

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger

„Immunmodulation mit Erythropoietin bei allogener
Herztransplantation“
Eine intravitalmikroskopische Studie

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2011

Vorgelegt von
Sarah Luisa Kirsch
geb. am 20.06.1983 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
1.1. Zusammenfassung	3
1.2. Summary	5
2. Einleitung	7
2.1. Geschichte der Herztransplantation	7
2.2. Aktueller Stellenwert der Herztransplantation	8
2.3. Das Immunsystem	10
2.3.1. Entzündung	10
2.3.2. Angeborene und erworbene Immunität	11
2.3.3. Grundlagen der Abstoßungsreaktion	12
2.3.4. Ischämie-Reperfusionsschaden	13
2.3.5. Leukozytenrekrutierung	15
2.4. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantation	18
2.4.1. Calcineurininhibitoren	19
2.4.2. Zytotoxische Substanzen	19
2.4.3. Glukokortikoide	20
2.5. Erythropoietin	21
2.6. Ziel der Studie	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Versuchstiere	25
3.2. Experimentelles Modell	25
3.2.1. Explantation des Spenderherzens	26
3.2.2. Tracheotomie und Beatmung der Empfängertiere	26
3.2.3. Vorbereitung des Empfängers	27
3.2.4. Implantation des Spenderorgans	28
3.2.5. Chronische Transplantationsexperimente	29
3.3. Intravitale Mikroskopie	30
3.3.1. Physikalische Grundlagen	30
3.3.2. Aufbau und Durchführung	32
3.3.3. Fluoreszenzfarbstoffe	33
3.3.4. Mikrozirkulatorische Analyse	33
3.4. Histologische Analysen	36
3.4.1. Probenentnahme	36
3.4.2. Blutbildanalyse	36
3.4.3. HE-Färbung	36
3.4.4. Immunhistochemische Färbung des Epo-R	37
3.4.5. Mastzellfärbung mit Toluidinblau	38

3.5. Western Blot-Analyse	38
3.6. Durchflusszytometrie	40
3.7. Experimentelles Protokoll	41
3.7.1. Akutversuche	41
3.7.2. Chronische Versuche	42
3.7.3. Überblick des experimentellen Aufbaus	44
3.8. Statistik	44
3.8.1. Datenerfassung	44
3.8.2. Statistische Bearbeitung	44
4. Ergebnisse	46
4.1. Akute Experimente zum Ischämie-Reperfusionsschaden	46
4.1.1. Charakteristika der myokardialen Reperfusion in kardialen Transplantaten	46
4.1.2. Postischämische Entzündung	52
4.1.3. Blutbildanalyse	58
4.1.4. Histologie und Immunhistochemie	58
4.1.5. Western Blot-Analyse	61
4.1.6. Durchflusszytometrie	63
4.2. Chronische Experimente zur Transplantatabstoßung	65
4.2.1. Mittleres Allograft-Überleben	65
4.2.2. Histologie	66
4.2.3. Blutbildanalyse	66
5. Diskussion	68
5.1. Diskussion von Material und Methoden	68
5.1.1. Die heterotope Herztransplantation	68
5.1.2. Die intravitale Mikroskopie	71
5.1.3. Das experimentelle Protokoll	72
5.2. Diskussion der Ergebnisse	74
5.2.1. Mikrozirkulation	75
5.2.2. Inflammation	79
5.2.3. Transplantatabstoßung	85
6. Literaturverzeichnis	86
7. Publikationen	105
8. Danksagung	106
9. Curriculum Vitae	107

1.1. Zusammenfassung

Der Schutz des Myokards vor Ischämie-Reperfusionsschäden ist bei Operationen am offenen Herzen, die mit globaler myokardialer Ischämie assoziiert sind, wie z.B. der Herztransplantation von höchster Bedeutung. Bis heute wurden beachtliche Fortschritte bei der Entwicklung von Strategien zur Organprotektion gemacht. Dazu gehört unter anderem auch der Einsatz von kardioplegen Lösungen (Murphy et al., 2008). Trotzdem können die Folgen des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens zu verlängerter kontraktile Dysfunktion, Low-Output-Syndrom, Arrhythmien, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz führen (Bolli et al., 2004). Daher muss die Myokardprotektion bei Eingriffen am offenen Herzen insbesondere durch den Einsatz protektiver Substanzen verbessert werden. So gibt es zahlreiche experimentelle Arbeiten, die sich mit den non-hämatopoetischen, zytoprotektiven Eigenschaften von Erythropoietin beschäftigt haben. In verschiedenen Geweben, wie z.B. in der Retina (Junk et al., 2002), im Gehirn (Wang et al., 2007) und im kardiovaskulären System (Wright et al., 2004), wurden die Wirkungen von Erythropoietin nach Ischämie und Reperfusion untersucht. Auch im kardiovaskulären System wurde vielfach ein protektiver Effekt von Erythropoietin nachgewiesen. Die primären Targets und die nachgeschalteten Signalmechanismen des kardioprotektiven Effekts von Erythropoietin sind jedoch nicht eindeutig geklärt.

Das Ziel dieser experimentellen Studie an der Maus war, die pleiotropen Effekte von Erythropoietin auf die postischämische Mikrozirkulation und Entzündungsreaktion in transplantierten Herzen zu untersuchen um zu klären, in wieweit Erythropoietin die Ischämie-Reperfusion-bedingte und die Abstoßungs-bedingte Störung der koronaren Mikrozirkulation vermindern kann. In einer ersten Versuchsreihe erfolgte nach dreistündiger Ischämiephase die Transplantation des Herzens an die Halsgefäße des Empfängers mit anschließender Reperfusion. Die Transplantatempfänger der Kontrollgruppe wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 2 h vor Reperfusion behandelt. In der zweiten Versuchsreihe erhielten die Transplantatempfänger 2 h vor Reperfusion Erythropoietin (5000 I.E./kg KG). In der dritten Gruppe wurden die Spender mit Erythropoietin (5000 I.E./kg KG) 2 h vor Herzentnahme behandelt. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der koronaren Mikrozirkulation zeigte 1, 3 und 6 h nach Reperfusion in der Kontrollgruppe eine Abnahme der kapillare Blutflussgeschwindigkeit und der funktionellen Kapillardichte von $0,34 \pm 0,04$ mm/s und 351 ± 73 cm/cm² auf $0,30 \pm 0,01$ mm/s und 293 ± 41 cm/cm². Kapillardurchmesser, venöser Durchmesser und venöse Blutflussgeschwindigkeit veränderten sich in dem beobachteten Zeitraum nicht. Der Kapillardurchmesser reichte von 4,5 bis 5,5 µm, die venöse Blutflussgeschwindigkeit von 0,76 bis 0,96 mm/s. Die Behandlung mit Erythropoietin hatte

keinen Einfluss auf die Hämodynamik, weder wenn der Spender noch wenn der Empfänger behandelt wurde.

Die postischämische Entzündung war durch eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität gekennzeichnet. In der Gruppe, in der der Spender vor Organentnahme Erythropoietin erhielt, war die Gefäßpermeabilität signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert ($p < 0,05$). Die Zahl der in den postkapillaren Venolen der Kontrollgruppe rollenden Leukozyten nahm von 64 ± 16 rollende Zellen/min auf 19 ± 16 rollende Zellen/min ab, während die Zahl der fest adhätierenden Leukozyten von 238 ± 84 adhätierende Zellen/mm² auf 479 ± 154 Zellen/mm² zunahm. Die Zahl der Leukozyten, die die Kapillaren verlegten, blieb über die Zeit in der Kontrollgruppe mit 4-6 Zellen/HPF konstant. Die Adhärenz der Leukozyten in den postkapillaren Venolen wurde durch die Epo-Behandlung des Empfängers gehemmt, so dass hier nur 84 ± 34 Zellen/cm² 6 h nach Reperfusion fest adhätierten ($p < 0,05$). Durch die Epo-Behandlung des Empfängers wurden ebenfalls die Zahl der in den Kapillaren haftenden Leukozyten reduziert ($p < 0,05$). Erythropoietin hatte keine Wirkung auf die rollenden Leukozyten. Die Epo-Behandlung des Spenders vor Herzentnahme beeinflusste die postischämische Entzündungsreaktion nicht. Die Epo-Behandlung des Empfängers hemmte die akute postischämische Leukozytensequestration, indem Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen reduziert wurden. In den histologischen Schnitten war eine deutliche Ödembildung in allen Transplantaten zu erkennen, die auch unter Epo-Behandlung keine Verminderung aufwies.

Die immunhistochemische Färbung gab Hinweise darauf, dass kardiale Mastzellen an der Wirkung von Epo maßgeblich beteiligt sein könnten. Durch Hemmung der Mastzell-abhängigen Expression inflammatorischer Moleküle durch Erythropoietin spielten Mastzellen eine vermittelnde Rolle bei dem beobachteten anti-inflammatorischen Effekt von Erythropoietin. Die Epo-Behandlung führt nicht zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens.

In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass eine Hochdosis-Behandlung mit Erythropoietin anti-inflammatorische Effekte ausübt. Die akute postischämische Leukozytensequestration wurde gehemmt, indem Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen reduziert wurden, ohne dass die Hämodynamik verbessert und die Transplantatabstoßung vermindert wurde.

1.2. Summary

Myocardial protection from ischemia and reperfusion injury remains of paramount importance in the setting of global myocardial ischemia associated with open heart surgical procedures as heart transplantation. There has been considerable progress made to date in myocardial protection strategies including the use of blood cardioplegia (Murphy et al., 2008). Nevertheless, in a subset of cases myocardial ischemia reperfusion injury can cause prolonged contractile dysfunction, low output syndrome, arrhythmias, myocardial infarction and cardiac failure (Bolli et al., 2004). There is a compelling necessity to improve myocardial protection from ischemia reperfusion injury during open heart surgical procedures. There is a large body of experimental work showing the non-hematopoietic cytoprotective properties of recombinant human Erythropoietin in a variety of tissues subjected to ischemia and reperfusion, including the retina (Junk et al., 2002), the brain (Wang et al., 2007) and the cardiovascular system (Wright et al., 2004). However, the primary targets and downstream mechanisms of the cardioprotective effect of Epo remain controversial.

The aim of this study is to characterize the cardioprotective effect of Erythropoietin in an in vivo model of cold global ischemia reperfusion injury and to gain insights into the primary targets and downstream mechanisms involved in its cardioprotective effect.

In the first experimental setting after 3 hours of ischemia heart transplantation was performed with subsequent reperfusion of the graft. Controls received an intraperitoneal saline solution injection. In the second experimental setting recipients were pretreated with Erythropoietin (5000 I.U./kg bw). In the third experimental setting donors received a pretreatment with Erythropoietin (5000 I.U./kg bw) 2h before the surgical procedure was started.

Intravital fluorescence microscopy of the subepicardial coronary microcirculation at 1, 3 and 6 hours of reperfusion exhibited decreasing capillary blood flow velocities and functional capillary densities in controls from 0.34 ± 0.04 mm/s and 351 ± 73 cm/cm² to 0.30 ± 0.01 mm/s and 239 ± 41 cm/cm². Capillary diameters and venular blood flow characteristics showed no significant changes over time, ranging between 4.5 and 5.5 μ m as well as 0.76 and 0.96 mm/s. Epo-treatment had no effect on coronary microhemodynamics, neither when donors, nor when recipients were treated.

Postischemic inflammation was characterized by augmented macromolecular leakage. Microvascular permeability decreased in the Epo-donor group ($P < 0.05$). Leukocyte rolling in coronary postcapillary venules decreased during reperfusion from 64 ± 16 to 19 ± 16 cells/min/mm, while firm adhesion increased from 333 ± 135 to 479 ± 154 cells/mm² in controls. Capillary leukocyte plugging remained stationary over time with approximately 4 to 6

cells/HPF. Firm adhesion was inhibited in the Epo-recipient group, resulting in 84 ± 34 cells/mm² at 6h of reperfusion ($P < 0.05$). Capillary leukocyte plugging was also reduced in the Epo-recipient group ($P < 0.05$). Erythropoietin exerted no effect on leukocyte rolling. Epo-treatment of the recipients inhibited acute postischemic myocardial leukocyte sequestration by reducing leukocyte-coronary endothelium adhesive interactions. Histology revealed significant myocardial edema formation in allografts, without any improvement by Epo treatment.

Immunohistochemistry indicated the involvement of resident cardiac mast cells. By Inhibition of mast cell dependent expression of inflammatory molecules by erythropoietin mast cells played a mediating role in the observed anti-inflammatory effects of erythropoietin. Allograft rejection was not affected by Epo treatment.

We demonstrated that a single high-dosis treatment with Erythropoietin exert anti-inflammatory effects. Erythropoietin inhibited acute postischemic myocardial leukocyte sequestration by reducing leukocyte-coronary endothelium adhesive interactions, without improving microcirculatory dysfunction and elongating allograft survival.

2. Einleitung

2.1. Geschichte der Herztransplantation

Die Arbeiten zahlreicher Wissenschaftler und Chirurgen legten das Fundament für eine erfolgreiche Transplantationsmedizin und die Durchführung der Herztransplantation am Menschen. Die experimentellen Wurzeln der Herztransplantation führen ins Jahr 1904, in dem Alexis Carrel Lyon in Zusammenarbeit mit Charles C. Guthrie, um die Verbesserung von Gefäßnahttechniken bemüht, ihr Werk „The transplantation of veins and organs“ veröffentlichten. In diesem Artikel beschrieben sie die erste experimentelle Herztransplantation, in welcher sie das Herz eines Hundes an die Halsgefäße eines anderen transplantierten. Das Transplantat versagte jedoch innerhalb der ersten zwei Stunden (Carrel et al., 1905).

Unter der Verwendung von Heparin erreichten Mann und Priestly bei ihren Experimenten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 4 Tagen. Die Beobachtung von Leukozyteninfiltration im Myokard führte sie zu der Annahme, dass immunologische Vorgänge an dem Transplantatversagen beteiligt sind (Mann et al., 1933). Der Russe Vladimir Demikhov führte als Erster bei Hunden intrathorakale, heterotope Herztransplantationen durch und verbesserte die Überlebenszeiten auf 32 Tage, was vor allem auf seine Methode zur Organerhaltung während der Ischämie zurückzuführen war (Demikhov, 1962).

Anfang der 50er Jahre lebten die Experimente zur Herztransplantation erneut auf, was nicht zuletzt auf der Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine durch Kirklin und Lillehei beruhte, die das Operieren am „stillgelegten“ Herzen ermöglichte (Kirklin, 1955; Lillehei et al., 1956). Ihren ersten klinischen Einsatz am Menschen hatte sie durch John Gibbon bei der Operation eines Vorhofseptumdefekts (Gibbon et al., 1954).

Nach der Vorarbeit durch Goldberg und Berman, die an einer Vereinfachung der Implantationstechnik arbeiteten, konnte 1960 die Stanford Gruppe um Lower und Shumway ihre bis heute weitgehend unveränderte Operationstechnik zur orthotopen Herztransplantation entwickeln. Das Spenderherz wird dabei an die Hinterwände der Empfängervorhöfe anastomosiert. Aorta und Arteria pulmonalis werden kurz oberhalb der Klappenebene anastomosiert (Aziz et al., 1999).

In der Klinik wurde die HTx von J. Hardy eingeführt. Er vollzog 1964 die erste orthotope, aber xenogene Herztransplantation am Menschen. Er transplantierte einem Menschen ein Schimpansenherz, welches noch auf dem OP-Tisch versagte (Hardy et al., 1967).

