Bindegewebes um das Gefäß (G). Auch die Alveolarsepten sind verdickt (dünner schwarzer Pfeil). Es herrscht in diesem Bildausschnitt eine moderate Fibrosierung.

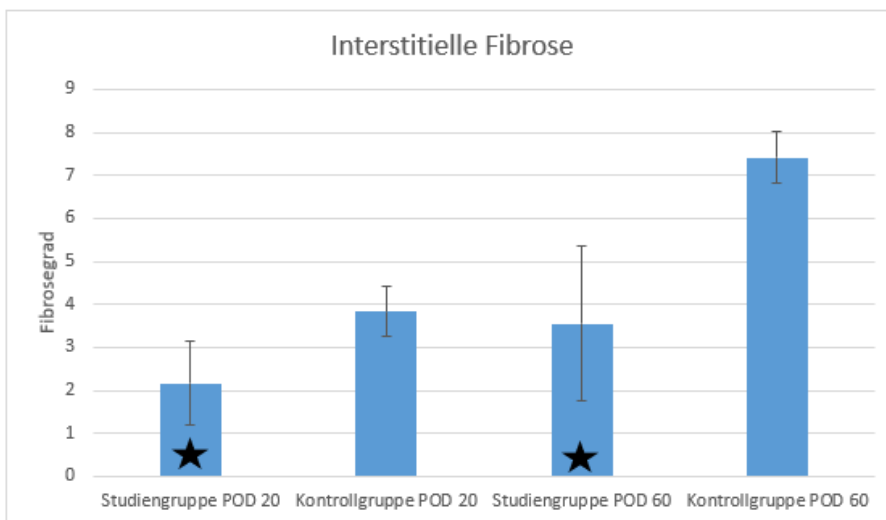


Abbildung 38: Graphische Darstellung der interstitiellen Fibrose an POD 20 und 60

In diesem Säulendiagramm ist der durchschnittliche interstitielle Fibrosegrad (siehe Tabelle 12) der Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeigt. Der durchschnittliche Schweregrad in der Kontrollgruppe an POD 60 reicht an ein Maximum heran, so dass hier eine vollständige Fibrosierung bis hin zur funktionslosen Vernarbung stattgefunden hat. Dagegen lag der Durchschnitt in der Studiengruppe nur bei einem Grad von 3,55. Sowohl an POD 20, als auch an POD 60 zeigt die Studiengruppe eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe (Sterne). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen je Gruppe.

3.3 Ergebnisse der Immunhistologie

Im Folgenden ist die graphische Darstellung der Auswertung der immunhistologischen Färbungen dargestellt. In einigen Gruppen wurde eine signifikante Reduzierung der gefärbten Zellen erreicht, welche mit verschiedenen farbigen Sternen markiert wurden.

Kennzeichnung der unterschiedlichen Signifikanzen in den graphischen Darstellungen

- ★ = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontroll- und Studiengruppe am gleichen POD
- ★ = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Studiengruppe an unterschiedlichen POD
- ★ = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den rechten und linken Lungen einer Untersuchungsgruppe am gleichen POD

3.3.1 Expression von CD117 (c-Kit)

Das immunphänotypische Oberflächenmerkmal auf verschiedenen Zellen CD117 (c-Kit) ist ein Protein aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Durch Phosphorylierung der Zielsubstrate kommt es zu einer Zellproliferation. Da in dieser Studie ein Weg zur Eindämmung der Fibroblastenproliferation und der Kollagenbildung gesucht wurde, bot sich die Tyrosinkinase CD117 zur Untersuchung an.

3.3.1.1 Rechte Lunge

Zur Auswertung wurde die Anzahl der positiv gefärbten Zellen in den **rechten Lungen** der Kontrollgruppe sowie der Studiengruppe gezählt und ausgewertet (siehe Abschnitt 2.10.1). Die Werte der Kontroll- und Studiengruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Das Balkendiagramm in Abbildung 39 stellt die Anzahl an positiven CD 117 Zellen in beiden Gruppe an POD 20 und POD 60 dar. Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $32,2 \pm 19,8$ und an **POD 60** $26,7 \pm 12,6$. In der Studiengruppe an **POD 20** bei $25,7 \pm 10,0$ sowie an **POD 60** bei $20,1 \pm 6,1$.

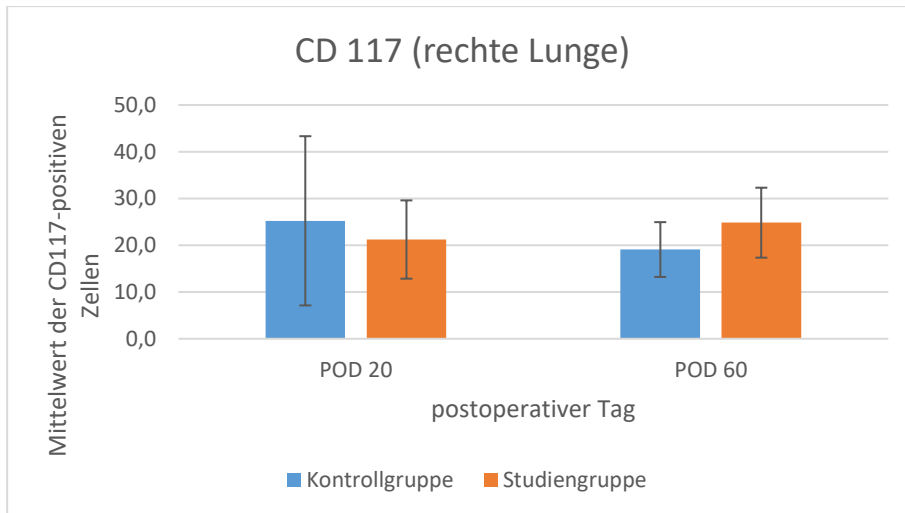


Abbildung 39: Expression der CD117-positiven Zellen der rechten Lunge

Hier sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der CD117-positiven Zellen der Kontroll- und Studiengruppe, jeweils pro Gesichtsfeld, abgebildet. Auch der Untersuchungszeitraum der rechten nicht- transplantierten Lungen, POD 20 und 60, kann hier verglichen werden. Es konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

3.3.1.2 Linke Lungen

Abbildung 40 zeigt ein repräsentatives immunhistologisches Bild von CD 117 positiv gefärbten Zellen der linken Lunge der Kontrollgruppe an **POD 20**. Die Anzahl der CD117-positiven Zellen der transplantierten **linken Lungen** nahm zwischen dem **POD 20** und **POD 60** in beiden Untersuchungsgruppen ab. Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $32,2 \pm 19,8$ und an **POD 60** bei $26,7 \pm 12,6$. In der Studiengruppe konnten an **POD 20** $25,7 \pm 10,0$ und **POD 60** $18,8 \pm 4,8$ der positiven Zellen ausgezählt werden. Abbildung 41 zeigt den graphischen Vergleich von CD 117 positiven Zellen der linken Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60**. Weder zwischen den Untersuchungszeiträumen, noch zwischen der Kontroll- und Studiengruppe konnte ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

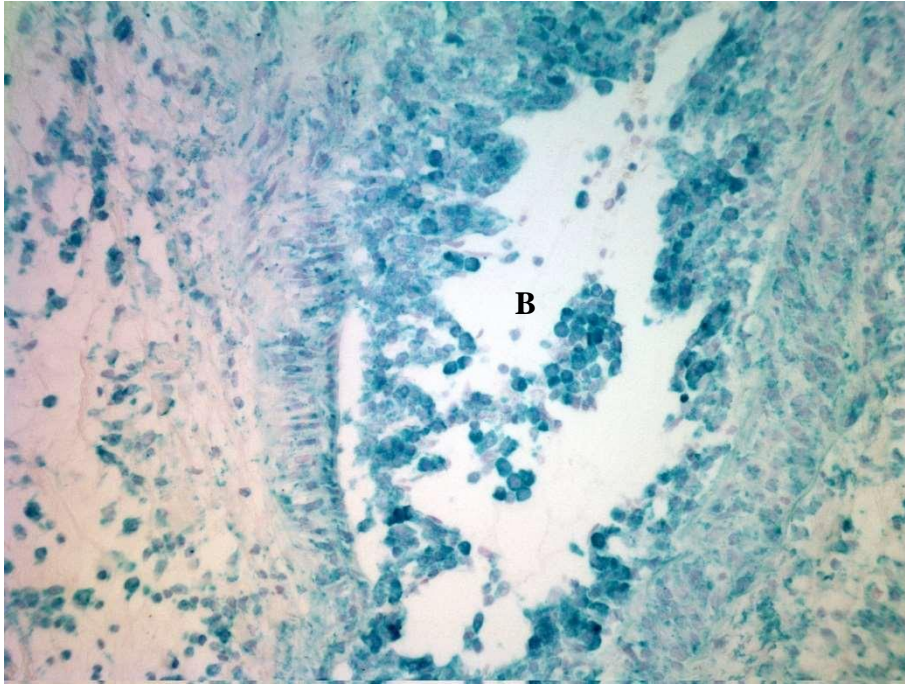


Abbildung 40: Kontrollgruppe, POD 20, CD117, linke Lunge

Ein Bronchiolus (B) ist zu sehen. Die Lamina muscularis und das Lumen des Bronchiolus sind teilweise mit mononukleären Zellen, welche CD117-positiv gefärbt sind, infiltriert.

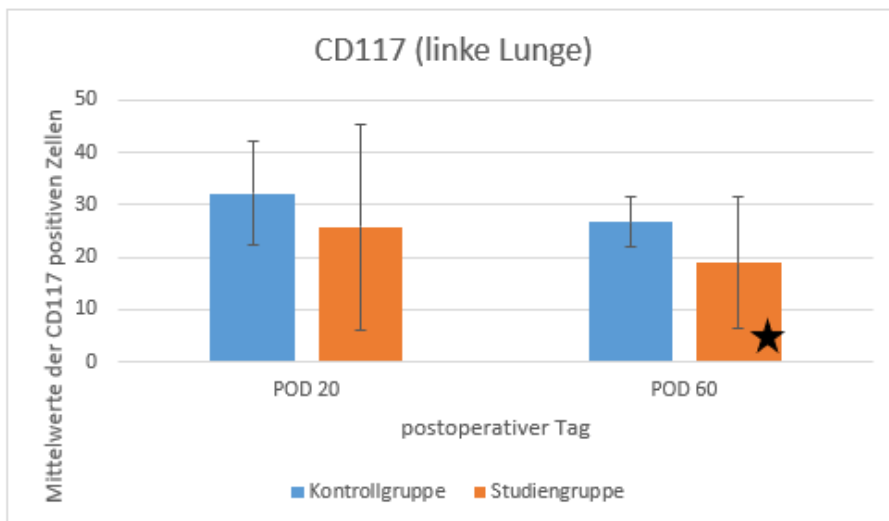


Abbildung 41: Expression der CD117-positiven Zellen der linken Lunge

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der CD117-positiven Zellen pro Gesichtsfeld an POD 20 und 60 in den linken transplantierten Lungen. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich Untersuchungsgruppen an POD 60 (schwarzer Stern, $p=0,019$).

3.3.2 Expression von PDGF-A und PDGFR- α

Der Wachstumsfaktor PDGF-A (platelet-derived growth factor) und dessen Rezeptor PDGFR- α wurden zur Untersuchung gewählt, da von einem Einfluss auf die überschießende Proliferation von Fibroblasten bei der Regeneration des Lungengewebes ausgegangen wird (Knoop &

Estenne, 2006). Im Folgenden werden die Auswertungen der immunhistologischen Färbungen dieser Marker zusammengefasst.

Signifikante Unterschiede werden durch Sterne in den Säulen der Diagramme gekennzeichnet. Bei der Expression von PDGF-A und PDGFR- α ergaben sich Signifikanzen an unterschiedlichen postoperativen Tagen, keine jedoch bei der Untersuchung zwischen der rechten und linken Lunge in der Studiengruppe.

3.3.2.1 Rechte Lunge

PDGF-A

In dieser Gruppe wurde die Anzahl der PDGF-A-positiv gefärbten Zellen in den **rechten Lungen** der Kontrollgruppe sowie der Studiengruppe ausgewertet. Die Zahlen der Kontroll- und Studiengruppe wiesen im Vergleich einen signifikanten Unterschied an **POD 60** auf. Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $14,4 \pm 9,9$ und an **POD 60** $11,0 \pm 5,7$. In der Studiengruppe konnten folgende Werte ermittelt werden: **POD 20** $12,1 \pm 8,2$ und **POD 60** $7,3 \pm 2,0$ (siehe Abbildung 42).

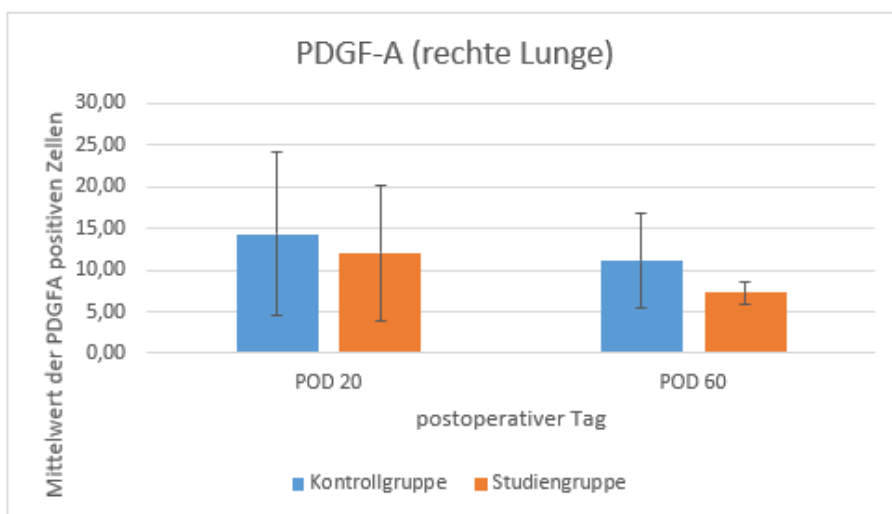


Abbildung 42: Expression der PDGF-A-positiven Zellen der rechten Lunge

In diesem Säulendiagramm sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der PDGF-A-positiven Zellen der rechten Lunge dargestellt. Im Vergleich des POD 20 mit dem POD 60 sind die Werte gesunken, sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Studiengruppe. Hier konnte keine signifikante Veränderung in den Untersuchungsgruppen/-zeitpunkt verzeichnet werden.

PDGFR- α

Abbildung 43 zeigt ein repräsentatives immunhistologisches Bild von PDGFR- α -positiv gefärbten Zellen der rechten Lunge der Kontrollgruppe an **POD 60**. Zur Auswertung wurde jeweils die Anzahl der PDGFR- α -positiv gefärbten Zellen in den **rechten Lungen** der Kontrollgruppe sowie der Studiengruppe gezählt. Die Werte der Kontroll- und Studiengruppe wiesen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abbildung 44). Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $23,7 \pm 8,6$ und an **POD 60** $27,0 \pm 9,3$. In der Studiengruppe konnten folgende Werte ermittelt werden: **POD 20** $22,4 \pm 8,0$ und **POD 60** $24,6 \pm 6,3$ (siehe Abbildung 44, Tabelle 20-23 im Anhang).

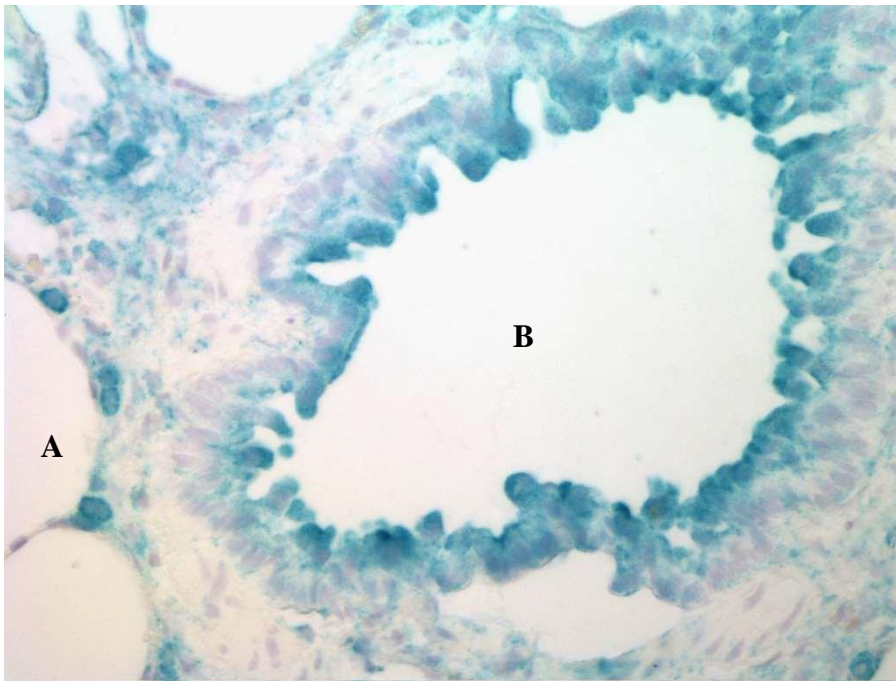


Abbildung 43: Kontrollgruppe, POD 60, PDGFR- α , rechte Lunge

Zentral ist in dieser Aufnahme ein Bronchiolus (B) dargestellt. Das Lumen ist frei und die Lamina muscularis intakt. Am linken Rand sind angeschnittene Alveolen (A) zu erkennen. Zwischen den Alveolen sitzen einzelne angefärbte mononukleäre Zellen.

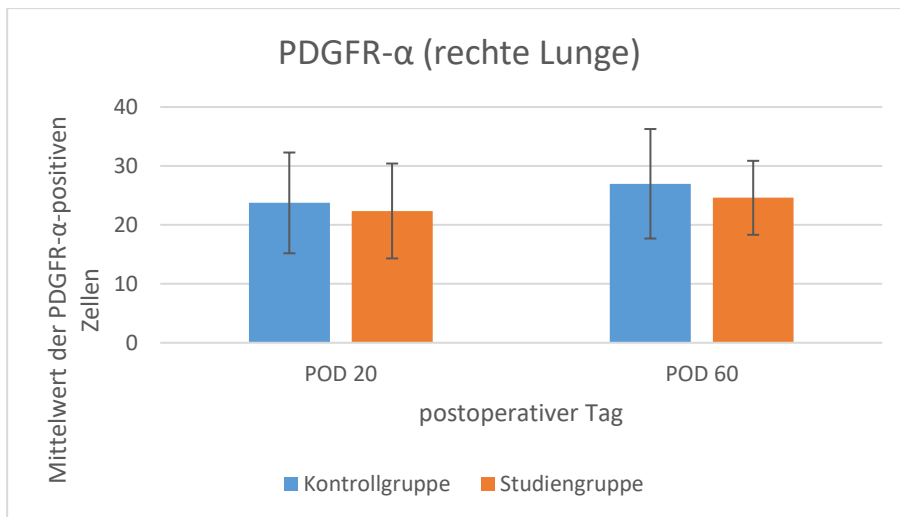


Abbildung 44: Expression der PDGFR- α -positiven Zellen der rechten Lunge

Hier sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der PDGFR- α -positiven Zellen dargelegt. Weder in der Kontroll-, noch in der Studiengruppe entwickelte sich eine Abnahme der positiven Zellen. An POD 60 sind in beiden untersuchten Gruppen Zunahmen der Mittelwerte aufgezeigt, wenn man den Vergleich zu POD 20 zieht.

3.3.2.2 Linke Lunge

PDGF-A

Die positiv gefärbten Zellen in den **linken Lungen** der Kontrollgruppe sowie der Studiengruppe wurden hier gezählt. Abbildung 25 zeigt den graphischen Vergleich von PDGF- A positiven Zellen der linken Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60**. Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $21,6 \pm 7,9$ und an **POD 60** $18,7 \pm 11,2$. In der Studiengruppe konnten an **POD 20** $16,0 \pm 3,8$ und **POD 60** $9,2 \pm 6,0$ Mittelwerte der positiven Zellen ausgezählt werden (siehe Abbildung 45, Tabelle 20-23).

Einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Studiengruppe erkennt man an **POD 60**. Ein Vergleich der Mittelwerte der Studiengruppe an den unterschiedlichen postoperativen Tagen zeigt ebenfalls eine signifikante Veränderung.

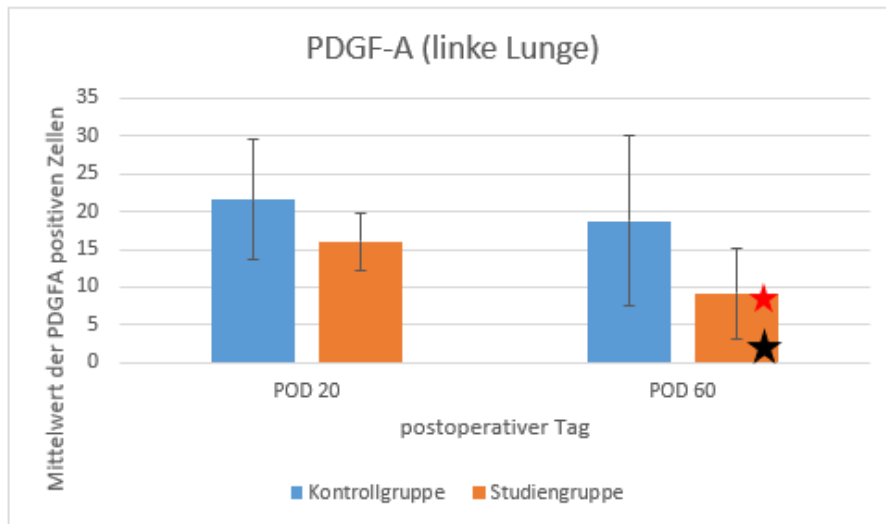


Abbildung 45: Expression der PDGF-A-positiven Zellen der linken Lunge

Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der PDGF-A-positiven Zellen der linken Lungen an POD 20 und 60 nach Transplantation. Wenn man die Werte an POD 60 näher untersucht, erkennt man einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Studiengruppe (schwarzer Stern, $p=0,034$). Auch ein Vergleich der Mittelwerte der Studiengruppe an den unterschiedlichen postoperativen Tagen zeigt eine signifikante Veränderung (roter Stern, $p=0,025$).

PDGFR- α

Abbildung 46 zeigt ein repräsentatives immunhistologisches Bild von PDGFR- α -positiv gefärbten Zellen der linken Lunge der Studiengruppe an **POD 20**. Hier in Abbildung 47 ist der graphische Vergleich von PDGFR- α -positiven Zellen der linken Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60** zu sehen. Das Mittel der **linken Lungen** der Kontrollgruppe lag an **POD 20** bei $18,6 \pm 11,0$ und an **POD 60** bei $19,8 \pm 9,0$. In der Studiengruppe wurde an **POD 20** ein Mittelwert von $23,1 \pm 4,6$ sowie an **POD 60** ein Mittelwert von $17,3 \pm 3,6$ ermittelt (siehe Abbildung 47, Tabelle 20-23). Die Werte der Kontroll- und Studiengruppe wiesen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede auf. Betrachtet man die linken Lungen der Studiengruppe ist keine signifikante Veränderung im Untersuchungszeitraum festzustellen.

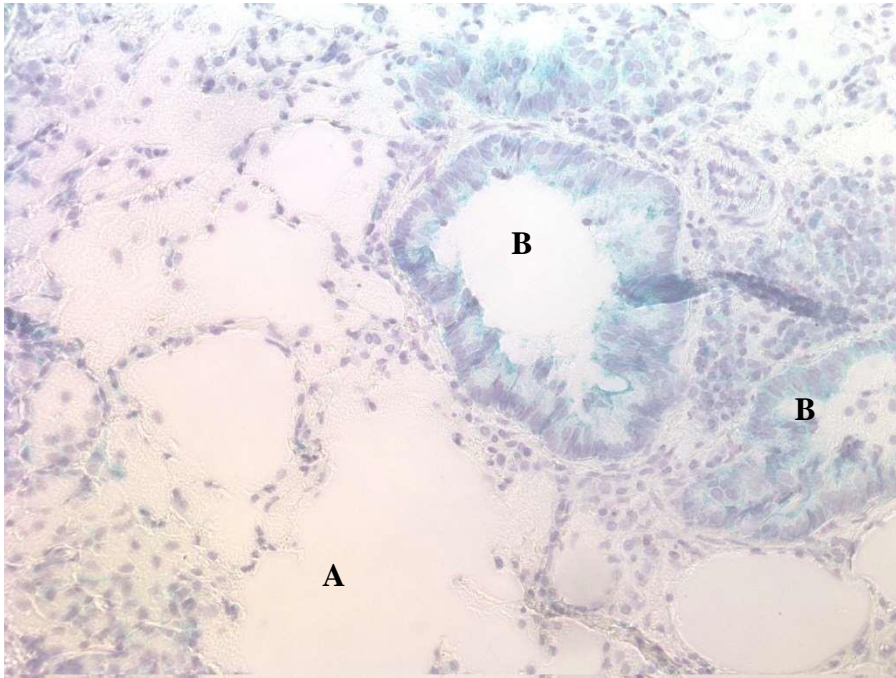


Abbildung 46: Studiengruppe, POD 20, PDGFR- α , linke Lunge

In dieser Abbildung sind zwei Bronchioli (B) und um diese herum Alveolen (A) dargestellt. In den Alveolarwänden und peribronchiolär ist eine Infiltration mit mononukleären Zellen zu erkennen. Einzelne sind blau angefärbt.

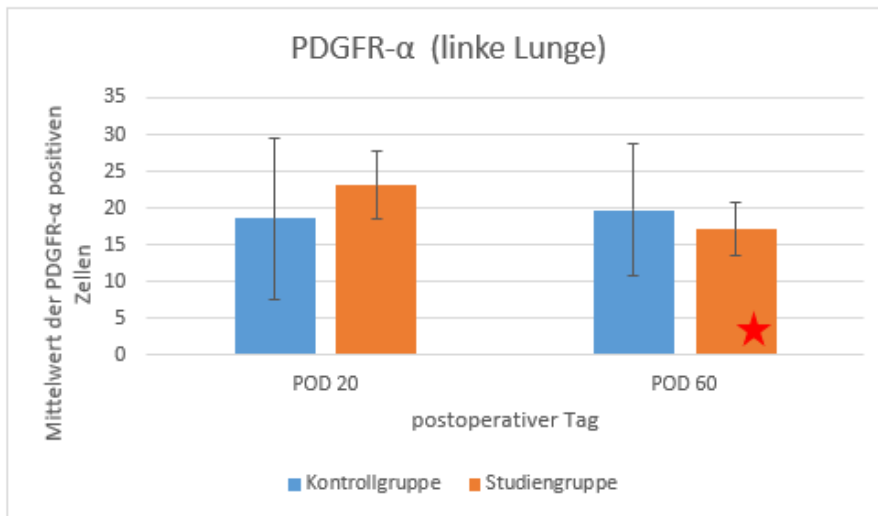


Abbildung 47: Expression der PDGFR- α -positiven Zellen der linken Lunge

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der PDGFR- α -positiven Zellen pro Gesichtsfeld der linken Lungen. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe nahmen im Untersuchungszeitraum zu, die der Studiengruppe ab. Eine signifikante Veränderung konnte bei der Untersuchung des Rezeptors zwischen den Untersuchungszeiträumen dargelegt werden (roter Stern, $p=0,025$).

3.3.3 Expression von VEGF-A und VEGFR-2

Der Effekt von VEGF-A (vascular endothelial growth factor), ein weiteres Protein, das als Wachstumsfaktor fungiert, und dessen Rezeptor VEGFR-2 wurde durch eine immunhistologische Färbung dargestellt. Das Protein wirkt mitogen auf endotheliale Zellen der Gefäßwand und ist somit entscheidend für das Gefäßwachstum (Ferrara et al., 2003).

3.3.3.1 Rechte Lunge

VEGF-A

Die Werte der Kontrollgruppe der **rechten Lungen** an **POD 20** lagen bei $10,8 \pm 4,4$ und an **POD 60** $7,7 \pm 6,0$. In der Studiengruppe lag der Mittelwert für **POD 20** bei $9,3 \pm 3,0$ und für **POD 60** bei $4,2 \pm 2,2$ (siehe Abbildung 48, Tabelle 20-23). An **POD 20** ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der rechten und linken Lunge der Kontrollgruppe.

Abbildung 48 bildet eine vergleichende Darstellung der VEGF-A positiven Zellen der rechten Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60** ab.

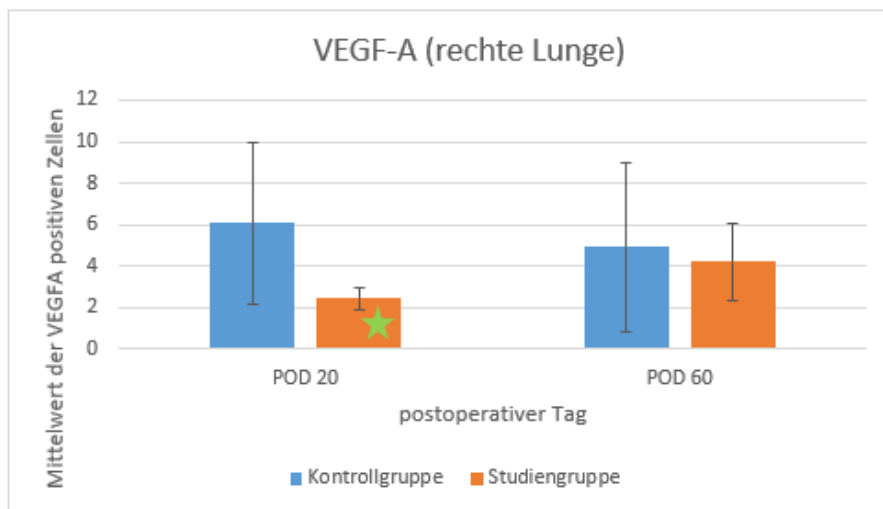


Abbildung 48: Expression der VEG-FA-positiven Zellen der rechten Lunge

Dieses Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der VEGF-A-positiven Zellen der rechten Lungen. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe nahm zum POD 60 hin ab, dagegen stiegen die Werte der Studiengruppe an. Hier ergab sich keine signifikante Veränderung. Der grüne Stern zeigt eine signifikante Veränderung zwischen den rechten und linken Lungen der Studiengruppe an POD 20 an ($p=0,002$).

VEGFR-2

Repräsentativ steht Abbildung 49 als immunhistologisches Bild von VEGFR-2-positiv gefärbten Zellen der rechten Lunge der Studiengruppe an **POD 20**. Abbildung 50 zeigt den graphischen Vergleich von VEGFR-2-positiv gefärbten Zellen der rechten Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60**. Die Mittelwerte der positiv gefärbten Zellen der **rechten Lungen** der Kontrollgruppe an **POD 20** lagen bei $14,7 \pm 7,9$ und an **POD 60** bei $15,4 \pm 8,6$. In der Studiengruppe konnten an **POD 20** $10,9 \pm 3,8$ und **POD 60** $8,2 \pm 3,6$ als Mittelwerte der VEGFR-2-positiven Zellen ermittelt werden (siehe Abbildung 50, Tabelle 20-23). Die Reduktion der ausgezählten Zellen der Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe stellt an **POD 20** eine signifikante Veränderung dar.

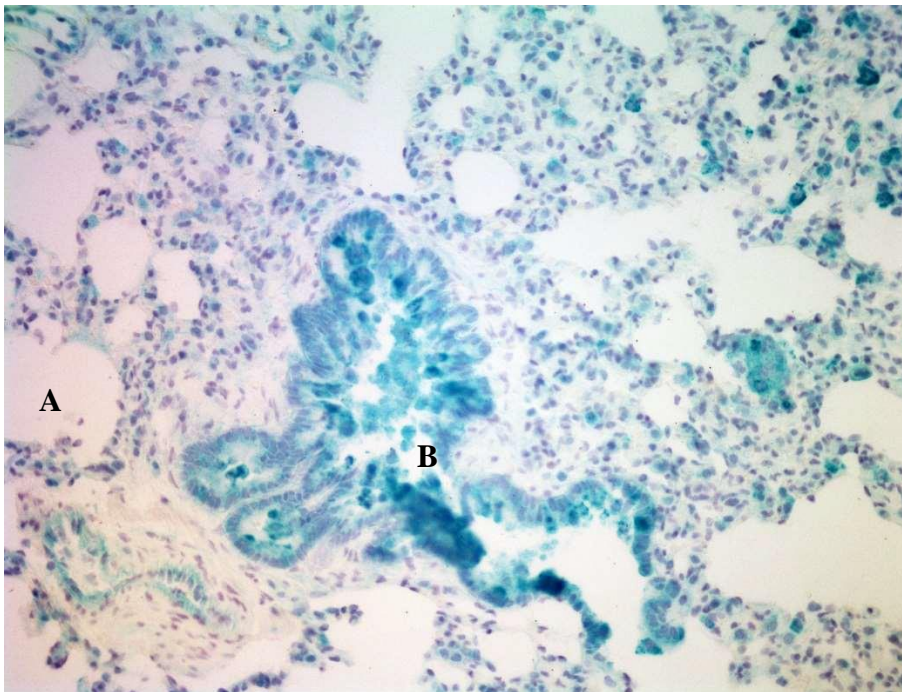


Abbildung 49: Studiengruppe, POD 20, VEGFR-2, rechte Lunge

Auf dieser Abbildung ist zentral ein Bronchiolus (B) zu sehen. Einige blau gefärbte Zellen sind in das Lumen eingedrungen. Im Umfeld des Gefäßes zeigt eine leichte diffuse leukozytäre Infiltration mit VEGFR-2-positiven Zellen, dennoch sind die Alveolen (A) größtenteils offen.

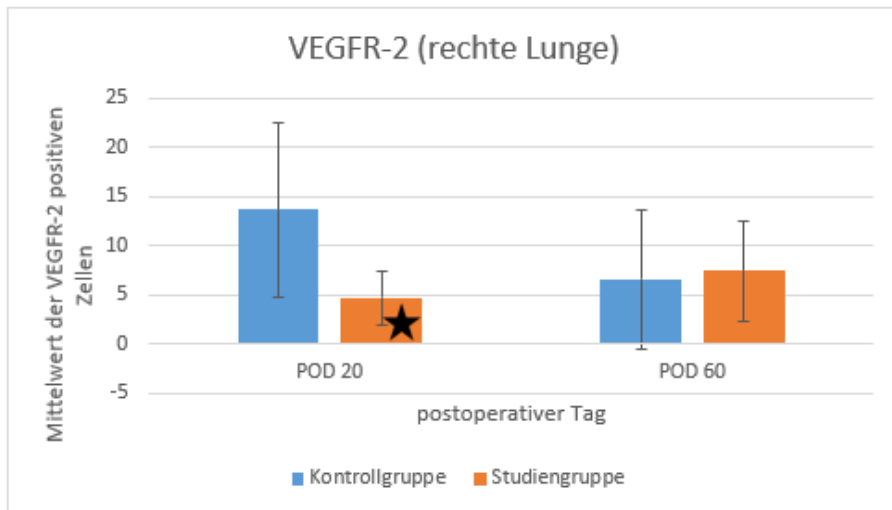


Abbildung 50: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der rechten Lunge

Hier sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der VEGFR-2-positiven Zellen der rechten Lungen graphisch veranschaulicht. Die aufgezeigte Abnahme der positiven Zellen der Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an POD 20 stellt eine signifikante Veränderung dar (schwarzer Stern, $p=0,019$). Die Werte der Studiengruppe nehmen zwischen dem POD 20 und dem POD 60 zu.

3.3.3.2 Linke Lunge

VEGF-A

Abbildung 51 bildet eine vergleichende Darstellung der VEGF-A positiven Zellen der linken Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60** ab. Im Mittel lagen die Werte der positiv gefärbten Zellen der **linken Lungen** der Kontrollgruppe an **POD 20** bei $6,1 \pm 3,9$ und an **POD 60** $4,9 \pm 4,1$. In der Studiengruppe lagen die Werte an **POD 20** bei $2,4 \pm 0,6$ sowie an **POD 60** bei $3,8 \pm 2,0$ (siehe Abbildung 51, Tabelle 20-23). Zwischen den Untersuchungszeiträumen **POD 20** und **POD 60** konnte eine signifikante Veränderung in der Studiengruppe dargelegt werden. Eine weitere Signifikanz trat in der Studiengruppe der **rechten Lungen** und der **linken Lungen** an **POD 20** auf (siehe Abbildung 52).

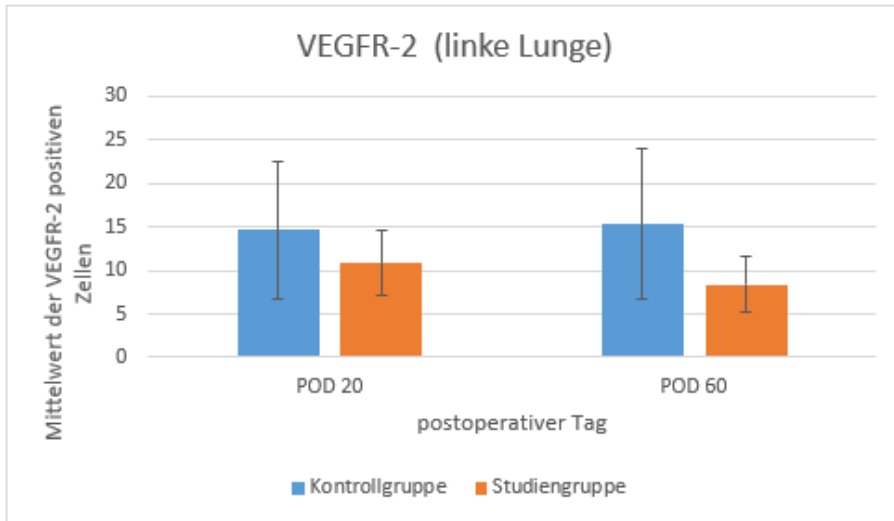


Abbildung 51: Expression der VEGF-A-positiven Zellen der linken Lunge

In diesem Diagramm sind die Ergebnisse der Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen der VEGF-A-positiven Zellen der linken Lungen dargestellt. Zwischen den Untersuchungszeiträumen POD 20 und POD 60 konnte eine signifikante Veränderung in der Studiengruppe dargelegt werden (roter Stern, $p=0,005$).

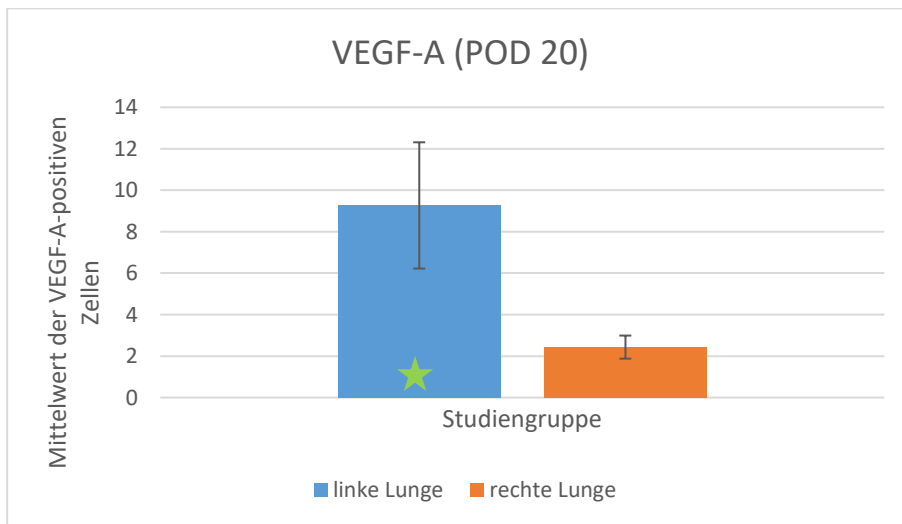


Abbildung 52: Expression der VEGF-A-positiven Zellen der linken und rechten Lunge

Bei der Präsentation von Mittelwerten und Standardabweichung der VEGF-A-positiven Zellen konnte eine Signifikanz in der Studiengruppe zwischen rechter und linker Lunge an POD 20 ermittelt werden (grüner Stern, $p=0,002$).

VEGFR-2

Abbildung 53 zeigt ein repräsentatives immunhistologisches Bild von VEGFR-2-positiv gefärbten Zellen der linken Lunge der Kontrollgruppe an **POD 60**. Abbildung 54 zeigt den graphischen Vergleich von VEGFR-2-positiv gefärbten Zellen der linken Lungen beider Gruppen an **POD 20** und **POD 60**. Für die Gruppe der **linken Lungen** der Kontrolltiere betragen die Mittelwerte an **POD 20** $14,7 \pm 7,9$ und an **POD 60** $15,4 \pm 8,6$. In der Studiengruppe

konnte Folgendes ermittelt werden: **POD 20** $10,9 \pm 3,8$ und **POD 60** $8,2 \pm 3,6$ (siehe Abbildung 54, Tabelle 20-23). An **POD 60** zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Studiengruppe. Zusätzlich dazu bestätigte sich eine Signifikanz zwischen der rechten und linken Lunge an **POD 20** in der Studiengruppe.

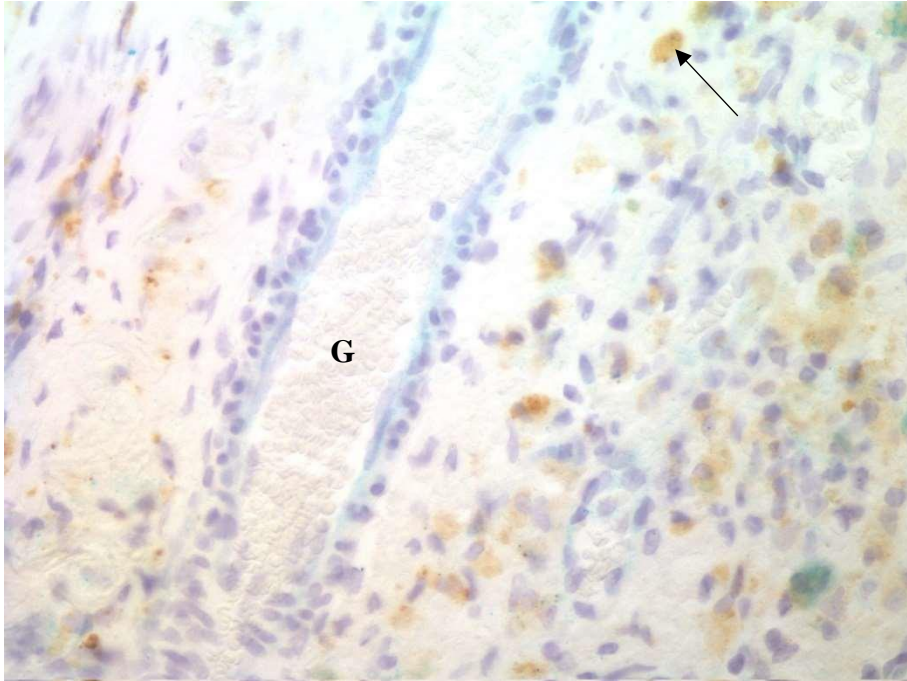


Abbildung 53: Kontrollgruppe, POD60, VEGFR-2, linke Lunge

In dieser mikroskopischen Aufnahme liegt mittig ein angeschnittenes Gefäß (G). Die Lamina propria ist bläulich angefärbt. Im Interstitium befinden sich Hämosiderinablagerungen (schwarzer dünner Pfeil) und nur wenige blaugefärbte mononukleare Zellen.

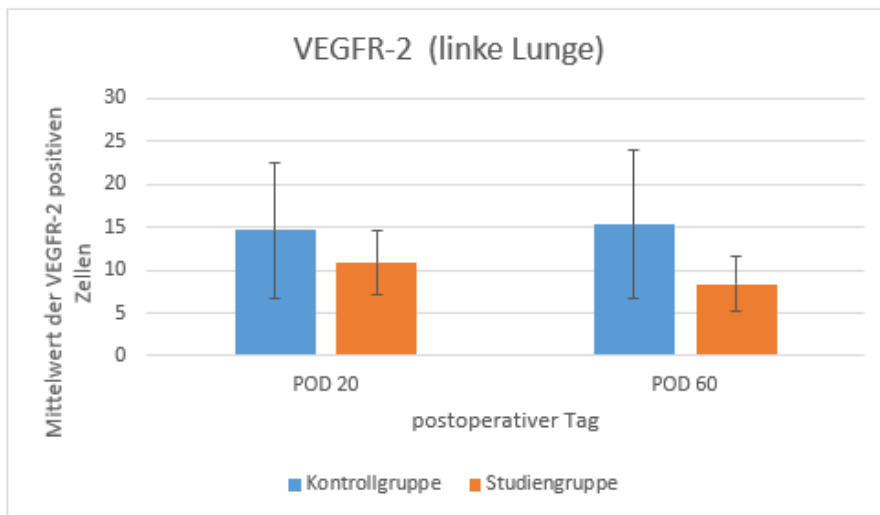


Abbildung 54: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der linken Lunge

Hier sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der VEGFR-2-positiven Zellen der linken Lungen graphisch veranschaulicht. Für die Werte der Kontrollgruppe kann man im Verlauf eine Zunahme des Mittelwertes erkennen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Studiengruppe. Die dargestellten Säulen der Studiengruppe zeigen zwischen POD 20 und POD 60 zwar eine Abnahme, bei näherer Untersuchung aber keine signifikante Veränderung.

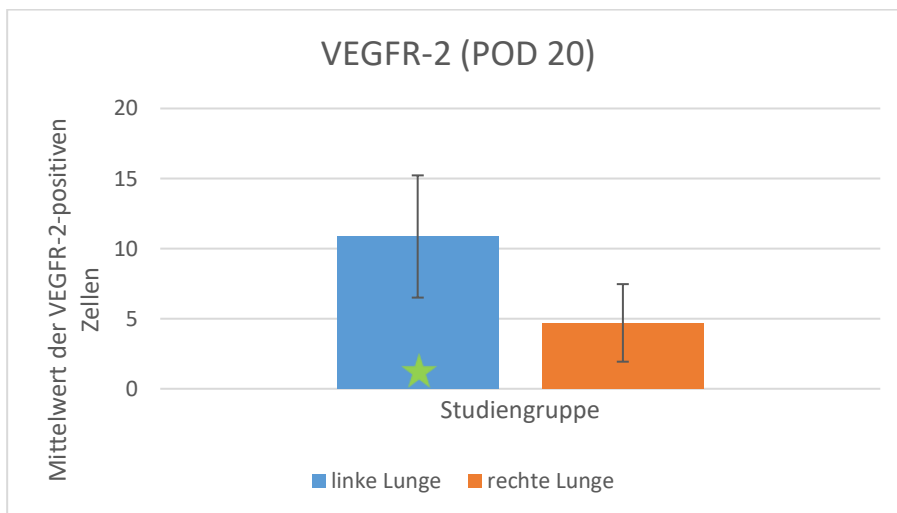


Abbildung 55: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der linken und rechten Lunge

Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der VEGFR-2-positiven Zellen. In der Studiengruppe konnte zwischen rechter und linker Lunge an POD 20 ein signifikanter Unterschied dargestellt werden (grüner Stern, $p=0,015$).

3.3.4 Intensität

Verschiedene Studien demonstrierten bereits, dass die Signalkaskade der Wachstumsfaktoren an der Pathogenese der CLAD nach einer Lungentransplantation beteiligt sind. Somit galt es herauszufinden, ob die Ausprägung der Färbung der einzelnen Zellen, Bronchialepithelzellen, Typ-I und Typ-II-Zellen, interstitiellen Zellen, Gefäßendothelzellen, Alveolarmakrophagen, anderer mononukleärer und metaplastischer Zellen, von Bedeutung ist.

Tabelle 18 und 19 (siehe Anhang) fassen die verschiedenen Expressionsmuster und die Intensität der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF-A, deren Rezeptor VEGFR-2 und PDGFR- α und die der Rezeptortyrosinkinase CD117 zusammen. Die Auswertung erfolgte für die Präparate von **POD 20** und von **POD 60**.

Native Lungen

Eine native Lunge bezeichnet den rechten Lungenflügel der Spender-Ratten. Diese standen unter keinem Medikamenten- oder Operationseinfluss und sind somit völlig unverändert. Aus diesem Grund können die nativen Lungenflügel der F344-Raten optimal zum Vergleich der abgestoßenen mit den unauffälligen Lungen herangezogen werden.

In den nativen Lungen zeigten sich sowohl die Liganden PDGF-A, VEGF-A, deren Rezeptoren PDGFR- α , VEGFR-2 und die Rezeptortyrosinkinase CD117 an **POD 20** und **POD 60**. Die Unterschiede in der Ausprägung der Intensität der einzelnen Zellen werden im Folgenden näher erläutert.

Die Bronchialepithelzellen wiesen an beiden Untersuchungszeitpunkten und in jeder Färbung, bis auf die VEGF-A-Färbung, eine starke Intensität auf.

An **POD 20** und **POD 60** konnte eine mäßige Färbung in den Typ II-Zellen, den Gefäßendothelzellen und in den Alveolarmakrophagen aufgezeigt werden. Die VEGFR-2-Färbung war mäßig in den Typ II-Zellen und im Gefäßendothel und schwach in den Typ I-Zellen und den Alveolarmakrophagen.

In den nativen Lungen war die PDGF-A-Färbung in den Typ II-Zellen, im Gefäßendothel und in den Alveolarmakrophagen mäßig. Eine starke Färbung zeigte sich dagegen beim Rezeptor PDGFR- α in den Typ II-Zellen, nur eine mäßige im Gefäßendothel.

Die CD117-Färbung war an **POD 60** in den Typ II-Zellen und in den Alveolarmakrophagen stark ausgeprägt, an **POD 20** dagegen nur mäßig. Die interstitiellen Zellen, das Gefäßendothel und die mononukleären Zellen waren schwach angefärbt.

Linke Lungen der Kontrollgruppe (unbehandelt)

Sowohl an **POD 20** als auch an **POD 60** wurden stark angefarbte Bronchialepithelzellen vorgefunden. Dieses Ergebnis zeigte sich bei allen Färbungen.

Typ I-Zellen zeigten sich am **POD 20** in der VEGF-A- und VEGFR-2-Färbung nur schwach gefärbt. In der VEGF-A-Färbung stieg die Intensität an **POD 60** in den Typ II-Zellen von mäßig auf stark und ebenso im Gefäßendothel. Das gleiche Bild, allerdings eine Veränderung von schwach zu mäßig, zeigte sich in der VEGFR-2-Färbung.

In den Alveolarmakrophagen zeigte sich eine mäßige an PDGF-A-Färbung an **POD 20**, welche sich an **POD 60** auf eine starke intensivierte. Die mononukleären Zellen, die in den Lungen der Kontrollgruppe zu sehen waren, färbten sich am ersten Untersuchungszeitpunkt schwach an. An **POD 60** steigerte sich dies auf eine starke Färbung. Bei allen anderen untersuchten Zellen wurde keine Änderung gefunden. Eine Steigerung der Intensität fand sich in der PDGFR- α -Färbung in den Typ II-Zellen von mäßig auf stark und in den mononukleären Zellen von schwach auf stark. Die Alveolarmakrophagen blieben mäßig angefarbt.

Als Auffälligkeit ist bei der CD117-Färbung zu der Reduktion der Intensität von stark auf mäßig in den Zellen des Gefäßendothels zu nennen. In den Alveolarmakrophagen zeigte sich dagegen ein Anstieg von mäßig auf stark beim Vergleich von **POD 20** zu **POD 60**. Die mononukleären Zellen wurden an **POD 20** in eine mäßige CD117-Färbung eingestuft, an **POD 60** in eine starke.

Linke Lungen der Studiengruppe (behandelt)

Die Bronchialepithelzellen färbten sich an **POD 20** in allen Färbungen stark an, bis auf die **PDGFR- α - und VEGF-A-Färbung**. Hier zeigte sich eine mäßige Anfärbung. Eine mäßige Intensität der Färbung war an **POD 60** bei CD117, PDGFR- α und bei VEGF-A, eine starke dagegen bei PDGF-A und VEGFR-2 zu sehen.

In der Studiengruppe dominierte an **POD 60** bei der VEGF-A-Färbung die schwache Anfärbung. Bei den Alveolarmakrophagen änderte sich zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten die Intensität von mäßig auf schwach. Auch an **POD 20** in der VEGFR-2-Färbung findet sich hauptsächlich eine schwache Anfärbung.

In den Alveolarmakrophagen und den metaplastischen Zellen stieg die Intensität von schwach auf mäßig.

In der Reihe der PDGF-A-Färbung wurden die Typ II-Zellen als mäßig gefärbt eingestuft, alle anderen untersuchten Zellarten als schwach. Die Typ II-Zellen färbten sich dann allerdings an

POD 60 wiederum auch nur schwach an. Ein ähnliches Bild ist auch bei der PDGFR- α -Färbung zu erkennen. Generell überwog an **POD 20** eine schwache Färbung. In der Gruppe der Typ II-Zellen reduzierte sich die Intensität von mäßig auf schwach.

An **POD 20** und an **POD 60** waren die interstitiellen Zellen, die Alveolarmakrophagen, die mononukleären Zellen und auch die metaplastischen Zellen in der CD117-Färbung schwach angefärbt. Die Typ II-Zellen und die Gefäßendothelzellen änderten die Intensität von mäßig auf schwach.

4 Diskussion und Stand der Arbeit

Obleich die Lungentransplantation eine wichtige Behandlungsoption für die fortgeschrittene irreversible Lungenerkrankung darstellt, ist die akute und chronische Abstoßungsreaktion ein großes Problem. Trotz Verbesserungen der Operationstechniken, der immunsuppressiven Therapie und dem angepassten postoperativen Medikamentenmanagement bleibt die CLAD (chronic lung allograft dysfunction) eine ernstzunehmende Komplikation nach der Transplantation und schränkt das Langzeitüberleben ein (Verleden, Sacreas, Vos, Vanaudenaerde, & Verleden, 2016b). BOS, eine obliterative Form der CLAD, beeinträchtigt 60% der Empfänger, welche fünf Jahre nach der Operation überleben (Al-Githmi et al., 2006). Momentan liegen keine durchgreifenden Behandlungsstrategien für diese fibroproliferative Erkrankung vor (Afshar, 2014; Bonner, 2004). Die derzeitigen Möglichkeiten bestehen in der Intensivierung und der Individualisierung der konventionellen immunsuppressiven Therapie bei transplantierten Patienten. Die Blutspiegel der Wirkstoffe werden regelmäßig kontrolliert, um die richtige Konzentration einzustellen und die Compliance der Patienten zu sichern. Allerdings ist die Erhöhung der Immunsuppression nur in der inflammatorischen Phase der akuten Abstoßung effektiv (Al-Githmi et al., 2006; Belperio, 2003). Während der anschließenden fibroproliferierenden Phase reagiert die BO, das histologische Korrelat des BOS, nicht mehr auf die gesteigerte Dosis der konventionellen immunsuppressiven Wirkstoffe. Dies ist die Begründung dafür, dass nach neuen Strategien der Prävention und der Behandlung geforscht werden sollte (Tikkanen et al., 2006). Alternativen zu klassischen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Tacrolimus oder Steroiden müssen gesucht werden (Koch, 2009). Vielversprechende Substanzen, um das Langzeitüberleben nach Lungentransplantation zu verbessern, könnten die Rezeptortyrosinkinasen Imatinib und Vatalanib in Kombination mit Proliferationssignal-Inhibitoren wie Everolimus sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Kombination der drei Stoffe Vatalanib, Imatinib und Everolimus auf die Entwicklung der CLAD im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe histologisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass die dreifache Kombination der Medikamente das Auftreten der Vaskulopathie, die Entwicklung der BO und die interstitielle Fibrose (RAS, restrictive allograft syndrome) signifikant reduziert. Hierfür wurde ein schwach allogenes, orthotopes Rattenlungentransplantationsmodell ausgewählt, bei welchem eine Lunge der Fischer-Ratten (F344) orthotop in Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) transplantiert wurde. Dieses Modell wurde zuvor mehrfach zur Untersuchung der akuten und chronischen Transplantatabstoßung von unserer Arbeitsgruppe gewählt (Suesskind-Schwendi et al., 2013a; Suesskind-Schwendi et al. 2012). Vorangehend wurden einige andere Versuchsmodelle

entworfen, die ebenfalls die chronische Abstoßung nach einer Lungentransplantation in einem Tiermodell analysieren sollten. Beispielsweise wurden Trachealringe, Hauptbronchien oder peripheres Lungengewebe einer Spendermaus heterotop in das subkutane Gewebe einer Empfängermaus implantiert (Hertz, Jessurun, King, Savik, & Murray, 1993). Dieser Versuch ist zwar einfach durchzuführen, da man, nicht wie bei einer orthotopen Lungentransplantation mikrochirurgisches Equipment benötigt. Allerdings zieht der Versuchsaufbau auch Nachteile mit sich. So beschreiben Jungraithmayr et al. im Jahr 2010 das Modell als nicht vergleichbar mit der klinischen Realität und als unphysiologisch. Die Trachealsegmente sind einer initialen Ischämie ausgesetzt, welche die mögliche Ursache einer folgenden Immunantwort sein könnte. Anschließend findet die Blutversorgung lediglich über Diffusion aus dem Gewebe statt. Des Weiteren fehlt die physiologische Atmung im Trachealspangenmodell, wodurch ein wichtiger Aspekt, nämlich der Kontakt des transplantierten Gewebes mit Luft aus der Umwelt, fehlt. Auch von der Unterscheidung zwischen großen und kleinen Atemwegen wird abgesehen, wobei gerade diese Differenzierung in der Lunge von entscheidender Bedeutung sein kann (Jungraithmayr et al., 2010b). Jedes Kompartiment in der Lunge beherbergt andere spezifische Zellen und reagiert so auch unterschiedlich während einer Transplantatabstoßung. Eine Untersuchung der vaskulären Abstoßung und der interstitiellen Fibrose ist nicht möglich, obwohl gerade diese ausschlaggebend für die Entwicklung der chronischen Transplantatabstoßung ist. Abgesehen davon unterscheidet sich die Anatomie von Bronchiolen stark von jener der Trachea. Der Knorpel fehlt und das Lumen ist kleiner. Zudem verfügt die heterotop transplantierte Trachea über keinerlei Luftfluss. Ähnliche Modelle, wie beispielsweise die direkte heterotope Implantation der Trachea in das Lungenparenchym der Empfängerratte (Sato et al., 2008) und das Trachealspangenmodell nach Tikkanen et al., weisen gleich geartete Schwachstellen auf. Tikkanen und Mitarbeiter verpflanzten syngene und allogene Trachealtransplantate der Ratte in das große Omentum des Empfängertiers. Sie untersuchten, inwiefern die Rezeptortyrosinkinasen Imatinib und Vatalanib die Transplantatabstoßung reduzieren oder verhindern können (Tikkanen et al., 2006).

Aufgrund der vielen Nachteile bezieht sich unsere Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, auf ein orthotopes, allogenes Lungentransplantationsmodell. Im Jahr 1995 wurde das Modell, welches hier beschrieben und untersucht wurde, von Matsumura etabliert. Dieser konnte zeigen, dass Transplantate der F344-Ratten auf WKY-Tiere nach einer anfänglichen akuten Abstoßungsreaktion in eine chronische Veränderung übergingen (Matsumura et al., 1995a). Das Modell der allogenen Transplantation bot sich an, da Möglichkeiten zur Verhinderung der chronischen Reaktion untersucht werden konnten. Matsumaras Arbeitsgruppe wählte ein

Rattenmodell, bei welchem nur eine schwache immungenetische Differenz in Bezug auf den MHC I-Komplex vorhanden war. Somit ähnelt diese Situation der Organtransplantation im Menschen (Hirt, 2003). Matsumara et al. untersuchten 1995 zwei Modelle ohne immunsuppressive Therapie: linke Lungen von F344-Spenderratte werden in WKY-Ratten (F344→WKY) transplantiert und umgekehrt (WKY→F344). Das WKY→F344-Modell entwickelte eine Toleranz nach einer kurzzeitigen Abstoßungsreaktion zum POD 21, so dass dieses Modell für die Untersuchung der chronischen Abstoßungsreaktion ungünstig erschien. Das Modell F344→WKY zeigte eine persistierende akute Reaktion, auf die eine chronische Abstoßungsreaktion mit einer peribronchialen Fibrose resultierte (Matsumura et al., 1995b). Auch Hirt verwendete bereits dieses Tiermodell in seinen Versuchen zur Transplantatabstoßung (Hirt et al., 1999b). Ein weiterer Vorteil des F344→WKY-Modells der orthotopen allogenen LTx ist, dass das Problem der Frühdiagnostik, beispielsweise eine Computertomographie des Thoraxes, umgangen werden kann. Die Abläufe können von Beginn an durch histologische Schnitte des gesamten Lungenparenchyms analysiert werden. Unser gewähltes Versuchsmodell weist auch die oben genannten Nachteile der verschiedenen Studien nicht auf und eignete sich somit für die Analyse des Verlaufs der akuten und chronischen Abstoßung nach einer Lungentransplantation (Suesskind-Schwendi et al., 2013a).

Trotz aller Vorteile des verwendeten Tiermodells wird darüber kontrovers diskutiert. Hirschburger et al. demonstrierten in ihrer Arbeit, dass das Rattenmodell F344→WKY ungeeignet für die Untersuchung einer BO ist, da sich die Bronchiolitis obliterans nicht in allen Transplantaten entwickelt (Hirschburger et al., 2007). Möglicherweise sind die verschiedenen Ergebnisse unterschiedlicher Studien ein Resultat ungleicher Umweltfaktoren oder genetischer Variationen der Rattenstämme bei verschiedenen Lieferanten (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Aus diesen Gründen hielten wir die Bedingungen in Haltung und Ernährung der Tiere in allen Studien unserer Arbeitsgruppe gleich. Außerdem wurden alle Ratten von dem gleichen Lieferanten bezogen und die Auswirkungen des herangezogenen Tiermodells wurden genau geprüft. Diese Vermutung deckt sich mit der früheren Untersuchung unserer Forschungsgruppe, welche zeigte, dass sowohl chronische als auch akute Abstoßung bei HW- im Vergleich zu CR-Tieren zeitverzögert auftreten. Hirt und Matsumara bezogen die Ratten von der Firma Harlan und Winkelmann (HW). Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit Rattenlungen der Firma Charles River (CR) transplantiert und untersucht (Suesskind-Schwendi et al., 2012).

Das schwach allogene linksseitige Rattentransplantationsmodell der Lunge wurde im Vorfeld mehrfach zur Untersuchung der akuten und chronischen Transplantatabstoßung von unserer

Arbeitsgruppe eingesetzt (Suesskind-Schwendi et al., 2012; Suesskind-Schwendi et al., 2013b; Suesskind-Schwendi et al., 2013a). Im Folgenden wird daher bei der Bewertung der Ergebnisse der Kontrollgruppe auf diese Vorarbeiten Bezug genommen.