Das wachsende Verständnis um die Transplantationsimmunologie, die Entwicklung der Herzlungenmaschine und die Verbesserung der chirurgischen Technik ermöglichten es dem Südafrikaner Christiaan N. Barnard am 3. Dezember 1967 in Kapstadt das Rennen um die erste humane Herztransplantation der Welt zu gewinnen (Barnard et al., 1967). Die spektakuläre Operation galt geradezu als paradigmatisches Zeichen für eine hoch entwickelte, zukunftsweisende und hochspezialisierte Medizin. Im gleichen Jahr folgte die erste europäische Herztransplantation in Paris durch Christian Cabrol. Die erste Herztransplantation in Deutschland wurde 1969 von Sebening und Klinner in München durchgeführt (Sebening et al., 1969).

Fehlende Langzeiterfolge machten schnell deutlich, dass nachdem das Problem der chirurgischen Technik der Organtransplantation gelöst war, sich die Aufmerksamkeit auf biologische Methoden zur Behandlung der Immunreaktion der Empfänger auf das transplantierte Organ richten musste.

2.2. Aktueller Stellenwert der Herztransplantation

Die Herztransplantation hat sich zu einer anerkannten therapeutischen Option entwickelt. Sie wird dann in Betracht gezogen, wenn ein Patient an terminaler Herzinsuffizienz leidet, die durch andere therapeutische Maßnahmen nicht mehr zu bessern ist (DSO, 2008). Es handelt sich um eine lebensverlängernde Maßnahme, die dem Patienten ermöglicht postoperativ eine erheblich verbesserte körperliche Belastbarkeit und befriedigende Lebensqualität zurück zu gewinnen (Kao et al., 2002).

Nach Angaben der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) wurden weltweit bis zum Jahr 2007 mehr als 80.000 Herztransplantationen durchgeführt. Seit 2001 stagniert die Zahl bei ca. 3300 jährlich weltweit durchgeführter Transplantationen (ISHLT, 2009). In den 24 deutschen Transplantationskliniken wurden im Jahr 2008 insgesamt 382 Herzen transplantiert und auch hier sind die Zahlen der letzten Jahre weitgehend konstant. Die geringen Veränderungen der Zahl der Herztransplantationen gehen zum einen auf die zunehmende Routineanwendung von Herzunterstützungssystemen und die Verbesserung der konservativen medikamentösen Therapie zurück. Zum anderen spiegelt sich hier die Veränderung der Indikationsstellung und der Mangel an postmortalen Transplantaten wider (DSO, 2008). Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der Patienten auf der Warteliste und der unvermindert niedrigen Spendebereitschaft in der Bevölkerung unterstreicht die Wichtigkeit der immunsuppressiven Therapie, aber auch die Bedeutung von Substanzen und Maßnahmen, die zum Erhalt und zur Verbesserung der Transplantatfunktion im Allgemeinen beitragen.

Lange Zeit war der Verlust des transplantierten Organs durch die akute Abstoßungsreaktion das zentrale Problem der Herztransplantation. Die Abstoßung eines Transplantats bedeutet den Verlust der Organfunktion, der infaust ist (Menger et al., 2000). Die verbesserte immunsuppressive Therapie erlaubt heute ein Organüberleben nach Herztransplantation von 76% und 67% nach 1 und 5 Jahren. Die transplantierten Patienten sind auf eine kontinuierliche Einnahme von Immunsuppressiva angewiesen. Diese Medikamente verzögern die Abstoßung des fremden Organs und sind für einen längerfristigen Erfolg verantwortlich. Zugleich haben diese Substanzen ein erhebliches Nebenwirkungsprofil mit zum Teil tödlichen Folgen (DSO, 2008).

Allerdings sind die langfristigen Überlebenszeiten noch immer begrenzt und in den letzten Jahren weitgehend gleich geblieben. Unter moderner Immunsuppression beträgt das mittlere Transplantatüberleben durchschnittlich 10 Jahre (ISHLT, 2009). Angesichts der Tatsache, dass in der Regel ein gesundes Herz mit guter Funktion transplantiert wird, stellt sich die Frage nach den Ursachen dieses verkürzten Organüberlebens und welche Mechanismen für den Untergang verantwortlich sind.

Die frühe Transplantatfunktion ist unter anderem abhängig von der Qualität des Spenderorgans. Die Qualität des Spenderorgans wiederum wird von einer Vielzahl von Faktoren bestimmt, zu denen das Spenderalter, Dauer der hypothermen Ischämie und Wahl der Perfusionstechnik zum Schutz des Gewebes vor Ischämie-Reperfusionsschaden gehören. Die Entwicklung von modernen Präservierungsstrategien war notwendig um die Organqualität zu erhalten. Die Methoden zur Organpräservierung basieren auf der Suppression des Metabolismus durch Hypothermie und der Aufrechterhaltung der Homöostase während der Ischämie. Hypothermie ist eine essentielle Komponente der Organpräservierung. In Kombination mit verschiedenen Perfusionstechniken schützt die Organpräservierung das Gewebe vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden. Um die Organe für die Hypothermie tolerant zu machen, wird das Blut aus der Zirkulation entfernt und durch eine geeignete hypotherme Präservierungslösung ersetzt. Die Zusammensetzung der Lösung ist eine bestimmende Größe der Toleranz des Organs auf die hypothermen Aufbewahrungsbedingungen. Der Einsatz von kolloidalen Konservierungslösungen, alleine oder in Kombination mit Zusatzstoffen wie z.B. Bioflavonoiden oder Curcumin, verbesserte erfolgreich die Organfunktion, indem versucht wurde, die physikalischen Umstände als auch das biochemische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten und die Reperfluationsantwort zu modulieren (Anaya-Prado et al., 2008).

Charakteristischerweise repräsentieren diese Therapiestrategien zur Konservierung nicht Einzelmediator-Ansätze, sondern vermitteln Organprotektion durch die Beeinflussung verschiedener Stoffwechselwege, die am hypoxischen oder inflammatorischen Schaden beteiligt sind, durch die Aufrechterhaltung der Homöostase (Menger et al., 2007).

Diese Strategien erlauben es, Herztransplantate bis zu 6h aufzubewahren und somit das Spenderorgan über große Distanzen zu dem geeigneten Empfänger zu transportieren. Durch die Ischämie während des Organtransports und der akuten Belastung durch die Reperfusion werden die transplantierten Herzen geschädigt und in ihrer Funktion beeinträchtigt. Da das Herz direkt nach Transplantation seine Funktion aufnehmen und die Zirkulation des Empfängers aufrechterhalten muss, darf keine größere Schädigung des Herzmuskels auftreten (Southard et al., 1995). Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist von umso größerer Bedeutung, da möglicherweise die initiale Schädigung langfristige Konsequenzen hat und zur chronischen Transplantatdysfunktion beitragen kann (Menger et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens das Ausmaß und die Inzidenz von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen triggern kann (Millington et al., 2009).

Daten der ISHLT deuten darauf hin, dass das Risiko des Transplantatversagens und Tod dramatisch mit steigender Ischämiezeit korreliert. Auf diesen Daten basierend wird eine maximale Ischämiezeit beim Herzen von 6 h empfohlen (DSO, 2008).

2.3. Das Immunsystem

2.3.1. Entzündung

Entzündungsreaktionen sind in ihrer Wirkung klassischerweise durch Schmerz, Rötung, Überwärmung und Schwellung gekennzeichnet. Diese Symptome beruhen auf der Wirkung von Zytokinen und anderen Mediatoren auf die lokalen Blutgefäße. Die Zytokin-vermittelte Gefäßdilatation, der damit vergrößerte Gefäßdurchmesser und erhöhte lokale Blutfluss bedingen Überwärmung und Rötung. Gleichzeitig verringert sich die Blutflussgeschwindigkeit. Die Endothelzellen, die das Gefäß auskleiden, werden aktiviert, exprimieren Adhäsionsmoleküle, welche die Bindung von zirkulierenden Leukozyten verstärken. Die Kombination aus verlangsamtem Blutfluss und Expression von Adhäsionsmolekülen ermöglicht den Leukozyten am Endothel zu adhären und ins Gewebe zu migrieren. Eine weitere durch Zytokine ausgelöste Veränderung ist die erhöhte Gefäßpermeabilität. Insgesamt kommt es zur Schwellung und folglich zu Schmerzen (Janeway et al., 2002).

Entzündung ist eine charakteristische Antwort von biologischem Gewebe auf schädigende Reize wie z.B. Trauma, Toxine, Ischämie oder Mikroorganismen mit der Funktion, das schädigende Agens und die zerstörten Zellen zu beseitigen, eingetretene Schäden zu reparieren und somit die Gewebeintegrität und -funktion zu erhalten. Andererseits gibt es

pathophysiologische Situationen in denen eine ausgedehnte Entzündungsreaktion zu zusätzlichem Schaden und sogar Funktionsverlust führen kann (Jaeschke et al., 2006). Atherosklerose, Allergien und Ischämie-Reperfusionsschäden gehören zu diesen Situationen (Hansson et al., 2006; Kelly et al., 2007; Menger et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Limitierung der Entzündungsreaktion zu einer Verbesserung der Gewebefunktion führt. Die Mechanismen, die zur Entzündung führen sind sowohl Teil des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems.

3.2.2. Angeborene und erworbene Immunität

Das angeborene Immunsystem besteht aus unspezifischen Abwehrmechanismen. Es bekämpft fremde Strukturen ohne vorher jemals Kontakt mit ihnen gehabt zu haben und stellt eine schnelle Sofortantwort dar. Eine erste Verteidigungslinie bilden anatomische Barrieren wie Haut und Schleimhäute. Die Wirkung dieser mechanischen Barrieren wird unterstützt durch physikalische Abwehrmechanismen wie Flimmerepithelien und Peristaltik. Ein weiterer Baustein sind humorale Faktoren, wie Komplement, Lysozym und Proteasen. Die für die angeborene Immunabwehr bedeutsamen Zellen sind Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Ihre Wirkung beruht auf unveränderlichen Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale erkennen (Janeway et al., 2002). Die Zellen des angeborenen Immunsystems tragen entscheidend zur Auslösung und der anschließenden Steuerung des adaptiven Immunsystems bei (Abb. 1).

Die adaptive Immunität basiert auf der klonalen Selektion aus einem Repertoire von Lymphozyten, die eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen. Dadurch kann das Immunsystem beinahe jedes beliebige fremde Antigen erkennen. Die antigenspezifischen Lymphozyten vermehren sich und differenzieren. Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems haben sich zu einem flexiblen Abwehrmechanismus entwickelt, der durch Ausbildung eines Gedächtnisses bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Reaktion ermöglicht (Janeway et al., 2002).

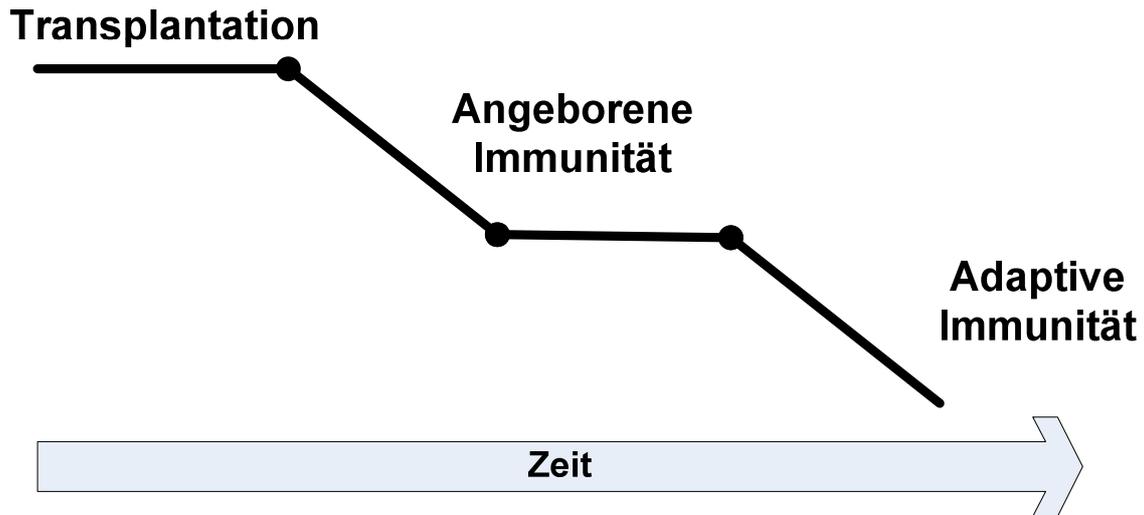


Abb. 1: Abnahme der Transplantatfunktion nach Transplantation. Die Funktion eines transplantierten Organs ist in der frühen postoperativen Phase durch den Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems bedroht. Die adaptive Immunität bedingt die Häufigkeit und Intensität akuter Abstoßungsepisoden und der chronischen Abstoßung im langfristigen Verlauf.

2.3.3. Grundlagen der Abstoßungsreaktion

Adaptive Immunreaktionen gegen das transplantierte Herz stellen ein schwieriges Hindernis für ein erfolgreiches Langzeitergebnis dar. Als Abstoßungsreaktion bezeichnet man die Immunantwort des Empfängers auf die Alloantigene im Transplantat. Die Abstoßungsreaktionen können zeitlich in drei unterschiedliche Immunantworten unterteilt werden. Die hyperakute Abstoßung setzt innerhalb weniger Minuten nach Reperfusion ein. Präformierte natürliche Antikörper binden an die Oberflächenantigene von Gefäßendothelzellen des Transplantats. Dies führt zur Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade. Die Folge sind interstitielle Ödeme und multiple intravasale Thrombosierungen, die das Erliegen der Durchblutung und ischämische Organnekrose verursachen können (Abbas et al., 1994). Die hyperakute Abstoßung spielt bei xenogenen Transplantationen eine bedeutende Rolle und limitiert entscheidend den Einsatz xenogener Transplantate (Berszstel et al., 2006).

Bei der akuten Abstoßung handelt es sich vornehmlich um einen T-Zell-vermittelten Prozess, vergleichbar mit einer Typ IV- Reaktion bei Allergie. Erfahrungsgemäß tritt sie innerhalb der ersten Wochen nach Transplantation auf, kann sich aber auch noch nach Jahren ereignen (Mueller et al., 2004). Naive antigenspezifische T-Zellen des Empfängers treffen auf antigenpräsentierende Zellen (APC) des Spenders und erkennen die von MHC-Komplexen präsentierten Antigene der Zellen des Transplantats. Die Aktivierung von T-Zellen durch APCs bei gleichzeitiger Co-Stimulation führt zur Expression und Sekretion von IL-2 sowie zur

Expression hochaffiner IL-2-Rezeptoren. IL-2 fördert auf autokrine Weise die T-Zell Proliferation und Differenzierung. CD8-T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen und Suppressorzellen. Nach gegenwärtigem Wissensstand können letztere vielleicht eine Toleranz des Transplantats bewirken. Zytotoxische T-Zellen töten ihre Zielzellen durch Induktion von Apoptose und durch Lyse. Durch IL-10 kommt es zur Entwicklung von CD4-Zellen zu Helferzellen. T1-Helferzellen aktivieren über Zytokine Makrophagen. T2-Helferzellen regen naive antigenspezifische B-Zellen zur Antikörpersynthese an. Antigenspezifische Antikörper, Makrophagen und zytotoxische T-Zellen führen dann zur Zerstörung des Transplantats (Halloran et al., 1993). Histologisch ist der Beginn der akuten Abstoßung durch ein interstitielles Ödem und ein Infiltrat mononuklearer Zellen im Biopsiematerial zu erkennen. Diese Charakteristika können je nach Schweregrad der Reaktion unterschiedlich ausgeprägt sein (Billingham et al., 1990). Die akute Abstoßung und deren Häufigkeit gelten als Trigger für die chronische Abstoßung.