An POD 20 entwickelten die unbehandelten Tiere der Kontrollgruppe eine starke akute Abstoßungsreaktion der Bronchiolen und auch der Gefäße. Dazu kam, dass gleichzeitig eine einsetzende chronische Veränderung der Bronchiolen mit einer begleitenden Vaskulopathie beobachtet wurden. Für die aktuelle Studie wählten wir POD 20 zur Untersuchung der akuten Abstoßungsreaktion und den POD 60 zur Analyse der chronischen Reaktion als Entnahmezeitpunkt der Lungen. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde mit dem gleichen Tiermodell gearbeitet und die Präparate von verschiedenen Entnahmetagen (POD 5, 9, 14, 20, 30, 40, 60, 100) nach dem ISHLT-Schema bewertet (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Es zeigte sich, dass erst an POD 20 eine vollständige, schwere akute Reaktion mit einer starken Infiltration von mononukleären Zellen in Bronchiolen, Gefäßen und im Interstitium ausgebildet wurde. Eine schwere chronische Reaktion mit peribronchiolärer und perivaskulärer Fibrose konnte ab dem POD 60 beobachtet werden. Bis zu POD 100 fand eine komplette Vernarbung statt, so dass keine Eingruppierung mehr vorgenommen werden konnte (Suesskind-Schwendi et al. 2012). An POD 60 war in der Kontrollgruppe unserer Studie durchgehend eine BO mit parallel starker Vaskulopathie und interstitielle Fibrose zu verzeichnen. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Suesskind et al. (2012) überein (Suesskind-Schwendi et al., 2012). Aus diesen Ergebnissen resultierte die Entscheidung für die Lungenentnahme am 20. und 60. postoperativen Tag.

Im Jahr 1999 erzielten Hirt et al. ähnliche Ergebnisse unter Verwendung desselben Versuchsmodells. Er untersuchte die akute und chronische Transplantatabstoßung an POD 5, 15, 30, 60 und 100 konnte dabei jedoch erst an POD 30 eine einsetzende chronische Veränderung beobachten (Hirt et al., 1999a). Auch Matsumura (1995) konnte erst am POD 35 chronische Reaktionen feststellen (Matsumura et al., 1995b). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Rattenstämme stimmen die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit auch mit Matsumura (1995) und Hirt (1999) überein, welche an POD 70 bzw. POD 60 chronische Veränderungen beobachteten (Hirt et al., 1999a; Matsumura et al., 1995b).

Wie bereits oben beschrieben, wurde das Tiermodell kontrovers diskutiert (Hirschburger et al., 2007; Jungrathmayr, Kayser, Haberstroh, Weder, & Korom, 2010a). Bei Hirt (1999) und Matsumura (1995) wurden spätere Zeitpunkte der Höhepunkte der akuten und chronischen Abstoßung ermittelt (Hirt et al., 1999a; Matsumura et al., 1995b). Da mit denselben Rattenstamm-

Kombinationen einer Firma und denselben Sublinien gearbeitet wurde, wurde auch in allen Studien unserer Arbeitsgruppe auf Reproduzierbarkeit geachtet und gleichbleibend POD 20 und POD 60 als Untersuchungszeitpunkt gewählt.

Im Jahre 1990 wurde eine international gültige einheitliche Klassifikation zur Beurteilung der Abstoßungsreaktion nach einer Lungentransplantation herausgebracht. Diese wurde von Yousem et al. 1996 modifiziert und 1999 als ISHLT-Klassifikation veröffentlicht (Yousem et al., 1996). Anschließend beriefen sich Hirt et al. auf diese Einteilung. Hier erfolgte die Beurteilung der akuten und chronischen Abstoßung durch die Gegenüberstellung der akut vaskulären (A) und bronchialen Abstoßung (B) sowie chronisch vaskuläre (D) und bronchiale Abstoßung (C) (Hirt et al., 1999b; Hirt, 2003). Im Jahre 2007 wurde dieses System erneut überarbeitet und ein aktuelles histologisches Beurteilungsschema erstellt (Stewart et al., 2007). Im Vergleich zur Klassifikation von 1999 wird bei chronischer Abstoßung nur zwischen dem Nichtvorhanden- und Vorhandensein einer BO (C0 oder C1) oder vaskulären Sklerose (D0 oder D1) unterschieden. Bei der bronchialen akuten Reaktion erfolgt die Einteilung in B0 (keine Reaktion), B1R (low grad BO) und B2R (high grade BO) sowie BX (nicht auswertbar), wobei das R für die Überarbeitung der Version von 1996 steht (Stewart et al., 2007). Die neueste ISHLT-Klassifikation ist in den Tabellen 8-11 (siehe Anhang) näher erläutert. In dieser Arbeit wurde auf das Beurteilungsschema von Stewart et al. aus dem Jahr 2007 zurückgegriffen, da dieses auch Anwendung in den vorausgegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe fand. Somit kann ein guter Vergleich zu bisherigen und zukünftigen Versuchen hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Anwendung des ISHLT-Bewertungsschemas gezeigt werden, dass der Einsatz von den Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren Vatalanib, Imatinib und dem mTOR-Inhibitor Everolimus das Auftreten einer chronischen Abstoßungsreaktion signifikant reduziert hat. Sowohl bei der vaskulären Sklerose (D2, siehe Abschnitt 2: Material und Methoden) als auch bei der Bronchiolitis obliterans (C2) konnte man einen deutlichen Rückgang erkennen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden mit der Kombination aus Imatinib und Everolimus (Suesskind-Schwendi et al., 2013a) und aus Imatinib und Vatalanib bereits ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Da die alleinige Gabe von Vatalanib der Entwicklung einer BO deutlich entgegenwirkt (Keil et al., 2019) und die ausschließliche Verabreichung Gabe von Imatinib eine signifikante Reduktion schwerer chronischer Abstoßung der Bronchiolen erreicht (Suesskind- Schwendi et al., 2013a), deutet dies auf eine ähnliche Wirkungsweise hin. So konnte die kombinierte Gabe von Vatalanib und Imatinib durch einen synergistischen Effekt die chronische Veränderung der Bronchiolen in allen drei Abstoßungsgraden signifikant

reduzieren (Keil et al., 2019). Durch die Zugabe des mTOR-Inhibitors Everolimus ließ sich diese Wirkung nochmals verstärken. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Tikkanen et al. (2006), indem sie zeigten, dass die duale Gabe von Imatinib und Vatalanib im Trachealmodell die Entwicklung einer obliterativen Atemwegserkrankung komplett verhindert, während die alleinige Gabe nur abschwächt (Tikkanen et al., 2006). Sowohl in der Versuchsreihe mit Imatinib und Vatalanib (Keil et al., 2019), als auch in der vorliegenden Arbeit blieb die Entwicklung der BO nicht komplett aus, wurde allerdings signifikant reduziert.

Bei der Untersuchung der Vaskulopathie konnte eine signifikante Reduktion erzielt werden. So war der Anteil der Gefäße, die frei waren von chronischen Veränderungen, bereits an POD 20 deutlich höher als in der Kontrollgruppe (D0: 61,12% ± 33,71% gegenüber D0: 22,13% ± 10,69%) und eine starke Abstoßung konnte nicht festgestellt werden. An POD 60 war der Anteil der Gefäße, die komplett chronisch verändert waren, deutlich geringer als die der Kontrollgruppe (D2: 8,27% ± 10,30% gegenüber D2: 98,43% ± 4,40%). In Vorarbeiten erzielte hier Vatalanib alleine eine stärkere Wirkung als Imatinib (Keil et al., 2019; Suesskind-Schwendi et al., 2013a). Folglich ermöglichte die Monotherapie mit Imatinib eine Reduktion chronisch abgestoßener Bronchiolen, während Vatalanib die chronische Abstoßung der Gefäße vermindert. So liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Stoffe teils über dieselben Mechanismen, teils über unterschiedliche Wege einer CLAD entgegenwirken. Dieser Synergismus könnte die verstärkte Wirkung der kombinierten Verabreichung beider Medikamente erklären.

In einer weiteren Versuchsreihe von Suesskind et al. (2013) zeigte sich, dass die ausschließliche Gabe von Everolimus am Zenit der akuten Abstoßung keinen Einfluss auf den Verlauf der chronischen Abstoßung nimmt (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). Hausen et al. (1999) kamen zu dem Ergebnis, dass die Monotherapie mit Everolimus eine akute Reaktion nach einer einseitigen Lungentransplantation im allogenen Rattenmodell nicht verhindert. Lediglich die Applikation des mTOR-Inhibitors unmittelbar nach der Lungentransplantation konnte das Fortschreiten der BO und der vaskulären Sklerose inhibieren (Suesskind-Schwendi et al. 2012). In unserer Studie wurde daher der positive Effekt der Kombination der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren zusammen mit der Gabe eines mTOR-Inhibitors erforscht.

In unserer Versuchsreihe erfolgte die Medikamentenapplikation der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren an POD 0, das heißt am Tag der Operation. Die Entstehung der Bronchiolitis obliterans kann in zwei Phasen unterteilt werden: Eine frühe inflammatorische und eine späte fibroproliferative Phase. Tikkanen und Mitarbeiter untersuchten die Bedeutung des Zeitpunkts der

Applikation von Tyrosinkinaseinhibitoren und beobachteten einen positiven Effekt bei einer frühen Medikamentengabe (Tikkanen et al., 2006).

Der antiinflammatorische Effekt von Everolimus auf die initiale akute Phase wurde in einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Wirksamkeit von Everolimus von dem Grad der akuten Reaktion abhängig ist. Die früh beginnende Behandlung reduziert das Fortschreiten der akuten vaskulären und bronchialen Reaktion (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). Der mTOR-Inhibitor Everolimus wurde in der vorliegenden Studie an POD 7 verabreicht, das heißt zum Zeitpunkt der beginnenden akuten Abstoßung. Everolimus wurde zu diesem späteren Zeitpunkt, nicht vor oder zum Zeitpunkt der Operation, appliziert, um Nebenwirkungen wie Wundheilungsstörung oder starken Gewichtsverlust einzuschränken. Die klinische Situation nach der Operation sollte nicht negativ beeinflusst werden, um die Rekonvaleszenz der Versuchstiere nicht zu verzögern.

RAS (restrictive allograft rejection syndrome) als eine Entität der CLAD ist sowohl durch eine periphere Lungenfibrose als auch durch einen alveolären Schaden gekennzeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der chronischen Transplantatabstoßung (Sato et al., 2011; Verleden et al., 2015a). Um die Entwicklung und Therapieoptionen zu untersuchen, ist ein Tiermodell wichtig, welches sowohl eine BO als auch das RAS aufweist. In bisherigen Arbeiten unserer Forschungsgruppe zeigte das herangezogene Rattenmodell mit einer linken Lungentransplantation von F344- auf WKY-Ratten histologische Kennzeichen von BO und RAS (Suesskind-Schwendi et al., 2017). Für die pathologischen Veränderungen der RAS gibt es kein Klassifikationssystem, daher haben wir uns für die Einteilung der klassischen Lungenfibrose entschieden. Der Goldstandard für die Diagnose und Einteilung der Lungenfibrose ist die histopathologische Untersuchung. Mittels der modifizierten Gradeinteilung nach Hubner (Ashcroft-Scala) wurde jedes Lungenpräparat der Ratte herangezogen und in Kategorie 0-8 eingeordnet (Hubner et al., 2008).

In der Kontrollgruppe zeigte sich bereits an POD 20 eine interstitielle Bindegewebsvermehrung. An POD 60 waren die meisten Präparate komplett fibrotisch. Matsumura et al. (1995) konnten in ihrer Versuchsreihe ebenfalls eine zunehmende Fibrosierung feststellen. Allerdings waren hier auch an Tag 98 die Lungen noch nicht komplett fibrotisch. Eventuell können diese Unterschiede durch die Anwendung einer anderen Skala begründet sein. Im Gegensatz zur Ashcroft-Skala maß er die interstitielle Fibrose in Prozenten der betroffenen Lunge (Matsumura et al., 1995b). Hirt (1999) teilte die interstitielle Fibrose nicht ein, beobachtete sie aber dennoch in der Kontrollgruppe (Hirt et al., 1999a).

Die interstitielle und periphere Fibrose konnte in unserem Versuchsmodell unter Anwendung des Klassifikationssystems an POD 20 und an POD 60 signifikant reduziert werden. In der Studiengruppe war an POD 60 keine Lunge von einer kompletten Fibrose betroffen im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Auch Tikkanen et al. (2006) stellten einen ähnlichen Effekt dar. Die kombinierte Gabe von Imatinib und Vatalanib im Modell der heterotopen Trachealtransplantation verhinderte den fibroproliferativen Verschluss des Lumens nahezu komplett (Tikkanen et al., 2006). Auch wenn es sich hierbei nicht um eine interstitielle Fibrose der Lunge handelt, stellt sich jedoch ebenfalls der antifibrotische Effekt von Imatinib und Vatalanib dar.

Infolgedessen bestätigte sich, dass die Rezeptortyrosinkinasen und der mTOR-Inhibitor Everolimus im verwendeten linkseitigen Rattenlungentransplantationsmodell nicht nur die Entwicklung der CLAD in unseren Ratten, sondern auch RAS und dessen histologische Manifestation vorbeugen kann. Somit konnte ein Lösungsansatz für beide Aspekte der CLAD entwickelt werden.

Zwar konnte das chronische Abstoßungsgeschehen in Form einer chronic lung allograft dysfunction (CLAD) in unseren Versuchen mit Rezeptortyrosinkinasen und einem mTOR-Inhibitor deutlich herabgesetzt, allerdings die Entwicklung chronischer Veränderungen nicht vollständig verhindert werden. Viele Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer akuten Abstoßungsreaktion und der Entstehung einer BO, einer chronischen Reaktion (Nakajima et al., 2011). Aus dem histologischen Verlauf unserer Versuchsgruppen kann diese vorbekannte These ebenfalls belegt werden (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Somit stellt sich die Frage, welche Risikofaktoren bei der Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion eine Rolle spielen könnten. Kann eine Reduktion dieser Gegebenheiten die Wirkung der dreifachen medikamentösen Therapie noch verbessern?

Nakajima et al. sehen in der akuten perivaskulären Reaktion, der lymphozytären Bronchiolitis und der Infektion der Atemwege, die stärksten Risikofaktoren für das BOS (Nakajima et al., 2011). Die akute Reaktion ist gekennzeichnet durch perivaskuläre monozytäre Infiltrate und durch die lymphozytäre Bronchiolitis (Husain & Garrity, 2016). Während der akuten Reaktion sind die Bronchiolen von aktivierten Lymphozyten umgeben. Die Infiltration von Lymphozyten ist eine Vorstufe des fibrösen Umbaus der Atemwege. Somit kann die lymphozytäre Bronchiolitis als ein Hauptrisikofaktor der BO und somit der CLAD bezeichnet werden (Glanville et al., 2012). Estenne et al. (2002) wiesen ebenfalls auf die akute perivaskuläre Reaktion und die lymphozytäre Bronchiolitis als signifikante Risikofaktoren hin (Estenne & Hertz, 2002).

Diese alloimmun-abhängigen Faktoren stehen den alloimmun-unabhängigen Faktoren gegenüber (siehe Abbildung 56). Die Transplantatdysfunktion, die bakterielle, virale oder fungale Infektion, der gastroösophageale Reflux und eine lange Ischämiezeit des Transplantats gehören einer Gruppe der Risikofaktoren an, welche antigenunabhängig sind. Ein alloimmun-unabhängiger Faktor ist eine allgemeine Infektion mit Krankheitserregern. Die bakterielle bronchopulmonale Infektion ist die häufigste Komplikation nach einer Lungentransplantation beim Menschen. Der bakterielle Erreger *Pseudomonas aeruginosa* wird in 39,4% der Fälle nach einer Transplantation gefunden (Nakajima et al., 2011). Vos et al. (2008) zeigen in einer Studie auf, dass eine Atemwegskolonisation mit diesem Bakterium in Zusammenhang mit dem Anstieg der Prävalenz von BOS steht und somit als Risikofaktor bezeichnet werden kann (Vos et al., 2008). Dagegen hält die Studie von Estenne et al. (2002) eine bakterielle Infektion nach einer Lungentransplantation für nicht direkt beitragend zur Entwicklung einer BO. Im Gegensatz dazu korreliert eine mit dem Cytomegalievirus (CMV) verbundene Pneumonie mit der Entstehung einer BO (Estenne & Hertz, 2002).

Hieraus lässt sich folgern, dass eine genaue Bestimmung und Einschätzung von Risikofaktoren als schwierig gilt und man in den diagnostischen Möglichkeiten eingeschränkt ist. Mit dieser Arbeit lässt sich die These vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe sowie anderer Arbeiten bestätigen, dass die akute Abstoßung ein Risikofaktor für die Entwicklung der chronischen Abstoßung sein kann. Es sollte daher nach neuen Wegen gesucht werden, die die akute Reaktion als alloimmun-abhängiger Risikofaktor einschränken können.

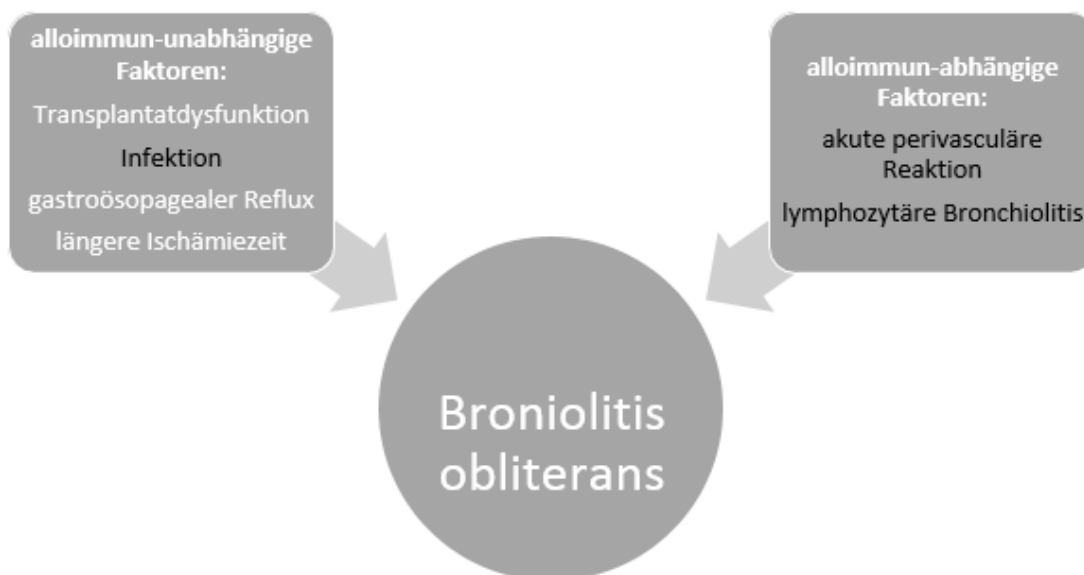


Abbildung 56: Darstellung der Risikofaktoren für die Entstehung der Bronchiolitis obliterans

Quelle: modifiziert nach Estenne & Hertz, 2002; Glanville et al., 2012; Knoop & Estenne, 2006; Nakajima et al., 2011.

Jedes Arzneimittel, welches auf einen Organismus wirkt, kann jedoch unerwünschte Wirkungen mit sich bringen. Die Gabe der Medikamente Everolimus, Imatinib und Vatalanib ist auch mit Nebenwirkungen verbunden, auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll. In der randomisierten doppelblinden multizentrischen Studie von Kovarik et al. aus dem Jahr 2006 wird von einem häufigen Auftreten einer Hyperlipidämie (Triglyzeridämie, Cholesterinämie) im Zusammenhang mit Everolimus bei den untersuchten Patienten berichtet (Kovarik et al., 2006). Des Weiteren wird von einer Verbindung zwischen Everolimus und einer Stomatitis, peripheren Ödemen, Diarrhoe und Appetitverlust im Vergleich zu einer Placebo- Gruppe der Patienten berichtet (Fazio et al., 2018). Everolimus kann auch Wundheilungsstörungen bei Studienteilnehmern nach einer Herztransplantation verursachen (Dandel, Lehmkuhl, Knosalla, & Hetzer, 2010). Ein Bezug besteht auch zwischen Everolimus und einer Leukozytopenie, Thrombozytopenie und einer Anämie (Pablo et al., 2013). Keine dieser Nebenwirkungen wurden bei uns im Rattenmodell beobachtet.

Im vorliegenden Tierversuch wurde eine deutliche Gewichtsreduktion bei der Studiengruppe, den Tieren wurden die Medikamente appliziert, festgestellt. Dieses Phänomen tauchte auch in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe auf (Suesskind-Schwendi et al. 2012). Es bestätigt sich ein deutlicher Gewichtsverlust, der eventuell auf die Everolimusgabe zurückzuführen ist (Suesskind-Schwendi et al., 2013b). In unserer Versuchsgruppe nahm das Gewicht der Tiere ab POD 7 und somit bei Beginn der Applikation von Everolimus ab. Die Ratten erholten sich langsam und das Gewicht stieg wieder an. Allerdings erreichte keines der Tiere das Ausgangsgewicht, dennoch zeigten die Tiere keine Störung in ihrem Allgemeinbefinden. Futter- und Wasseraufnahme waren normal und auch andere Anzeichen, die mit einer Störung des Allgemeinbefindens einhergehen, waren nicht zu verzeichnen. Auch in der Arbeit von Deblon et al. aus dem Jahr 2012 wurde bei einer Dauertherapie mit Everolimus im Rattenmodell ein Gewichtsverlust beobachtet. Dazu kamen eine Glucoseintoleranz, Hyperinsulinämie und eine Hyperglykämie bei den Tieren. Sie stellten einen Appetitverlust mit verminderter Nahrungsaufnahme fest (Deblon et al., 2012). Dies konnten wir allerdings bei unseren Tieren nicht beobachten. Wegen des Gewichtsverlustes wurde Everolimus erst ab POD 7 verabreicht und nicht schon zu einem früheren Zeitpunkt. Zwar zeigten vorangegangene Versuchsreihen keinen unterschiedlichen Effekt bei einem Applikationszeitpunkt POD 7-60 oder bei POD 7-100. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Gabe des mTOR-Inhibitors ab dem Zeitpunkt POD 0 zu einer Hemmung der chronischen Transplantatabstoßung führte (Suesskind-Schwendi et al. 2012).

Diese Ergebnisse führen vor Augen, welcher bedeutende Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Everolimusgabe und der Entwicklung einer BOS besteht.

Auch wenn Tyrosinkinaseinhibitoren sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien als gut verträglich gelten (Scott et al., 2007; Wood et al., 2000), können sowohl Vatalanib als auch Imatinib Übelkeit und Diarrhoe in Studien am Patienten verursachen (Joensuu et al., 2011). Eine mögliche Ursache des Gewichtsverlustes der Ratten in unserem Versuch wäre daher die Kombination dieser eingesetzten Medikamente nach der Langzeitapplikation. In einer Fünf-Jahres-Follow-up-Studie zum Einsatz von Imatinib bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurden die Nebenwirkungen des Medikaments statistisch ausgewertet. Die am häufigsten beobachteten Probleme waren periphere und periorbitale Ödeme. Auch über Muskelkrämpfe, Übelkeit und Diarrhoe, Hauteffloreszenzen und andere dermatologische Probleme, Müdigkeit und Kopfschmerzen wurde berichtet (Druker et al., 2006). Eine Myelosuppression mit Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie ist ebenso eine ernstzunehmende nachteilige Wirkung von Imatinib (Rea, 2015). In nicht veröffentlichten Daten über Stichproben von Blutuntersuchungen zum Zeitpunkt der Organentnahme konnten keine dieser Blutveränderungen beobachtet werden.

Da Vatalanib die Angiogenese hemmt, besteht Grund zur Annahme, dass die Wundheilung negativ beeinflusst werden könnte. Wood et al. (2000) widerlegten diese Theorie, indem sie Wundmaterial der Ratten entnahmen und untersuchten (Wood et al., 2000). Als unerwünschte Komplikation litten vier unserer Versuchsratten postoperativ an kleineren Abszessen. Diese mussten bei wenigen Tieren unter Narkose ausgeräumt werden. Um den Zustand zu verbessern, wurden die Wunden eröffnet, mit jodhaltiger Lösung gespült und wieder verschlossen. Keiner der Versuchsabläufe musste unterbrochen werden und die Lungen konnten am geplanten Tag entnommen werden. Der Prozess der Wundheilung beginnt mit der Inflammation und Hämostase. Ein komplexer Prozess aus Zellproliferation und einer Fibroblasten-vermittelten Kollagenbildung folgt im Anschluss. Immunsuppressiva, die in eine der Phasen eingreifen, können die Heilung beeinträchtigen. Everolimus kann die Fibrosierung, ein Schlüsselement der Wundheilung, einschränken (Nashan & Citterio, 2012). Die Wirkung der eingesetzten Medikamente in unserem Versuchsmodell kann somit der Grund für die Zeichen der Wundheilungsstörung sein. Aber auch andere Faktoren beeinflussen die Heilung postoperativ. Hämatome, Serome, Wundinfektionen oder Gewebsnekrosen als intrinsische Faktoren (siehe Tabelle 7), die die Wundheilung beeinflussen, seien hier genannt (Berger & Hierner, 2003). Für zukünftige Studien könnte man an eine Reduktion der Medikamentendosierungen denken, um Wundheilungsstörungen und einen erheblichen Gewichtsverlust zu vermeiden (Fine & Kushwaha, 2016).

Tabelle 7: Ursachen der Wundheilungsstörung unter klinischen Bedingungen

extrinsisch		intrinsisch
Tumorerkrankungen Infektionen Diabetes mellitus Medikamente Immundefekte Adipositas Hohes Lebensalter	Ursachen der Wundheilungsstörung	Hämatome Serome Fremdkörper Wundinfektion Gewebenekrosen Sauerstoffmangel

Quelle: modifiziert nach Berger & Hierner, 2003

Da, wie bereits oben beschrieben, die akute Reaktion ein nachgewiesener Risikofaktor der BO ist, gilt zu klären, durch welche Wirkung genau Imatinib und Vatalanib die fibroproliferativen Ereignisse hemmen. Der Entwicklung einer BO liegt vermutlich eine Entzündung von Epithel und subepithelialen Strukturen der kleinen Luftwegen zugrunde. Hier schließt sich eine überschießende Proliferation mesenchymaler Zellen und eine sich daraus ergebende Kollagenablagerung an. Dieser inadäquaten Reaktion auf eine Gewebsverletzung folgt eine massive Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Bonner, 2004; Knoop & Estenne, 2006; Krebs et al., 2006). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF in der Entstehung der CLAD eine Rolle spielen. VEGF scheint die luminale Okklusion von Bronchiolen und Gefäßen zu steigern, indem die Produktion von Wachstumsfaktoren und so die inflammatorische Reaktion forciert wird (Krebs et al., 2006). PDGF spielt als Mitogen der Zellen der glatten Muskulatur eine Rolle in der Entstehung einer Atemwegsobliteration (Kallio et al., 1999). Eine erhöhte Konzentration von PDGF stellte sich in der Bronchiolavage von Patienten mit BO dar (Hertz et al., 1992).

C-Kit ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, unter anderem in Mastzellen. Sein Ligand, auch bekannt als Stammzellfaktor (SCF) oder Mastzell-Wachstumsfaktor, wird vor allem von Fibroblasten und Mastzellen sezerniert, aktiviert in den Zielzellen Transkriptionsfaktoren und reguliert damit die Apoptose, Chemotaxis und Zelldifferenzierung und -proliferation (Miettinen & Lasota, 2005). Die Anwesenheit von c-Kit (CD 117) positiven Mastzellen in der Bronchiolitis obliterans und die Konsequenz, dass c-Kit- Inhibitoren einen Vorteil in der Therapie der chronischen Fibrose bringen, wurde schon von Fuehrer et al. beschrieben (Fuehrer, Marchevsky, & Jagirdar, 2009). Ding et al. bewiesen im Jahr 2013, dass

der Signalweg von c-Kit in fibrotisch veränderten Mäuselungen aktiviert wird und somit relevant für Lungenfibrose ist (Ding et al., 2013).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen auf Proteinebene vorgenommen. Lungenpräparate mit immunhistochemische Färbungen von den Wachstumsfaktoren c-Kit, PDGF-A und VEGF-A, als auch von Rezeptoren PDGFR- α und VEGF-2 wurden hergestellt. In den Studien der Immunhistologie ergab sich, dass an POD 60 die Anzahl der Rezeptoren VEGFR-2 und PDGFR- α in der Studiengruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant abnahm. Auch der Ligand PDGF-A zeigte eine signifikante Reduktion. Beim Vergleich der Untersuchungszeiträume in der Studiengruppe zeigte sich ebenfalls ein kennzeichnender Rückgang bei den Liganden VEGF-A und PDGF-A von POD 20 zu POD 60. Eine signifikante Reduktion an POD 20 von VEGFR-2 und VEGF-A stellte sich zwischen der nicht- transplantierten rechten und der linken Lunge ein. PDGF-A konnte in den Allografts zwar stärker nachgewiesen werden, allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

Die Untersuchungen zur Intensität der immunhistologischen Färbungen in verschiedenen Zelltypen präsentierten eine eindeutige Tendenz der Abnahme bei der Gegenüberstellung der unbehandelten Kontrollgruppe und der behandelten Studiengruppe. Die immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF-A und deren Rezeptoren VEGFR-2 und PDGFR- α und die Rezeptortyrosinkinase c-Kit wurde in den verschiedenen Zellen der Lunge an POD 20 und POD 60 bewertet. Hierzu wurden die Bronchiepithelzellen, Typ-I und Typ-II-Zellen, interstitielle Zellen, Gefäßendothelzellen, Alveolarmakrophagen, andere mononukleäre und metaplastische Zellen herangezogen.

Im Gegensatz zu unserer Annahme zeigte die immunhistologische Analyse keinen überzeugenden Unterschied in der Expression von PDGF-A, PDGFR- α , VEGF-A, VEGFR-2 und c-Kit zwischen den Transplantaten der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Nur eine Tendenz war zu beobachten, so dass eine generell niedrigere Expression von Rezeptoren und Liganden in der Versuchsgruppe festzustellen war. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Tikkanen et al. und Nykänen et al. im Jahr 2006 und 2005, welche keine Wirksamkeit von Imatinib und Vatalanib bei der Expression von VEGF-A und PDGF-A beobachten konnten (Nykänen et al., 2005; Nykänen et al., 2005; Tikkanen et al., 2006). Somit kann gemutmaßt werden, dass PDGF in diesem Tiermodell für die Entwicklung der Fibrose nur eine untergeordnete Rolle spielt. Möglich wäre, dass die Wachstumsfaktoren in Ratten eine andere Rolle spielen als im menschlichen Organismus. Nach Bonner (2004) zum Beispiel, unterliegt PDGFR- α im Menschen einer anderen Regulation (Bonner, 2004).

Es könnten auch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine eine größere Rolle spielen. In einer weiteren Arbeit unserer Forschungsgruppe wurde die Wirkung von Nintedanib unter Verwendung des gleichen Transplantationsmodells untersucht (Suesskind-Schwendi et al., 2017). Nintedanib ist ebenso wie Imatinib und Vatalanib ein RTKI und hemmt alle drei VEGF- Rezeptoren sowie PDGF-A, PDGFR-B und den FGF-Rezeptor (fibroblast growth factor) (Roth et al., 2015). Dabei zeigte sich keine Reduktion des fibrotischen Umbaus im Vergleich zu den Kontrolltieren. Trotz alledem konnte die Kombination von Imatinib, Vatalanib und Everolimus eine signifikante Wirkung in der Prävention von chronischer Transplantatabstoßung aufweisen. Wie kann dieser Effekt erklärt werden?

Wie bereits bekannt, hemmen die Rezeptortyrosinkinasen nicht nur PDGF-R und VEGF-R, sondern auch andere Rezeptoren. So blockt Imatinib auch die Tyrosinkinaseaktivität von c-Kit und c-Fms (Buchdunger et al., 2002; Dewar, Zannettino, Hughes, & Lyons, 2005). Vatalanib hemmt ebenfalls c-Fms, ein Rezeptor für die Makrophagenstimulation (Wood et al., 2000). Wahrscheinlich führt dieser nicht zu einem fibrotischen Prozess. Jedoch kommt ihm eine Bedeutung bei der Entwicklung von Monozyten und Gewebsmakrophagen zu (Dewar et al., 2005). Diese Funktion könnte bei der Transplantatabstoßung eine Rolle spielen, da Makrophagen hierbei wesentlich beteiligt sind (Neuringer et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen Makrophagen und der fibrotischen Veränderungen bei einer Transplantatabstoßung muss noch weiter geklärt werden.

Unser Versuchsmodell erlaubt es, die Therapieoptionen für interstitielle Lungenfibrose und die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation zu untersuchen (Hirt et al., 1999a; Suesskind-Schwendi et al. 2012). Im Hinblick auf die Sicherheit sind sowohl Vatalanib als auch Imatinib gut tolerierte Arzneimittel (Joensuu et al., 2011). Dazu kommt, dass Everolimus in klinischen Studien in der Kombination mit Cyclosporin als Therapie nach Lungentransplantationen erfolgreich eingesetzt wurde (Glanville et al., 2015; Snell et al., 2006), wohingegen Daten für ein Cyclosporin-freies-Medikamentenregime fehlen (Ivulich, Westall, Dooley, & Snell, 2018). Unsere Studie stellt einen neuen Ansatz für eine mögliche Kombinationstherapie dar, welche aus Everolimus und Rezeptortyrosinkinasen besteht. Das bietet zusätzliche Möglichkeiten zur Behandlung der CLAD.

Zusammenfassend kann belegt werden, dass die dreifache Therapie mit Imatinib, Vatalanib und Everolimus nicht nur die chronische vaskuläre und bronchiale Reaktion, sondern auch die interstitielle Fibrose nach einer Lungentransplantation signifikant reduzieren kann. Folglich ist mit einer überzeugenden Wirkung zu rechnen. Die Kombination aus einem mTOR-Inhibitor

und Rezeptortyrosinkinasen könnte eine mögliche Strategie in der Prävention von CLAD und der chronischen Lungentransplantatreaktion sein. Trotz allem muss berücksichtigt werden, dass im Tiermodell möglicherweise andere Faktoren zur Entstehung einer BO beitragen als im Patienten. Die anhaltende Infiltration von Entzündungszellen bis hin ins chronische Stadium weicht von der Präsentation beim Patienten ab (Suesskind-Schwendi et al., 2013b), womit die Übertragbarkeit auf die Klinik möglicherweise eingeschränkt ist. Allerdings kommt das für die vorliegende Arbeit verwendete Modell der klinischen Situation sehr nahe und stellt ein reproduzierbares Instrument zur Untersuchung der Entwicklung der CLAD dar (Suesskind-Schwendi et al., 2012). Schlussendlich kann unser Rattentransplantationsmodell dazu beitragen, Behandlungsoptionen für CLAD und RAS als eine neue Form der CLAD zu verstehen und zu finden. Als nächster Schritt könnte daher eine klinische Studie zur Wirksamkeit der Kombination von Imatinib, Vatalanib und Everolimus auf die Entwicklung der CLAD beim Menschen angeregt werden.

5 Ausblick

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der kombinierte Einsatz von Imatinib, Vatalanib und Everolimus sowohl die BO als auch die interstitielle Fibrose und die chronische Gefäßabstoßung im schwach allogenen orthotopen Lungentransplantationsmodell in der Ratte signifikant reduzieren kann. Allerdings konnten weder die akute noch die chronische Reaktion verhindert werden.

Weiterhin treten verschiedene Fragen auf: Wie kann der Versuchsaufbau verbessert werden, um die CLAD, interstitielle Fibrose und Vaskulopathie komplett zu verhindern? Kann der Erfolg im Tiermodell auch auf Patienten übertragen werden?

In welchem Maß sich diese Ergebnisse auf die klinische Situation übertragen lassen, kann nicht beantwortet werden. Schließlich sollte die gezeigte vielversprechende Wirkung der RTKIs und des mTOR-Inhibitors in einer klinischen Studie getestet werden, um herauszufinden, ob die Kombinationstherapie beim Menschen nach einer Lungentransplantation dieselbe erfolgsversprechende Wirkung zeigt, wie im Tiermodell und um etwaige Nebenwirkungen abzuschätzen. Da Everolimus in Kombination mit Cyclosporin bereits erfolgreich in klinischen Studien zur Therapie nach einer Lungentransplantation eingesetzt wurde (Glanville et al., 2015), zeigen unsere Studienergebnisse neue Möglichkeiten auf, um die Nebenwirkungen bisher etablierter Immunsuppressiva zu vermeiden und die akute und chronische Abstoßung einzuschränken.

6 Zusammenfassung

Chronic allograft dysfunction (CLAD) bleibt weiterhin ein bedeutender Rückschritt im Ergebnis nach einer Lungentransplantation (LTx). Hauptursache für die hohe Mortalitätsrate nach LTx ist die Ausbildung der chronischen Abstoßung in Form einer Bronchiolitis obliterans (BO) restrictives Allograftsyndrom (RAS) und Vaskulopathie, deren Intensität von dem Schweregrad und der Häufigkeit der vorausgegangenen akuten Abstoßung abhängig ist. Neue Therapieoptionen sind gefordert. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie der platelet-derived growth factor-receptor (PDGFR) und vascular endothelial growth factor-receptor (VEGFR), könnten eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der CLAD spielen. In dieser Studie verwendeten wir ein schwach allogen orthotopes linksseitiges Transplantationsmodell der Lunge von Fischer (F344)- zu Wistar Kyoto (WKY)-Ratten. Der Effekt der Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (RTKI) Vatalanib und Imatinib zusammen mit dem mammalian target of rapamycin inhibitor (mTORI) Everolimus auf eine Entwicklung der CLAD nach einer LTx bei Ratten wurde hier untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. An POD 20 und an POD 60 wurden die histologischen Präparate hinsichtlich der Ausprägung der akuten und chronischen Abstoßung ausgewertet. In der Kontrollgruppe, ohne Therapie, entwickelte sich in den ersten 20 Tagen eine akute Abstoßungsreaktion, welche an POD 60 sich zu einem Vollbild einer chronischen Abstoßung mit BO, RAS und Vaskulopathie ausbildete. Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass die dreifache Kombinationstherapie nach einer Lungentransplantation die akute und chronische bronchioläre und vaskuläre Abstoßungsreaktion und die interstitielle Fibrose signifikant reduziert. Jedoch konnte der chronische Verlauf mit Ausbildung der CLAD nicht verhindert werden. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass die Expression der Wachstumsfaktoren c-Kit, PDGF-A und VEGF-A und deren Rezeptoren PDGFR- α und VEGFR-2 an POD 20 und 60 nach LTx reduziert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Kombination von mTORI und RTKIs eine mögliche Strategie in der Prävention von CLAD, BO und RAS sein könnte.

Summary

Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) still remains a major drawback in the outcome following lung transplantation (LTx). The main cause for the high mortality rate after LTx is the formation of chronic rejection as bronchiolitis obliterans (BO), restrictive allograft syndrome (RAS) and vasculopathy, which intensity depends on the severity and frequency of the previous acute rejection. New therapeutic strategies are warranted. Growth factors and their receptors like platelet-derived growth factor-receptor (PDGFR) and vascular endothelial growth factor-receptor (VEGFR), may play a crucial role in the development of CLAD. In this study, we used a weak allogeneic orthotopic left lung transplantation model from Fischer (F344) to Wistar Kyoto (WKY) rats to investigate the effect of the receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI) vatalanib and imatinib with the mammalian target of rapamycin inhibitor (mTORI) everolimus on the development of CLAD after LTx in rats. It was compared with the results from a control group. At POD 20 and POD 60 the histological preparation were evaluated for the severity of acute and chronic rejection. The control group, without therapy, developed an acute rejection within the first 20 days, which formed to a complete chronic rejection at POD 60 with BO, RAS and vasculopathy. With this trial we demonstrated that triple therapy after LTx showed a significant reduction of acute and chronic bronchiolar and vascular rejection and interstitial fibrosis. Also the reduction of expression of the growth factors c-Kit, PDGF-A and VEGF-A and of the receptors PDGFR- α and VEGFR-2 at POD 20 and 60 after LTx was shown.

However, the chronic rejection and the CLAD could not be prevented. In conclusion, the combination of mTORI and RTKIs might be a possible strategy in the prevention of CLAD, BO and RAS.

7 Literaturverzeichnis

- Afshar, K. (2014). Future direction of immunosuppression in lung transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 19(6), 583–590.
- Al-Githmi, I., Batawil, N., Shigemura, N., Hsin, M., Lee, T. W., He, G.-W., & Yim, A. (2006). Bronchiolitis obliterans following lung transplantation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 30(6), 846–851.
- Angel, L., Homma, A., & Levine, S. M. (2000). Bronchiolitis obliterans. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 21(2), 123–134.
- Aono, Y., Nishioka, Y., Inayama, M., Ugai, M., Kishi, J., Uehara, H., et al. (2005). Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(11), 1279–1285.
- Arber, D. A., Tamayo, R., & Weiss, L. M. (1998). Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD 117) in human tissues: Value in the diagnosis of mast cell disorders. *Human Pathology*, 29(5), 498–594. Retrieved August 09, 2016.
- Azzola, A., Havryk, A., Chhajed, P., Hostettler, K., Black, J., Johnson, P., et al. (2004). Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. *Transplantation*, 77(2), 275–280.
- Barker, A. F., Bergeron, A., Rom, W. N., & Hertz, M. I. (2014). Obliterative bronchiolitis. *The New England journal of medicine*, 370(19), 1820–1828.
- Belperio, J. A. (2003). Bronchiolitis Obliterans Syndrome Complicating Lung or Heart–Lung Transplantation, 2003, 499–530.
- Belperio, J. A., Weigt, S. S., Fishbein, M. C., & Lynch, J. P. 3. (2009). Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(1), 108–121. Retrieved June 09, 2016, from <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/pats.200807-073GO>.
- Berger, A., & Hierner, R. (2003). *Plastische Chirurgie: Band I Grundlagen Prinzipien Techniken*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer.
- Bhamidipati, P. K., Kantarjian, H., Cortes, J., Cornelison, A. M., & Jabbour, E. (2013). Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Therapeutic advances in hematology*, 4(2), 103–117.
- Bonner, J. C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(4), 255–273.
- Borro, J. M., Solé, A., La Torre, M. de, Pastor, A., & Tarazona, V. (2005). Steroid withdrawal in lung transplant recipients. *Transplantation proceedings*, 37(9), 3991–3993.
- Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295(1), 139–145.

- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer research*, *56*(1), 100–104.
- Buchdunger, E., O'Reilly, T., & Wood, J. (2002). Pharmacology of imatinib (STI571). *European Journal of Cancer*, *38*, S28-S36.
- Chapman, J. R., Valantine, H., Albanell, J., Arns, W. A., Campistol, J. M., Eisen, H., et al. (2007). Proliferation signal inhibitors in transplantation: questions at the cutting edge of everolimus therapy. *Transplantation proceedings*, *39*(10), 2937–2950.
- Cooper D. Joel (1986). Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*, *314*(18), 1140–1145.
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*, *353*(20), 2135–2147. Retrieved August 09, 2016.
- Dalton, M. L. (1995). The first lung transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery*, *60*(5), 1437–1438.
- Dandel, M., Lehmkuhl, H. B., Knosalla, C., & Hetzer, R. (2010). Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. *Transplant immunology*, *23*(3), 93–103.
- Davis, R. D., JR, & Pasque, M. K. (1995). Pulmonary transplantation. *Annals of surgery*, *221*(1), 14–28. Retrieved July 01, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1234491/pdf/annsurg00047-0024.pdf>.
- Deblon, N., Bourgoin, L., Veyrat-Durebex, C., Peyrou, M., Vinciguerra, M., Caillon, A., et al. (2012). Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. *British journal of pharmacology*, *165*(7), 2325–2340.
- Dewar, A. L., Zannettino, A. C. W., Hughes, T. P., & Lyons, A. B. (2005). Inhibition of c-fms by imatinib: expanding the spectrum of treatment. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *4*(7), 851–853.
- Ding, L., Dolgachev, V., Wu, Z., Liu, T., Nakashima, T., Wu, Z., et al. (2013). Essential role of stem cell factor-c-Kit signalling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of pathology*, *230*(2), 205–214.
- Dreves, J., & Droll, A. (2005). *Tumorangiogenese: Grundlagen und therapeutische Ansätze* (1. Aufl.). UNI-MED Science. Bremen: UNI-MED Verl.
- Dreves, J., Müller-Driver, R., Wittig, C., Fuxius, S., Esser, N., Hugenschmidt, H., et al. (2002). PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer research*, *62*(14), 4015–4022.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., et al. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, *355*(23), 2408–2417.

- Eisen, H. J., Tuzcu, E. M., Dorent, R., Kobashigawa, J., Mancini, D., Valentine-von Kaeppler, H. A., et al. (2003). Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *The New England journal of medicine*, *349*(9), 847–858.
- Estenne, M., & Hertz, M. I. (2002). Bronchiolitis Obliterans after Human Lung Transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *166*(4), 440–444. Retrieved June 09, 2016, from <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/rccm.200201-003PP>.
- Estenne, M., Maurer, J. R., Boehler, A., Egan, J. J., Frost, A., Hertz, M., et al. (2002). Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *21*(3), 297–310.
- Fazio, N., Buzzoni, R., Delle Fave, G., Tesselaar, M. E., Wolin, E., van Cutsem, E., et al. (2018). Everolimus in advanced, progressive, well-differentiated, non-functional neuroendocrine tumors: RADIANT-4 lung subgroup analysis. *Cancer science*, *109*(1), 174–181.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, *9*(6), 669–676.
- Fine, N. M., & Kushwaha, S. S. (2016). Recent Advances in Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Use in Heart and Lung Transplantation. *Transplantation*, *100*(12), 2558–2568.
- 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 & laboratory medicine*, *133*(9), 1420–1425.
- Glanville, A. R., Aboyoun, C. L., Havryk, A., Plit, M., Rainer, S., & Malouf, M. A. (2012). *Severity of Lymphocytic Bronchiolitis Predicts Long-Term Outcome after Lung Transplantation*. Retrieved September 25, 2018, from American Thoracic Society: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.200706-951OC#readcube-epdf>.
- Glanville, A. R., Aboyoun, C., Klepetko, W., Reichenspurner, H., Treede, H., Verschuuren, E. A., et al. (2015). Three-year results of an investigator-driven multicenter, international, randomized open-label de novo trial to prevent BOS after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *34*(1), 16–25.
- Gottlieb, J., Welte, T., Hoper, M. M., Struber, M., & Niedermeyer, J. (2004). Lung transplantation. Possibilities and limitations [Lungentransplantation. Möglichkeiten und Grenzen]. *Der Internist*, *45*(11), 1246–1259.
- Hachem, R. R., Khalifah, A. P., Chakinala, M. M., Yusen, R. D., Aloush, A. A., Mohanakumar, T., et al. (2005). The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation*, *80*(10), 1406–1413.
- Hartert, M., Senbaklavacin, O., Gohrbandt, B., Fischer, B. M., Buhl, R., & Vahld, C.-F. (2014). Lung transplantation: A treatment option in end-stage lung disease. *Deutsches Arzteblatt international*, *111*(7), 107–116.
- Hayes, D., JR (2011). A review of bronchiolitis obliterans syndrome and therapeutic strategies. *Journal of cardiothoracic surgery*, *6*, 92.
- Hensley, M. L., & Ford, J. M. (2003). Imatinib treatment: specific issues related to safety, fertility, and pregnancy. *Seminars in hematology*, *40*(2 Suppl 2), 21–25.

- Hentges, K. E., Sirry, B., Gingeras, A. C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., & Peterson, A. S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13796–13801.
- Hertz, M. I., Henke, C. A., Nakhleh, R. E., Harmon, K. R., Marinelli, W. A., Fox, J. M., et al. (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), 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), 1945–1951.
- Hirschburger, M., Greschus, S., Kuchenbuch, T., Plotz, C., Obert, M., Traupe, H., et al. (2007). Lung transplantation in the Fischer 344--Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 26(4), 390–398. Retrieved April 06, 2017.
- Hirt, S. W. (2003). *Tierexperimentelle Untersuchungen zur Rolle spezifischer und unspezifischer Einflussfaktoren bei der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge*. Habilitationsschrift, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Hirt, S. W., You, X. M., Möller, F., Boeke, K., Starke, M., Spranger, U., & Wottge, H. U. (1999a). Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: Implication of acute rejection and the time point of treatment. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 18(6), 542–548.
- Hirt, S.W., You, X.M., Möller, F., Boeke, K., Starke, M., Spranger, U., & Wottge, H.U. (1999b). Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: Implication of acute rejection and the time point of treatment. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 18(6), 542–548.
- Hopkins, P. M., Aboyoun, C. L., Chhajed, P. N., Malouf, M. A., Plit, M. L., Rainer, S. P., & Glanville, A. R. (2004). Association of minimal rejection in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(9), 1022–1026.
- Hubner, R.-H., Gitter, W., El Mokhtari, N. E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., et al. (2008). Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*, 44(4), 507-11, 514-7.
- Husain, A. N., & Garrity, E. R. (2016). Lung Transplantation: The State of the Airways. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(3), 241–244.
- The International Society for Heart and Lung Transplantation (2018). *International Thoracic Organ Transplant (ITX) Registry Data Slides*. Retrieved May 05, 2019, from <https://ishltregistries.org/registries/slides.asp?year=2018>.
- Ivulich, S., Westall, G., Dooley, M., & Snell, G. (2018). The Evolution of Lung Transplant Immunosuppression. *Drugs*, 78(10), 965–982.

- Joensuu, H., Braud, F. de, Grignani, G., Pas, T. de, Spitalieri, G., Coco, P., et al. (2011). Vatalanib for metastatic gastrointestinal stromal tumour (GIST) resistant to imatinib: Final results of a phase II study. *British journal of cancer*, 104(11), 1686–1690.
- Jost, L. M., Gschwind, H.-P., Jalava, T., Wang, Y., Guenther, C., Souppart, C., et al. (2006). Metabolism and disposition of vatalanib (PTK787/ZK-222584) in cancer patients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34(11), 1817–1828.
- Jungraithmayr, W., Kayser, G., Haberstroh, J., Weder, W., & Korom, S. (2010a). An experimental approach toward chronic pulmonary allograft rejection: Orthotopic lung versus heterotopic tracheal segment transplantation in rats. *Transplantation proceedings*, 42(7), 2767–2770.
- Jungraithmayr, W., Vogt, P., Inci, I., Hillinger, S., Arni, S., Korom, S., & Weder, W. (2010b). A model of chronic lung allograft rejection in the rat. *The European respiratory journal*, 35(6), 1354–1363.
- Kaiser, L. R. (1997). *Atlas of general thoracic surgery*. St. Louis: Mosby.
- Kallio, E. A., Koskinen, P. K., Aavik, E., Buchdunger, E., & Lemström, K. B. (1999). Role of platelet-derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(4), 1324–1332.
- Kamholz, S. L. (1988). Current perspectives on clinical and experimental single lung transplantation. *Chest*, 94(2), 390–396.
- Keil, L., Schaub, A.-L., Hirt, S. W., Schmid, C., Lehle, K., & Suesskind-Schwendi, M. von (2019). Synergism of imatinib, vatalanib and everolimus in the prevention of chronic lung allograft rejection after lung transplantation (LTx) in rats. *Histology and histopathology*, 18088.
- Kessler, M., Jay, N., Molle, R., & Guillemin, F. (2006). Excess risk of cancer in renal transplant patients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 19(11), 908–914.
- Knoop, C., Haverich, A., & Fischer, S. (2004). Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. *The European respiratory journal*, 23(1), 159–171.
- Knoop, C., & Estenne, M. (2006). Acute and chronic rejection after lung transplantation. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 27(5), 521–533.
- Koch, M. (2009). Everolimus in liver and lung transplantation. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*, 45(1), 11–20.
- Kovarik, J. M., Snell, G. I., Valentine, V., Aris, R., Chan, C. K. N., Schmidli, H., & Pirron, U. (2006). Everolimus in pulmonary transplantation: Pharmacokinetics and exposure-response relationships. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 25(4), 440–446.
- Krebs, R., Hollmen, M. E., Tikkanen, J. M., Wu, Y., Hicklin, D. J., Koskinen, P. K., & Lemstrom, K. B. (2006). Vascular endothelial growth factor plays a major role in development of experimental obliterative bronchiolitis. *Transplantation proceedings*, 38(10), 3266–3267.
- Krebs, R., Tikkanen, J. M., Nykanen, A. I., Wood, J., Jeltsch, M., Yla-Herttuala, S., et al. (2005). Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative

- bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(12), 1421–1429. Retrieved June 24, 2016, from <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/rccm.200408-1001OC>.
- Kühnel, W. (2014). *Taschenatlas Histologie: [750 mikroskopische Aufnahmen mit ausführlichen Bildbeschreibungen]* (13., aktualisierte und erweiterte Auflage). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Laine, J., Holmberg, C., & Häyry, P. (1996). Chronic rejection and late renal allograft dysfunction. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 10(2), 221–229.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., & Shivakrupa, R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(1), 16–43.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen* (3., vollst. überarb. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Matsumura, Y., Marchevsky, A., Zuo, X. J., Kass, R. M., Matloff, J. M., & Jordan, S. C. (1995a). Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation*, 59(11), 1509–1517. Retrieved June 09, 2016, from <http://ovidsp.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCJCIDNBJJ00/fs047/ovft/live/gv031/00007890/00007890-199506150-00002.pdf>.
- Matsumura, Y., Marchevsky, A., Zuo, X. J., Krass RM, Matloff, J. M., & Jordan, S. C. (1995b). Assessment of Pathological changes associates with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation*, 59(11), 1509–1517. Retrieved April 05, 2017, from <http://ovidsp.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNC OBAFLALB00/fs046/ovft/live/gv023/00007890/00007890-199506150-00002.pdf>.
- 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), 137–143.
- Miettinen, M., & Lasota, J. (2005). KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 13(3), 205–220.
- Morton, J. M., Williamson, S., Kear, L. M., McWhinney, B. C., Potter, J., & Glanville, A. R. (2006). Therapeutic drug monitoring of prednisolone after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 25(5), 557–563.
- Müller, M. R., Watzka, S. B., Inderbitzi, R. G. C., Kiefer, T., Stubenberger, E., & Aigner, C. (2016). *Expertise Thoraxchirurgie: [online-Version in der eRef]*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mutschler, E. (2013). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit 257 Tabellen und 1417 Strukturformeln* (10., vollst. überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart: WVG Wiss. Verl.-Ges.
- 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), 135–156.
- Nashan, B. (2002). Review of the proliferation inhibitor everolimus. *Expert opinion on investigational drugs*, 11(12), 1845–1857.

- Nashan, B., & Citterio, F. (2012). Wound healing complications and the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplantation: A critical review of the literature. *Transplantation*, *94*(6), 547–561.
- Neuringer, I. P., Chalermkulrat, W., & Aris, R. (2005). Obliterative bronchiolitis or chronic lung allograft rejection: a basic science review. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *24*(1), 3–19.
- Neurohr, C., Huppmann, P., Samweber, B., Leuschner, S., Zimmermann, G., Leuchte, H., et al. (2009). Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, *28*(5), 468–474.
- Nykänen, A. I., Krebs, R., Tikkanen, J. M., Raisky, O., Sihvola, R., Wood, J., et al. (2005). Combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor inhibition in rat cardiac allografts: Beneficial effects on inflammation and smooth muscle cell proliferation. *Transplantation*, *79*(2), 182–189.
- Pablo, A. de, Santos, F., Solé, A., Borro, J. M., Cifrian, J. M., Laporta, R., et al. (2013). Recommendations on the use of everolimus in lung transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, *27*(1), 9–16.
- Pain, M., Bermudez, O., Lacoste, P., Royer, P.-J., Botturi, K., Tissot, A., et al. (2014). Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, *23*(131), 118–130.
- Peng, B., Lloyd, P., & Schran, H. (2005). Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clinical pharmacokinetics*, *44*(9), 879–894.
- Perrot, M. de, Liu, M., Waddell, T. K., & Keshavjee, S. (2003). Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *167*(4), 490–511.
- Ramos-Vara, J. A., Joaquim Segalé, s, C. Oliver Duran, MRCVS, Kathleen Campbell, & Mariano Domingo (1999). Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. *The Journal of Swine Health and Production*, *7*(2), 85–91. Retrieved July 29, 2016, from <https://www.aasv.org/shap/issues/v7n2/v7n2p85.pdf>.
- Rea, D. (2015). Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Annals of hematology*, *94* Suppl 2, S149-58.
- Reichart, B. (Ed.) (1995). *Lungentransplantationen*. Bern: Verlag Hans Huber.
- Reis, A., Megahed, M., Reinhard, T., Godehardt, E., Braunstein, C., & Sundmacher, R. (2002). Synergism of RAD and cyclosporin A in prevention of acute rat corneal allograft rejection. *Cornea*, *21*(1), 81–84.
- Roth, G. J., Binder, R., Colbatzky, F., Dallinger, C., Schlenker-Herceg, R., Hilberg, F., et al. (2015). Nintedanib: from discovery to the clinic. *Journal of medicinal chemistry*, *58*(3), 1053–1063.
- Sabiston, D. C., Sellke, F. W., Del Nido, P. J., & Swanson, S. J. (2010). *Sabiston & Spencer surgery of the chest* (8th ed.). Philadelphia: Saunders/Elsevier.

- Sato, M., Liu, M., Anraku, M., Ogura, T., D'Cruz, G., Alman, B. A., et al. (2008). Allograft airway fibrosis in the pulmonary milieu: a disorder of tissue remodeling. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(3), 517–528.
- Sato, M., & Keshavjee, S. (2008). Bronchiolitis obliterans syndrome: Alloimmune-dependent and -independent injury with aberrant tissue remodeling. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*, 20(2), 173–182.
- Sato, M., Waddell, T. K., Wagnetz, U., Roberts, H. C., Hwang, D. M., Haroon, A., et al. (2011). Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 30(7), 735–742.
- Schaffer, S. A., & Ross, H. J. (2010). Everolimus: efficacy and safety in cardiac transplantation. *Expert opinion on drug safety*, 9(5), 843–854.
- Scheffert, J. L., & Raza, K. (2014). Immunosuppression in lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*, 6(8), 1039–1053.
- Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Haberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H. J., et al. (1997a). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation*, 64(1), 36–42.
- Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Haberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H. J., et al. (1997b). SDZ RAD, A NEW RAPAMYCIN DERIVATIVE: Pharmacological Properties In Vitro and In Vivo. (64), 36–42. Retrieved June 09, 2016
- Schuurman, H. J., Cottens, S., Fuchs, S., Joergensen, J., Meerloo, T., Sedrani, R., et al. (1997). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation*, 64(1), 32–35.
- Scott, E. N., Meinhardt, G., Jacques, C., Laurent, D., & Thomas, A. L. (2007). Vatalanib: The clinical development of a tyrosine kinase inhibitor of angiogenesis in solid tumours. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(3), 367–379.
- Snell, G. I., Valentine, V. G., Vitulo, P., Glanville, A. R., McGiffin, D. C., Loyd, J. E., et al. (2006). Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: An international, randomized, double-blind clinical trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(1), 169–177.
- Sobotta, J., & Welsch, U. (Eds.) (2009). *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [+ mit dem plus im Web, Zugangscode im Buch, www.studentconsult.de]* (2., völlig überarb. Aufl., 4. Nachdr). München: Elsevier Urban & Fischer.
- Stewart, S., Fishbein, M. C., Snell, G. I., Berry, G. J., Boehler, A., Burke, M. M., et al. (2007). Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 26(12), 1229–1242.
- Strueber, M., Warnecke, G., Fuge, J., Simon, A. R., Zhang, R., Welte, T., et al. (2016). Everolimus versus mycophenolate mofetil de novo after lung transplantation - a prospective,

- randomized, open-label trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.
- Suesskind-Schwendi, M. von, Valenti, V., Haneya, A., Puhler, T., Bewig, B., Schmid, C., et al. (2013a). Synergism of imatinib mesylate and everolimus in attenuation of bronchiolitis obliterans after rat LTX. *Histology and histopathology*, 28(10), 1273–1284.
- Suesskind-Schwendi, M. von, 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), 259–270.
- Suesskind-Schwendi, M. von, Brunner, E., Hirt, S. W., Diez, C., Ruemmele, P., Puehler, T., et al. (2013b). Suppression of bronchiolitis obliterans in allogeneic rat lung transplantation-- effectiveness of everolimus. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 65(4), 383–389. Retrieved July 04, 2016.
- Suesskind-Schwendi, M. von, 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), 142–148.
- Suesskind-Schwendi, M. von, Ruemmele, P., Schmid, C., Hirt, S. W., & Lehle, K. (2012). Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. *Experimental lung research*, 38(3), 111–123.
- Taylor, A. L., Watson, C. J. E., & Bradley, J. A. (2005). Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical reviews in oncology/hematology*, 56(1), 23–46.
- Tikkanen, J. M., Hollmen, M., Nykanen, A. I., Wood, J., Koskinen, P. K., & Lemstrom, 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), 1145–1152. Retrieved June 10, 2016.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., & Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry*, 266(18), 11947–11954.
- Todd, J. L., Jain, R., Pavlisko, E. N., Finlen Copeland, C. A., Reynolds, J. M., Snyder, L. D., & Palmer, S. M. (2014). Impact of forced vital capacity loss on survival after the onset of chronic lung allograft dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 189(2), 159–166.
- Verleden, G. M., Vos, R., Dupont, L., van Raemdonck, D. E., Vanaudenaerde, B. M., & Verleden, S. E. (2014). Are we near to an effective drug treatment for bronchiolitis obliterans? *Expert opinion on pharmacotherapy*, 15(15), 2117–2120. Retrieved June 09, 2016.
- Verleden, G. M., Vos, R., Vanaudenaerde, B., Dupont, L., Yserbyt, J., van Raemdonck, D., & Verleden, S. (2015a). Current views on chronic rejection after lung transplantation.

Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation, 28(10), 1131–1139.

- Verleden, S. E., Todd, J. L., Sato, M., Palmer, S. M., Martinu, T., Pavlisko, E. N., et al. (2015b). Impact of CLAD Phenotype on Survival After Lung Retransplantation: A Multicenter Study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 15(8), 2223–2230.
- Verleden, S. E., Ruttens, D., Vandermeulen, E., Bellon, H., Dubbeldam, A., Wever, W. de, et al. (2016a). Predictors of survival in restrictive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*.
- Verleden, S. E., Sacreas, A., Vos, R., Vanaudenaerde, B. M., & Verleden, G. M. (2016b). Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*, 150(1), 219–225.
- Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y., & Chen, J. (1999). The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *The Journal of biological chemistry*, 274(7), 4266–4272.
- Vos, R., Vanaudenaerde, B. M., Geudens, N., Dupont, L. J., van Raemdonck, D. E., & Verleden, G. M. (2008). Pseudomonal airway colonisation: Risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation? *The European respiratory journal*, 31(5), 1037–1045.
- Welsh, C. H., Wang, T. S., Lyu, D. M., Orr, J., Meyer, K. C., Glanville, A. R., et al. (2015). An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: summary for clinicians. Bronchiolitis obliterans syndrome complicating lung transplantation. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(1), 118–119. Retrieved June 09, 2016, from <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/AnnalsATS.201410-471CME>.
- Winter, B. C. M. de, Monchaud, C., Prémaud, A., Pison, C., Kessler, R., Reynaud-Gaubert, M., et al. (2012). Bayesian estimation of mycophenolate mofetil in lung transplantation, using a population pharmacokinetic model developed in kidney and lung transplant recipients. *Clinical pharmacokinetics*, 51(1), 29–39.
- Wohlschlager, J., Sommerwerck, U., Jonigk, D., Rische, J., Baba, H. A., & Muller, K. M. (2011). Lung transplantation and rejection. Basic principles, clinical aspects and histomorphology [Lungentransplantation und Abstossung. Grundlagen, klinische Aspekte und Histomorphologie]. *Der Pathologe*, 32(2), 104–112.
- Wood, J. M., Bold, G., Buchdunger, E., Cozens, R., Ferrari, S., Frei, J., et al. (2000). 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 research*, 60(8), 2178–2189.
- Yamamoto, S., Tsuda, H., Takano, M., Kita, T., Kudoh, K., Furuya, K., et al. (2008). Expression of platelet-derived growth factors and their receptors in ovarian clear-cell carcinoma and its putative precursors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(2), 115–124.
- Yousem, S. A. (1993). Lymphocytic bronchitis/bronchiolitis in lung allograft recipients. *The American journal of surgical pathology*, 17(5), 491–496.