Die chronische Abstoßung ist die Hauptursache für ein spätes, üblicherweise nach Monaten bis Jahren einsetzendes Transplantatversagen. Chronische Abstoßung kann sich durch wiederholte Episoden akuter Abstoßung manifestieren mit Anzeichen allogener, T-Zell-vermittelter Vorgänge, kann sich aber auch in einigen Fällen als wiederholte Autoimmunreaktion ohne direkte Anzeichen für einen Schaden präsentieren, der durch das adaptive Immunsystem verursacht wird. Histologische Kennzeichen sind konzentrische Ablagerungen in den Koronargefäßen, ähnlich der Atherosklerose, und progressive Fibrosierung des Parenchyms (Azuma et al., 1994).

An der Beeinträchtigung der Transplantatfunktion sind immunologische und nicht-immunologische Faktoren beteiligt. Das Zusammenwirken der verschiedenen Mediatoren verursacht eine chronische Entzündung, so dass es schließlich zum irreversiblen Organversagen kommt (Ventura et al., 1995).

2.3.4. Ischämie-Reperfusionsschaden

Mit Ischämie-Reperfusion verbundenes Gewebe- und Organversagen stellt immer noch ein erhebliches Problem bei der Organtransplantation dar (Land et al., 2005). Bei der Transplantation von soliden, vaskularisierten Organen ist eine Ischämiephase unvermeidbar. In der Ischämiephase führen der Sauerstoffmangel und der Verbrauch an ATP zur zellulären Nekrose und Apoptose und damit zum Gewebeschaden. Mit dem Wiedereinsetzen des Blutflusses in den versorgenden Gefäßen des transplantierten Organs beginnt die Reperfusion. Trotz des makroskopisch sichtbaren Blutflusses kommt es nur zu einer inkompletten Wiederdurchblutung der nutritiven Kapillaren. Dies verstärkt den Parenchym-

schaden. Die ursächlichen Mechanismen dieser kapillaren Dysfunktion umfassen eine Schwellung der Endothelzellen, intravasale Hämokonzentration, Verengung der Kapillaren aufgrund des durch Ödem angestiegenen interstitiellen Drucks und die Endothelin-1-vermittelte mikrovaskuläre Konstriktion (Menger et al., 2000). Neben der nutritiven Dysfunktion führt die Reperfusion zu einer Entzündung, die durch Aktivierung von Makrophagen und polymorphkernigen, neutrophilen Leukozyten und Akkumulation von Thrombozyten gekennzeichnet ist. Die Rekrutierung der Leukozyten folgt einem genau geregelten mehrstufigen Ablauf, in dem vor allem Zellinteraktionen über Adhäsionsmoleküle eine Rolle spielen (Kapitel 2.3.5.). Die Entzündungszellen werden durch Zytokine, Chemokine und Komplementfaktoren stimuliert, produzieren und setzen diese Stimulationsfaktoren aber auch selbst frei, so dass ein „Circulus vitiosus“ entsteht. Des Weiteren sind von den Leukozyten produzierte Proteasen und Radikale am Gewebeschaden beteiligt. Das Phänomen, dass erfolgreiche postischämische Reperfusion zu zusätzlichem Schaden führt, wird als „Reflow Paradoxon“ bezeichnet (Menger et al., 2007). Zusammenfassend besteht der pathophysiologische Mechanismus des Ischämie-Reperfusion-Schadens aus der Produktion von Sauerstoffradikalen, Aktivierung des Komplementsystems, Thrombozytenaktivierung und Mikrothrombusformation, nutritiver und endothelialer Dysfunktion sowie Gewebeinvasion der polymorphkernigen Leukozyten und resultiert letztlich im Verlust der Zellintegrität.

Klinisch manifeste Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens am Herzen können Arrhythmien, vermindertes Herzzeitvolumen und Funktionseinschränkungen des Myokards sein. Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden ist einer der Hauptfaktoren, der den Erfolg einer Herztransplantation limitiert. Störungen der kardialen Mikrozirkulation nach Organtransplantation sind für die Ausprägung der Transplantatdysfunktion und –zerstörung verantwortlich (Moens et al., 2005). Wenngleich die postischämische Reperfusion und die Abstoßung aus pathogenetischen Gründen prinzipiell als separate Faktoren angesehen werden können, die zu einem Gewebeschaden führen, haben Studien gezeigt, dass Ischämie-Reperfusion-vermittelte Ereignisse eine späte Abstoßung triggern können (Menger et al., 2000).

Die Bedeutung der Leukozyteninfiltration im Myokard wird kontrovers diskutiert (Baxter et al., 2002). So konnte in zahlreichen experimentellen Studien ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Leukozytenakkumulation und postischämischer kardialer Dysfunktion hergestellt werden (Romson et al., 1983; Tanaka et al., 1993). Andere konnten dieses nicht bestätigen (Birnbau et al., 1997). Tanaka et al. konnten nachweisen, dass eine Unterbrechung der Kaskade im Bereich der Signaltransduktion der Integrine zur Reduktion der Leukozytenakkumulation und folglich zum Gewebeerhalt durch Reduktion der Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion in Hunden führt (Tanaka et al., 1993). Im Rahmen der

klinischen Studie LIMIT-AMI konnte die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Integrine keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erwirken (Baran et al., 2001). Auch in anderen Arbeiten wurde erfolglos versucht die vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen Studien in den klinischen Einsatz zu überführen. Eine Unterbrechung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen mittels monoklonaler Antikörper hatte jedoch keinen relevanten Einfluss auf die postischämische, myokardiale Dysfunktion (Baran et al., 2001; Rusnak et al., 2001).

Das Phänomen des Ischämie-Reperfusionsschadens ist kein selektiv im Myokard beschriebenes Problem. Es wurde gezeigt, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden nach ausgedehnter Ischämie in nahezu allen Organsystemen vorkommt. Zahlreiche Modelle beschäftigen sich in Organsystemen wie Leber oder auch Muskel mit dem Phänomen des Ischämie-Reperfusionsschadens (Menger et al., 2003; Vollmar et al., 1995).

Insgesamt existiert eine Vielzahl von erfolgsversprechenden präklinischen Therapiekonzepten, die aber nur vereinzelt im klinischen Szenario Einzug erhalten. Solche neuen Therapiestrategien beinhalten antioxidative und anti-inflammatorische Substanzen z.B. Komplementinhibitoren, Hemmung intrazellulärer Moleküle z.B. Heat-shock Moleküle oder Hormone wie Erythropoietin (Menger et al., 2007).

2.3.5. Leukozytenrekrutierung

Die Rekrutierung von Leukozyten in ein geschädigtes Gewebe ist ein typisches Merkmal akuter und chronischer Entzündungsprozesse. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass im Blutstrom zirkulierende Leukozyten während der Passage der Mikrozirkulation des geschädigten Gewebes in einem aktiven Prozess aus dem Blutgefäß über die Gefäßwand hinweg in das Gewebe einwandern. Dabei spielt die Interaktion zirkulierender Leukozyten mit dem Endothel der Gefäßwand eine entscheidende Rolle. Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom in das Gewebe ist ein genau definierter Prozess, wie er auch während der Reperfusion von postischämischem Myokard stattfindet. Er wird durch die Freisetzung von Mediatoren in Gang gesetzt und ist im Ablauf auf die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle und ihrer Gegenspieler auf vornehmlich neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen angewiesen (Butcher et al., 1991). Diese Adhäsionsmoleküle werden im Wesentlichen in drei Familien unterteilt: Selektine, Integrine und die Immunglobulin Superfamilie. Für gewöhnlich findet die Leukozytenrekrutierung und damit die Leukozyten-Endothel-Zellinteraktionen in postkapillaren Venolen statt. Die Freisetzung klassischer proinflammatorischer Mediatoren wie TNF-alpha, IL-1 alpha, C5a, PAF, MIP-2, und CXC Chemokine (IL-8) führt auch zur Ansammlung von Leukozyten im postischämischen

Myokard. Diese chemotaktischen Signale stammen von Kardiomyozyten, Endothelzellen, Mastzellen oder bereits ins Gewebe transmigrierten Leukozyten (Schramm et al., 2004). Die Extravasation der Leukozyten ins Gewebe ist ein fließender Prozess, der aber in Teilschritten verstanden werden kann (Abb. 2).

Im ersten Schritt der Extravasationskaskade nähert sich der im Gefäß frei fließende Leukozyt dem Endothel. Dadurch wird eine erste Kontaktaufnahme ermöglicht, die dem Leukozyt erlaubt auf dem Endothel exprimierte Moleküle wahrzunehmen (Capture). Es kommen zunächst nur kurze, reversible Verbindungen zwischen Endothel und Leukozyt zustande und der Leukozyt beginnt so über die endotheliale Gefäßwand zu rollen. Die Geschwindigkeit des Leukozyten nimmt dabei ab und die Zelle kann dadurch Signale der lokalen Umgebung empfangen. Tatsächlich ist ein rollender Leukozyt um ein 50faches langsamer als die im axialen Blutstrom schwimmenden Zellen (Ley et al., 1991). Generell wird angenommen, dass das Rollen ein Selektin-vermittelter Prozess ist. Die Familie der Selektine (CD62) besteht aus L-, P- und E-Selektin. L-Selektin wird von den meisten Leukozyten exprimiert, während E-Selektin ausschließlich auf Endothelzellen gefunden wird. P-Selektin wird von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert (Bevilacqua et al., 1993). Die Aktivierung des Endothels durch proinflammatorische Mediatoren wie Histamin, Sauerstoffradikale und Thrombin verursacht die direkte Translokation von gespeichertem P-Selektin durch Fusion der Weibel-Palade-Körperchen mit der Phospholipidmembran der Endotheloberfläche. P-Selektin bindet auf der Leukozytenoberfläche präsentierte Glykoproteine, sehr wahrscheinlich Sialyl-Lewis X und P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1). Während die P-Selektin Expression 10-20 Minuten nach Reperfusion ihren Höhepunkt erreicht, wird angenommen, dass E-Selektin erst in der späten Reperfusionsphase (4-6 h) auf der Endotheloberfläche präsentiert wird und folglich auch erst an späten Reperfusionseignissen funktionell beteiligt ist (Jordan et al., 1999). Dieser anfänglich lockere Kontakt ist ein obligater Schritt für die nachfolgende, feste Leukozytenadhäsion.

Die feste Adhäsion ist ein β 2-Integrin-vermittelter Prozess. Die β 2-Integrine (CD11/CD18) setzen sich aus einer von vier verschiedenen α -Einheiten (CD11a für LFA-1, CD11b für Mac-1, CD11c für p150,95, CD11d für $\alpha_d\beta_2$) und der β -Untereinheit (CD18) zusammen (Smyth et al., 1993). Sie sind nur auf Leukozyten zu finden. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die Wirkung der Entzündungsmediatoren veranlassen die Fusion von Mac-1 speichernden, sekretorischen Granula mit der Leukozytenmembran. Dies führt zur Zunahme an Mac-1 auf der Oberfläche der Leukozyten und gleichzeitig zum Abbau von L-Selektin. LFA-1 hingegen liegt nicht in gespeicherter Form vor und wird bei Zellaktivierung nicht hochreguliert. Vielmehr wird durch eine Konformationsänderung des konstitutiv exprimierten Moleküls ein Zustand höherer Bindungsfähigkeit herbeigeführt. Die β 2-Integrine haben gemeinsam, dass sie an das endotheliale Oberflächenmoleküle ICAM-1 binden, das

zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. ICAM-1 wird 2-4 h nach Reperfusion hochreguliert, was mit der Hochregulierung von CD11/CD18 zusammenfällt (Jordan et al., 1999).

Im letzten Schritt der Extravasationsequenz passieren die Leukozyten die Gefäßwand. Dieser Schritt wird als Transmigration bezeichnet. Die Transmigration wird maßgeblich durch PECAM-1 (CD31) vermittelt, einem Oberflächenadhäsionsmolekül, das ebenfalls zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. PECAM-1 (CD31) wird auf Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und findet sich selbst als Rezeptor. Auf den Endothelzellen ist PECAM-1 (CD31) vorwiegend in Nähe der interzellulären Verbindungen zu finden. Es wird daher angenommen, dass Leukozyten hauptsächlich zwischen den Endothelzellen hindurch migrieren (Ebnet et al., 1999; Tedder et al., 1995). In vivo elektronenmikroskopische Studien haben allerdings gezeigt, dass Leukozyten wohl auch die Möglichkeit haben einem direkten Weg durch die Endothelzelle hindurch zu folgen, indem transzelluläre Kanäle in der Membran der Endothelzelle geöffnet werden. Diese Kanäle werden vermutlich durch die Verschmelzung mehrerer Vesikel gebildet (Feng et al., 1998; Millán et al., 2006).

Beim myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden nehmen transmigrierte Leukozyten, vornehmlich neutrophile Granulozyten, Kontakt mit den Kardiomyozyten auf. Dies geschieht auf derselben molekularen Basis wie die feste Adhäsion am Endothel. Die Leukozyten binden über Mac-1 auf aktivierten Myozyten exprimiertes ICAM-1 (Jordan et al., 1999). Folge ist die Freisetzung von zytotoxischen Oxidantien, proteolytischen Enzymen und Entzündungsmediatoren, wodurch letztlich eine Gewebeschädigung eintritt (Vinten-Johansen et al., 2004).

Die Antagonisierung der an diesem Ablauf beteiligten Rezeptoren könnte im Umkehrschluss zum Gewbeerhalt führen. Simpson et al. zeigten in einem experimentellen Modell am Kaninchen die Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens und eine reduzierte Infarktgröße nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen β 2-Integrine (Simpson et al., 1988).

Die Leukozytenrekrutierung ist nicht nur essentieller Bestandteil der akuten Entzündung beim Ischämie-Reperfusionsschaden. Während man prinzipiell zwischen akuter und chronischer Entzündung unterscheiden muss, wird angenommen, dass das Grundprinzip der Leukozytenrekrutierung bei akuter und chronischer Entzündung gleich ist. Nach Transplantation findet eine entzündliche Leukozytenrekrutierung im Rahmen des akuten Ischämie-Reperfusionsschadens statt und gehört zum pathophysiologischen Mechanismus von Abstoßungsreaktionen.

Das Verständnis dieses pathophysiologischen Prozesses bildet die Basis für die erfolgreiche Entwicklung pharmakologischer Strategien den Leukozyten-vermittelten Ischämie-

Reperfusionsschaden zu vermindern und kann auf zahlreiche klinische Situationen wie Trauma, Schock und Organ- und Gewebetransplantation übertragen werden (Jordan et al., 1999).