- Yousem, S. A., Berry, G. J., Cagle, P. T., Chamberlain, D., Husain, A. N., Hruban, R. H., et al. (1996). Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 15(1 Pt 1), 1–15.
- Yusen, R. D., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Benden, C., Dipchand, A. I., Dobbels, F., et al. (2014). The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 33(10), 1009–1024.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Graphische Darstellung der Anatomie der Lunge, Frontalansicht.....	11
Abbildung 2:	Anastomosen des Hauptbronchus und der A. pulmonalis.....	12
Abbildung 3:	Die Formen der CLAD.....	16
Abbildung 4:	Chemische Strukturformel von Everolimus und Sirolimus	19
Abbildung 5:	Chemische Strukturformel von Imatinib.....	22
Abbildung 6:	Strukturformel von Vatalanib.....	24
Abbildung 7:	Spenderoperation.....	33
Abbildung 8:	Spenderoperation.....	33
Abbildung 9:	Empfängeroperation	35
Abbildung 10:	Empfängeroperation	35
Abbildung 11:	Empfängeroperation	36
Abbildung 12:	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	40
Abbildung 13:	Makroskopische Rattenlunge	41
Abbildung 14:	Mikroskopische Übersichtsaufnahme einer Rattenlunge.....	42
Abbildung 15:	Wandschichten einer Arterie.....	44
Abbildung 16:	Beispiel einer HE-Färbung.....	45
Abbildung 17:	Beispiel einer HE-Färbung.....	46
Abbildung 18:	Beispiel einer Sirius-Elastika-Färbung.....	47
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der CD117-Rezeptortyrosinkinase.....	48
Abbildung 20:	Beispiel für eine CD 117-Färbung	49
Abbildung 21:	Beispiel für eine CD 117-Färbung	49
Abbildung 22:	Beispiel für eine PDGFR- α -Färbung	50
Abbildung 23:	Beispiel für eine VEGFR-2-Färbung	51
Abbildung 24:	Beispiel für VEGFR-2-Färbung	51
Abbildung 25:	Postoperativer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe und Studiengruppe an POD 20/POD 60.....	55
Abbildung 26:	Kontrollgruppe, POD 20, HE, rechte Lunge	57
Abbildung 27:	Kontrollgruppe, POD 20, HE, linke Lunge.....	58
Abbildung 28:	Kontrollgruppe, POD 60, HE, linke Lunge.....	59
Abbildung 29:	Kontrollgruppe POD 60, Sirius Elastika, linke Lunge.....	60
Abbildung 30:	Graphische Darstellung der ISHLT-D-Klassifizierung an POD 20.....	61
Abbildung 31:	Graphische Darstellung der ISHLT-C-Klassifizierung an POD 20.....	62

Abbildung 32: Studiengruppe, POD 20, HE, linke Lunge	62
Abbildung 33: Studiengruppe, POD 20, Sirius Elastika, linke Lunge	63
Abbildung 34: Graphische Darstellung der ISHLT-D-Klassifizierung an POD 60.....	64
Abbildung 35: Graphische Darstellung der ISHLT-C-Klassifizierung an POD 60	64
Abbildung 36: Studiengruppe, POD 60, HE, linke Lunge	65
Abbildung 37: Studiengruppe, POD 60, Sirius Elastika, linke Lunge	66
Abbildung 38: Graphische Darstellung der interstitiellen Fibrose an POD 20 und 60	66
Abbildung 39: Expression der CD117-positiven Zellen der rechten Lunge	68
Abbildung 40: Kontrollgruppe, POD 20, CD117, linke Lunge	69
Abbildung 41: Expression der CD117-positiven Zellen der linken Lunge	69
Abbildung 42: Expression der PDGF-A-positiven Zellen der rechten Lunge	70
Abbildung 43: Kontrollgruppe, POD 60, PDGFR- α , rechte Lunge	71
Abbildung 44: Expression der PDGFR- α -positiven Zellen der rechten Lunge	72
Abbildung 45: Expression der PDGF-A-positiven Zellen der linken Lunge	73
Abbildung 46: Studiengruppe, POD 20, PDGFR- α , linke Lunge	74
Abbildung 47: Expression der PDGFR- α -positiven Zellen der linken Lunge	74
Abbildung 48: Expression der VEG-FA-positiven Zellen der rechten Lunge	75
Abbildung 49: Studiengruppe, POD 20, VEGFR-2, rechte Lunge	76
Abbildung 50: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der rechten Lunge	77
Abbildung 51: Expression der VEGF-A-positiven Zellen der linken Lunge.....	78
Abbildung 52: Expression der VEGF-A-positiven Zellen der linken und rechten Lunge .	78
Abbildung 53: Kontrollgruppe, POD60, VEGFR-2, linke Lunge.....	79
Abbildung 54: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der linken Lunge	80
Abbildung 55: Expression der VEGFR-2-positiven Zellen der linken und rechten Lunge	80
Abbildung 56: Darstellung der Risikofaktoren für die Entstehung der Bronchiolitis obliterans	92

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationen (Auszug) für eine Lungentransplantation.....	10
Tabelle 2: Bronchiolitis-obliterans-Syndrom: Klassifikation der ISHLT 2002.....	15
Tabelle 3: Versuchsgruppen.....	31
Tabelle 4: Medikamentenschema Imatinib/Vatalanib.....	31
Tabelle 5: Medikamentenschema Everolimus.....	31
Tabelle 6: Übersicht zu Primärantikörper.....	41
Tabelle 7: Ursachen der Wundheilungsstörung unter klinischen Bedingungen.....	95
Tabelle 8: Akute Abstoßung der Gefäße.....	116
Tabelle 9: Akute Abstoßung der Luftwege.....	116
Tabelle 10: Chronische Gefäßabstoßung.....	117
Tabelle 11: Chronische Abstoßung der Luftwege.....	117
Tabelle 12: Einteilung des interstitiellen Fibrosegrades.....	118
Tabelle 13: Prozentualer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe an POD 20 (n=12).....	119
Tabelle 14: Prozentualer Gewichtsverlauf der Studiengruppe an POD 20 (n=5).....	120
Tabelle 15: Prozentualer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe an POD 60 (n=15).....	120
Tabelle 16: Prozentualer Gewichtsverlauf der Studiengruppe an POD 60 (n=9).....	121
Tabelle 17: Histologische Auswertung der Gruppen nach ISHLT.....	123
Tabelle 18: Immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in den verschiedenen Zellen der Lunge am POD 20...124	124
Tabelle 19: Immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in den verschiedenen Zellen der Lunge am POD 60...125	125
Tabelle 20: Immunhistochemische Messdaten der Kontrollgruppe an POD 20 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α	126
Tabelle 21: Immunhistochemische Messdaten der Kontrollgruppe an POD 60 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α	127
Tabelle 22: Immunhistochemische Messdaten der Studiengruppe an POD 20 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α	128
Tabelle 23: Immunhistochemische Messdaten der Studiengruppe an POD 60 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α	129

8.3 Tabellarischer Anhang

Tabelle 8: Akute Abstoßung der Gefäße

Grad	Bezeichnung	Kennzeichen
A0	Keine akute Abstoßung	Normales Lungengewebe ohne akute Abstoßung
A1	Minimale akute Abstoßung	Vereinzelte perivaskuläre Infiltrate mononukleärer Zellen, maximal 2 Lagen um die Gefäße; keine Eosinophilen
A2	Leichte akute Abstoßung	Häufige perivaskuläre Infiltrate mononukleärer Zellen, mindestens 3 Lagen um Gefäße; gelegentlich Eosinophile und Endotheliasis
A3	Mäßige akute Abstoßung	Ausbreitung der mononukleären Zellen in angrenzende Interalveolarepten und Lufträume; häufig Endotheliasis und Eosinophile; gelegentlich Neutrophile; evtl. intraalveoläre Makrophagen und Pneumozyt Typ II- Hyperplasie
A4	Schwere akute Abstoßung	Diffuse perivaskuläre und interstitielle Infiltrate mononukleärer Zellen; deutliche Schädigung des Alveolarepithels und Endotheliasis; evtl. intraalveoläre Epithelzellnekrose, hyaline Membranen, Einblutungen und Neutrophile; evtl. paradoxe Auflockerung der perivaskulären Infiltrate

Quelle: modifiziert nach (Suesskind-Schwendi et al.2012)

Tabelle 9: Akute Abstoßung der Luftwege

Grad	Bezeichnung	Kennzeichen
B0	Keine Entzündung der Luftwege	Keine bronchioläre Entzündung
B1R	Geringgradige Entzündung	Mononukleäre Zellen in Submukosa; evtl. Eosinophile; keine Epithelschädigung
B2R	Hochgradige Entzündung	Mononukleäre Zellen in Submukosa; mehr Eosinophile; Epithelschädigung in Form von Nekrose und Metaplasie; deutliche lymphozytäre Infiltration des Epithels mit Durchdringung der Basalmembran; evtl. Ulzerationen, fibrinös-eitriges Exsudat, Zelldebris und Neutrophile

Quelle: modifiziert nach (Suesskind-Schwendi et al.2012)

Tabelle 10: Chronische Gefäßabstoßung

Grad	Bezeichnung	Kennzeichen
D0	Normales Lungenparenchym	Normales Lungengewebe ohne Zeichen einer chronischen Abstoßung
D1R	Geringgradige chronische Abstoßung	Obstruktion der kleinen Gefäße durch am Endothel haftende Leukozyten
D2R	Hochgradige chronische Abstoßung	Deutliche perivaskuläre Fibrose/Intimaverdickung der meisten Gefäße; kompletter Verschluss kleiner Gefäße; deutliche Intimaverdickung mittlerer Gefäße; Ausbreitung perivaskulärer Fibrose ins umgebende Interstitium

Quelle: modifiziert nach (Suesskind-Schwendi et al.2012)

Tabelle 11: Chronische Abstoßung der Luftwege

Grad	Bezeichnung	Kennzeichen
C0	Normales Lungenparenchym	Normales Lungengewebe ohne Zeichen einer Bronchiolitis obliterans
C1R	Geringgradige BO	Erste Anzeichen von intraluminalen Polypen mit Granulationsgewebe, Fibroblasten und Fibrinfilamenten; lose subepitheliale Fibrinstrukturen um terminale Bronchiolen (konstruktive Bronchiolitis)
C2R	Hochgradige BO	Deutliche exzentrische/konzentrische peribronchiale Fibrose mit teilweisem oder komplettem Verschluss des Lumens; Zerstörung der Muscularis und Elastika; Schädigung des Epithels; Verformung des gesamten Lumens oder komplette Obliteration mit Narbengewebe; Ausbreitung des Narbengewebes in das angrenzende Interstitium; Schleimansammlung und Schaumzellen in den distalen Lufträumen

Quelle: modifiziert nach (Suesskind-Schwendi et al.2012)

Tabelle 12: Einteilung des interstitiellen Fibrosegrades

Fibrosegrad	Alveolarsepten	Lungenarchitektur
0	Keine fibrotischen Veränderungen, höchstens kleinste Fasern in einigen Alveolarwänden	Normales Lungenparenchym
1	Isolierte leichte fibrotische Veränderungen (Septum weniger als 3mal dicker als normal)	Alveolen teilweise vergrößert oder verkleinert, jedoch keine fibrotischen Anhäufungen
2	Deutliche fibrotische Veränderungen (Septum mehr als 3mal dicker als normal) mit sporadischen fibrotischen Knoten	Alveolen teilweise vergrößert oder verkleinert, jedoch keine fibrotischen Anhäufungen
3	Zusammenhängende fibrotische Mauern (Septum mehr als 3mal dicker als normal) herrschen im gesamten mikroskopischen Feld vor	Alveolen teilweise vergrößert oder verkleinert, jedoch keine fibrotischen Anhäufungen
4	Variabel	Einzelne fibrotische Anhäufungen (<10% des Präparats)
5	Variabel	Zusammenlaufende fibrotische Anhäufungen (>10% und <50% des Präparats); Lungenarchitektur schwer beschädigt, aber erhalten
6	Variabel, meist nicht mehr vorhanden	Große zusammenhängende fibrotische Anhäufungen (>50% des Präparats); Lungenarchitektur größtenteils nicht erhalten
7	Nicht mehr vorhanden	Alveolen nahezu komplett fibrotisch obliteriert; bis zu fünf Luftblasen
8	Nicht mehr vorhanden	Komplette Fibrose

Quelle: modifiziert nach Hubner et al., 2008

Tabelle 13: Prozentualer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe an POD 20 (n=12)

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
0	319,00	100%	22,43	0
1	298,67	93,63%	20,50	6,37%
2	294,50	92,32%	20,41	7,68%
3	297,17	93,16%	20,71	6,84%
4	298,33	93,52%	22,24	6,48%
5	300,00	94,04%	22,72	5,96%
6	302,50	94,83%	24,86	5,17%
7	304,00	95,30%	24,77	4,70%
8	306,08	95,95%	26,59	4,05%
9	306,42	96,06%	28,66	3,94%
10	309,83	97,13%	30,83	2,87%
11	313,08	98,15%	30,01	1,85%
12	315,83	99,01%	27,53	0,99%
13	319,08	100,03%	28,68	-0,03%
14	322,25	101,02%	30,84	-1,02%
15	324,50	101,72%	32,00	-1,72%
16	327,08	102,53%	32,93	-2,53%
17	330,17	103,50%	32,21	-3,50%
18	331,42	103,89%	33,63	-3,89%
19	332,00	104,08%	34,98	-4,08%
20	337,92	105,93%	34,04	-5,93%

Standardabweichung (SA), Mittelwert (MW) und Anteil der Zunahme; Als Nullpunkt gilt das präoperative Ausgangsgewicht

Tabelle 14: Prozentualer Gewichtsverlauf der Studiengruppe an POD 20 (n=5)

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
0	315,60	100%	6,50	0
1	293,20	92,90%	7,66	7,10%
2	290,40	92,02%	7,50	7,98%
3	293,40	92,97%	7,57	7,03%
4	292,60	92,71%	5,90	7,29%
5	292,00	92,52%	7,48	7,48%
6	291,80	92,46%	7,60	7,54%
7	291,80	92,46%	7,22	7,54%
8	288,80	91,51%	8,41	8,49%
9	287,20	91,00%	7,16	9,00%
10	280,00	88,72%	8,60	11,28%
11	281,40	89,16%	10,09	10,84%
12	280,60	88,91%	9,07	11,09%
13	279,20	88,47%	4,66	11,53%
14	279,40	88,53%	5,77	11,47%
15	280,40	88,85%	6,43	11,15%
16	277,80	88,02%	5,97	11,98%
17	278,60	88,28%	7,16	11,72%
18	277,60	87,96%	7,57	12,04%
19	278,60	88,28%	8,88	11,72%
20	279,00	88,40%	7,97	11,60%

Standardabweichung (SA), Mittelwert (MW) und Anteil der Zunahme; Als Nullpunkt gilt das präoperative Ausgangsgewicht

Tabelle 15: Prozentualer Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe an POD 60 (n=15)

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
0	232,15	100,00%	89,73	0,00%
1	227,61	98,05%	74,00	1,95%
2	248,25	106,94%	49,36	-6,94%
3	257,21	110,80%	39,28	-10,80%
4	268,45	115,64%	29,39	-15,64%
5	262,28	112,98%	34,42	-12,98%
6	279,37	120,34%	19,96	-20,34%
7	277,27	119,44%	23,45	-19,44%
8	276,13	118,95%	26,13	-18,95%
9	287,31	123,76%	17,43	-23,76%
10	288,95	124,47%	17,14	-24,47%
11	300,16	129,30%	13,96	-29,30%
12	289,43	124,67%	18,98	-24,67%
13	294,73	126,96%	16,38	-26,96%
14	301,92	130,06%	13,23	-30,06%
15	300,44	129,42%	12,91	-29,42%
16	311,51	134,19%	14,06	-34,19%
17	304,33	131,10%	12,02	-31,10%
18	307,13	132,30%	11,94	-32,30%
19	322,53	138,94%	17,22	-38,94%
20	323,73	139,45%	17,71	-39,45%
21	325,67	140,28%	18,36	-40,28%
22	326,73	140,74%	18,99	-40,74%
23	327,33	141,00%	18,91	-41,00%
24	330,67	142,44%	20,34	-42,44%
25	323,93	139,54%	32,61	-39,54%
26	334,53	144,10%	18,41	-44,10%

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
27	336,20	144,82%	19,46	-44,82%
28	338,73	145,91%	18,64	-45,91%
29	340,60	146,72%	18,15	-46,72%
30	342,00	147,32%	18,58	-47,32%
31	344,20	148,27%	19,07	-48,27%
32	344,60	148,44%	19,57	-48,44%
33	346,93	149,45%	20,15	-49,45%
34	348,27	150,02%	21,31	-50,02%
35	349,13	150,39%	21,51	-50,39%
36	349,47	150,54%	21,66	-50,54%
37	352,07	151,66%	22,04	-51,66%
38	346,47	149,24%	37,68	-49,24%
39	346,73	149,36%	37,74	-49,36%
40	356,20	153,44%	22,74	-53,44%
41	356,20	153,44%	22,50	-53,44%
42	357,07	153,81%	22,35	-53,81%
43	358,53	154,44%	23,33	-54,44%
44	359,20	154,73%	23,24	-54,73%
45	360,13	155,13%	23,57	-55,13%
46	361,47	155,71%	24,46	-55,71%
47	363,07	156,40%	23,96	-56,40%
48	363,20	156,45%	24,50	-56,45%
49	364,60	157,06%	23,76	-57,06%
50	365,27	157,34%	23,51	-57,34%
51	367,13	158,15%	24,28	-58,15%
52	367,27	158,20%	25,00	-58,20%
53	367,93	158,49%	25,25	-58,49%
54	369,60	159,21%	26,13	-59,21%
55	370,33	159,53%	25,19	-59,53%
56	372,60	160,50%	26,02	-60,50%
57	374,00	161,11%	26,54	-61,11%
58	375,07	161,56%	25,87	-61,56%
59	375,60	161,79%	24,67	-61,79%
60	375,80	161,88%	24,50	-61,88%

Standardabweichung (SA), Mittelwert (MW) und Anteil der Zunahme; Als Nullpunkt gilt das präoperative Ausgangsgewicht

Tabelle 16: Prozentualer Gewichtsverlauf der Studiengruppe an POD 60 (n=9)

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
0	314,29	100,00%	13,65	0
1	301,00	95,77%	12,51	4,23%
2	291,25	92,67%	13,44	7,33%
3	290,38	92,39%	11,80	7,61%
4	288,38	91,76%	11,45	8,24%
5	288,75	91,88%	14,05	8,12%
6	286,63	91,20%	12,98	8,80%
7	288,75	91,88%	12,52	8,12%
8	288,63	91,84%	13,13	8,16%
9	281,88	89,69%	11,51	10,31%
10	277,25	88,22%	11,78	11,78%
11	276,50	87,98%	10,86	12,02%
12	275,88	87,78%	12,56	12,22%
13	277,13	88,18%	11,59	11,82%
14	277,63	88,34%	13,99	11,66%
15	276,88	88,10%	13,27	11,90%
16	276,88	88,10%	12,56	11,90%
17	277,00	88,14%	10,66	11,86%
18	275,88	87,78%	11,98	12,22%

POD	MW	MW%	SA	%Anteil der Zunahme
19	275,50	87,66%	12,18	12,34%
20	274,38	87,30%	11,38	12,70%
21	274,63	87,38%	12,76	12,62%
22	274,00	87,18%	11,90	12,82%
23	273,50	87,02%	11,78	12,98%
24	272,88	86,82%	10,22	13,18%
25	270,50	86,07%	11,51	13,93%
26	272,00	86,55%	10,17	13,45%
27	271,38	86,35%	10,70	13,65%
28	270,13	85,95%	11,33	14,05%
29	269,50	85,75%	11,11	14,25%
30	269,25	85,67%	13,13	14,33%
31	267,38	85,07%	13,14	14,93%
32	267,88	85,23%	13,77	14,77%
33	268,38	85,39%	13,49	14,61%
34	268,38	85,39%	12,88	14,61%
35	267,75	85,19%	13,77	14,81%
36	266,75	84,88%	14,54	15,13%
37	267,00	84,95%	13,96	15,05%
38	266,88	84,91%	14,72	15,09%
39	266,63	84,84%	15,32	15,16%
40	266,88	84,91%	15,31	15,09%
41	267,50	85,11%	14,43	14,89%
42	267,50	85,11%	14,95	14,89%
43	267,38	85,07%	16,47	14,93%
44	266,75	84,88%	16,69	15,13%
45	267,38	85,07%	17,11	14,93%
46	268,25	85,35%	18,64	14,65%
47	269,50	85,75%	18,69	14,25%
48	269,00	85,59%	18,38	14,41%
49	270,13	85,95%	16,21	14,05%
50	271,50	86,39%	16,67	13,61%
51	270,88	86,19%	15,91	13,81%
52	271,13	86,27%	16,08	13,73%
53	271,25	86,31%	15,65	13,69%
54	272,75	86,78%	15,61	13,22%
55	272,75	86,78%	15,35	13,22%
56	272,50	86,70%	16,47	13,30%
57	272,38	86,66%	16,16	13,34%
58	273,50	87,02%	16,40	12,98%
59	273,13	86,90%	16,23	13,10%
60	270,38	86,03%	15,27	13,97%

Standardabweichung (SA), Mittelwert (MW) und Anteil der Zunahme; Als Nullpunkt gilt das präoperative Ausgangsgewicht

Tabelle 17: Histologische Auswertung der Gruppen nach ISHLT

Gruppe	Tier	A4	B0	B1	B2	C0	C1	C2	D0	D1	D2	Fibrosegrad	
Kontrollgruppe POD 20	FW405	1,00	-	-	1,00	0,25	0,75	-	0,30	0,70	0,06	4	
	FW407	1,00	-	-	1,00	0,29	0,71	-	0,33	0,57	0,10	4	
	FW408	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,23	0,68	0,08	4	
	FW409	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,20	0,80	-	4	
	FW410	1,00	-	-	1,00	-	-	-	0,33	0,67	-	3	Anzahl
	FW412	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,17	0,76	0,07	4	
	FW534	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,22	0,72	0,06	3	
	FW535	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,26	0,68	0,06	4	
	FW536	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,04	0,80	0,15	5	
	FW537	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,12	0,85	0,03	4	
	FW538	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,06	0,89	0,04	4	
FW551	1,00	-	-	1,00	-	1,00	-	0,38	0,63	-	3		
Standardabweichung						0,10	0,29	-	0,11	0,10	0,05	0,58	
Mittelwert						0,04	0,87	-	0,22	0,73	0,05	3,83	
Kontrollgruppe POD 60	FW344					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW345					-	-	1,00	-	-	1,00	7	
	FW346					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW348					-	-	1,00	-	-	1,00	7	
	FW349					-	-	1,00	-	-	1,00	7	Anzahl
	FW351					-	-	1,00	-	-	1,00	7	
	FW528					-	-	1,00	-	0,08	0,92	6	
	FW529					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW530					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW531					-	-	1,00	-	-	1,00	7	
	FW532					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW533					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW552					-	-	1,00	-	-	1,00	8	
	FW554					-	-	1,00	-	0,16	0,84	7	
FW555					-	-	1,00	-	-	1,00	8		
Standardabweichung						-	-	-	-	0,04	0,04	0,64	
Mittelwert						-	-	1,00	-	0,02	0,98	7,47	
Studiengruppe POD 20	FW545	1,00	-	-	1,00	0,38	0,63	-	0,73	0,27	-	3	
	FW546	1,00	-	-	1,00	1,00	-	-	1,00	-	-	3	
	FW547	1,00	-	-	1,00	0,44	0,56	-	0,52	0,48	-	3	Anzahl
	FW548	1,00	-	-	1,00	0,55	0,45	-	0,68	0,32	-	2	
	FW549	1,00	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	1	
	FW550	1,00	-	-	1,00	0,83	0,17	-	0,73	0,27	-	1	
Standardabweichung						0,35	0,28	-	0,19	0,19	-	0,98	
Mittelwert						0,53	0,30	-	0,78	0,22	-	2,17	
Studiengruppe POD 60	FW487					0,22	0,56	0,22	0,29	0,47	0,24	4	
	FW488					0,20	0,60	0,20	0,24	0,59	0,18	6	
	FW489					0,83	0,17	-	0,65	0,30	0,05	6	
	FW539					1,00	-	-	1,00	-	-	3	Anzahl
	FW540					0,80	0,20	-	0,67	0,33	-	3	
	FW541					0,27	0,73	-	0,13	0,67	0,20	5	
	FW556					0,50	0,50	-	0,56	0,44	-	2	
	FW557					1,00	-	-	1,00	-	-	1	
	FW558					0,67	0,33	-	0,60	0,40	-	2	
Standardabweichung						0,31	0,27	0,09	0,31	0,23	0,10	1,81	
Mittelwert						0,61	0,34	0,05	0,57	0,36	0,07	3,56	

Mittelwert und Standardabweichung der chronischen Abstoßung; Mittelwert und Standardabweichung der interstitiellen Fibrose.

In den histologischen Schnittpräparaten wurden Bronchioli und Gefäße aus fünf Gesichtsfeldern mikroskopisch in 10-facher Vergrößerung ausgezählt und nach ISHLT ausgewertet. Der prozentuale Anteil wird in der Tabelle dargestellt.

Tabelle 18: Immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in den verschiedenen Zellen der Lunge am POD 20

	CD117			PDGF-A			PDGFR- α			VEGF-A			VEGFR-2		
	Native Lungen	Kontroll- gruppe linke Lunge	Stu- dien- gruppe linke Lunge	Native Lungen	Kontroll- gruppe linke Lunge	Stu- dien- gruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontroll- gruppe linke Lunge	Stu- dien- gruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontroll- gruppe linke Lunge	Stu- dien- gruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontroll- gruppe linke Lunge	Stu- dien- gruppe linke Lunge
Bronchial-epithelzellen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Typ I-Zellen	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Typ II-Zellen	++	++	++	-	++	++	+++	++	++	++	++	+	++	+	+
Interstitielle Zellen	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Gefäß-endothelzellen	+	+++	++	++	++	+	++	+	+	++	++	+	++	+	+
Alveolar-makrophagen	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	+++	++	+	++	+
Andere Mononukleäre Zellen	+	++	+	-	+	+	-	+	+	-	++	+	-	++	++
Meta- plas-tische Epi-thelzellen	-	++	+	-	+	+	-	+	-	-	++	+	-	+	+

Tabelle 19: Immunhistologische Auswertung der Intensität der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in den verschiedenen Zellen der Lunge am POD 60

	CD117			PDGF-A			PDGFR- α			VEGF-A			VEGFR-2		
	Native Lungen	Kontrollgruppe linke Lunge	Studiengruppe linke Lunge	Native Lungen	Kontrollgruppe linke Lunge	Studiengruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontrollgruppe linke Lunge	Studiengruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontrollgruppe linke Lunge	Studiengruppe linke Lunge	Native Lunge	Kontrollgruppe linke Lunge	Studiengruppe linke Lunge
Bronchial-epithelzellen	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Typ I-Zellen	-	++	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Typ II-Zellen	+++	++	+	++	++	+	+++	+++	++	++	+++	+	++	++	+
Interstitielle Zellen	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gefäß-endothelzellen	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	+++	+	++	++	+
Alveolar-makrophagen	+++	+++	+	++	+++	+	++	++	+	++	+++	+	+	++	++
Andere Mononukleäre Zellen	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	++	-	++	+	-	+	+
Meta-plastische Epithelzellen	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	-	-	++	++

Tabelle 20: Immunhistochemische Messdaten der Kontrollgruppe an POD 20 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α

CD117 Kontrollgruppe									CD117 Kontrollgruppe								
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		rechte Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	
POD 20	PWS34	20	26	29	26	10	22,2	7,6	POD 20	PWS34	54	7	44	66	45	43,2	22,1
	PWS35	48	37	38	13	16	30,4	15,2		PWS35	36	18	24	44	23	29	10,7
	PWS36	67	54	123	47	58	69,8	30,6		PWS36	31	41	17	15	14	23,6	11,9
	PWS37	11	14	16	7	11	11,8	3,4		PWS37	11	11	32	14	29	19,4	10,3
	PWS38	31	29	14	31	35	28	8,1		PWS38	22	21	18	18	14	18,6	3,1
	PWS51	6	29	28	32	61	31,2	19,6		PWS51	2	30	18	23	15	17,6	10,4
							Gesamt	32,2							Gesamt	25,2	18,1
VEGFA Kontrollgruppe									VEGFA Kontrollgruppe								
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		rechte Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	
POD 20	PWS34	7	25	24	6	12	14,8	9,1	POD 20	PWS34	11	4	7	7	9	7,6	2,6
	PWS35	8	14	33	6	11	14,4	10,8		PWS35	5	7	4	5	6	5,4	1,1
	PWS36	5	3	3	5	4	4	1,0		PWS36	1	0	1	0	0	0,4	0,5
	PWS37	10	4	8	4	8	6,8	2,7		PWS37	5	6	23	11	10	11	7,2
	PWS38	17	18	11	9	3	11,6	6,1		PWS38	14	6	14	9	2	9	5,2
	PWS51	2	15	17	28	5	13,4	10,4		PWS51	4	0	6	5	1	3,2	2,6
							Gesamt	10,8							Gesamt	6,1	3,9
VEGFR-2 Kontrollgruppe									VEGFR-2 Kontrollgruppe								
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		rechte Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	
POD 20	PWS34	29	32	11	13	19	20,8	9,4	POD 20	PWS34	17	19	18	10	18	16,4	3,6
	PWS35	5	7	4	5	6	5,4	1,1		PWS35	48	14	30	28	14	26,8	14,0
	PWS36	16	14	9	11	8	11,6	3,4		PWS36	9	6	4	11	2	6,4	3,6
	PWS37	7	5	10	9	8	7,8	1,9		PWS37	14	18	15	26	28	20,2	6,4
	PWS38	27	22	20	33	28	26	5,1		PWS38	9	8	13	0	0	6	5,8
	PWS51	10	8	20	7	37	16,4	12,6		PWS51	15	1	4	9	2	6,2	5,8
							Gesamt	14,7							Gesamt	13,7	8,8
PDGFA Kontrollgruppe									PDGFA Kontrollgruppe								
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		rechte Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	
POD 20	PWS34	28	24	24	9	12	19,4	8,4	POD 20	PWS34	31	12	6	11	3	12,6	10,9
	PWS35	18	32	35	27	71	36,6	20,3		PWS35	37	33	42	7	34	30,6	13,6
	PWS36	6	12	37	17	16	17,6	11,7		PWS36	12	12	10	6	22	12,4	5,9
	PWS37	6	11	7	36	13	14,6	12,3		PWS37	9	10	5	16	10	10	3,9
	PWS38	13	16	53	21	14	23,4	16,8		PWS38	8	19	24	25	21	19,4	6,8
	PWS51	5	0	39	18	28	18	16,1		PWS51	0	0	3	1	2	1,2	1,3
							Gesamt	21,6							Gesamt	14,37	9,9
PDGFR- α Kontrollgruppe									PDGFR- α Kontrollgruppe								
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		rechte Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	
POD 20	PWS34	5	28	35	36	22	25,2	12,6	POD 20	PWS34	37	38	42	29	25	34,2	7,0
	PWS35	19	13	30	20	23	21	6,2		PWS35	35	40	28	32	9	28,8	11,9
	PWS36	0	2	13	5	8	5,6	5,1		PWS36	11	24	22	36	18	22,2	9,2
	PWS37	3	3	15	3	3	5,4	5,4		PWS37	45	29	12	24	32	28,4	12,0
	PWS38	20	21	27	16	22	21,2	4,0		PWS38	20	13	15	3	1	10,4	8,1
	PWS51	20	12	72	31	30	33	23,2		PWS51	37	15	13	16	11	18,4	10,6
							Gesamt	18,6							Gesamt	23,7	8,6

Tabelle 21: Immunhistochemische Messdaten der Kontrollgruppe an POD 60 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α

CD117								CD117									
Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD	Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD		
linke Lunge								rechte Lunge									
POD 60	FWS28	24	16	31	16	28	23,0	2,8	POD 60	FWS28	30	26	26	16	21	23,8	5,4
	FWS29	61	25	16	26	97	45,0	25,5		FWS29	20	27	14	23	21	21,0	4,7
	FWS30	10	24	4	12	31	16,2	14,8		FWS30	31	11	19	10	13	16,8	8,7
	FWS31	20	41	21	15	31	25,6	7,8		FWS31	16	25	15	25	37	23,6	8,9
	FWS32	74	54	57	34	48	53,4	18,4		FWS32	33	31	29	14	22	25,8	7,8
	FWS33	41	21	11	16	9	19,6	22,6		FWS33	6	15	13	9	11	10,8	3,5
	FWS52	3	0	24	64	8	19,8	3,5		FWS52	19	13	10	20	15	15,4	4,2
	FWS54	28	31	32	23	61	35,0	23,3		FWS54	13	6	17	8	9	10,6	4,4
	FWS55	12	15	97	21	7	30,4	3,5		FWS55	34	27	14	14	31	24,0	9,5
						Gesamt	26,7	12,6						Gesamt	19,1	5,9	
VEGFA								VEGFA									
Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD	Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD		
linke Lunge								rechte Lunge									
POD 60	FWS28	3	18	0	8	18	9,4	8,4	POD 60	FWS28	5	10	2	0	1	3,6	4,0
	FWS29	0	0	1	0	2	0,6	0,9		FWS29	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	FWS30	3	4	5	5	3	4,0	1,0		FWS30	6	1	4	3	5	3,8	1,9
	FWS31	8	12	5	7	13	9,0	3,4		FWS31	7	6	5	7	3	5,6	1,7
	FWS32	4	12	9	15	2	8,4	5,4		FWS32	3	3	0	1	2	1,8	1,3
	FWS33	25	22	19	16	21	20,6	3,4		FWS33	17	4	6	13	5	9,0	5,7
	FWS52	4	2	3	42	1	10,4	17,7		FWS52	8	3	4	5	4	4,8	1,9
	FWS54	1	4	17	3	5	6,0	6,3		FWS54	20	9	15	5	18	13,4	6,3
	FWS55	1	3	0	0	1	1,0	1,2		FWS55	0	0	2	10	0	2,4	4,3
						Gesamt	7,7	6,0						Gesamt	4,9	4,1	
VEGFR-2								VEGFR-2									
Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD	Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD		
linke Lunge								rechte Lunge									
POD 60	FWS28	20	58	16	18	25	27,4	17,4	POD 60	FWS28	13	16	10	4	2	9,0	7,8
	FWS29	23	41	31	24	15	26,8	9,8		FWS29	41	20	16	15	22	22,8	13,4
	FWS30	7	18	18	28	19	18,0	7,4		FWS30	9	2	8	3	11	6,6	1,4
	FWS31	13	23	29	11	35	22,2	10,3		FWS31	15	6	11	10	13	11,0	1,4
	FWS32	16	16	13	8	4	11,4	5,3		FWS32	2	1	3	1	15	4,4	9,2
	FWS33	6	1	17	13	10	9,4	6,2		FWS33	0	2	1	0	0	0,6	0,0
	FWS52	8	0	2	12	17	7,8	7,0		FWS52	3	3	1	4	0	2,2	2,1
	FWS54	18	5	15	11	9	11,6	5,1		FWS54	0	0	2	0	0	0,4	0,0
	FWS55	4	6	0	2	6	3,6	2,6		FWS55	0	0	2	10	0	2,4	0,0
						Gesamt	15,4	8,6						Gesamt	6,6	7,1	
PDGFA								PDGFA									
Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD	Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD		
linke Lunge								rechte Lunge									
POD 60	FWS28	21	39	23	25	34	28,4	7,7	POD 60	FWS28	24	30	16	13	17	20,0	4,9
	FWS29	20	17	19	14	21	18,2	2,8		FWS29	12	10	22	13	14	14,2	1,4
	FWS30	21	7	8	4	11	10,2	6,5		FWS30	17	17	12	26	12	16,8	3,5
	FWS31	15	18	29	17	7	17,2	7,9		FWS31	14	15	14	13	12	13,6	1,4
	FWS32	36	26	34	46	58	40	12,3		FWS32	13	15	6	9	7	10,0	4,2
	FWS33	21	15	39	28	19	24	9		FWS33	10	15	9	8	11	10,6	0,7
	FWS52	40	5	24	4	8	16,2	15,6		FWS52	4	2	7	5	2	4,0	1,4
	FWS54	21	10	15	14	6	13,2	5,6		FWS54	4	10	3	10	8	7,0	2,8
	FWS55	0	1	1	2	0	0,8	0,8		FWS55	3	6	2	3	2	3,2	0,7
						Gesamt	18,7	11,2						Gesamt	11,0	5,7	
PDGFR- α								PDGFR- α									
Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD	Kontrollgruppe		1	2	3	4	5 MW	SD		
linke Lunge								rechte Lunge									
POD 60	FWS28	16	44	42	33	36	34,2	11,1	POD 60	FWS28	55	24	42	31	28	36,0	12,5
	FWS29	7	41	5	14	18	17	14,4		FWS29	27	17	37	12	29	24,4	9,9
	FWS30	7	23	9	10	40	17,8	13,9		FWS30	32	39	25	44	26	33,2	8,2
	FWS31	23	31	26	22	21	24,6	4,0		FWS31	48	37	41	47	41	42,8	4,6
	FWS32	34	20	41	0	21	23,2	15,7		FWS32	34	20	41	0	21	23,2	15,7
	FWS33	28	39	33	29	21	30	6,6		FWS33	28	39	33	29	21	30,0	6,6
	FWS52	4	13	15	1	4	7,4	6,2		FWS52	12	19	13	24	31	19,8	7,9
	FWS54	13	13	3	8	16	10,6	5,1		FWS54	25	8	11	10	11	13,0	6,8
	FWS55	11	18	1	26	9	13	9,5		FWS55	29	31	8	19	15	20,4	9,6
						Gesamt	19,8	9,0						Gesamt	27,0	9,3	

Tabelle 22: Immunhistochemische Messdaten der Studiengruppe an POD 20 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α

CD117								CD117								CD117										
linke Lunge								rechte Lunge								rechte Fischer-Lunge										
POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD			
	FWS45	44	31	40	29	31	36,6	8,7		FWS45	37	19	14	29	26	25,0	8,9		FWS45	24	33	33	22	21	26,6	5,9
	FWS46	40	34	17	21	22	26,8	9,7		FWS46	21	32	25	26	29	26,6	4,2		FWS46	13	7	21	15	9	13,0	5,5
	FWS47	57	36	27	16	40	35,2	15,3		FWS47	50	36	19	14	18	27,4	15,2		FWS47	17	18	13	23	13	16,8	4,1
	FWS48	13	21	11	5	18	13,6	6,2		FWS48	10	8	12	5	28	12,6	9,0		FWS48	48	34	23	27	22	30,8	10,7
	FWS49	19	8	8	19	16	14,0	5,6		FWS49	31	19	31	22	33	27,2	6,3		FWS49	26	20	9	17	13	17,0	6,5
	FWS50	17	12	39	41	31	20,0	13,0		FWS50	7	6	16	4	10	8,6	4,7		FWS50	14	32	13	15	16	18,0	7,9
						Gesamt	25,7	10,0						Gesamt	21,2	8,4						Gesamt	20,4	6,8		
VEGFA								VEGFA								VEGFA										
linke Lunge								rechte Lunge								rechte Fischer-Lunge										
POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD			
	FWS45	2	4	12	6	9	6,6	4,0		FWS45	2	1	2	5	0	2,0	1,9		FWS45	0	0	0	0	1	0,2	0,4
	FWS46	22	0	15	9	21	13,4	9,1		FWS46	3	5	8	0	0	3,2	3,4		FWS46	13	7	21	15	9	13,0	5,5
	FWS47	18	13	9	14	8	12,4	4,0		FWS47	2	2	3	3	1	2,2	0,8		FWS47	3	3	1	8	5	4,0	2,6
	FWS48	4	5	7	3	14	6,6	4,4		FWS48	7	4	0	1	3	3,0	2,7		FWS48	11	20	23	11	16	16,2	5,4
	FWS49	4	10	7	8	6	7,0	2,2		FWS49	0	0	4	3	2	1,8	1,8		FWS49	4	1	9	5	1	4,0	3,3
	FWS50	9	4	7	19	9	9,6	5,6		FWS50	0	3	5	3	1	2,4	1,9		FWS50	0	3	5	3	1	2,4	1,9
						Gesamt	9,3	3,0						Gesamt	2,4	0,6						Gesamt	6,6	6,4		
VEGFR-2								VEGFR-2								VEGFR-2										
linke Lunge								rechte Lunge								rechte Fischer-Lunge										
POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD			
	FWS45	26	3	16	20	3	13,6	10,3		FWS45	3	2	1	1	2	1,8	0,8		FWS45	3	12	3	6	6	6,0	3,7
	FWS46	22	0	15	9	21	13,4	9,1		FWS46	11	9	14	7	7	9,6	3,0		FWS46	12	12	11	7	12	10,8	2,2
	FWS47	34	3	12	6	23	15,6	12,8		FWS47	1	6	7	7	6	5,4	2,5		FWS47	2	8	7	7	6	6,0	2,3
	FWS48	15	6	6	4	3	6,8	4,8		FWS48	10	2	4	4	6	5,2	3,0		FWS48	16	17	20	32	15	20,0	7,0
	FWS49	4	10	7	8	6	7,0	2,2		FWS49	4	4	6	2	0	3,2	2,3		FWS49	8	6	8	5	15	8,4	3,9
	FWS50	9	11	5	11	8	8,8	2,5		FWS50	0	2	2	10	1	3,0	4,0		FWS50	9	5	12	9	10	9,0	2,5
						Gesamt	10,9	3,8						Gesamt	4,7	2,8						Gesamt	10,0	5,2		
PDGFA								PDGFA								PDGFA										
linke Lunge								rechte Lunge								rechte Fischer-Lunge										
POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD			
	FWS45	29	0	28	15	22	18,8	11,9		FWS45	27	13	17	37	18	22,4	9,6		FWS45	28	17	21	36	10	22,4	10,0
	FWS46	15	11	12	11	9	11,6	2,2		FWS46	9	20	23	13	32	19,4	9,0		FWS46	8	8	10	9	0	7,0	4,0
	FWS47	21	24	19	16	26	21,2	4,0		FWS47	14	11	9	10	8	10,4	2,3		FWS47	12	13	14	15	9	12,6	2,3
	FWS48	14	4	9	33	15	15,0	11,0		FWS48	4	0	5	6	12	5,4	4,3		FWS48	12	18	20	9	30	17,8	8,1
	FWS49	15	14	13	9	9	12,0	2,8		FWS49	0	0	0	1	4	1,0	1,7		FWS49	10	8	4	8	6	7,2	2,3
	FWS50	16	15	9	22	26	17,6	6,6		FWS50	15	17	10	15	13	14,0	2,6		FWS50	15	1	10	15	13	10,8	5,8
						Gesamt	16,0	3,8						Gesamt	12,1	8,2						Gesamt	13,0	3,2		
PDGFR- α								PDGFR- α								PDGFR- α										
linke Lunge								rechte Lunge								rechte Fischer-Lunge										
POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD	POD20	Studiengruppe	1	2	3	4	5 MW	SD			
	FWS45	19	0	49	35	28	26,2	18,3		FWS45	36	23	33	14	28	26,8	8,7		FWS45	39	27	11	33	26	27,2	10,4
	FWS46	20	17	16	13	32	19,6	7,4		FWS46	21	32	17	19	15	20,8	6,6		FWS46	25	3	7	8	1	8,8	9,5
	FWS47	11	38	25	33	23	26,0	10,3		FWS47	33	44	42	18	8	29	15,6		FWS47	47	21	17	30	10	25,0	14,3
	FWS48	22	14	17	10	19	16,4	4,6		FWS48	6	17	17	0	9	9,8	7,3		FWS48	30	42	41	31	41	37,0	6,0
	FWS49	29	28	25	33	27	28,4	3,0		FWS49	31	40	36	36	11	30,8	11,5		FWS49	15	27	30	31	16	23,8	7,7
	FWS50	19	34	22	24	12	22,2	8,0		FWS50	17	0	10	26	32	17	12,7		FWS50	29	27	31	13	20	24,0	7,4
						Gesamt	23,1	4,6						Gesamt	22,4	8,0						Gesamt	24,3	9,1		

Tabelle 23: Immunhistochemische Messdaten der Studiengruppe an POD 60 CD117, VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-A und PDGFR- α

CD117								CD117									
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		
POD60	FW487	41	14	19	24	45	28,6	13,7	POD60	FW487	10	19	13	19	9	14,0	4,8
	FW488	17	15	21	16	21	18,0	2,8		FW488	12	30	17	25	18	20,4	7,1
	FW489	14	22	15	25	13	17,8	5,4		FW489	16	15	9	24	24	17,6	6,4
	FW539	24	16	9	17	27	18,6	7,1		FW539	20	32	38	18	12	24,0	10,7
	FW540	18	8	16	11	17	14,0	4,3		FW540	31	24	16	10	22	20,6	8,0
	FW541	25	6	15	33	17	19,2	10,3		FW541	27	18	7	19	15	17,2	7,2
	FW556	20	17	1	34	16	17,6	11,8		FW556	13	15	18	69	44	31,8	24,3
	FW557	5	5	14	14	23	12,2	7,5		FW557	23	52	37	32	29	34,6	11,0
	FW558	15	9	14	35	44	23,4	15,2		FW558	34	22	44	35	42	35,4	8,6
						Gesamt	18,8	4,8						Gesamt	24,0	8,0	
VEGFA								VEGFA									
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		
POD60	FW487	1	3	3	9	6	4,4	3,1	POD60	FW487	0	2	4	4	4	2,8	1,8
	FW488	2	0	5	2	1	2,0	1,9		FW488	12	8	0	2	5	5,4	4,8
	FW489	5	1	15	3	7	6,2	5,4		FW489	1	9	13	0	0	4,6	6,0
	FW539	0	2	3	4	4	2,6	1,7		FW539	11	4	2	2	7	5,2	3,8
	FW540	7	7	3	7	2	5,2	2,5		FW540	2	0	3	2	1	1,6	1,1
	FW541	0	6	2	3	4	3,0	2,2		FW541	4	2	9	6	4	5	2,6
	FW556	0	0	1	4	5	2,0	2,3		FW556	0	0	1	11	9	4,2	5,4
	FW557	5	3	13	2	17	8,0	6,6		FW557	13	8	4	6	6	7,4	3,4
	FW558	5	0	7	4	2	3,6	2,7		FW558	3	0	0	6	0	1,8	2,7
						Gesamt	4,1	2,0						Gesamt	4,2	1,9	
VEGFR-2								VEGFR-2									
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		
POD60	FW487	16	2	7	14	8	9,4	5,6	POD60	FW487	13	1	1	3	7	5,0	5,1
	FW488	9	19	10	16	14	13,6	4,2		FW488	5	5	8	15	7	8,0	4,1
	FW489	10	3	11	13	5	8,4	4,2		FW489	9	4	8	6	7	6,8	1,9
	FW539	22	3	11	6	7	9,8	7,4		FW539	5	6	4	3	7	5	1,6
	FW540	5	2	14	5	13	7,8	5,4		FW540	7	5	10	10	1	6,6	3,8
	FW541	7	0	0	10	9	5,2	4,9		FW541	3	1	2	4	3	2,6	1,1
	FW556	10	18	8	7	11	10,8	4,3		FW556	26	20	13	15	6	16	7,5
	FW557	2	0	4	1	6	2,6	2,4		FW557	2	0	0	4	2	1,6	1,7
	FW558	12	4	9	7	9	8,2	2,9		FW558	17	13	11	16	19	15,2	3,2
						Gesamt	8,4	3,2						Gesamt	7,4	5,1	
PDGFA								PDGFA									
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		
POD60	FW487	2	9	3	9	9	6,4	3,6	POD60	FW487	14	5	5	6	5	7,0	3,9
	FW488	12	0	9	14	14	9,8	5,8		FW488	11	6	5	10	12	8,8	3,1
	FW489	16	20	8	16	24	16,8	5,9		FW489	4	4	4	4	7	4,6	1,3
	FW539	2	0	4	28	2	7,2	11,7		FW539	6	7	9	8	6	7,2	1,3
	FW540	7	4	18	4	12	9,0	6,0		FW540	6	4	7	2	14	6,6	4,6
	FW541	2	10	50	8	3	14,6	20,1		FW541	10	3	5	3	8	5,8	3,1
	FW556	14	24	30	5	12	17,0	9,9		FW556	3	0	6	18	9	7,2	6,9
	FW557	2	0	0	4	2	1,6	1,7		FW557	18	15	3	0	4	8	8,0
	FW558	0	0	0	3	1	0,8	1,3		FW558	4	5	3	5	34	10,2	13,3
						Gesamt	9,2	6,0						Gesamt	7,3	1,3	
PDGFR- α								PDGFR- α									
linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD	linke Lunge		1	2	3	4	5 MW	SD		
POD60	FW487	21	13	12	14	12	14,4	3,8	POD60	FW487	12	14	25	21	32	20,8	8,2
	FW488	26	33	20	9	25	22,6	8,9		FW488	24	36	27	46	32	33,0	8,6
	FW489	14	9	8	15	16	18,0	3,6		FW489	12	8	15	16	18	13,8	3,9
	FW539	25	26	17	9	11	17,6	7,8		FW539	7	6	16	24	16	13,8	7,4
	FW540	16	16	13	12	17	14,8	2,2		FW540	39	29	19	25	14	25,2	9,6
	FW541	3	23	8	25	46	21,0	16,9		FW541	18	31	14	25	35	24,6	8,7
	FW556	0	16	6	14	16	10,4	7,1		FW556	31	13	24	38	24	26	9,3
	FW557	17	8	24	21	21	18,2	6,2		FW557	12	28	35	41	23	27,8	11,2
	FW558	19	15	18	16	17	17,0	1,6		FW558	34	48	18	19	24	28,6	12,6
						Gesamt	17,1	3,6						Gesamt	23,7	6,5	

9 Publikation und Posterpräsentation

Die vorliegende Arbeit diene als Grundlage für eine Publikation und eine Posterpräsentation. Unten aufgeführt sind die Veröffentlichung und das Poster zu finden. Bei der eingereichten Publikation bin ich als Zweitautorin genannt. Das angefertigte Poster wurde auf der 24. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft in Dresden (22.-24. Oktober 2015) vorgestellt.

Publikation:

Keil, Laura; Schaub, Anna-Lena; Hirt, Stephan W.; Schmid, Christof; Lehle, Karla; Suesskind-Schwendi, Marietta von (2019):

Synergism of imatinib, vatalanib and everolimus in the prevention of chronic lung allograft rejection after lung transplantation (LTx) in rats. In: *Histology and histopathology S.*: 18088.
DOI: 10.14670/HH-18-088

Original article:

Title, words; abstract, words; words (introduction to conclusion), figures, supplemental tables, references

Title:

Synergism of imatinib, vatalanib and everolimus in the prevention of bronchiolitis obliterans after lung transplantation (LTX) in rats

Key words

Chronic lung allograft dysfunction, bronchiolitis obliterans, vatalanib, imatinib, everolimus

Authors:

Laura Keil, Anna-Lena Schaun, Stephan W. Hirt, Christof Schmid, Karla Lehle, Marietta von Suesskind-Schwendi

Affiliations:

Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany (LK, ALS, SWH, CS, KL, MvSS)

Corresponding author:

Laura Keil

Laura.D.Keil@gmail.com

University Medical Center Regensburg

Franz-Josef-Strauss-Allee 11

93053 Regensburg

Germany

Summary

Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) still remains a major drawback in the outcome following lung transplantation (LTx). New therapeutic strategies are warranted. Growth factors and their receptors like platelet-derived growth factor-receptor (PDGFR) and vascular endothelial growth factor-receptor (VEGFR), may play a crucial role in the development of CLAD, especially bronchiolitis obliterans (BO) and vasculopathy. In this study, we used an orthotopic left lung transplantation model from Fischer (F344) to Wistar Kyoto (WKY) rats to investigate the effect of vatalanib alone, the dual combination of vatalanib and imatinib and a triple therapy consisting of vatalanib, imatinib and the mTOR inhibitor everolimus on the development of CLAD after LTx. With this trial we demonstrated that monotherapy with vatalanib attenuated mild and severe chronic vascular rejection, whereas dual therapy (vatalanib and Imatinib) after LTX also showed a significant reduction of interstitial fibrosis. By adding the mammalian target of rapamycin inhibitor (mTORI) everolimus, the effect of vatalanib and imatinib could additionally be increased. In conclusion, the combination of mTORI and RTKIs might be a possible strategy in the prevention of CLAD and BO.

Introduction

Lung transplantation has become an effective clinical treatment option for patients with end-stage lung diseases. In spite of improved surgical techniques, donor organ preservation solutions and immunosuppression regimes, CLAD still remains a severe complication after LTx and limits long term survival (Verleden et al. 2016). The current therapy mainly consists of augmentation or variation of immunosuppressive agents (Al-Githmi et al. 2006), which have little effect on the development of lung dysfunction (Tikkanen et al. 2006). Better therapeutic strategies are required in order to reduce proliferative and fibrotic processes in the long term follow up after lung transplantation. Nowadays a variety of chronic transplant rejection forms are known. The non-reversible type of CLAD comprises two forms, the non-reversible form of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and/or restrictive allograft syndrome (RAS) (Verleden et al. 2015). RAS patients display more interstitial damages like

peripheral lung fibrosis (Sato et al. 2011). Bronchiolitis obliterans (BO) describes the histological correlate of BOS and is characterized by the progressive luminal occlusion of small airways, often accompanied by intimal thickening and vascular sclerosis (Tikkanen et al. 2006; Stewart et al. 2007)). A wide range of immune and nonimmune risk factors for the development of BO have already been described (Nakajima et al. 2011).

It is commonly assumed that CLAD develops during two different phases: First tissue injury leads to inflammation, which is followed by an excessive fibroproliferative reaction that finally results into progressive scarring (Bonner 2004). This aberrant tissue repair is presumably promoted by growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Knoop und Estenne 2006; Bergmann et al. 1998). Several studies suggest a vital role of PDGF in the progression of CLAD and in lung fibrogenesis (Hertz et al. 1992; Ferrara et al. 2003; Abdollahi et al. 2005). It both works as a mitogen and survival factor of myofibroblasts and also plays an important role in collagen production (Bonner 2004). Furthermore, VEGF has a mitogenic effect on endothelial cells and is crucial for vascular growth (Ferrara 1999; Ferrara et al. 2003).

The effect of PDGF and VEGF is mediated via receptor RTKs, which are therefore possible targets to prevent or at least attenuate the development of CLAD. In this context, co-application of imatinib with the mTORI everolimus has already shown promising results after experimental LTx (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). In addition, the RTKIs imatinib and vatalanib successfully prevented obliterative airway disease in heterotopic tracheal transplantation (Tikkanen et al. 2006). As already described in detail earlier, this rodent model, commonly used to understand BO, has several drawbacks including lack of physiological ventilation and perfusion (Sato et al. 2009; Suesskind-Schwendi et al. 2013a). Moreover, one cannot examine small bronchioles or peripheral lung tissue, which are primarily affected during the development of both forms of CLAD (Jungraithmayr et al. 2013). In contrast, in our model we can not only examine chronic vascular and bronchiolar rejection, but also interstitial and peripheral fibrosis (Suesskind-Schwendi et al. 2017).

Another important risk factor for the development of BO is acute allograft rejection (Hirt et al. 1999; Estenne und Hertz 2002; Nakajima et al. 2011). Consequently, the treatment of acute rejection (AR) should prevent chronic rejection (CR) as well (Hirt et al. 1999). The mTORI everolimus reversed ongoing acute rejection under cyclosporine maintenance therapy in a stringent rat lung allotransplant model (Hausen et al. 2000). In contrast, monotherapy of everolimus could not delay the progression of acute rejection (Brunner et al. 2013).

Everolimus suppresses growth-factor stimulated proliferation of haematopoietic cells (T cells and B cells), vascular smooth muscle cells and human lung fibroblasts *in vitro* (Schuler et al. 1997; Hausen et al. 2000; Azzola et al. 2004) (Schuler et al. 1997; Azzola et al. 2004; Hausen et al. 2000) . and chronic allograft rejection (Suesskind-Schwendi et al. 2013b) in rat lung allografts. By adding the RTKI imatinib, everolimus has been shown to reduce severe acute vascular and bronchiolar rejection (Suesskind-Schwendi et al. 2013a).

Therefore we hypothesize, that co-application of imatinib, vatalanib and everolimus shows a better long term outcome after experimental orthotopic lung transplantation compared to monotherapy or dual-combination of these anti-proliferative and anti-fibrotic substances.

Material and methods

Lung transplantation

Left lung allografts were transplanted orthotopically from pathogen-free inbred male F344 (RT1^{lv}) rats to MHC (RT1)-incompatible WKY (RT1^l) rats (Charles River, Sulzfeld, Germany; 250 to 300 g) as described in preliminary work (Matsumura et al. 1995; Hirt et al. 1999; Süßkind-Schwendi et al. 2012). The animals were kept according to the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the European Union Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. For assessment of rejection, recipients were killed on postoperative day (POD) 20 to evaluate AR and on POD 60 to assess CR.

Experimental groups

The allograft recipients were divided into four experimental groups: group one received vatalanib (PTK/ZK, Novartis, Basel, Switzerland), group two a combination of imatinib (Glivec®, Novartis, Basel, Switzerland) and vatalanib (vata/ima), group three additionally received the mTORI everolimus (rapamycin-derivate-RAD, Certican®, Novartis, Basel) (vata/ima/RAD) and the control-group without treatment after LTx. Within each group, part of the animals was killed on POD 20 and on POD 60 (Table 1). Drugs were dissolved in polyethylene glycol and administered daily per gavage starting with the first preoperative day. The animals received no additional immunosuppression. The dosage of imatinib: (20 mg/kg bw from POD -1) and everolimus (2.5 mg/kg/day intraperitoneal from POD 7) was based upon the experience of the research group (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). Everolimus was administered later due to reduced wound healing and the clinical situation. The dosage of vatalanib (100 mg/kg from POD -1) was based on previous studies in rodent models (Tikkanen et al. 2006).

Histology

Transplanted left lungs and non-transplanted right lungs were removed at the time points indicated above. Thereafter, they were fixed in 5% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany), embedded in paraffin, and cut into 5 µm sections. For histopathological analysis, sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) to assess acute rejection and Sirius-red and Masson Goldner Trichrome (MGT) to assess chronic rejection. Acute rejection was graded as described in the revised working formulation of The International Society for Heart and Lung Transplantation (Stewart et al. 2007). In summary, acute vascular rejection was graded from A0 to A4 according to the intensity and distribution of perivascular mononuclear cells whereas acute airway inflammation/lymphocytic bronchiolitis was graded from B0 to B2R depending on infiltration of the submucosa by mononuclear cells and epithelial damage (table 2). Chronic vascular and airway rejection was classified according to the modified scale by Suesskind et al. 2012 (Süßkind-Schwendi et al. 2012). Briefly, chronic vascular

rejection was ranked from D0 to D2R by assessing the obstruction of the lumen and perivascular fibrosis and chronic airway rejection was graded from C0 to C2R according to intraluminal granulation tissue and peribronchiolar fibrosis. The exact classification has been described previously (Süßkind-Schwendi et al. 2012).

On top of that, interstitial fibrosis was also graded from 0 (normal lung) to 8 (complete interstitial fibrosis) according to the modified Ashcroft scale by Hübner et al. (Table 2) (Hübner et al. 2008).

Immunohistochemistry

The expression of PDGF-A, PDGFR- α , VEGF-A and VEGFR-2 was analyzed by immunohistochemistry using rabbit anti-rat as primary antibodies (PDGF-A: Santa Cruz sc7958, diluted 1:300; PDGFR- α : Santa Cruz sc338, diluted 1:1000; VEGF-A: BioLogo, diluted 1:80; VEGFR-2: Dianova, diluted 1:100) and goat anti-rat as secondary antibodies (Vector Laboratories, diluted 1:300) in 5 μ m sections. After deparaffinization, tissue sections were heated for 20 minutes in 1 x Target Retrieval Solution (Dako, Denmark) and treated with hydrogen peroxide to quench non-specific peroxidases. Thereafter, tissue sections were incubated in 10% normal goat serum (Sigma, Munich, Germany) to block unspecific binding-sites. Then, the sections were incubated with the primary antibody (Table 3) overnight at 4°C. After rinsing, sections were incubated with secondary goat-anti-rabbit antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA; diluted 1:300) and then with the tertiary antibody, an avidin-biotin-complex (Vector Laboratories, Burlingame, USA, diluted 1:100). HistoGreen (Linaris, Dossenheim, Germany) was used as a specific substrate chromogen. Counterstaining was performed with hematoxylin (Merck, Germany). The number of positive cells was counted in a blinded fashion by two independent operators using five randomly selected microscopic power fields (200x, diameter 1.1 mm).

Statistical analysis

Histological and immunohistochemical scoring was performed by two independent investigators in a blinded fashion. Data were expressed as means \pm standard deviation (SD). The Kruskal-Wallis test was used to compare the non-treated control group with the study groups (vatalanib, vatalanib/imatinib, vatalanib/imatinib/everolimus). As non-parametric statistical hypothesis test, Wilcoxin-Mann-Whitney-U-test was used to decide whether one experimental group improved after therapy as compared to another group. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Survival and general health

All successfully transplanted rats showed good general conditions (normal social and grooming behavior, acceptable feed consumption, inconspicuous defecation). Drugs were well tolerated.

As shown in figure 1, independent of drug treatment, early after LTx feed consumption was restricted (data not shown) and resulted in a significant decrease in mean body weight. Rats from the control group, vatalanib group and vata/ima group regained their initial body weight within 15, 14, and 16 days, respectively. Afterwards, body weight increased significantly over time ($p \leq 0.05$ each) in these groups. In contrast, additional application of everolimus on POD 7 to the vata/ima treated animals caused a secondary weight loss up to POD 30. Animals in this group never regained their initial body weight. Compared to the other groups animals were significantly lighter in weight at the end of the trail (on POD 60 compared to vata/ima: $p < 0.0001$; compared to vata $p = 0.001$; compared to control: $p = 0.004$). Apart from that, the animals' general health was unaffected and they showed no altered feeding behavior, urine and faeces production was equally normal. Two animals showed crusty skin lesions in the area of the elbow which vanished after a singular treatment with Braunol® (Braun, Melsungen, Germany). Nevertheless, all animals had pale mucous membranes at the time of organ harvesting.

Histology

Effect of vatalanib, imatinib and everolimus on acute allograft rejection

Figures 2 a-d show representative micrographs from allografts of all study groups on POD 20.

In the control group, alloimmune activation peaked at that time. Severe acute vascular (ISHLT-A3-4) and airway rejection (ISHLT-B1R-2R) dominated the tissue sections of all study groups (Fig. 2, a-d). Prominent alveolar pneumocyte damage with varying degrees of organization in combination with diffuse perivascular, interstitial, and airway infiltration of mononuclear cells and endothelialitis, dominated the sections on POD 20. Bronchiolar epithelial hyperplasia, epithelial destruction and vascular obstruction by mononuclear cells were common (Fig. 2a).