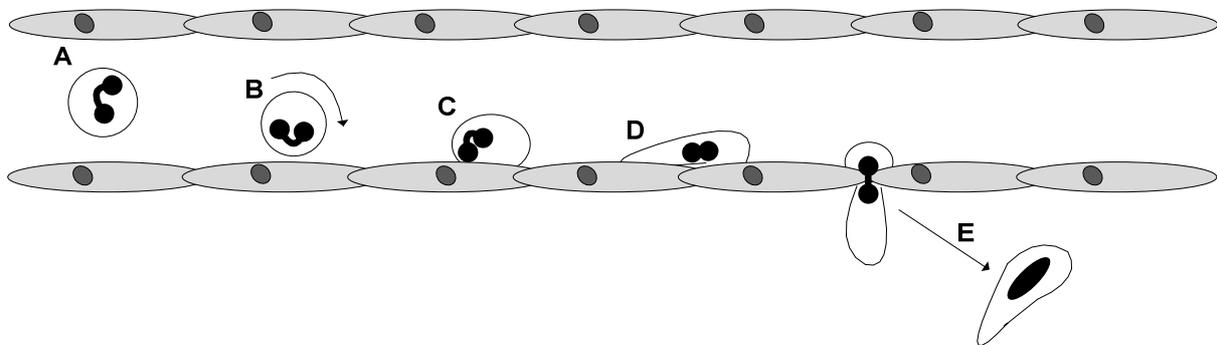


Abb. 2: Leukozytenrekrutierung in einer postkapillaren Venule. Die Extravasation von zirkulierenden Leukozyten im Rahmen einer Entzündung: (A) im Blutstrom (von links nach rechts) fließender Leukozyt, (B) rollender Leukozyt, (C) Aktivierung und Übergang zur (D) festen Adhäsion, (E) Transmigration durch das Endothel der Gefäßwand.

2.4. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantation

Der Einsatz von Immunsuppressiva dient der Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen des adaptiven Immunsystems. Immunsuppressiva verzögern die Abstoßung eines fremden Organs und ermöglichen den längerfristigen Erhalt der Organfunktion. Erzeugung von immunologischer Toleranz gegenüber dem Transplantat ist das bislang unerreichte Ziel der Transplantationsmedizin. Die immunsuppressive Therapie wird direkt nach Herztransplantation begonnen und muss ein Leben lang fortgesetzt werden. Allerdings können die hohen postoperativen Dosierungen im Verlauf reduziert werden, da die Reaktion des Immunsystems auf das Transplantat schwächer wird. Auch das Konzept Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen zu kombinieren, ermöglicht die Menge der einzelnen Medikamente so zu reduzieren, dass einerseits das nötige Immunsuppressionsniveau erreicht und andererseits das Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen minimiert wird. Man kann die heute verwendeten Medikamente nach ihrem Wirkmechanismus grob in drei Kategorien einteilen: hochwirksame entzündungshemmende Mittel aus der Familie der Glukokortikoide, zytotoxische Substanzen und Pilz- und Bakterienwirkstoffe. Aufgrund des breiten, unspezifischen Wirkspektrums haben alle diese Substanzen eine schmale therapeutische Breite. Daher ist eine regelmäßige Bestimmung der Blutspiegel notwendig. In der Herztransplantation ist die Kombinationstherapie aus Tacrolimus, Mycophenolat mofetil und Kortison als gängiges Behandlungsschema etabliert (Mueller et al., 2004).

2.4.1. Calcineurininhibitoren

Ciclosporin A und Tacrolimus gehören zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren mit spezifischer Wirkung auf T-Lymphozyten. Trotz struktureller Unterschiede haben sie fast identische Wirkmechanismen. Über die Bindung an intrazelluläre Signalmoleküle der Familie der Immophiline hemmen sie die Phosphataseaktivität von Calcineurin. Ciclosporin A bindet an Cyclophilin, Tacrolimus (FK506) bindet an FK-bindendes Protein. Nur als Medikament-Protein-Komplex können sie auf Calcineurin wirken. Calcineurin setzt die Signaltransduktion für die Expression des IL-2 Gens in aktivierten T-Zellen in Gang. Als Konsequenz der Calcineurininhibition unterbleibt die IL-2 Produktion und Expression des IL-2-Rezeptors, was eine Hemmung der klonalen Expansion und Differenzierung der aktivierten T-Zellen zu Folge hat (Mueller et al., 2004). Beide Medikamente bilden das Fundament moderner immunsuppressiver Therapien. Der Einsatz von Ciclosporin A als Basistherapie nach HTx ist von 1992 bis 2000 von 99% auf weniger als 75% zurückgegangen. Tacrolimus, das 1992 nur bei 1% der Transplantierten eingesetzt wurde, verzeichnete bis 2000 eine Steigerung auf 25% und löste im Bereich der Herztransplantation Ciclosporin A als Immunsuppressivum der 1.Wahl ab (Heldermann et al., 2003). Die immunsuppressive Potenz von Tacrolimus ist um das hundertfache höher als die von Ciclosporin A. Beide unterliegen einem intensiven Cytochrom-P450-abhängigen Metabolismus, was komplexe Medikamenteninteraktionen bedingt und aufgrund der engen therapeutischen Breite regelmäßige Spiegelbestimmungen und genaue Dosisanpassung erfordert (Taylor et al., 2005).

2.4.2. Zytotoxische Substanzen

Azathioprin und Mycophenolat mofetil (MMF) haben eine vornehmlich additive Rolle und werden als Begleitmedikation gegeben. Sie besitzen zytotoxische Wirkung. Das primär inaktive Azathioprin wird durch intrahepatische Aktivierung zu 6-Mercaptopurin umgewandelt. Enzyme, die für die Purin-de-novo Synthese und die Synthese von Xanthinsäure und Adenylatsuccinat zuständig sind, werden inhibiert und anstelle von Adenin und Guanin werden „falsche“ Produkte in die Nukleotide eingebaut. Die DNA- und RNA-Synthese wird gehemmt. Diese unspezifische Hemmung der Zellproliferation führt einerseits zur Suppression der zellulären und humoralen Immunabwehr durch Hemmung der B- und T-Zellproliferation, andererseits sind auch andere Gewebe betroffen.

MMF hemmt nicht-kompetitiv reversibel die Inositolmonophosphatdehydrogenase, ein Schlüsselenzym der Purin-de-novo Synthese. Die selektive Proliferationshemmung des MMF

auf T- und B-Lymphozyten ergibt sich aus der Unfähigkeit der Lymphozyten, den Wiederverwertungsstoffwechsel von Purinen nutzen zu können. Sie sind auf die de-novo Synthese von Purinen angewiesen (Humiston et al., 1997). Nachdem sich MMF in kontrollierten, randomisierten Studien zur Prävention der akuten Abstoßung nach Herz- und Nierentransplantation effektiver als Azathioprin erwies (Eisen et al. 2005), hat MMF Azathioprin aus dem klinischen Einsatz nach Herztransplantation fast vollständig verdrängt (52). Immunsuppression mit MMF erlaubt im Gegensatz zu Azathioprin geringere Dosen der Calcineurininhibitoren, dadurch eine verbesserte Nierenfunktion und eine schnellere Senkung der Steroiddosis (Hamour et al., 2007).

2.4.3. Glukokortikoide

Glukokortikoide hemmen unspezifisch das gesamte Immunsystem über verschiedene Mechanismen. Die lipophilen Glukokortikoide passieren die Zellmembran um an den intrazellulären Glukokortikoidrezeptor zu binden. Der aktivierte Rezeptor transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und führt dort zu einer Änderung der Transkriptionsrate Glukokortikoid-sensitiver Gene. Ihre antiphlogistische Wirkung basiert auf einer verminderten Produktion von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Stickoxiden und Zytokinen. Die verminderte Expression von IL-1 in Makrophagen führt zu einer indirekten Hemmung der IL-2 Produktion. Humorale und zelluläre Immunabwehr werden gehemmt. Durch die Hemmung der Expression der entsprechenden Adhäsionsmoleküle verhindern sie die Leukozytenrekrutierung und induzieren bei Lymphozyten und Eosinophilen den Zelltod durch Apoptose (Barnes et al., 1998). Sie sind Mittel der ersten Wahl bei akuten Abstoßungsreaktionen. Langfristig wird allerdings versucht die Kortisongabe zu reduzieren oder ganz zu beenden, da die Glukokortikoide erhebliche Nebenwirkungen induzieren (De Bosscher et al., 2000).

Alle genannten Immunsuppressiva haben erhebliche immunologische wie auch nicht-immunologische Nebenwirkungen. Glukokortikoide beeinflussen den Lipid- und Glucosestoffwechsel, was einen Diabetes mellitus und eine Hyperlipidämie zur Folge haben kann (Schleimer et al., 1993). Wichtige Nebenwirkungen der Calcineurininhibitoren sind Nephro- und Neurotoxizität (Matas et al., 2006). Folgen der unselektiven Wirkung von Azathioprin sind vor allem hämatologische Veränderungen im Rahmen einer Knochenmarksdepression. MMF kann schwere gastrointestinale Beschwerden verursachen (Diaz et al., 2007). Die Schwächung des Immunsystems bahnt bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen den Weg. Das Auftreten von opportunistischen Infektionen ist unter

immunsuppressiver Therapie charakteristisch. Die Inzidenz von Neoplasien ist unter Einnahme der immunsuppressiven Medikamente nach Transplantation signifikant erhöht (Gutierrez-Dalmau et al., 2007). Aufgrund der Schwere dieser unerwünschten Nebenwirkungen und ihrer Bedeutung hinsichtlich der Prognose für herztransplantierte Patienten ist nicht nur eine Optimierung der bisher etablierten immunsuppressiven Therapie wünschenswert, sondern vor allem die Erforschung neuer alternativer Strategien. Auf der Suche nach verbesserten Therapiemöglichkeiten spielt die Erforschung der immunologischen und pathophysiologischen Vorgänge der Transplantatabstoßung eine grundlegende Rolle. Das ideale therapeutische Ziel wäre durch gezieltes Eingreifen in das menschliche Immunsystem Toleranz erzeugen zu können.

2.5. Erythropoietin

Erythropoietin (Epo) ist ein körpereigenes Glykoprotein. Das Hormon wird beim Erwachsenen vorwiegend in der Niere produziert und stimuliert die Erythropoese im Knochenmark. Über einen Hypoxie-induzierten Mechanismus wird Erythropoietin ausgeschüttet, um die erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark zur Differenzierung zu stimulieren und somit die Anzahl an zirkulierenden Erythrozyten zu erhöhen. Durch diese allgemein protektive Antwort auf Gewebhypoxie wird die adäquate Oxygenierung durch Erhöhung der zirkulierenden Erythrozytenzahl erreicht (Buemi et al., 2002). Die Herstellung von rekombinantem Erythropoietin hat den klinischen Einsatz ermöglicht. Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEpo) wird klinisch genutzt, um die Erythropoese zur Prävention und Behandlung von Anämien verschiedener Kausalitäten wie Niereninsuffizienz, Tumorerkrankungen, Thalassämien, chronisch infektiösen Erkrankungen und nach Knochenmarkstransplantation zu stimulieren. Während der chronischen Anwendung können durch die gesteigerte Blutviskosität kardiovaskuläre Komplikationen entstehen (Buemi et al., 2002).

Die klassische Wirkung von Epo wird über den Epo-Rezeptor, einen spezifischen, an der Oberfläche von erythroiden Vorläuferzellen exprimierten Rezeptor, vermittelt (Calvillo et al., 2003). Es hat sich gezeigt, dass Epo und Epo-R ebenfalls in nicht-hämatopoetischen Geweben und Organen, im Gehirn, im Rückenmark, in der Retina, im Skelettmuskel (Parsa et al., 2004), in Endothelzellen (Anagnostou et al., 1994) und im Myokard (Wright et al., 2004) vorhanden sind. Dabei wurden hinsichtlich ihrer Affinität zwei Rezeptor-Klassen unterschieden. Der hoch-affine Rezeptor vermittelt die bekannten hämatopoetischen Effekte, während der niedrig-affine Rezeptor vermutlich für gewebprotektive nicht-hämatopoetische Effekte verantwortlich ist (Yonekura et al., 1991).

Die protektive Rolle von Epo bei der Prävention des Ischämie-induzierten Zelltods wurde durch Versuche am Gehirn nachgewiesen (Bernaudin et al., 1999). So reduzierte die intraperitoneale Applikation von rhEpo an Ratten die Auswirkungen einer fokalen Ischämie im Gehirn um 50-70% (Brines et al., 2000). Dieses Tiermodell ließ sich erfolgreich in eine klinische Studie zur cerebralen Ischämie umsetzen (Ehrenreich et al., 2002). In einer Reihe weiterer präklinischer Modelle konnte bei verschiedenen Entzündungserkrankungen des ZNS eine protektive Wirkung von Epo, d.h. reduzierte Entzündungszellzahl und verminderte Produktion von Zytokinen und Chemokinen, festgestellt werden (Agnello et al., 2002; Sugawa et al., 2002). Weitere am ZNS durchgeführte Studien zeigten, dass Epo zu einer Verbesserung der Perfusion führt und auch auf diese Weise zu einer Limitierung des Gewebeschadens beiträgt (Grasso et al., 2002). Diese günstigen Auswirkungen von Epo beschränken sich nicht nur auf das ZNS, sondern konnten auch in anderen Organsystemen, wie beispielsweise Lunge (Wu et al., 2006), Leber (Schmeding et al., 2010) und quergestreiftem Muskel (Harder et al., 2009; Rezaeian et al., 2008) nachgewiesen werden. Auch im infarzierten Herzen entfaltet Epo seine protektive Wirkung. Die Verabreichung von Epo vor oder während Ischämie führt zur signifikanten Verbesserung der funktionellen Erholung des Myokards während Reperfusion und zu einer verminderten Infarktgröße (Bogoyevitch et al., 2004). Es wird beobachtet, dass eine Hemmung der Apoptose der Kardiomyozyten durch Epo ein zellulärer Mechanismus ist, der in der akuten Phase zu diesen protektiven Effekten bedeutend beiträgt (Calvillo et al., 2003). Zusätzlich fördert Epo die Angiogenese. Westenbrink et al. konnten in einer Studie demonstrieren, dass an der Epo vermittelten Neovaskularisation in ischämischem Myokard zwei Mechanismen beteiligt sind. Zum einen ist Epo für eine erhöhte Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und deren vermehrte Inkorporation in das Endothel verantwortlich, zum anderen führte die Epo-Behandlung zu einer erhöhten myokardialen Expression des Wachstumsfaktors VEGF (Westenbrink et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der Signalübertragung von Epo auf Epo-R zu einer Fehlentwicklung des embryonalen Kreislaufs führt, was auf eine Rolle von Epo bei dem Gefäßwachstum hindeutet (Wu et al., 1991).

Doch Epo wirkt nicht nur anti-apoptotisch und pro-angiogen, sondern auch entzündungshemmend (Contaldo et al., 2007). In Versuchen von Rui et al. konnte durch Vorbehandlung mit Epo die durch Ischämie-Reperfusion induzierte, akute Entzündungsantwort im Myokard unterdrückt werden (Rui et al., 2005). Li et al. untersuchten die anti-inflammatorische Wirkung von Epo an einem Modell zur chronischen Herzinsuffizienz. Erst sechs Wochen nach Myokardinfarkt wurde die Epo-Behandlung begonnen und für vier Wochen fortgeführt. Auch hier waren die proinflammatorischen Zytokine und die Anzahl der in das infarzierte Myokard eingewanderten Leukozyten

signifikant reduziert (Li et al., 2006). Im akuten wie im chronischen Modell wird die anti-inflammatorische Wirkung von Epo begleitet von einer Verbesserung der Herzfunktion und Verminderung des Remodellings (Van der Meer et al., 2005).

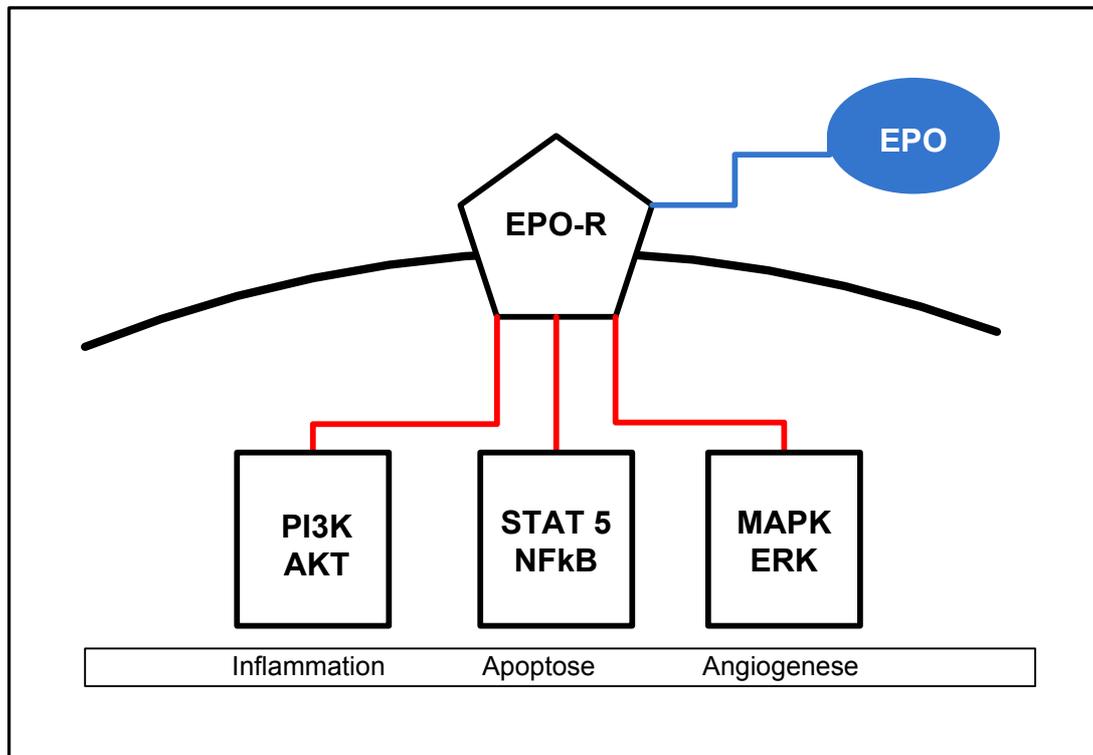


Abb. 3: Intrazelluläre Signalwege von Erythropoietin. Erythropoietin bindet an den membranständigen Epo-Rezeptor. Dies führt zur Beeinflussung von sekundären Signalmolekülen wie Signal transduction and activator of transcription 5 (STAT 5), der mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK1/2, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und nuclear factor kappa B (NFκB). STAT 5, aber auch Epo direkt hemmt die Expression von NFκB. NFκB ist an der Epo-vermittelten Gewebeprotektion beteiligt. Via Aktivierung von AKT hemmt PI3K die Inflammation und fördert die Angiogenese. ERK1/2 wirkt pro-angiogen.

Der Wirkungsmechanismus von Epo ist noch nicht vollständig geklärt. Es sind vermutlich verschiedene Signaltransduktionsketten an der kardioprotektiven Wirkung von Epo beteiligt, dazu gehören u.a. die IP3K und ERK1/2-Kaskade (Schulmann et al., 2002). ERK1/2 gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und spielt bei der Begrenzung der Infarktgröße eine entscheidende Rolle (Schulmann et al., 2002; Guillard et al., 2003). Studien haben gezeigt, dass Epo den PI3Kinase/Akt Signalweg aktiviert. Eine Aktivierung von Akt führt zur Expression und Aktivierung von eNos. Das durch eNos gebildete NO schützt Kardiomyozyten vor Apoptose durch Reduktion des oxidativen Stress (Burger et al., 2006; Tramontano et al., 2003). Digicaylioglu et al. zeigten, dass Epo auch anti-inflammatorisch über den Signalweg von JAK2 und NFκB wirkt (Digicaylioglu et al., 2001). Die Hemmung von NFκB während Ischämie und Reperfusion führt vermutlich zur Unterdrückung der

Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Liu et al., 2006). Eine grobe Zusammenfassung der intrazellulären Signalwege findet sich in Abb. 3.

2.6. Ziel der Studie

In zahlreichen vielversprechenden experimentellen Studien wurden die pleiotropen Wirkmechanismen von Erythropoietin untersucht und günstige Auswirkungen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden festgestellt. Zur Wirkung von Erythropoietin nach Herztransplantation gibt es allerdings bislang kaum Daten. Mögliche protektive, pleiotrope Effekte nicht-hämatopoetischer Dosen von Erythropoietin auf die postischämische Mikrozirkulation und Entzündungsreaktion in transplantierten Herzen sind bisher nicht untersucht worden.

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war daher, mit Hilfe eines etablierten tierexperimentellen Transplantationsmodells und mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, die durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufenen mikrozirkulatorischen Störungen und Entzündungsreaktionen nach allogener Herztransplantation an der Maus zu untersuchen. Besonders eingegangen wurde auf die Frage, ob und inwieweit eine Behandlung mit Erythropoietin eine Reduktion der Ischämie-induzierten Mikrozirkulationsstörungen und des inflammatorischen Schadens bewirken kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften von rekombinantem humanen Erythropoietin mit Hilfe eines in vivo Modells genauer untersucht und Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus von Erythropoietin an Endothel und Kardiomyozyten erarbeitet.

Auf folgende Fragen wurde näher eingegangen:

- 1) Ist die koronare Mikrozirkulation nach allogener Herztransplantation gestört?
- 2) Kann Erythropoietin die durch die Transplantation verursachte Störung der Mikrozirkulation vermindern?
- 3) Kann Erythropoietin die nach allogener Transplantation auftretende leukozytäre Entzündungsreaktion vermindern?
- 4) Übt Epo seine anti-inflammatorische Wirkung über die Beeinflussung der Degranulation von Mastzellen aus?
- 5) Kann Erythropoietin das Überleben von Herzallotransplantaten verlängern?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden C57BL/6 und Balb/c Mäuse verwendet. Sie wurden von den Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) gekauft und im Institut für klinische und experimentelle Chirurgie, Homburg/Saar, Deutschland gezüchtet. Ihr Körpergewicht bei Versuchsdurchführung lag zwischen 20-30 g. Die Tiere wurden unter den üblichen Bedingungen - bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65%, einer Raumtemperatur zwischen 22°C und 24°C und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus - gehalten und hatten Zugang zu Standardtrockenfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum. Die Experimente wurden den Tierschutzgesetzen entsprechend durchgeführt und von der zuständigen Ethikkommission für Tierexperimente genehmigt.

Die Spender- und Empfängertiere erhielten für die operativen Eingriffe eine Narkose mit 0,75 mg Ketamin und 2,5 mg Xylazin pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal. Bei den Empfängertieren wurde die Narkose nach Tracheotomie durch Inhalation von Isofluran 0,5% aufrechterhalten. Es wurde eine Heizplatte verwendet um eine Körpertemperatur von 37°C während des gesamten Experiments zu gewährleisten. Nach Durchführung des Experiments wurden die narkotisierten Tiere durch Sternotomie, Phrenotomie und Ventrikulotomie getötet und Gewebe zur histologischen Untersuchung entnommen.

In zusätzlichen Experimenten wurde nach der Durchführung der Transplantation die Operationswunde über dem Transplantat verschlossen. Nachdem die Tiere aus der Narkose erwachten, wurden sie in ihren Käfig zurückgesetzt und die Herzfunktion wurde anschließend täglich durch Inspektion und Palpation kontrolliert.

3.2. Experimentelles Modell - Heterotope Herztransplantation

Das Herz eines allogenen Spenders wurde an die Halsgefäße eines Empfängers transplantiert (Matsuura et al., 1991). Die Anastomosen wurden durch eine vereinfachende Cuff-Technik hergestellt. Sämtliche operative Eingriffe fanden unter sauberen aber nicht sterilen Bedingungen statt.

3.2.1. Explantation des Spenderherzens

Das Spendertier wurde mit einer intraperitonealen Injektionsnarkose anästhesiert. Im Op-Feld befand sich eine Wärmplatte, auf welcher das Tier in Rückenlage platziert wurde, um während der gesamten Operation eine Körpertemperatur von 37°C aufrecht zu erhalten. Durch eine mediane Laparotomie wurde das Abdomen eröffnet. Mit Hilfe von Wattesticks wurden die Viszeralorgane ausgelagert und die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis freipräpariert. Um später eine Perfusion von Leber, Magen oder Duodenum zu verhindern bzw. zu minimieren und im Herzen einen möglichst hohen Perfusionsdruck zu erreichen, wurden der Truncus coeliacus, die Arteria mesenterica superior und die Aorta abdominalis zusammen mit der Vena cava inferior unmittelbar vor der Bifurkation je mit einem 9-0 Nylonfaden ligiert. Möglichst weit proximal der Ligatur wurde ein Mikrogefäßclip auf die Aorta infrarenalis gesetzt. Nach Arteriotomie wurde intraluminal ein Polyethylenkatheter (1,2 mm Durchmesser) in diese vom Kreislauf isolierte Gefäßstrecke der Aorta platziert. Heparinsulfat (50 I.E. in 0,3 ml NaCl) wurde in die Vena cava injiziert. Der Clip wurde von der Aorta entfernt und die Organperfusion mittels kalter Perfusionslösung (Perfadex, Medisan, Schweden) über die aortale Kanüle begonnen. Durch eine Inzision der Vena cava konnte das Blut und das überschüssige Volumen entweichen. Es wurde ca. 10 min mit einem Perfusionsdruck von 100 cmH₂O perfundiert und unter visueller Kontrolle darauf geachtet, dass möglichst kein Spenderblut in der myokardialen Mikrozirkulation und den Herzhöhlen verbleibt. Die Laparotomie wurde um eine mediane Sternotomie erweitert, gefolgt von einer bilateralen Abtrennung des Diaphragmas. Beide Thoraxhälften wurden nach lateral abgespreizt. Das Perikard wurde reseziert. Das Herz wurde nur indirekt mit feuchten Kompressen oder umliegende Organstrukturen mobilisiert, um eine mechanische Alteration der Mikrozirkulation zu vermeiden. Anschließend wurde die Vena cava inferior direkt unterhalb des rechten Vorhofs ligiert und abgesetzt. Die Aorta wurde bis zum Aortenbogen und die Arteria pulmonalis communis bis zu ihrer Bifurkation mobilisiert und abgesetzt. Die Pulmonalvenen wurden durch eine einzelne große Ligatur hinter dem Herzen zusammengefasst und abgesetzt. Das Spenderherz wurde umgehend in ein mit kalter Perfusionslösung gefülltes Gefäß gegeben und bis zur Implantation kalt gelagert.

3.2.2. Tracheotomie und Beatmung der Empfängertiere

Das narkotisierte Empfängertier wurde in Rückenlage mit dem Kopf Richtung Operateur auf der Wärmplatte gelagert. Nach Eröffnung der Regio collis über einen nach rechts verlagerten Kocherschen Kragenschnitt wurde die prätracheale Muskulatur atraumatisch in

Längsrichtung gespalten und die freigelegte Trachea mit einer Ligatur angeschlungen. Zwischen zwei Knorpelspannen wurde das Ligamentum anulare durchtrennt, der Tubus in die Trachea eingeführt und mit einer vorgelegten Ligatur fixiert.

Der Empfänger wurde volumenkontrolliert mit einer Atemfrequenz von 150/min, einem Atemzugvolumen von 200 ml und 0,5% Isofluran/Sauerstoff (Baxter GmbH, Deutschland) beatmet (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland; Vapor 19.3 Forane® Abbott, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland).

3.2.3. Vorbereitung des Empfängers

Zunächst wurde die rechte Vena jugularis mobilisiert, danach ihre Äste unterbunden und abgetrennt. Nach Entfernung des M. sternocleidomastoideus durch thermische Koagulation wurde die Arteria carotis communis dextra freigelegt und unter Schonung des Nervus vagus ebenfalls mobilisiert. Beide Gefäße wurden proximal mit Mikrogefäßclips okkludiert und weit distal mit 9-0 Nylonfäden ligiert. Ziel war, ausreichend große und freie Gefäßenden herzustellen um die Gefäßanastomosen zu vereinfachen.

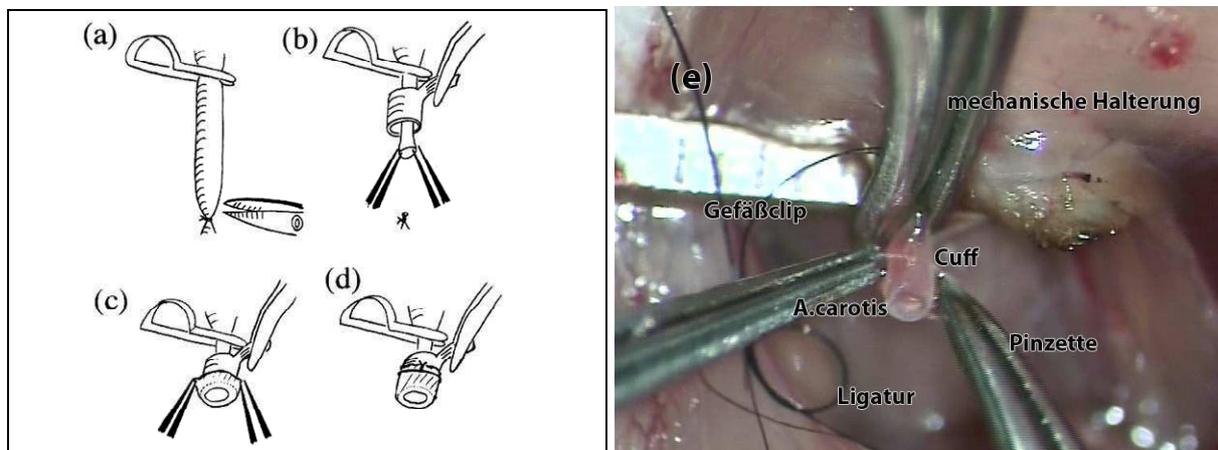


Abb. 4: Präparation der Arteria carotis communis (CA). (a) Die rechte CA wurde mobilisiert und proximal mit einem Mikrogefäßclip okkludiert und weit distal mit 9-0 Nylonfaden ligiert. (b) An einem transmuralen Haltefaden wird die CA durch das Lumen eines röhrenförmigen Polyethylencuffs gezogen. (c) Mit extrafeinen Pinzetten ergreift man die Gefäßwand am distalen Ende, stülpt sie vorsichtig über das Cuff, (d) bevor sie dann am Cuff mit einer zirkulären Ligatur (9-0 Nylonfaden) befestigt wird (Tomita et al., 1997). (e) zeigt den Operationssitus während das freie Ende der CA über das Polyethylencuff gestülpt wird.