In addition to the acute inflammatory response, first signs of chronic rejection could be detected in all groups on POD 20. Especially in the control group, there was evidence of chronic vascular rejection. A multitude of small and medium sized vessels were obstructed by leucocytes. Incipient subendothelial and perivascular fibrosis of the vessels were diagnosed as first signs of severe chronic vascular rejection (D2R). Chronic vascular rejection could be reduced by increasing the number of drug applications. Within the vatalanib group, a multitude of small vessels was obstructed by mononuclear cells adhered to the endothelium (D1: $60 \pm 19.24\%$, Fig. 2b). However, compared to the control group, there were no severe grade rejected vessels to be found ($p=0,015$, Fig. 4). In the vata/ima group, half of the vessels were completely free of chronic alterations (D0: $51.25 \pm 28.35\%$), the effect being increased by adding everolimus (D0: $61.12 \% \pm 33.71\%$, Fig. 2d). All in all, dual application (vata/ima) increased the percentage of unaffected vessels, lowered the amount of mild CR and significantly reduced severe CR already on POD 20 ($p=0,029$) whereas triple application (vata/ima/RAD) significantly reduced both mild and severe chronic vascular rejection ($p(D1)=0.002$ and $p(D2)=0.015$, Fig. 4). The latter was also significantly superior to the vatalanib group regarding mild vascular rejection ($p=0.009$, Fig. 4).

Investigation of terminal bronchioles on POD 20 showed that on the bronchiolar level, mild rejection with intraluminal signs of granulation tissue, fibroblasts and fibrin filaments dominated the sections of the control group (C1: $78,5\% \pm 40,17\%$). There was no evidence

of severe chronic bronchiolar rejection on POD 20. In comparison to the control group, vatalanib reduced chronic bronchiolar rejection, although no significant improvement could be observed (C0: $52.17 \pm 45.78\%$ as compared to $4.83 \pm 11.84\%$, Fig. 4). In contrast, the percentage of unaltered bronchioles was significantly higher in the vata/ima group than in the control group ($p=0,008$, Fig. 2c and 4). This effect was further increased by everolimus. Triple application significantly reduced the amount of bronchioles affected by mild CR as compared to the control group already on POD 20 ($p(C1)=0.041$) $p(D1)= p=0.002$ and $p(D2)= p=0.015$, Fig. 4). Moreover, no severe chronic bronchiolar rejection was found in any lung and the percentage of non-altered bronchioles was significantly increased in comparison to the control group ($p=0.015$, Fig. 5), analogous to the vata/ima group.

On POD 20, all allografts presented beginning interstitial fibrosis comparable to the control group with thickening of alveolar septa and single fibrotic masses (grade of interstitial fibrosis: 4 ± 0.63). Aside from this, exudate and bleeding into alveolar spaces was commonly seen. Despite this, unaffected lung parenchyma was more commonly seen in the vata/ima group than in the control and vatalanib group and two allografts showed no augmentation of connective tissue at all (mean grade of interstitial fibrosis: 2.5 ± 1.69). By adding RAD, interstitial fibrosis could significantly be decreased already on POD 20 in comparison to the vatalanib and control group ($p=0.004$ and $p=0.015$, fig. 5).

Effect of vatalanib, imatinib and everolimus on chronic allograft rejection

On POD 60, chronic alterations dominated whereas inflammatory infiltrations had receded. In the control group, mononuclear cell infiltrates had vanished. Instead, perivascular fibrosis, intimal thickening, and destruction of the epithelium were commonly seen. All vessels that were investigated in the section were affected by chronic fibrotic disorders (vasculopathy $100\% \pm 0$). However, as opposed to the control group, the inflammatory process persisted in all drug-applied groups on POD 60 (Fig. 3c). $76 \pm 36.83\%$ of the vessels of the vatalanib group developed distinct perivascular fibrosis and/or fibrointimal thickening. One allograft even exhibited complete fibrosis and vasculopathy. Despite this, vasculopathy was

significantly less pronounced within the vatalanib-group as compared to the control group on POD 60 ($p(D1R)=0,035$, $p(D2R)=0,035$, Fig. 3a and 4), whereas the combination of vatalanib and imatinib achieved significantly better results concerning all three grades of rejection. Finally, the vata/ima/RAD group significantly exceeded dual therapy by lowering severe vascular rejection ($p<0.0001$) as well as in preventing vascular rejection altogether ($p(D0)<0.0001$, Fig. 4).

Regarding chronic bronchiolar rejection, all untreated animals exhibited C2R alterations. Peribronchiolar fibrosis, destruction of the lamina muscularis and lamina epithelialis associated with luminal obstruction due to granulation tissue were commonly seen. In contrast, vatalanib lowered the number of bronchioles affected by chronic alterations. Though three allografts had completely developed BO, a small amount of bronchioles remained free of chronic rejection on POD 60 (C0: $6 \pm 12.37\%$, Fig. 3a). But only the combination with imatinib significantly reduced chronic bronchiolar rejection. This effect was even exceeded in the triple combination group: It showed significantly superior results in the category C0 and C2R as compared to dual therapy and vatalanib alone ($p(C0)=0.01$ and $p(C2R)=0.008$ and $p(C0)<0.0001$ and $p(C2R)=0.02$, respectively; Fig. 4).

On POD 60, interstitial fibrosis could be significantly reduced in all intervention groups ($p = 0.035$ (vatalanib alone), $p=0.001$ (vata/ima) and $p=0,001$ (vata/ima/RAD) in comparison to the control group (Fig. 5).

Immunohistochemistry

Receptor and ligand expression in non-treated allografts

PDGF-A, PDGFR- α , and VEGFR-2 were all expressed in the lungs of the control group. Immunohistochemical analysis showed strong PDGF-A expressions in fibroblasts, alveolar macrophages, and other mononuclear cells and moderate expression in bronchiolar epithelium and vascular endothelium on POD 20 and POD 60. Strong expression of VEGFR-2 and PDGFR- α was also detected in alveolar macrophages and other mononuclear cells on POD 20, but VEGFR-2 expression decreased on POD 60 (Table 4 and 5). In contrast, there

was only weak expression of PDGF-A in type I cells on POD 20, and apart from that no expression of ligands or their receptors in type I or II cells on POD 20 or 60. Also, only weak to no expression was observed in metaplastic epithelial cells.

Receptor and ligand expression in the vatalanib-treated allografts

In the vatalanib group, PDGF-A, VEGF-A, and VEGFR-2 were all strongly expressed in mononuclear cells other than alveolar macrophages on POD 20, whereas there was no expression of ligands or their receptors in type I or II cells. Except for PDGF-A expression in metaplastic epithelial cells, there were only slight differences between POD 20 and 60. No significant difference between the vatalanib group and the control group was to be found.

Receptor and ligand expression in the vatalanib/imatinib-treated allografts

Generally, there was lower expression of growth factors and their receptors in the vata/ima group as compared to the control or vatalanib group. For example, as opposed to the control group, fibroblast and endothelial cells were PDGF-A negative on POD 20 and POD 60 (Table 4-5). Expression of VEGFR-2 was significantly decreased on POD 20 as compared to the vatalanib group (Fig. 6, $p=0.003$).

Receptor and ligand expression in the vatalanib/imatinib/RAD-treated allografts

Similar to the vata/ima-group, there was generally lower expression of PDGF-A, PDGFR- α , and VEGFR-2 than in the vatalanib and control group. Strong expression of PDGF-A and VEGFR-2 was found in the bronchiolar epithelium and only moderate to weak expression of all investigated growth factors and receptors in macrophages and other mononuclear cells on POD 20 and POD 60. On POD 20, VEGFR-2 was significantly decreased as compared to the vatalanib group ($p=0.004$, Fig. 6). In contrast, PDGFR- α was significantly higher in the vata/ima/RAD group than in the vata/ima group ($p=0.02$, Fig. 6). On POD 60, there was a significantly lower expression of PDGF-A and VEGFR-2 as compared to the control group ($p=0.037$ and $p=0.038$, Fig. 6).

Discussion

The present study describes the efficiency of the co-application of the two RTKIs, vatalanib and imatinib, alone and in combination with the mTORI everolimus in the development of CLAD after left lung allo-transplantation in a rat model. We demonstrated that the use of vatalanib alone significantly attenuated chronic vascular rejection whereas the combination with imatinib almost completely prevented the development of BO. By adding everolimus, vascular and bronchiolar rejection could be reduced even further. In contrast, acute allograft rejection could not be reduced by either of the treatment groups.

CLAD is predominantly a consequence of chronic rejection, resulting in one of three phenotypes: bronchiolitis obliterans (BO), restrictive allograft rejection syndrome (RAS) and neutrophilic reversible allograft dysfunction (NRAD) (Gauthier et al. 2016). While the first two are irreversible, NRAD can be attenuated by azithromycin and will not be discussed in this study.

RAS is hallmarked by peripheral lung fibrosis as well as diffuse alveolar damage and approximately accounts for 30% of CLAD (Sato et al. 2011; Verleden et al. 2015). To further understand its development and possible treatment options, an animal model is needed, which shows both BO and RAS. As shown previously, the left lung LTx rat model from F344 to WKY rats exhibits histological features of BO and RAS (Suesskind-Schwendi et al. 2017). In the present study, we were able to demonstrate that interstitial and peripheral fibrosis could be significantly reduced by the treatment with vatalanib on POD 60. This effect could further be enhanced by adding imatinib and both imatinib and everolimus. Consequently, the RTKIs and the mTORI used not only prevent the development of BO but also of RAS, targeting both aspects of CLAD.

Several studies have demonstrated that growth factors signalling cascades targeted by imatinib and vatalanib are involved in the pathogenesis of CLAD after LTx. Al-Dossari et al. demonstrated that PDGF and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induce fibroproliferation, occluding the tracheal lumen in tracheal isografts in mice (al-Dossari et al. 1995).

Significantly increased expression of FGF-1, FGF-2, and PDGF-B but not PDGF-A were found during BO 4 weeks after transplantation in a mouse model of heterotopic tracheal transplantation (Aris et al. 2002). Tikkanen et al. already showed the beneficial effect of imatinib and vatalanib on the development of obliterative airway disease using a heterotopic tracheal model. Blocking VEGF receptor tyrosine kinase activity with vatalanib (PTK/ZK) in combination with inhibiting PDGF receptor tyrosine kinase activity with imatinib significantly attenuated the development of tracheal occlusion in an early or prophylactic treatment regimen (Tikkanen et al. 2006). On top of that, VEGFR-1-inhibition also reduced vasculopathy after heart transplantation in mice (Chatur et al. 2016), indicating a potentially beneficial effect on chronic vascular rejection after transplantation. In a large animal model of BO, Alho et al. showed that the expression of PDGF-A, PDGF receptors, and transforming growth factor β were up-regulated in allografts that were rejected (Alho et al. 2007). By targeting PDGF receptors, imatinib treatment reduced the rate of obliterative processes in this model. Our own study group indicated the role of elevated growth factors and receptors in the pathogenesis of CLAD (Suesskind-Schwendi et al. 2017). In a previous study, our group also showed in an orthotopic lung transplantation model in the rat that early application of imatinib decreased the number of animals with BO (Suesskind-Schwendi et al. 2013a) whereas monotherapy with vatalanib significantly reduced vasculopathy in the present study. These findings suggest a synergistic effect of imatinib and vatalanib with imatinib mainly affecting the bronchioles and vatalanib the vessels. Similarly, the additional application of a mTORI (everolimus) to imatinib furthermore reduced the number of animals with vasculopathy (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). Moreover, imatinib reduced collagen deposit after lung transplantation (Suesskind-Schwendi et al. 2013a), indicating an anti-fibrotic effect of imatinib.

The effect of imatinib and vatalanib, inhibitors of PDGFR and VEGFR, on the development of CLAD could lead to the hypothesis that, by inhibiting tyrosine kinase activity after ligand binding, they would also influence their expression. As demonstrated previously, the

treatment with nintedanib significantly lowered the expression of PDGF-A, VEGF-A and their receptors (Suesskind-Schwendi et al. 2017). Nintedanib is also a tyrosine kinase inhibitor, inhibiting VEGFR-1, -2 and -3, PDGFR- α and - β and fibroblast growth factor receptor-1, -2 and -3 (FGFR-1, -2 and -3) (Hilberg et al. 2008). Therefore we hypothesized that imatinib and vatalanib have a similar effect on the expression of growth factors and their receptors. Contrary to our assumption, immunohistological analysis showed no conclusive difference in the expression of PDGF-A, PDGFR- α , and VEGFR-2 between allografts in the treatment groups and the control group. Although there was generally lower expression of receptors and ligands in the treated allografts, a significant reduction as compared to the control group was only found in the vata/ima/RAD group on POD 60. These findings correlate with the results of Tikkanen et al. and Nykänen et al., who observed no effect of vatalanib and imatinib on the expression of VEGF or PDGF-A. Unfortunately, they do not refer to the expression of their receptors (Tikkanen et al. 2006; Nykanen et al. 2005). In addition, it is possible that receptor and ligand expression declines in the control group due to progressive fibroproliferation. As a consequence, fewer cells can produce proteins such as growth factors, whereas the allografts of the treatment groups exhibited nearly unaffected lung tissue with living cells. As we described previously, blocking only growth factors with nintedanib did not have any effect on the expression of CLAD and resulted in the same histologic features as detected in the control group (Suesskind-Schwendi et al. 2017). This may be the reason for the different findings concerning the significance between treatment group and control group in the present study.

Unfortunately, immunohistology did not show results conclusive enough to understand the mechanism of action of vatalanib and imatinib in our model. In addition, a RT-PCR on POD 20 and 60 showed no significant differences in the expression of PDGFA, VEGF-A, and their receptors between allografts, non-transplanted and naïve lungs (data not shown). These results lead to the assumption that imatinib and vatalanib may reduce CLAD via other mechanisms.

Supporting this theory, we had suggested that nintedanib would reduce the development of BO and interstitial fibrosis due to its inhibition of growth factors (Suesskind-Schwendi et al. 2017). The lack of efficacy in the prevention of CLAD suggests that the antifibrotic effect of imatinib and vatalanib is mediated through other pathways than blocking VEGFR and PDGFR.

One can also conclude that PDGF and VEGF may be expressed already in an earlier phase of BO. For instance, Tikkanen found an elevated level of VEGF on POD 10 (Tikkanen et al. 2006).

In addition, PDGF and VEGF could only play a minor role, if any, in this experimental model of BO. Other factors may in contrast be responsible for the fibroproliferative process and the effect of imatinib and vatalanib could thus also be due to alternative ways. For instance, imatinib also blocks c-Kit, Abl, Bcr-Abl and c-Fms in addition to the PDGF-receptors (Buchdunger et al. 2002; Dewar et al. 2005) while vatalanib likewise inhibits c-Kit and c-Fms (Wood et al. 2000). Supporting this theory, c-Kit-positive mast cells have already been found to play a possible role in BO (Fuehrer et al. 2009). Ding et al. found elevated levels of its ligand, stem cell factor (SCF), in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice (Ding et al. 2013), indicating a potential role in the pathogenesis of fibrosis. Furthermore, TGF- β is known to mediate fibrotic processes through stimulating collagen deposit (Bonner 2004) and was also shown to promote fibroblast proliferation via activation of c-Abl (Daniels et al. 2004; Wang et al. 2005). C-Abl itself was shown to promote collagen production that could be inhibited by imatinib (Wang et al. 2005; Pannu et al. 2008). Watanabe et al. found that by inhibiting c-Abl, imatinib reduced the number of fibrocytes and suppressed the differentiation of CD14⁺ monocytes and the fibrocyte migration in a murine heterotopic tracheal model of BO (Watanabe et al. 2017). All these findings suggest that other pathways than VEGFR and PDGFR activation may play a crucial role in the pathogenesis of BO.

As described previously, the co-application of everolimus and imatinib significantly reduces acute vascular and bronchiolar rejection on POD 20 in our left orthotopic rat LTx model (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). In contrast, the present study did not show reduced acute rejection after treatment with two RTKIs and everolimus. We speculated that the different time of application – on POD 7 in the present study versus POD 14 – may have contributed to the divergent results. Several studies indicate pulmonary toxicity with the administration of mTORIs, like everolimus, including interstitial pneumonitis and BO (Solazzo et al. 2016; Parada et al. 2011; Fine und Kushwaha 2016). Despite of the unaffected clinical appearance of our rats, we can assume that the early application of everolimus may influence the histological presentation and lead to enhanced inflammatory infiltration. On the other hand, one can also assume that maybe a more sensitive classification system would show more distinct differences. For instance, counting CD4⁺ and CD8⁺ cells could help to ameliorate accuracy in grading acute rejection (Tikkanen et al. 2006). However, the additional application of everolimus showed significantly superior results in the prevention of BO as compared to the combined treatment with vatalanib and imatinib, indicating a synergic antifibrotic and antiproliferative effect of the mTORI and the RTKIs as already described earlier (Suesskind-Schwendi et al. 2013a).

In order to assess possible side effects, we also compared the postoperative weight development in all study groups. Interestingly, in spite of significantly reducing BO and vasculopathy, the vata/ima-treated animals suffered from secondary weight loss at the end of the tested time period. Moreover, the additional administration of everolimus even prevented the animals from regaining their preoperative weight altogether. One could assume that the application of a VEGFR-inhibitor would disturb angiogenesis. Nevertheless, research indicates the influence of VEGF on vascular remodelling, but not on neo-vascularization (Tikkanen et al. 2006; Belperio et al. 2005). In spite of generally being well-tolerated drugs (Wood et al. 2000; Manley et al. 2002; Scott et al. 2007), vatalanib and imatinib are both known to cause diarrhoea and nausea (Joensuu et al. 2011; Guilhot 2004). Hence, maybe

the combination of both drugs leads to secondary weight loss after long term application. The decrease in body weight by treatment with everolimus has already been described earlier (Suesskind-Schwendi et al. 2013b). On top of that, animals also exhibited pale mucous membranes. In future studies, a dose reduction of everolimus should be taken into consideration, presumably reducing negative side effects on wound healing and postoperative weight development (Fine und Kushwaha 2016).

The transferability to humans is limited due to the persistence of inflammation (Suesskind-Schwendi et al. 2013a) and the possibly different role of growth factors in rats. For instance, PDGFR- α underlies other regulation mechanism in humans (Bonner 2004). Future studies are imperative to determine the role of proteins other than PDGF-A and VEGF, such as c-Abl, c-KIT, c-Fms and TGF- β , in the pathogenesis of CLAD and in our animal model of LTx. However, our model allowed studying interstitial lung fibrosis, the development of BO after LTx and possible treatment options for CLAD (Suesskind-Schwendi et al. 2013a; Süßkind-Schwendi et al. 2012; Hirt et al. 1999).

In conclusion, the dual therapy with the RTKIs imatinib and vatalanib significantly reduces not only chronic vascular and bronchiolar rejection but also interstitial fibrosis after rat LTx. This effect is synergistically increased by adding the mTORI everolimus. Therefore, the combination of mTORI and RTKIs might be a possible strategy in the prevention of BO and chronic lung allograft rejection. Finally, our rat LTX model may contribute to further understand and find treatment options for RAS as a novel form of CLAD.

Acknowledgements

Heike Norman provided language assistance. The authors were fully responsible for all content and editorial descisions.

Funding

This study was supported by Novartis Pharma GmbH, Sülzetal, Germany.

Literaturverzeichnis

- Abdollahi, Amir; Li, Minglun; Ping, Gong; Plathow, Christian; Domhan, Sophie; Kiessling, Fabian et al. (2005): Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. In: *J Exp Med* 201 (6), S. 925–935. DOI: 10.1084/jem.20041393.
- al-Dossari, G. A.; Jessurun, J.; Bolman, R. M.; Kshetry, V. R.; King, M. B.; Murray, J. J.; Hertz, M. I. (1995): Pathogenesis of obliterative bronchiolitis. Possible roles of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor. In: *Transplantation* 59 (1), S. 143–145.
- Al-Githmi, Iskander; Batawil, Nadia; Shigemura, Norihisa; Hsin, Michael; Lee, Tak Wai; He, Gue-Wei; Yim, Anthony (2006): Bronchiolitis obliterans following lung transplantation. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 30 (6), S. 846–851. DOI: 10.1016/j.ejcts.2006.09.027.
- Alho, Hanni S.; Maasilta, Paula K.; Vainikka, Tiina; Salminen, Ulla-Stina (2007): Platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, and connective tissue growth factor in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. In: *Experimental lung research* 33 (6), S. 303–320. DOI: 10.1080/01902140701539745.
- Aris, Robert M.; Walsh, Sean; Chalermkulrat, Worakij; Hathwar, Vasantha; Neuringer, Isabel P. (2002): Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 166 (3), S. 417–422. DOI: 10.1164/rccm.2102106.
- Azzola, Andrea; Havryk, Adrian; Chhajed, Prashant; Hostettler, Katrin; Black, Judith; Johnson, Peter et al. (2004): Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. In: *Transplantation* 77 (2), S. 275–280. DOI: 10.1097/01.TP.0000101822.50960.AB.
- Belperio, John A.; Keane, Michael P.; Burdick, Marie D.; Gomperts, Brigitte; Xue, Ying Ying; Hong, Kurt et al. (2005): Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (5), S. 1150–1162. DOI: 10.1172/JCI24233.
- Bergmann, M.; Tiroke, A.; Schafer, H.; Barth, J.; Haverich, A. (1998): Gene expression of profibrotic mediators in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. In: *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* 32 (2), S. 97–103.
- Bonner, James C. (2004): Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. In: *Cytokine & growth factor reviews* 15 (4), S. 255–273. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- Brunner, Elisabeth; Lehle, Karla; Hirt, Stephan W.; Schmid, Christof; Suesskind-Schwendi, Marietta von (2013): Everolimus's influence on persistent acute rejection after experimental lung transplantation. In: *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 22 (3), S. 355–359.
- Buchdunger, Elisabeth; O'Reilly, Terence; Wood, Jeanette (2002): Pharmacology of imatinib (STI571). In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 38 Suppl 5, S. 36.
- Chatur, Safia; Wong, Brian W-C; Carthy, Jon M.; McManus, Bruce M. (2016): Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces cardiac allograft vasculopathy. In: *The Journal of heart and lung*

transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation 35 (9), S. 1124–1130. DOI: 10.1016/j.healun.2016.04.011.

Daniels, Craig E.; Wilkes, Mark C.; Edens, Maryanne; Kottom, Ted J.; Murphy, Stephen J.; Limper, Andrew H.; Leof, Edward B. (2004): Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 114 (9), S. 1308–1316. DOI: 10.1172/JCI19603.

Dewar, Andrea L.; Cambareri, Antony C.; Zannettino, Andrew C. W.; Miller, Bernadette L.; Doherty, Kathleen V.; Hughes, Timothy P.; Lyons, A. Bruce (2005): Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. In: *Blood* 105 (8), S. 3127–3132. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3967.

Ding, Lin; Dolgachev, Vladislav; Wu, Zhuang; Liu, Tianju; Nakashima, Taku; Wu, Zhe et al. (2013): Essential role of stem cell factor-c-Kit signalling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In: *J. Pathol.* 230 (2), S. 205–214. DOI: 10.1002/path.4177.

Estenne, Marc; Hertz, Marshall I. (2002): Bronchiolitis Obliterans after Human Lung Transplantation. In: *Am J Respir Crit Care Med* 166 (4), S. 440–444. DOI: 10.1164/rccm.200201-003PP.

Ferrara, N. (1999): Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 77 (7), S. 527–543.

Ferrara, Napoleone; Gerber, Hans-Peter; LeCouter, Jennifer (2003): The biology of VEGF and its receptors. In: *Nature medicine* 9 (6), S. 669–676. DOI: 10.1038/nm0603-669.

Fine, Nowell M.; Kushwaha, Sudhir S. (2016): Recent Advances in Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Use in Heart and Lung Transplantation. In: *Transplantation* 100 (12), S. 2558–2568. DOI: 10.1097/TP.0000000000001432.

Fuehrer, Neil E.; Marchevsky, Alberto M.; Jagirdar, Jaishree (2009): Presence of c-KIT-Positive Mast Cells in Obliterative Bronchiolitis From Diverse Causes. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133 (9), S. 1420–1425. DOI: 10.1043/1543-2165-133.9.1420.

Gauthier, Jason M.; Hachem, Ramsey R.; Kreisel, Daniel (2016): Update on Chronic Lung Allograft Dysfunction. In: *Current transplantation reports* 3 (3), S. 185–191. DOI: 10.1007/s40472-016-0112-y.

Guilhot, F. (2004): Indications for Imatinib Mesylate Therapy and Clinical Management. In: *The Oncologist* 9 (3), S. 271–281. DOI: 10.1634/theoncologist.9-3-271.

Hausen, B.; Boeke, K.; Berry, G. J.; Christians, U.; Schüler, W.; Morris, R. E. (2000): Successful treatment of acute, ongoing rat lung allograft rejection with the novel immunosuppressant SDZ-RAD. In: *The Annals of Thoracic Surgery* 69 (3), S. 904–909.

Hertz, M. I.; Henke, C. A.; Nakhleh, R. E.; Harmon, K. R.; Marinelli, W. A.; Fox, J. M. et al. (1992): Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21), S. 10385–10389.

Hilberg, Frank; Roth, Gerald J.; Krssak, Martin; Kautschitsch, Susanna; Sommergruber, Wolfgang; Tontsch-Grunt, Ulrike et al. (2008): BIBF 1120. Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. In: *Cancer research* 68 (12), S. 4774–4782. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6307.

- Hirt, S. W.; You, X. M.; Moller, F.; Boeke, K.; Starke, M.; Spranger, U.; Wottge, H. U. (1999): Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: implication of acute rejection and the time point of treatment. In: *J Heart Lung Transplant* 18 (6), S. 542–548.
- Hübner, Ralf-Harto; Gitter, Wolfram; El Mokhtari, Nour Eddine; Mathiak, Micaela; Both, Marcus; Bolte, Hendrik et al. (2008): Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. In: *BioTechniques* 44 (4), S. 507. DOI: 10.2144/000112729.
- Joensuu, H.; Braud, F. De; Grignani, G.; Pas, T. De; Spitalieri, G.; Coco, P. et al. (2011): Vatalanib for metastatic gastrointestinal stromal tumour (GIST) resistant to imatinib: final results of a phase II study. In: *British journal of cancer* 104 (11), S. 1686–1690. DOI: 10.1038/bjc.2011.151.
- Jungraithmayr, Wolfgang; Jang, Jae-Hwi; Schrepfer, Sonja; Inci, Ilhan; Weder, Walter (2013): Small animal models of experimental obliterative bronchiolitis. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48 (6), S. 675–684. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0379TR.
- Knoop, Christiane; Estenne, Marc (2006): Acute and chronic rejection after lung transplantation. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27 (5), S. 521–533. DOI: 10.1055/s-2006-954609.
- Manley, P. W.; Cowan-Jacob, S. W.; Buchdunger, E.; Fabbro, D.; Fendrich, G.; Furet, P. et al. (2002): Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 38 Suppl 5, S. 27.
- 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. In: *Transplantation* 59 (11), S. 1509–1517.
- Nakajima, Takeshi; Palchevsky, Vyachesav; Perkins, David L.; Belperio, John A.; Finn, Patricia W. (2011): Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. In: *Seminars in immunopathology* 33 (2), S. 135–156. DOI: 10.1007/s00281-011-0249-9.
- Nykanen, Antti I.; Krebs, Rainer; Tikkanen, Jussi M.; Raisky, Olivier; Sihvola, Roope; Wood, Jeanette et al. (2005): Combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor inhibition in rat cardiac allografts: beneficial effects on inflammation and smooth muscle cell proliferation. In: *Transplantation* 79 (2), S. 182–189.
- Pannu, Jaspreet; Asano, Yoshihide; Nakerakanti, Sashidhar; Smith, Edwin; Jablonska, Stefania; Blaszczyk, Maria et al. (2008): Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate. In: *Arthritis and rheumatism* 58 (8), S. 2528–2537. DOI: 10.1002/art.23698.
- Parada, M. T.; Alba, A.; Sepúlveda, C.; Melo, J. (2011): Long-term use of everolimus in lung transplant patients. In: *Transplantation Proceedings* 43 (6), S. 2313–2315. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.06.010.
- Sato, M.; Keshavjee, S.; Liu, M. (2009): Translational Research: Animal Models of Obliterative Bronchiolitis after Lung Transplantation. In: *American Journal of Transplantation* 9. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02770.x.
- Sato, Masaaki; Waddell, Thomas K.; Wagnetz, Ute; Roberts, Heidi C.; Hwang, David M.; Haroon, Ayesha et al. (2011): Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the*

International Society for Heart Transplantation 30 (7), S. 735–742. DOI: 10.1016/j.healun.2011.01.712.

Schuler, W.; Sedrani, R.; Cottens, S.; Häberlin, B.; Schulz, M.; Schuurman, H. J. et al. (1997): SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. In: *Transplantation* 64 (1), S. 36–42.

Scott, Edwina N.; Meinhardt, Gerold; Jacques, Christian; Laurent, Dirk; Thomas, Anne L. (2007): Vatalanib: the clinical development of a tyrosine kinase inhibitor of angiogenesis in solid tumours. In: *Expert opinion on investigational drugs* 16 (3), S. 367–379. DOI: 10.1517/13543784.16.3.367.

Solazzo, A.; Botta, C.; Nava, F.; Baisi, A.; Bonucchi, D.; Cappelli, G. (2016): Interstitial Lung Disease After Kidney Transplantation and the Role of Everolimus. In: *Transplantation Proceedings* 48 (2), S. 349–351. DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.12.039.

Stewart, Susan; Fishbein, Michael C.; Snell, Gregory I.; Berry, Gerald J.; Boehler, Annette; Burke, Margaret M. et al. (2007): Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. In: *J Heart Lung Transplant* 26 (12), S. 1229–1242. DOI: 10.1016/j.healun.2007.10.017.

Suesskind-Schwendi, M. von; Valenti, Verena; Haneya, Assad; Puhler, T.; Bewig, B.; Schmid, C. et al. (2013a): Synergism of imatinib mesylate and everolimus in attenuation of bronchiolitis obliterans after rat LTX. In: *Histology and histopathology* 28 (10), S. 1273–1284.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Boxhammer, Elke; Hirt, Stephan W.; Schreml, Stephan; Schmid, Christof; Wollin, Lutz; Lehle, Karla (2017): The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. In: *Exp. Lung Res.* 43 (6-7), S. 259–270. DOI: 10.1080/01902148.2017.1354408.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Brunner, Elisabeth; Hirt, Stephan W.; Diez, Claudius; Ruemmele, Petra; Puehler, Thomas et al. (2013b): Suppression of bronchiolitis obliterans in allogeneic rat lung transplantation--effectiveness of everolimus. In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 65 (4), S. 383–389. DOI: 10.1016/j.etp.2011.12.002.

Süßkind-Schwendi, M. von; Ruemmele, P.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2012): Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. In: *Exp. Lung Res.* 38 (3), S. 111–123. DOI: 10.3109/01902148.2012.656820.

Tikkanen, Jussi M.; Hollmén, Maria; Nykänen, Antti I.; Wood, Jeanette; Koskinen, Petri K.; Lemström, Karl B. (2006): Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174 (10), S. 1145–1152. DOI: 10.1164/rccm.200601-0440C.

Verleden, Geert M.; Vos, Robin; Vanaudenaerde, Bart; Dupont, Lieven; Yserbyt, Jonas; van Raemdonck, Dirk; Verleden, Stijn (2015): Current views on chronic rejection after lung transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation.* DOI: 10.1111/tri.12579.

Verleden, Stijn E.; Sacreas, Annelore; Vos, Robin; Vanaudenaerde, Bart M.; Verleden, Geert M. (2016): Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. In: *Chest* 150 (1), S. 219–225. DOI: 10.1016/j.chest.2016.04.014.

Wang, Shinong; Wilkes, Mark C.; Leof, Edward B.; Hirschberg, Raimund (2005): Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (1), S. 1–11. DOI: 10.1096/fj.04-2370com.

Watanabe, Satoshi; Kasahara, Kazuo; Waseda, Yuko; Takato, Hazuki; Nishikawa, Shingo; Yoneda, Taro et al. (2017): Imatinib ameliorates bronchiolitis obliterans via inhibition of fibrocyte migration and differentiation. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 36 (2), S. 138–147. DOI: 10.1016/j.healun.2016.06.001.

Wood, J. M.; Bold, G.; Buchdunger, E.; Cozens, R.; Ferrari, S.; Frei, J. et al. (2000): 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. In: *Cancer research* 60 (8), S. 2178–2189.