Die beiden Gefäße wurden distal abgesetzt und die Gefäßenden mit Heparin benetzt. An den Gefäßenden wurden transmurale Haltefäden (11-0 Nylonfäden) in die Gefäßwand gesetzt, die es erleichterten die Gefäße durch das Lumen eines röhrenförmigen

Polyethylencuffs zu ziehen (für die Arterie ca. 1 mm lang und 0,6 mm Außendurchmesser; für die Vene ca. 1 mm lang und ca. 0,8 mm Außendurchmesser). Die Cuffs wurden mit einer mechanischen Halterung in Position gebracht und die Gefäße jeweils mit Hilfe des Haltefadens durch das Cuff durchgezogen. Mit extrafeinen Pinzetten wurde die Gefäßwand am distalen Ende gegriffen, vorsichtig über das Cuff gestülpt, bevor sie dann am Cuff mit einer zirkulären Ligatur (9-0 Nylonfaden) befestigt wurden (Abb. 4).

3.2.4. Implantation des Spenderorgans

Das Spenderherz wurde in der Regio collis des vorbereiteten Empfängers platziert. Die Herzspitze zeigte nach lateral-kranial und Aorta und Pulmonalarterie kamen in nächster Nähe der vorbereiteten Halsgefäße zum Liegen. Die Spenderaorta wurde dann über das Cuff der Empfängercarotis gestülpt und mit einer zirkulären Ligatur am arteriellen Cuff fixiert. Die Pulmonalarterie wurde in gleicher Weise mit der Jugularvene anastomosiert (Abb. 5).

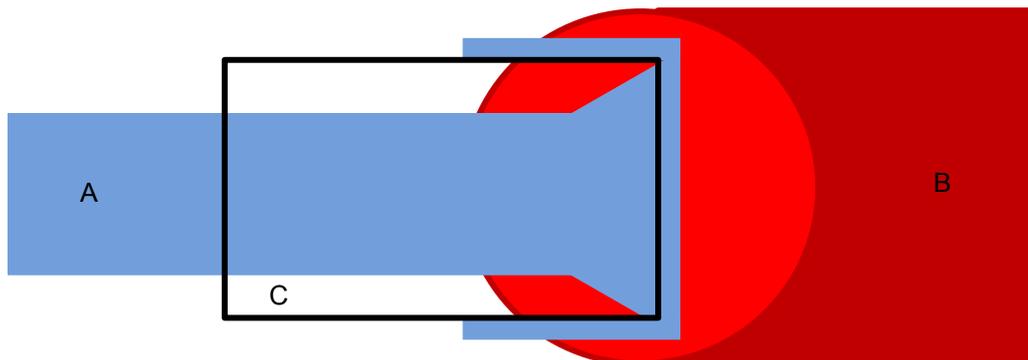


Abb. 5: Schematische Darstellung der Gefäßanastomose. Gefäß des Spenderherzens (B) wird über das Plastikcuff (C) gestülpt, welches zuvor am Empfängergefäß (A) mittels zirkulärer Ligatur befestigt wurde.

Nachdem beide Gefäße anastomosiert worden sind, wurden die Mikrogefäßclips entfernt und dadurch die Reperfusion des transplantierten Herzens erlaubt. Bei allen Experimenten fand dies nach einer 180minütigen kalten Ischämiezeit statt. Sauerstoffreiches Blut gelangte über die Empfängercarotis retrograd in die Aorta ascendens des Spenders und speiste von dort antegrad die Koronararterien des Transplantats. Die Koronarzirkulation wurde über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof drainiert. Das Blut gelang somit in den rechten Ventrikel und wurde dann über den Truncus pulmonalis in die Vena jugularis des Empfängers gepumpt.

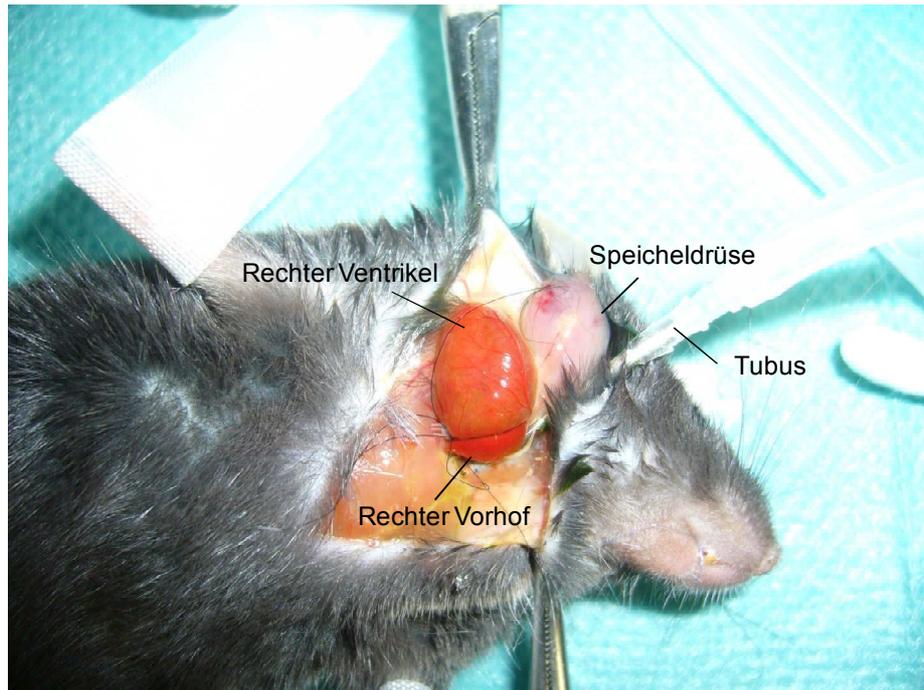


Abb. 6: Übersicht der anatomischen Verhältnisse nach Transplantation. Das narkotisierte, über die Tracheotomie beatmete Empfängertier wird in Rückenlage auf der Wärmplatte gelagert. Das Spenderherz ist in der Regio collis des Empfängers platziert. Die rosig-rötliche Farbe des Transplantats spricht für eine gute Perfusion und ausreichende Oxygenierung. Die Herzspitze zeigt nach lateral-kaudal. Man hat direkte Aufsicht auf den rechten Ventrikel und den rechten Vorhof.

3.2.5. Chronische Transplantationsexperimente

In zusätzlichen Experimenten wurde nach der Durchführung der Transplantation die Operationswunde über dem Transplantat verschlossen. Nachdem die Tiere aus der Narkose erwachten, wurden sie in ihren Käfig zurück gesetzt und die Herzfunktion anschließend täglich durch Inspektion und Palpation der Halsregion kontrolliert. Der Verlust sichtbarer und palpabler Herzaktionen wurde als Kennzeichen der vollständigen Abstoßung definiert.

In einer der Gruppen zum Langzeittransplantatüberleben wurde den C57BL/6 Mäusen zwei Tage vor Transplantation eine osmotische Pumpe (ALZET Pumpen, model 2004; Charles River, Sulzfeld, Germany) in das Unterhautgewebe am Rücken implantiert, um eine kontinuierlich systemische Gabe des Immunsuppressivums Ciclosporin A (50 mg/ml; Sandimmun, Novartis, Germany) zu gewährleisten. In Vorversuchen kontrollierten wir die Funktionalität dieser Pumpen, indem drei C57BL/6 Mäuse die genannten mit Ciclosporin A gefüllten osmotischen Pumpen implantiert wurden und regelmäßige Spiegelkontrollen des Ciclosporin A im Blutplasma durchgeführt wurden. Wir fanden über einen Beobachtungszeitraum von 4 Wochen konstante Plasmaspiegel von ca. 1000 ng/ml in allen

drei Tieren. Nach definitiver Abstoßung wurden die Transplantate und die nativen Herzen den narkotisierten Tieren entnommen und der histologischen Aufarbeitung zugeführt.

3.3. Intravitale Mikroskopie

Als Methode der direkten Untersuchung der Mikrozirkulation wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie verwendet, mit Hilfe derer - nach Verabreichung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe – die unterschiedlichen Strukturen der Mikrozirkulation im lebenden Gewebe visualisiert werden konnten.

3.3.1. Physikalische Grundlagen

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie nutzt die Eigenschaft fluoreszenzfähiger Stoffe bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge Lichtquanten zu emittieren. Gemäß der Definition von Fluoreszenz dauert die Lichtemission genau so lange, wie anregendes Licht auf ein zur Fluoreszenz befähigtes Molekül einstrahlt. Wird ein Molekül mit Licht bestrahlt, so wird ihm physikalisch gesehen Energie zugeführt und von ihm absorbiert. Dabei kollidieren einfallende Photonen mit Elektronen des betreffenden Moleküls und übertragen ihre kinetische Energie auf dessen Elektronen. Diese Elektronen werden aus ihrem Energieniveau auf ein energiereicheres gehoben und so aus ihrem stabilen Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Die so zugeführte Energie versetzt die jeweilige Substanz in einen energetisch höheren Zustand, wobei die zugeführte Lichtenergie in andere Energieformen (Schwingungs-, Rotations-, Anregungsenergie) umgewandelt und zwischengespeichert wird. Da der stabilste Zustand einer chemischen Verbindung normalerweise dem energieärmsten entspricht, versucht eine angeregte Substanz diesen energieärmsten Grundzustand schnellstmöglich wieder einzunehmen, indem sie die überschüssige Energie in Form von Wärme, chemischer oder elektromagnetischer Energie wieder abgibt. Unter Abgabe von Lichtquanten fallen die angeregten Elektronen zurück auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Gemäß den physikalischen Regeln wird ein gewisser Anteil der eingestrahlten Lichtenergie nicht als Licht zurückgestrahlt, sondern in einer anderen Energieform (z.B. Wärme) abgegeben. Daher unterscheiden sich die emittierten Lichtquanten von den einfallenden Quanten hinsichtlich ihrer Energie, sie sind energieärmer. Das Spektrum der emittierten Wellenlängen ist nicht abhängig von der Anregungswellenlänge, sondern von den Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten

Moleküls. Dieser Unterschied zwischen den Wellenlängen erlaubt mit Hilfe von speziellen Filtern die Unterscheidung zwischen Anregungslicht und dem schwächeren emittierten Licht. Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik bedarf es einer speziellen Filteranordnung innerhalb des Mikroskops. Der erste Filter hinter der Lichtquelle ist der sogenannte Anregungsfilter, der aus dem gesamten Wellenlängen-Spektrum der Lampe denjenigen Wellenlängenbereich isoliert, der zur Anregung des entsprechenden Fluorochroms erforderlich ist. Ein nachgeschalteter, dichromatischer Teilerspiegel reflektiert das Anregungslicht auf das zu mikroskopierende Objekt (Abb. 7). Gleichzeitig muss er für das emittierte Fluoreszenzlicht möglichst vollständig durchlässig sein. Da dieser auch als Reflexions-Kurzpassfilter bezeichnete Spiegel bestimmte Bereiche eines Spektrums vollständig reflektieren und andere durchlassen kann, ist es möglich Anregungs- und Emissionslicht voneinander zu trennen. Als letztes wird mittels eines Sperrfilters aus dem verbleibenden Wellenlängenspektrum nur dasjenige herausgefiltert, das für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist.

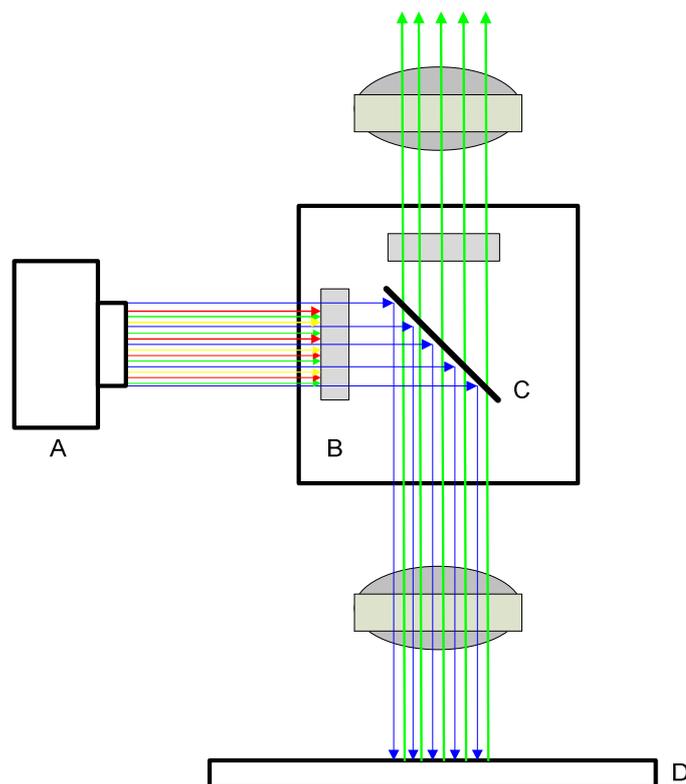


Abb. 7: Schemazeichnung zum Aufbau einer Auflichtfluoreszenzapparatur. Der Anregungsfilter (B) filtert das von der Lampe (A) ausgestrahlte Wellenspektrum. Der dichromatische Teilerspiegel (C) reflektiert das Licht auf den Objektträger (D).

3.3.2. Aufbau und Durchführung

Im Anschluss an die heterotope Herztransplantation wurde das beatmete Empfängertier auf der Heizplatte unter dem Fluoreszenzmikroskop positioniert. Das Transplantat lag mit der freien Wand des rechten Ventrikels nach oben. Ein Deckglass wurde in eine mechanische Haltevorrichtung eingespannt und unmittelbar über dem Herzen fixiert. Die konstant befeuchtete Myokardoberfläche des rechten Ventrikels wurde durch Adhäsionskräfte vermittelt unter dem Deckglas in vertikaler Position fixiert. So wurde jegliche Kompression des Myokards und damit verbundene eventuelle Affektion der Mikrozirkulation vermieden. Wenige Minuten vor Mikroskopiebeginn wurden dem Versuchstier die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC)-Dextran (Molekulargewicht 150.000 D, 0,1 mg i.v.; Sigma Chemical Co.) und Rhodamin 6G (0,01 mg i.v., Sigma Chemical., St.Louis, Mo; Lösungsmittel: NaCl) im Verhältnis 1:1 retrobulbär injiziert.

Die koronare Mikrozirkulation des rechtsventrikulären subepikardialen Myokards wurde mit Hilfe eines modifizierten Zeiss Axiotech Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) sichtbar gemacht. Zur Ausstattung des Mikroskops gehört eine 100 Watt Quecksilberdampflampe und Filtersätze für blaues (450-490 nm Anregungsspektrum und >520 nm Emissionsspektrum), grünes (530-560 nm; > 580 nm), und ultraviolettes (330-390; >430 nm) Licht. Die mikroskopischen Bilder wurden auf einen Bildschirm (PVM 1371- QM, Sony corp., Tokio, Japan) übertragen und mit Hilfe einer Digitalkamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet und auf DVD (DVD R121, Samsung Group, Seoul, South Korea) gespeichert, um nachträglich ausgewählte Parameter zur Mikrozirkulation mit der Cap Image Software (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysieren zu können. Zwischen Kamera und Bildschirm war ein Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) geschaltet, der eine Aufzeichnung und Paralleleinblendung von mikroskopischer Videoaufnahme, Datum und laufender Zeit in Stunden, Minuten und Sekunden ermöglicht.