Tables and Figures

Table 1: Experimental groups

Experimental group	Postoperative day (POD)	Number of animals (n)
vata/ima/RAD- group (triple combination group)	20	6
	60	9
vata/ima-group (dual combination group)	20	8
	60	11
Vatalanib-group	20	6
	60	7
Control-group	20	6
	60	6

Table 2: Grading of interstitial fibrosis according to Hübner et al.

Grade of fibrosis	Significance
0	Normal lung tissue
1	Rare interlobular septal thickening
2	Increased interlobular septal thickening
3	Confluent fibrotic walls
4	Isolated fibrotic masses (<10%)
5	Confluent fibrotic masses (<50%)
6	Confluent fibrotic masses (>50%)
7	Nearly complete fibrosis
8	Complete fibrosis

Table 3: Primary antibodies

Primary antibody	Dilution	Origin
Anti-PDGF-A (rabbit-anti-rat)	1:300	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-PDGFR- α (rabbit-anti-rat)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-VEGF-A (rabbit-anti-rat)	1:80	BioLogo, Susteren, Netherlands
Anti-VEGFR-2 (rabbit-anti-rat)	1:100	Dianova, Hamburg, Germany

Table 4: Immunohistology of allografts on POD 20. Intensity ([-] absent, [+] weak, [++] moderate and [+++] strong) of specific positive stained cells (C = control group, V = vatalanib group, D = vata/ima group, T = vata/ima/RAD group)

Study group	PDGF-A				PDGFR- α				VEGFR-2			
	C	V	D	T	C	V	D	T	C	V	D	T
Bronchiolar epithelium	++	+	++	+++	+	++	-	++	+	+	+	+++
Type I cells	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Type II cells	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	+
Fibroblasts	+++	+	-	+	++	++	+	+	+	-	+	+
Vascular endothelium	++	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Alveolar macrophages	+++	+	++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+
Other mononuclear cells	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	++
Metaplastic epithelial cells	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Table 5: Immunohistology of allografts on POD 60. Intensity ([-] absent, [+] weak, [++] moderate and [+++] strong) of specific positive stained cells (C = control group, V = vatalanib group, D = vata/ima group, T = vata/ima/RAD group)

Study group	PDGF-A				PDGFR- α				VEGFR-2			
	C	V	D	T	C	V	D	T	C	V	D	T
Bronchiolar epithelium	++	-	++	+++	+	+	+	++	+	+	+	+++
Type I cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type II cells	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	+
Fibroblasts	+++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Vascular endothelium	++	-	-	+	+	+	-	+	++	-	+	+
Alveolar macrophages	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	+	++	+	+	++
Other mononuclear cells	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	+
Metaplastic epithelial cells	-	-	+	-	-	+	-	++	+	-	-	++

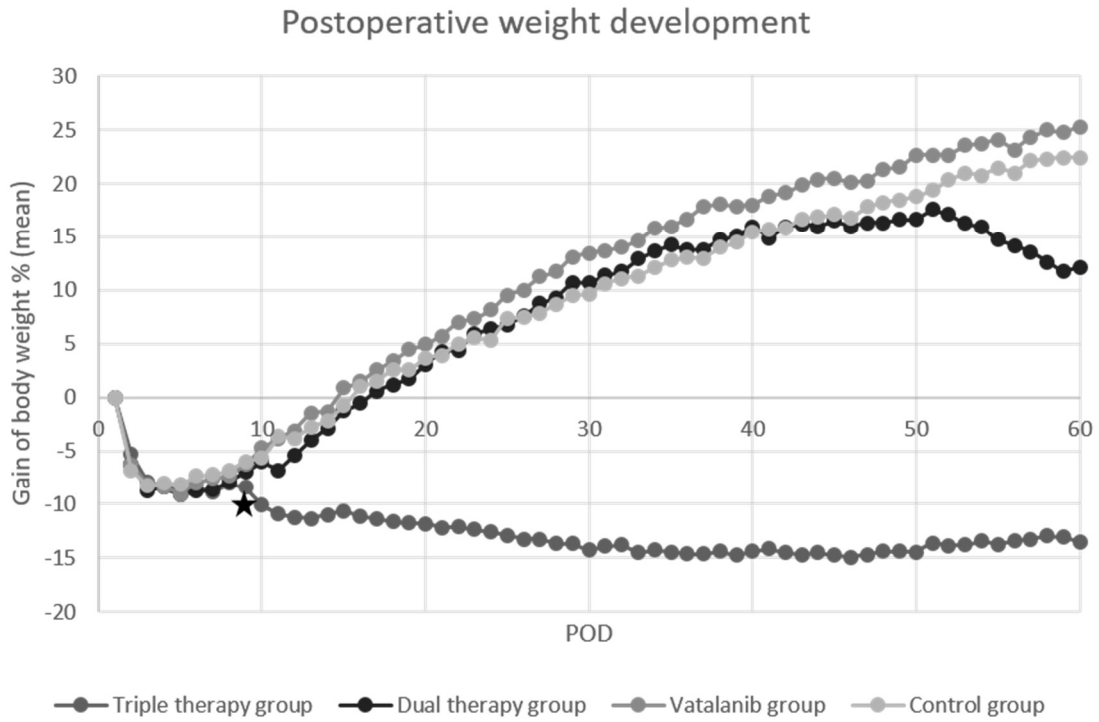


Figure 1: Postoperative weight development of the different study groups until POD 60. The preoperative weight is used as zero-point. Whereas the control, the vatalanib, and the vata/ima group significantly increased in weight after an initial weight loss ($p < 0.05$), the vata/ima/RAD group significantly lost weight after the application of RAD on POD 9 ($p < 0.005$, star) and never reached their preoperative weight.

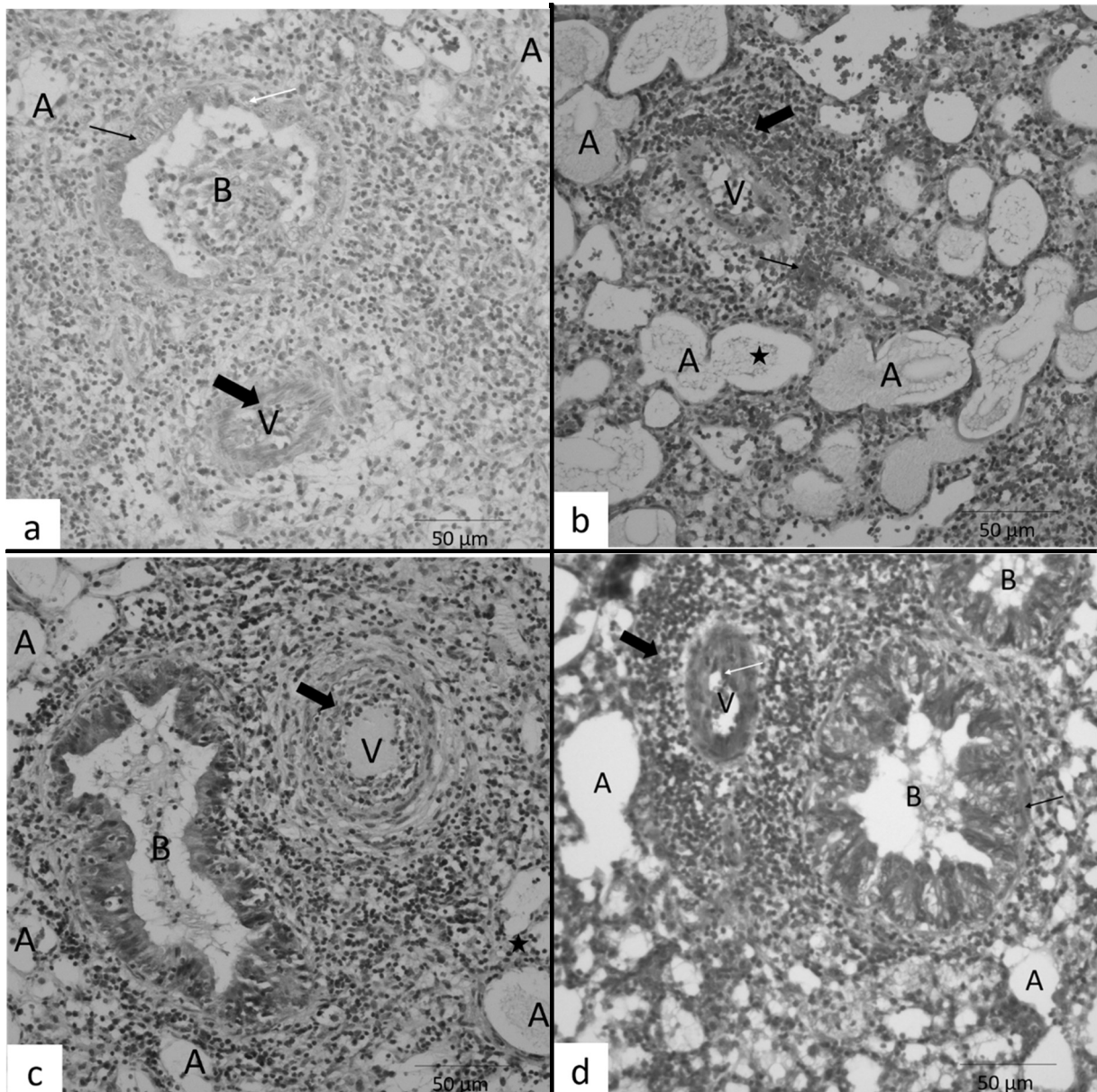


Figure 2: Representative histopathology for all experimental groups on POD 20 (HE, 400x); A=alveole; B=bronchiole; V=vessel **(a)** control group, **(b)** vatalanib group; **(c)** vata/ima group; **(d)** vata/ima/RAD group. **(a)** This sample show a terminal bronchiole (B2R) and a small vessel (A4). Damaged bronchiolar epithelium (white arrow) and in addition to epithelial hyperplasia (black small arrow) is present. Both bronchioles and vessel are surrounded by mononuclear cells. The lumen of the vessel is obstructed by leucocytes. **(b)** Diffuse mononuclear cell infiltrates (arrow) dominate the view and also spread into adjacent alveolar septa (A4). On top of that, inflammatory cells obstruct the vessel by adhering to the endothelium (D1R). Contemporaneously, alveolar exsudate (star) and bleeding can be seen. **(c)** No increased connective tissue can be seen in this staining. Inflammatory cells surround the vessel and spread into the adjacent alveolar septa (A4, stars). The lumen of the vessel is obstructed by leukocytes (D1R, big arrow). In contrast, the bronchiole with its continuous lamina muscularis is free from chronic rejection. **(d)** The small vessel on the left side is surrounded by multiple layers of mononuclear cells, with also infiltrate the adjacent alveolar septa (A4, thick black arrow). Moreover, leucocytes attached to the endothelium obstruct the lumen (D1R, small white arrow). The bronchiole is marked by beginning epithelial damage (B2R). Its lamina muscularis is still intact (C0, small black arrow).

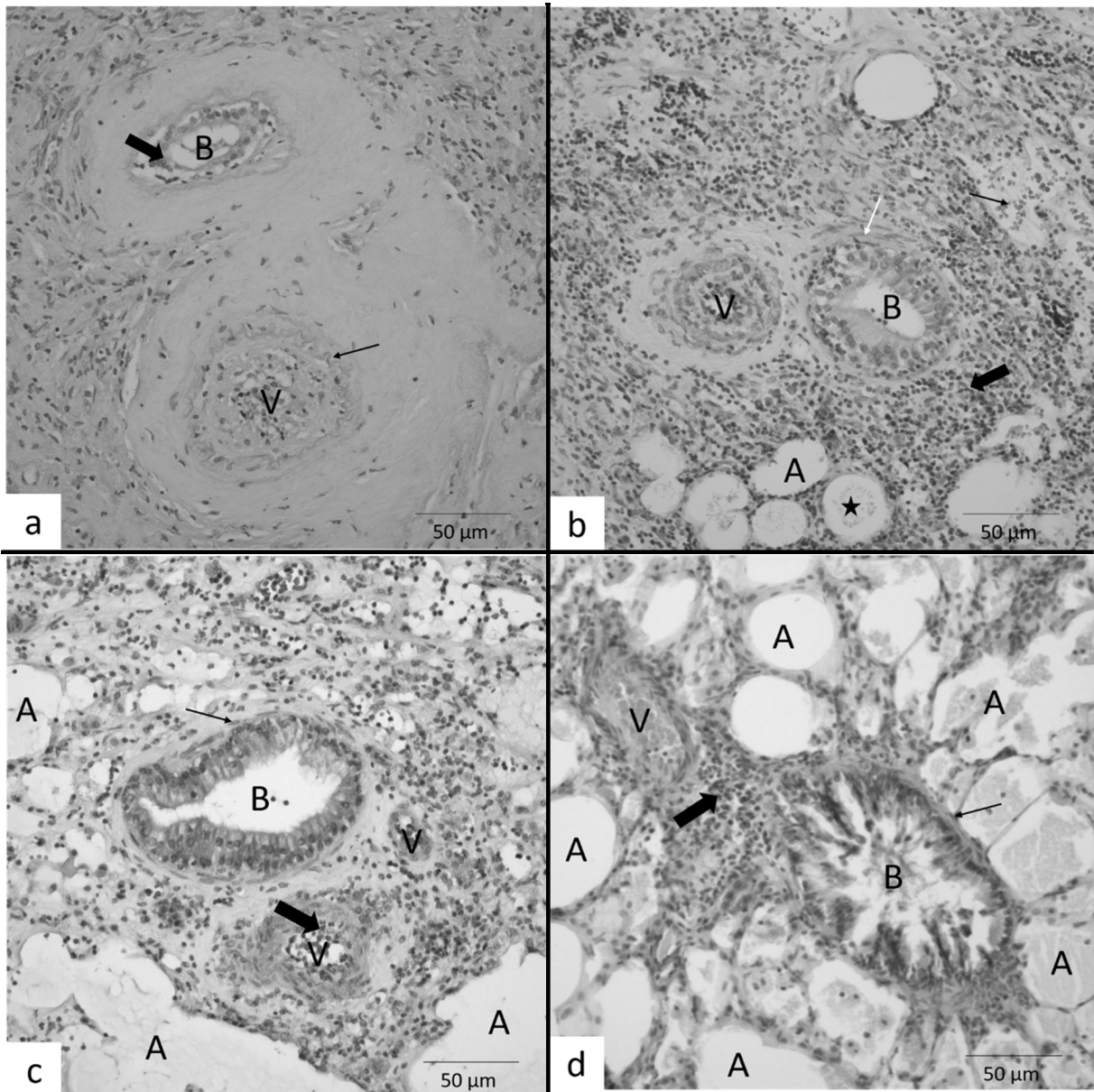


Figure 3: Representative histopathology for all experimental groups on POD 60 (HE, 400x); A=alveole; B=bronchiole; C=capillary; V=vessel. **(a)** control group, **(b)** vatalanib group; **(c)** vata/ima group; **(d)** vata/ima/RAD group. **(a)** In this staining, the epithelium of the central bronchioles is completely destroyed and fragmented (thick arrow). The vessel can only be recognized by its elastica (thin arrow). The whole area is almost completely fibrotic. **(b)** Mononuclear cell infiltrations are still present (thick arrow). The lumen of the small vessel is obstructed by leucocytes adhered to the endothelium and first signs of fibrointimal thickening can be distinguished (D1R-D2R). The bronchiole's lamina muscularis is intact (white arrow) and shows no peribronchiolar fibrosis (C0). Bleeding into alveolar spaces (small black arrow) and exudate (star) can be found. **(c)** The bronchiole is characterized by its continuous lamina muscularis (thin arrow). No signs of fibrosis can be seen (C0). The lumen of the small vessel is partly filled with leucocytes (thick arrow, D1R). The surrounding tissue rather resembles an acute than a chronic rejection. **(d)** The central vessel and bronchiole are not affected by chronic rejection (C0 and D0). The peribronchiolar and perivascular tissue is infiltrated by mononuclear cells (big arrow), hence inflammation is still present (A4). The layer of smooth muscle cells is not destroyed (small arrow).

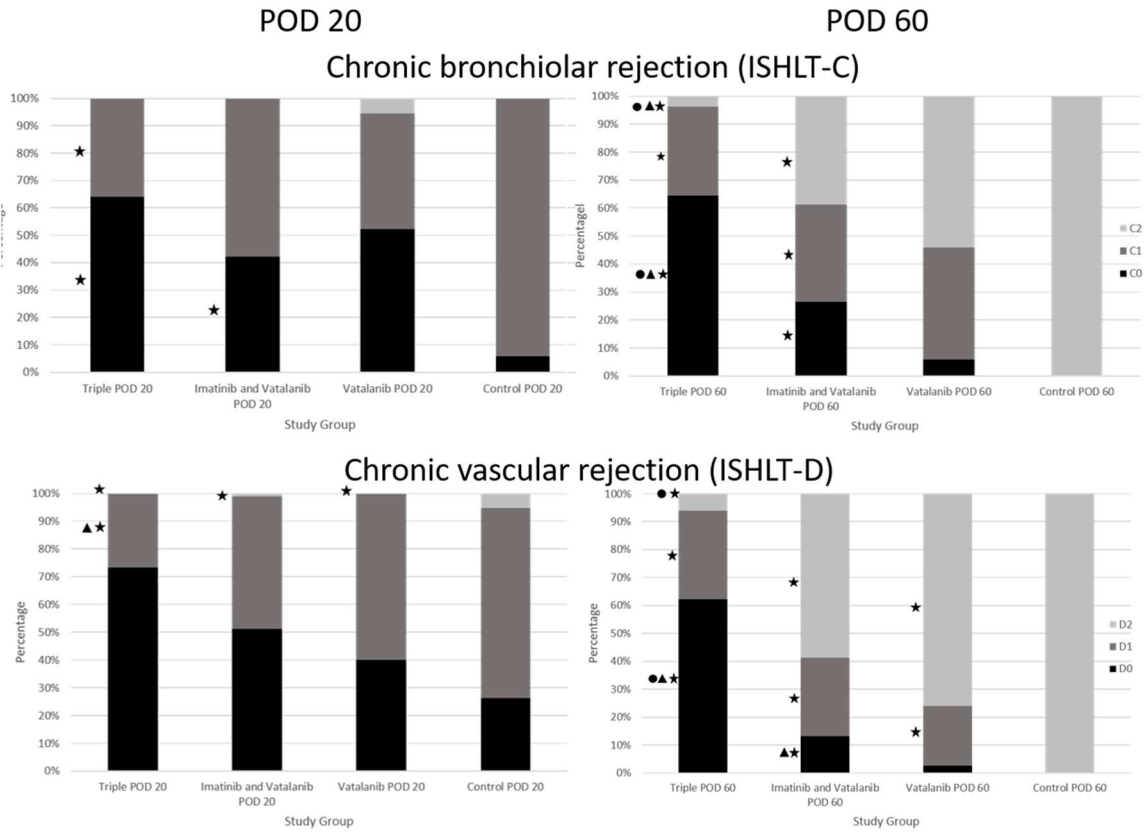


Figure 4: Effect of triple and dual combination therapy and of vatalanib alone on the development of chronic bronchiolar and vascular rejection, POD 20 (n1) and POD 60 (n2): Percentage of vessels with no (fairest bar), mild (intermediate bar) and severe (black bar) chronic rejection of each group (vata/ima/RAD group, n1= 6 and n2=9; vata/ima group, n1=8 and n2=11; vatalanib group, n1=6 and n2=7; control group, n1=6 and n2=6). Significance compared to the control group is shown by stars, compared to the vatalanib group by triangles and compared to the vata/ima group by circles. On POD 60, severe and mild chronic vascular rejection could significantly be reduced by the treatment with vatalanib. Both chronic vascular and bronchiolar rejection was significantly reduced regarding all three grades in the vata/ima group as compared to the control group. This effect could further be improved by adding everolimus.

Interstitial Fibrosis

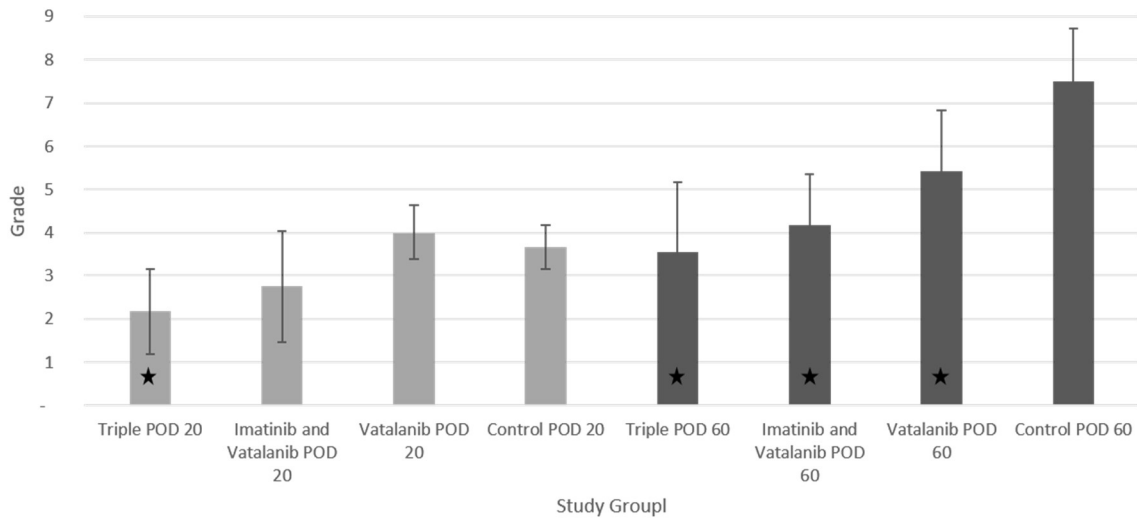


Figure 5: Effect of triple and dual combination therapy and of vatalanib alone on the development of interstitial fibrosis. Each bar represents the mean grade of interstitial fibrosis of each group on POD 20 and 60. The degree of interstitial fibrosis was significantly decreased by vatalanib ($p=0.035$), the dual combination of vatalanib and imatinib ($p=0.001$), and the triple therapy ($p=0.001$) compared to the control group on POD 60. Furthermore, the triple combination group showed significantly less interstitial fibrosis on POD 20 as compared to the vatalanib ($p=0.004$) and the control group ($p=0.015$) and showed significantly superior results to the vatalanib group on POD 60 ($p=0.035$).

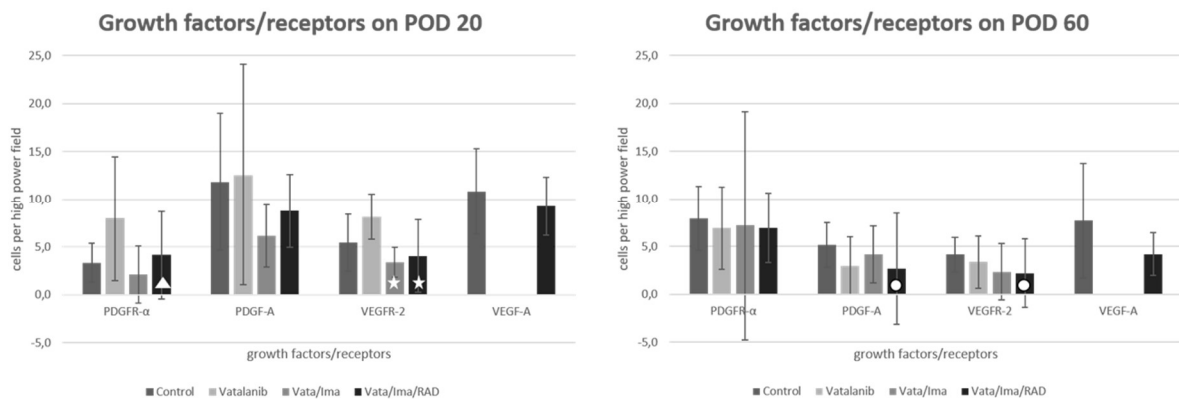


Figure 6: Immunohistologic evaluation of the expression of growth factors PDGF-A and VEGF-A and their receptors PDGFR- α and VEGFR-2 on POD 20 (left) and POD 60 (right). Each bar represents the mean \pm SD of positive stained cells in each group. Number of positive stained cells were counted per power field (200x). On POD 20, PDGFR- α was significantly higher in the vata/ima/RAD group than in the vata/ima group ($p=0.02$). VEGFR-2 was significantly decreased in the vata/ima/RAD group and in the vata/ima group as compared to the vatalanib group ($p=0.004$ and $p=0.003$). On POD 60, PDGF-A ($p=0.037$) and VEGFR-2 ($p=0.038$) were significantly higher in the allografts of the control group than in the vata/ima/RAD group. (Star = as compared to vatalanib group; circle = as compared to control group; triangle = as compared to vata/ima group).

Postervorstellung:



Combination therapy using Imatinib and Vatalanib improves the long-term outcome after rat lung transplantation

Marietta v. Süsskind-Schwendi, Anna-Lena Schaub, Christof Schmid, Stephan W. Hirt, Karla Lehle

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



Background. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and restrictive allograft syndrome (RAS) are different forms of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). The pathogenesis of both diseases is still unclear. Uncontrollable repair mechanisms with the release of growth factors (e.g. platelet derived growth factor and vascular endothelial growth factor) seem to be responsible for these processes. The aim of this study was to confirm the efficacy of the combination therapy of two receptor-tyrosine-kinase-inhibitors (Imatinib and Vatalanib) in addition to an mTOR-inhibitor (Everolimus) to attenuate the development of CLAD in a rat lung transplantation (LTx) model.

Methods. A rat model of left lung allo-transplantation (F344-to-WKY) was used to evaluate the anti-fibrotic and antiproliferative effects of Imatinib (IMA, 20 mg/kg/day; postoperative day (POD) 0 to POD 60), Vatalanib (VATA, 100 mg/kg/day; POD 0 to 60) and Everolimus (RAD, 2,5mg/kg/day) (n=4). Untreated allografts (n=8) and allografts of animals treated only with IMA/VATA (n=6) were used as controls. Extent of chronic rejection was classified according to a modified ISHLT-classification by Süsskind et al. (1). Interstitial lesions were divided into grade 0 (none changes of the alveolar septa) to grade 3 (fibrotic obliteration of the alveolar spaces).

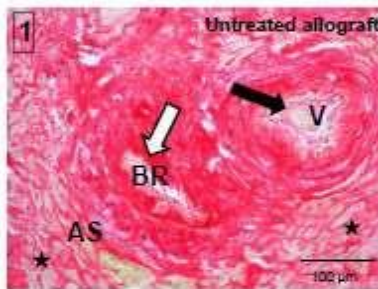


Figure 1. Representative histology of lung allograft of the untreated group. Distinct bronchiolitis obliterans (C2R) (white arrow) in addition to vasculopathy (D2R) (black arrow) and severe fibrotic alterations of the interstitium (asterisks) including large continuous fibrotic masses of the alveolar spaces (grade 3) dominates the histological section on POD 60. Sirius-red staining, 10x. (Bronchiolus, BR; vessel, V; alveolar septa, AS)

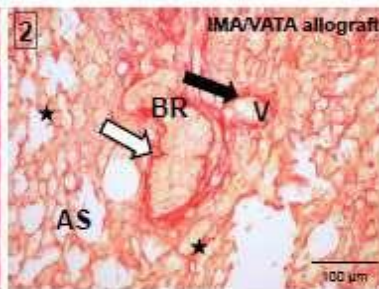


Figure 2. Representative histology of lung allograft of the IMA/VATA group. Mild bronchiolial alteration (C1R) (white arrow) and slight fibrotic change of the vessel (D0-D1R) (black arrow) is presented in this tissue section. Gentle fibrotic changes of the alveolar septa (asterisks) (grade 1) can be observed in this group on POD 60. Sirius-red staining, 10x. (Bronchiolus, BR; vessel, V; alveolar septa, AS)

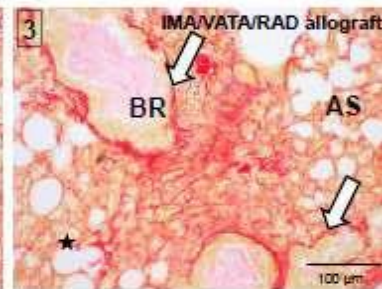
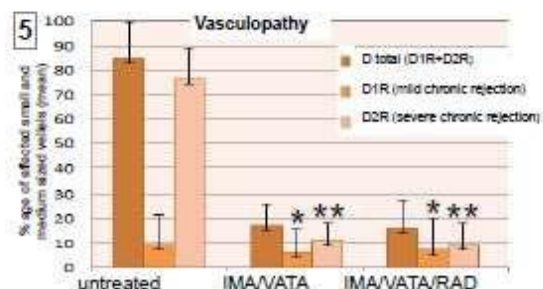
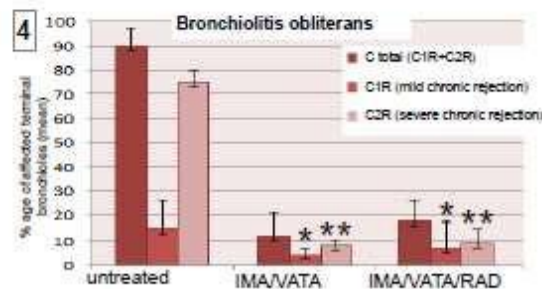


Figure 3. Representative histology of lung allograft of the IMA/VATA/RAD group. As in the IMA/VATA group, none to mild bronchiolial alteration (C0-C1R) (white arrow) in addition to gentle fibrotic changes of the alveolar septa (asterisk) (grade 1) dominates the histological section on POD 60 of this group. (Bronchiolus, BR; vessel, V; alveolar septa, AS)



Figures 4 and 6. The diagrams demonstrate the percentage of affected structures in each group with chronic bronchiolial (figure 4, ISHLT-C0-C2R) and chronic vascular (figure 6, ISHLT-D0-D2R) rejection. Allografts of untreated animals showed approximately 90% of fibrotic changes of the terminal bronchioles (figure 4, Bronchiolitis obliterans, C) and small and medium sized vessels (figure 5, vasculopathy, D) while allografts of the groups treated with IMA/VATA and IMA/VATA/RAD showed significantly less C and D.

* C0-control-group vs C0-study-groups, p<0.005 and *** C2R/C2R-control-group vs C2R/C2R-study-groups, p<0.005



Early administration of RTK-Inhibitors (Imatinib and Vatalanib) retarded CLAD processes in a rat LTx-model. So far, additional therapy with an mTOR inhibitor showed no further improvement.

The study was supported by a grant from Novartis, Basel, Switzerland

© 2011 Süsskind-Schwendi M et al. Long-term results in the rat lung transplantation model after combination therapy with imatinib and vatalanib to study the mechanism of chronic lung allograft dysfunction. *Transplantation* 2011, 91:301-307

Danksagung

Diese Dissertation wurde im Bereich der experimentellen Herzchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christof Schmid erstellt. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christof Schmid für die Erlaubnis, meine Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen.

Ich bedanke mich sehr bei Frau PD Dr. rer. nat. Karla Lehle für die Überlassung des Themas und ihre fachkundige Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Mein ganz spezieller und herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi für ihre hervorragende und warmherzige Betreuung, für ihre zahlreichen Tipps und Erklärungen, für ihre kompetente und stete Hilfestellung und für ihre besondere Freundlichkeit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Eva Lesser für die hochqualifizierte Ausführung der Tierversuche, Frau Christina Leykauf und Frau Angelika Urbanek für ihre professionelle Arbeit beim Anfertigen und Färben der histologischen Schnitte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle für die Unterstützung und Begleitung bei meiner Familie: Ein herzlicher Dank geht an meine Großeltern, meine Eltern und meinen Bruder Maximilian.

Ich bedanke mich außerdem bei all meinen Freunden und Kommilitonen/-innen, die mich auf meinem Lebensweg und während meiner studentischen Laufbahn begleitet haben.

Erklärung

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

Regensburg, der 18.01.2022

Anna-Lena Schaub