Zur Mikroskopie wurden verschiedene Objektive verwendet. Ein 5x und 10x Objektiv (Zeiss, Oberkochen) wurden für Übersichtsaufnahmen, ein 20x Objektiv und ein 50x Objektiv wurden für detaillierte Aufnahmen und zur Messung der Parameter verwendet. Alle Aufnahmen wurden mit blauem Auflicht aufgenommen. Mit dem 20x und 50x Objektiv wurde auch jeweils eine 20 s Sequenz im Grünlichtfilter bestimmt.

3.3.3. Fluoreszenzfarbstoffe

Bei der Intravitale Mikroskopie wurden die Farbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin 6G eingesetzt, da Blutplasma, Endothel und Blutzellen keine ausreichende Eigenfluoreszenz besitzen.

Fluoreszein-5-isothiocyanat (Sigma Chemical Co) ist ein an Dextran mit einem Molekulargewicht von 150.000 Dalton gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff, der der Kontrastverstärkung von Blutgefäßen dient. Über Thiocarbamid bindet er an Proteine und färbt das Blutplasma an. Gefäßwände und Erythrozyten können besser abgegrenzt werden. Das Exzitationsmaximum von FITC liegt bei 490 nm. Das Fluorochrom wird renal und hepatisch metabolisiert und eliminiert.

Rhodamin 6G (Sigma Chemical Co) ist ein positiv geladener, lipophiler, rot fluoreszierender Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 479 Dalton. Rhodamin 6G bindet an Cytochrom C, färbt Mitochondrien und Kernstrukturen lebender Zellen und eignet sich zur Sichtbarmachung von Leukozyten in Blutgefäßen. Es hat eine Anregungswellenlänge von 530-560 nm und eine Emissionswellenlänge >580 nm. Die intravenöse Injektion des Farbstoffes erfolgt am narkotisierten Empfängertier retrobulbär in einer 1:1 Mischung zusammen mit Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC)-Dextran.

3.3.4. Mikrozirkulatorische Analyse

Die rechtsventrikuläre Mikrozirkulation wurde nach 1 h, 3 h und 6 h nach Reperfusion mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb.8). Jede Aufnahmereihe begann damit, dass das in der Beobachtungsfläche befindliche Gewebe mittels eines 5x bzw. 10x Objektiv systematisch abgefahren und aufgenommen wurde. So konnte der Untersucher sich zunächst orientieren und das Ausmaß der Gewebefläche und dessen Zustand nach Reperfusion erfassen. Anschließend wurden 3 bis 5 zufällig ausgewählte Kapillarfelder und 3 bis 5 Venolen verschiedener Lokalisationen ausgewählt und mit dem 50x Objektiv im Grünlicht- und Blaulichtfilter zu jeweils 20-30 s aufgenommen. Arteriolen konnten in ihrem Verlauf ebenfalls zur Darstellung gebracht werden bevor sie in die Tiefe des Myokards zogen, wo sie der intravitale Mikroskopie dann aber unzugänglich waren.

3.3.4.1. Venöse und kapillare Gefäßdurchmesser

Zur Bestimmung der Durchmesser von Venolen und Kapillaren wurden diese bei blauem Auflicht mit dem 50x Objektiv 15-20 s aufgenommen. Die Auswertung erfolgte im Videostandbild. Dabei wurde die Distanz zwischen zwei gegenüberliegenden Punkten der fluoreszierenden Plasmasäule der Mikrogefäße bestimmt. Es wurden 3-5 Messungen über die gesamte relevante venöse Gefäßstrecke bestimmt und mindestens 5 verschiedene Kapillardurchmesser im gesamten Kapillarfeld gemessen. Der mittlere Kapillardurchmesser und der venöse Durchmesser wurden in μm angegeben.

3.3.4.2. Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Aufnahmen in blauem Auflicht und mit dem 50x Objektiv wurden auch zur Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (RBCV) in den einzelnen Segmenten der Mikrozirkulation verwendet. Zur Auswertung der RBCV wurde die Line-shift-Methode angewendet. Hierzu wurde eine Achse durch das Gefäßlumen gelegt und das Computerprogramm registrierte über ein Zeitintervall von 10 s Helligkeitsänderungen im Gefäßverlauf über der Achse. Anschließend wurden die gemessenen Helligkeitsänderungen als Raster mit Linien unterschiedlicher Grauabstufungen über die Zeit dargestellt. Die Ortsänderung eines Farbtönen über die Zeit stellte sich als Steigung der Linie im Raster dar. Die Markierung der Steigung dieser Linien war für die Berechnung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit entscheidend. Die Blutflussgeschwindigkeiten in den Kapillaren und Venolen wurden in mm/s angegeben. Die Blutflussgeschwindigkeit in den Arteriolen konnte mit diesem Messverfahren nicht mit der gewünschten Genauigkeit bestimmt werden, da sie generell über der mit der Line-shift-Methode möglichen zeitlichen und räumlichen Auflösung lag.

3.3.4.3. Funktionelle Kapillardichte

Die Kontrastverstärkung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC-) Dextran und blauem Auflicht diente der Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD), die laut Definition der Länge der perfundierten Kapillaren pro epikardialer Oberfläche entspricht. Kapillaren mit stehender Plasmasäule wurden als nicht perfundiert gewertet und nicht in die Messung einbezogen. Das Computerprogramm errechnete aus der Gesamtlänge der durch Nachfahren am Standbild markierten perfundierten Kapillaren und der durch Umranden

gemessenen Gesichtsfeldfläche die funktionelle Dichte der Kapillaren. Die FCD wurde ausgedrückt in cm/cm^2 .

3.3.4.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen erfolgte durch Markierung der zirkulierenden Leukozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G und dem 50x Objektiv bei grünem Auflicht. Rollende Leukozyten wurden definiert als diejenigen, die sich mit einer deutlich geringeren Geschwindigkeit als das frei fließende Blut an der Endotheloberfläche entlang bewegten. Die Anzahl der einen definierten Referenzpunkt innerhalb 20 s passierenden rollenden Leukozyten wurde in Zellen/min/mm angegeben. Die feste Leukozytenadhäsion wurde definiert durch die Anzahl der Rhodamin 6G-gefärbten Leukozyten, die mindestens 20 s ortsfest an der Endotheloberfläche verblieben. Die feste Adhäsion wurde in Zellen/ mm^2 Endotheloberfläche angegeben. Zusätzlich wurden Leukozyten gezählt, die sich ortsfest in den Kapillaren befanden und dort das Lumen verlegten. Das sogenannte Plugging war die Anzahl dieser Leukozyten im gewählten Kapillarfeld und wurde in Zellen/Gesichtsfeld angegeben (Schramm et al., 2007a).

3.3.4.5. Gefäßpermeabilität (makromolekulare Leakage)

Der Fluoreszenzfarbstoff FITC ist gekoppelt an Dextran, ein Molekül mit relativ großem Molekulargewicht (≈ 150.000 KD) und passiert Gefäßwände und Membrane somit nur bei relevanter Schädigung derselben.

Die makromolekulare Leakage wurde berechnet als dimensionsloser Quotient von extravasaler zu intravasaler Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran. Sie war ein Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität. Zur Berechnung eines Mittelwertes wurden jeweils 3-5 Aufnahmen mit dem 20x Objektiv bei blauem Auflicht vermessen.

3.4. Histologische Analysen

3.4.1. Probenentnahme

Am Ende eines jeden Versuches wurden 0,2 ml Vollblut aus der Vena cava in Ca^{2+} -EDTA-beschichteten Röhrchen zur Erstellung eines Blutbildes asserviert. Anschließend wurden den Versuchstieren Herz und Graft für die histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen entnommen. Die Gewebeproben wurden geteilt und in TissueTek (Jung Einbettmedium, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet, in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Durchführung der entsprechenden Untersuchungen bei -80°C gelagert oder in 4%-igem Phosphat-gepuffertem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert um anschließend in Paraffinwachs eingebettet zu werden.

3.4.2. Blutbildanalyse

Im Anschluss an die intravitale Mikroskopie wurde eine Blutbildanalyse des zum Versuchsende entnommenen Bluts hinsichtlich Zellzahl, Hämatokrit und Hämoglobin durchgeführt. Mit Hilfe eines automatischen Systems (Coulter AcT diff, Hialeh, FL, USA) wurden die genannten Parameter sowie ein Differentialblutbild bestimmt.

3.4.3. HE-Färbung

Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom in Schnitte von $5\ \mu\text{m}$ Dicke geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt. Die basophilen Strukturen färbten sich blau, insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Die Kerne erschienen somit blau, dunkelviolet bis schwarz. Alle azidophilen Strukturen färbten sich rot, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Somit färbten sich Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot.

Die Auswertung der HE gefärbten Histologien erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc). Die histologischen Bilder wurden als Schwarz-Weiß-Ansicht elektronisch gespeichert. Mit Hilfe

der Cap-Image-Software wurde eine Grauwertschwelle definiert, die es erlaubte, die weiße Fläche des Interstitiums von der gefärbten zellulären Graustufe getrennt pro Gesichtsfeld zu quantifizieren. Dies diente als direktes Maß für das interstitielle Gewebeödem. Das interstitielle Ödem wurde als Verhältnis von weiß erscheinendem interzellulärem Raum zu dunkel erscheinendem Myokardgewebe pro Gesichtsfeld definiert und in Prozent angegeben.

3.4.3.1. Histomorphologische Auswertung der Transplantate

Die HE-Histologien der kardialen Transplantate aus den chronischen Versuchen wurden von einem verblindeten Untersucher mit Hilfe eines Scoresystems hinsichtlich des Ausmaßes der parenchymalen Abstoßung bewertet (Tabelle 1). Bei dem von uns benutzten Punktesystem handelte es sich um eine modifizierte Fassung des von der ISHLT empfohlenen Systems zur semiquantitativen Bewertung der parenchymalen Abstoßung (Hasegawa et al., 1998).

Tabelle 1: Scoresystem

Score	histomorphologische Kennzeichen
0	kein Infiltrat mononukleärer Zellen
1	milde interstitielle oder perivaskuläre Infiltrate ohne Nekrose
2	fokale Infiltrate mit Nekrose
3	multifokale Infiltrate mit Nekrose
4	ausgedehnte Infiltrate mit Einblutungen und/oder Vaskulitis

Scoresystem modifiziert nach ISHLT. Beschreibung der histomorphologischen Kennzeichen und Zuordnung zu einem gestaffelten Punktesystem, welches mit der Schwere der Abstoßung korreliert.

3.4.4. Immunhistochemische Färbung des Epo-R

Zum immunhistochemischen Nachweis des Erythropoietin-Rezeptors wurde tiefgefrorenes Transplantatgewebe über Nacht mit einem primären rabbit-anti-mouse Epo-R- Antikörper (Verdünnung 1:50; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die 30 minütige Inkubation mit einem sekundären polyklonalen Peroxidase-konjugierten goat-anti-rabbit Antikörper (Verdünnung 1:100; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann mit PBS mehrfach

gewaschen und mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Die Inkubation mit ausschließlich dem sekundären Antikörper diente als Kontrolle. (Kapitel 4.1.4.3, Abb. 22A)

3.4.5. Mastzellfärbung mit Toluidinblau

Die Gewebeproben von nativen Herzen und Transplantaten wurden mit einem Mikrotom in Schnitte von 5 µm Dicke geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend mit Toluidinblau (1% in Aqua dest.) gefärbt. Nach einer Stunde wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und in Glyceringelatine eingedeckt. Die Toluidinfärbung ist ein zytochemisches Verfahren zum Nachweis von Mukopolysacchariden. Die Spezialgranula der Blutbasophilen und Gewebemastzellen enthalten Heparin und Heparinvorstufen, d. h. Mukopolysaccharid-Schwefelsäureester und färbten sich somit mit Toluidinblau infolge Metachromasie rotviolett. Rosa bis rot oder violett erscheinen ebenfalls Bindegewebe, Schleim, Grundsubstanz des Knorpels und viele epitheliale Muzinsubstanzen. Die übrigen Zellen, Kerne und Zytoplasma stellten sich graublau dar (Kapitel 4.1.4.3, Abb. 22B).

Die Auswertung der Histologien erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc). Die Toluidinblaufärbung diente in dieser Studie dem Nachweis von Mastzellen. Durch Auszählen wurde die Anzahl der intakten und der degranulierten Mastzellen bestimmt. Der Mastzelldegranulationsindex bezeichnete das Verhältnis von degranulierten zu intakten Mastzellen und wurde in Prozent angegeben.

3.5. Western Blot-Analyse

Um der Frage nachzugehen, ob eine Epo-Behandlung die Qualität einer Mastzell-abhängigen Inflammation am Herzen beeinflusst, wurden 16 C57BL/6 Mäuse genutzt, die eine intravenöse Applikation des Mastzelldegranulators Compound 48/80 (10 µg in 0,2 ml PBS; CMP48/80; Sigma, Germany) zwei Stunden nach intraperitonealer Epo-Gabe (n=8) oder PBS-Gabe (n=8) in der Kontrollgruppe erhielten (167). Sechs Stunden nach CMP48/80 Injektion wurden die Tiere narkotisiert und 0,4 ml Blut aus der Vena cava inferior für die folgende Durchflusszytometrie (Kapitel 3.6.) entnommen und in einem EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Die Herzen wurden rasch operativ entfernt und für die folgende Western Blot-Analyse tiefgefroren.

Aus den kryokonservierten Myokardproben der Herzen wurden Proteinextrakte hergestellt. Hierzu wurde ein Low Salt-Lysepuffer, bestehend aus 10 mM TRIS, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-x 100, 0,02% NaN₃, verwendet. Unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Cocktails (1:50; Sigma) und PSMF (1:100; Roth) wurden die Gewebeproben mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurde das Homogenisat 30 min mit 16.000 x g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) und der Überstand als Gesamtzell-Extrakt abpipettiert. Die Konzentration an löslichem Gesamtprotein im Überstand wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Die eingestellten Extrakte wurden nach Zusatz von 2-fach 'Sample buffer' nach Lämmli (Sigma) 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert, durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf einen identischen Proteingehalt eingestellt und anschließend in einer Konzentration von 15 µg/Tasche in die Geltaschen transferiert. Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel 10%, Sammelgel 5%) elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100 Volt im Sammelgel (15 min) und von 140 Volt im Trenngel (1 h) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Molekulargewichts-Standard diente der Rainbow Marker high-range (Amersham pharmacia biotech, Freiburg, Deutschland). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpuffer-Bad für das anschließende Membran-Blotting equilibriert. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend während einer Dauer von 2 Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) bei einer angelegten Spannung von 50 Volt auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µm, BioRad) transferiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Membran wurden die Proteine mit einer 5%-igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk, BioRad) in TBS-T (tweenhaltige TRIS-gepufferte Kochsalzlösung) für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 2). Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBS-T-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit dementsprechend markierten Sekundärantikörper (Tabelle 2) für 90 min.

Nach wiederholtem Waschen wurden die Antigen-Antikörper-Konjugate mittels Chemilumineszenz-Methode (ECL, Amersham pharmacia biotech, Freiburg, Deutschland) detektiert. Dazu wurden die Membranen nach einminütiger Inkubation mit dem ECL-Reagenz in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham pharmacia biotech) in einer Röntgenkassette positioniert. Die Signale der belichteten Filme wurden anschließend in Entwicklungs- und Fixierbädern (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, Deutschland) visualisiert und densitometrisch (Bio-Rad, Gel-Dokumentationssystem, München, Deutschland) ausgewertet.

Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde ein monoklonaler Tubulin-Antikörper als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte Dichte rechnerisch auf gleiche Tubulin-Konzentrationen korrigiert.

Tabelle 2: Antikörper zur Western Blot-Analyse

Primär-antikörper	Ursprung	Bezugsquelle	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Tubulin	mouse monoclonal	Sigma	1:10000			
Epo-R	rabbit-anti-mouse	Santa Cruz	1:50	goat-anti-rabbit	Santa Cruz	1:100
ICAM-1	rat-anti-mouse	eBioscience	1:50	donkey-anti-rat	eBioscience	1:1000
NFκB	rabbit-anti-mouse	Santa Cruz	1:400	donkey-anti-rabbit	GE Healthcare	1:5000

Auflistung der für die Western Blot-Analysen eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper

3.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Dabei können die Zellen mittels spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden, was eine Unterscheidung von Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften ermöglicht.

Zusätzlich zur Analyse des qualitativen Effekts einer Epo-Behandlung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten während Mastzell-abhängiger Entzündung wurden Vollblutproben der 16 C57BL/6 Mäusen, die mit dem Mastzelldegranulator CMP48/80 2 h nach Epogabe bzw. NaCl-Gabe behandelt wurden, untersucht. Weitere sechs Stunden später wurde den Tieren unter Narkose 0,4 ml Vollblut aus der Vena cava entnommen (s. 3.5.1). Je 50 µl Vollblut wurden mit 1,5 µl eines PE- bzw. FITC-konjugierten Primärantikörpers (Tabelle 3) für 30 min inkubiert. Isotyp angepasste PE- bzw. FITC-Kontrollantikörper dienten zum Ausschluss unspezifischer Bindungen. Überschüssige Primärantikörper wurden entfernt. Die Proben, bei denen keine Fluoreszenz-gefärbten Primärantikörper verwendet wurden, wurden mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert, der in dieser Gruppe auch als Kontrolle diente. Anschließend wurden die Erythrozyten in allen Ansätzen mit je 3 ml Lysepuffer (PharmLyse, Becton Dickinson GmbH,

Heidelberg) 15 min lysiert, zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Cell Fix (BD, San Jose, USA) resuspendiert und bis zur Durchführung der Durchflusszytometrie auf Eis gelagert. Die Proben wurden während allen Inkubationsschritten vor Licht geschützt. Die Differenzierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen erfolgte durch Messung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben wurde durch Subtraktion der entsprechenden Kontrollwerte normiert. Die normierten mittleren Fluoreszenz-Intensitätswerte wurden innerhalb der Gruppen gemittelt und zwischen den Gruppen statistisch verglichen.

Tabelle 3: Antikörper zur Durchflusszytometrie

Antikörper	Ursprung	Bezugsquelle	Verdünnung	Sekundärantikörper
CD11a	rat-anti-mouse	San Jose	1:30	rat control IgG
CD11b	rat-anti-mouse	eBioscience	1:30	rat control IgG
L-Selectin	rat-anti-mouse	BD Pharmingen	1:30	rat control IgG
PGSL-1	rat-anti-mouse	BD Pharmingen	1:30	rat control IgG
CD31	rat-anti-mouse	BD Pharmingen	1:30	rat control IgG

Auflistung der für die Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörper

3.7. Experimentelles Protokoll

3.7.1. Akutversuche

Die Versuchstiere wurden in drei unterschiedliche experimentelle Gruppen eingeteilt. Grundsätzlich wurden in allen Gruppen Herzen von Balb/c Mäusen allogene in C57BL/6 Mäuse transplantiert. Es ergaben sich für die Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Erythropoietin auf die Mikrozirkulation während des akuten Ischämie-Reperfusionsschadens in allogene transplantierten Mäuseherzen drei verschiedene Versuchsprotokolle:

- Kontrollgruppe

Die erste Gruppe (n = 6) diente als Kontrollgruppe der Versuchsreihe. Die Transplantatempfänger wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 2 h vor Reperfusion behandelt.

- Epo-Empfänger-Gruppe

In der zweiten Gruppe (n = 6) wurden den Empfängern 5000 I.E./kg eines gentechnisch hergestellten Erythropoietins (recombinant human erythropoietin, NeoRecormon®; Roche; Basel, Switzerland) in 0,2 ml NaCl 0,9% 2 h vor Reperfusion intraperitoneal injiziert.

- Epo-Spender-Gruppe

In der dritten Gruppe (n = 6) wurden die Spender mit 5000 I.E./kg Erythropoietin in 0,2 ml NaCl 0,9% 2 h vor Herzentnahme behandelt.

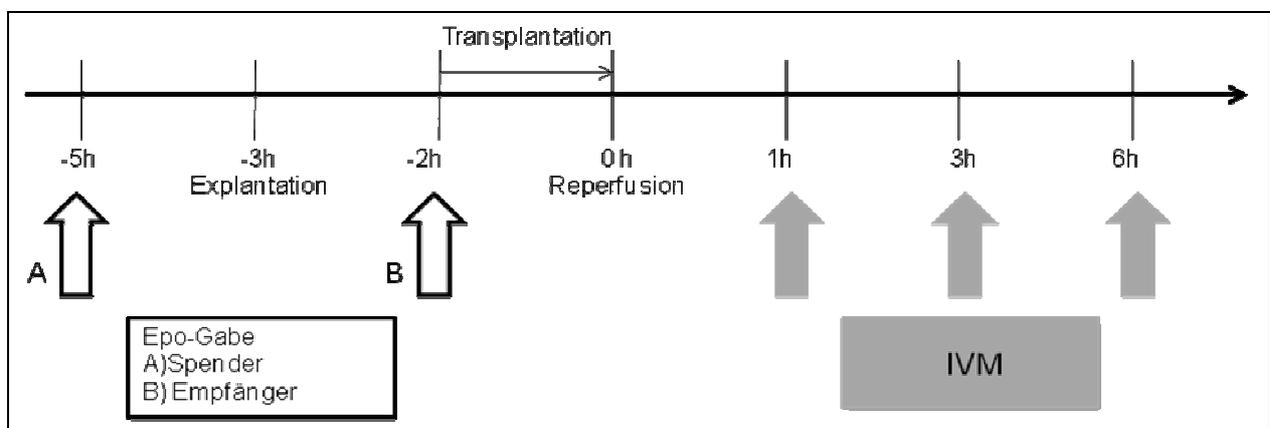


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Experimente. In der Epo-Spendergruppe (weißer Pfeil A) wurde Epo 2 h vor Herzentnahme injiziert. In der Epo-Empfängergruppe (weißer Pfeil B) wurde Epo 2 h vor Reperfusion injiziert. Die intravitalen Mikroskopie wurde in beiden Gruppen nach 1, 3, und 6 h nach Reperfusion durchgeführt (graue Pfeile)

Nach der ersten Stunde der Reperfusion erfolgte für jede Gruppe die Durchführung der Durchföhrung der intravitalen Mikroskopie. Diese wurde zum Zeitpunkt 3 h und 6 h Reperfusion wiederholt (Abb. 8). Nach diesen Untersuchungen wurden Herz und Transplantat entnommen und der histologischen Aufarbeitung zugeföhrt.

3.7.2. Chronische Versuche

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung mit Erythropoietin auf das mittlere Transplantatüberleben wurden die Versuchstiere in fünf unterschiedliche experimentelle Gruppen eingeteilt. Dementsprechend ergaben sich für die Versuche zur Untersuchung des

Einflusses von Erythropoietin auf die Abstoßungsreaktion transplantierte Mäuseherzen fünf verschiedene Versuchsprotokolle:

- In der ersten Gruppe wurde eine syngene Herztransplantation durchgeführt, d.h. eine Transplantation zwischen zwei genetisch identischen Individuen. Das Herz einer C57BL/6 Maus wird einer C57BL/6 Maus aus derselben Zuchtlinie transplantiert (n=3).
- Die zweite Gruppe diente als Kontrollgruppe für das Modell der allogenen Herztransplantation, d.h. einer Transplantation zwischen zwei genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies. Das Herz einer Balb/c Maus wurde einer C57BL/6 Maus transplantiert (n=6).
- In der dritten Gruppe wurde eine allogene Herztransplantation zwischen Balb/c und C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Die Empfänger, d.h. die C57BL/6 Mäuse, erhielten 2 h vor Reperfusion 5000 I.E./kg Erythropoietin in 0,2 ml NaCl 0,9%.
Balb/c → C57BL/6 + Epo 5000 I.E (n=3)
- In der vierten Gruppe wurde eine allogene Herztransplantation zwischen Balb/c und C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Den Empfängern wurde zuvor eine mit Ciclosporin A gefüllte Alzetpumpe subkutan implantiert.
Balb/c → C57BL/6 + Ciclosporin A (1000 pg/ml) (n=5)
- In der fünften Gruppe wurde eine allogene Herztransplantation zwischen Balb/c und C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Den Empfängern, denen zuvor eine mit Ciclosporin A beladene Alzetpumpe implantiert wurde, erhalten 2 h vor Reperfusion 5000 I.E./kg Erythropoietin in 0,2 ml NaCl 0,9%.
Balb/c → C57BL/6 + Ciclosporin A + Epo (n=3)

Die syngene Transplantation wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass der operative Eingriff der Transplantation erfolgreich ohne Bildung von Thromben, Abstoßung oder begleitende Funktionsverschlechterung einhergeht. Die syngenen Transplantate, die ausschließlich dem Ischämie-Reperfusionsschaden, aber keiner akuten oder chronischen Abstoßung ausgesetzt waren, zeigten ein unbegrenztes Transplantatüberleben.

3.7.3 Überblick des experimentellen Aufbaus

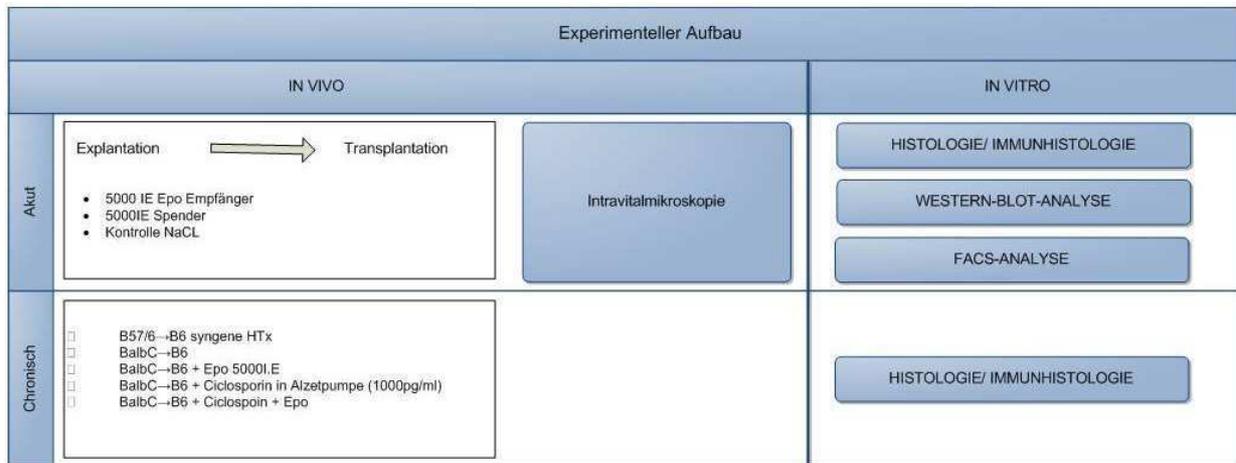


Abb. 9: Übersicht über den experimentellen Aufbau und Ablauf. Die in vivo Versuche gliederten sich in Gruppen zur Untersuchung des akuten Transplantatschadens mittels IVM und des chronischen Transplantatversagens. Den in vivo Versuchen schlossen sich die in vitro Untersuchungen an. Dazu gehörten die Entnahme der Organe zu histologischen Untersuchungen sowie die Durchführung der Western-Blot und FACS-Analyse.

3.8. Statistik

3.8.1. Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte während der Videoauswertung am Cap-Image-System. Die Daten wurden in dafür angefertigte, mit der Microsoft-Excel-Software erstellte Erfassungsbögen eingetragen und somit direkt im Computer gespeichert um mögliche Übertragungsfehler zu vermeiden.

3.8.2. Statistische Bearbeitung

Die Daten wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler (MW+/-SEM) angegeben. Die Variable n steht für die Anzahl der Tiere pro Gruppe. Der Varianzkoeffizient errechnete sich aus dem Verhältnis zwischen Standardabweichung und Mittelwert und machte eine Aussage über die intraindividuelle Heterogenität der Parameter möglich.

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels der Computersoftware SigmaStat (Version 3.0, Jandel Corporation, San Rafael, California, USA). Zum Vergleich zweier Gruppen miteinander wurde ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben

durchgeführt. Falls die Voraussetzung der Normalverteilung dafür nicht gegeben war, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann-Whitney Test) durchgeführt. Bei Vergleichen innerhalb einer Gruppe zu den drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wurde eine einfache Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) angewendet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde der Wahrscheinlichkeitswert $P < 0,05$ gewählt.

4. Ergebnisse

4.1. Akute Experimente zum Ischämie-Reperfusionsschaden

Die heterotope Herztransplantation war im Mausmodell in 80-90% der Experimente erfolgreich durchführbar. Die Reperfusion der transplantierten Herzen begann unmittelbar nach Entfernen der Gefäßklemmen. Bei erfolgreicher Transplantation wandelte sich unmittelbar nach Beginn der Reperfusion das zunächst gräulich erscheinende Myokard in einen rötlichen Aspekt. Die transplantierten Herzen begannen innerhalb der ersten zwei Minuten nach Reperfusion in einem stabilen Sinusrhythmus zu schlagen (Matsuura et al., 1991; Schramm et al., 2006b).

4.1.1. Charakteristika der myokardialen Reperfusion in kardialen Transplantaten

Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie konnte die subepikardiale Mikrozirkulation des schlagenden kardialen Allografts während der postischämischen Reperfusion zur Darstellung gebracht werden. Alle Segmente der kardialen Mikrozirkulation konnten so erfasst werden. Dazu gehörten Arteriolen, nutritive Kapillaren und postkapillare Venolen (Abb. 10). Das Fließmuster der benachbarten, nutritiven Kapillaren war hauptsächlich gemischt gleich- und gegenläufig mit zahlreichen Querverbindungen (Schramm et al., 2007a). Die koronaren Arteriolen konnten nahe am atrio-ventrikulären Übergang sichtbar gemacht werden. Kennzeichen der Arteriolen waren die charakteristische Darstellung in der intravitalen Mikroskopie, die hohe Blutflussgeschwindigkeit und vor allem die sichtbare Pulswelle. Im Allgemeinen zogen die Arteriolen in ihrem Verlauf rasch in die Tiefe des Myokards, wo die Zugänglichkeit für die intravitale Mikroskopie beschränkt war. Die arterielle Blutflussgeschwindigkeit war einheitlich hoch in allen Tieren und überschritt zu jedem Zeitpunkt das zeitliche Auflösungsvermögen der zur Analyse verwendeten 50 Hz Technik. Zusätzlich zu den Blutgefäßen fand man auch dilatierte Lymphgefäße, die durch den ins postischämische Gewebe diffundierten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar wurden. Die Mikrohämodynamik wurde in den nutritiven Kapillaren und den Venolen gemessen.

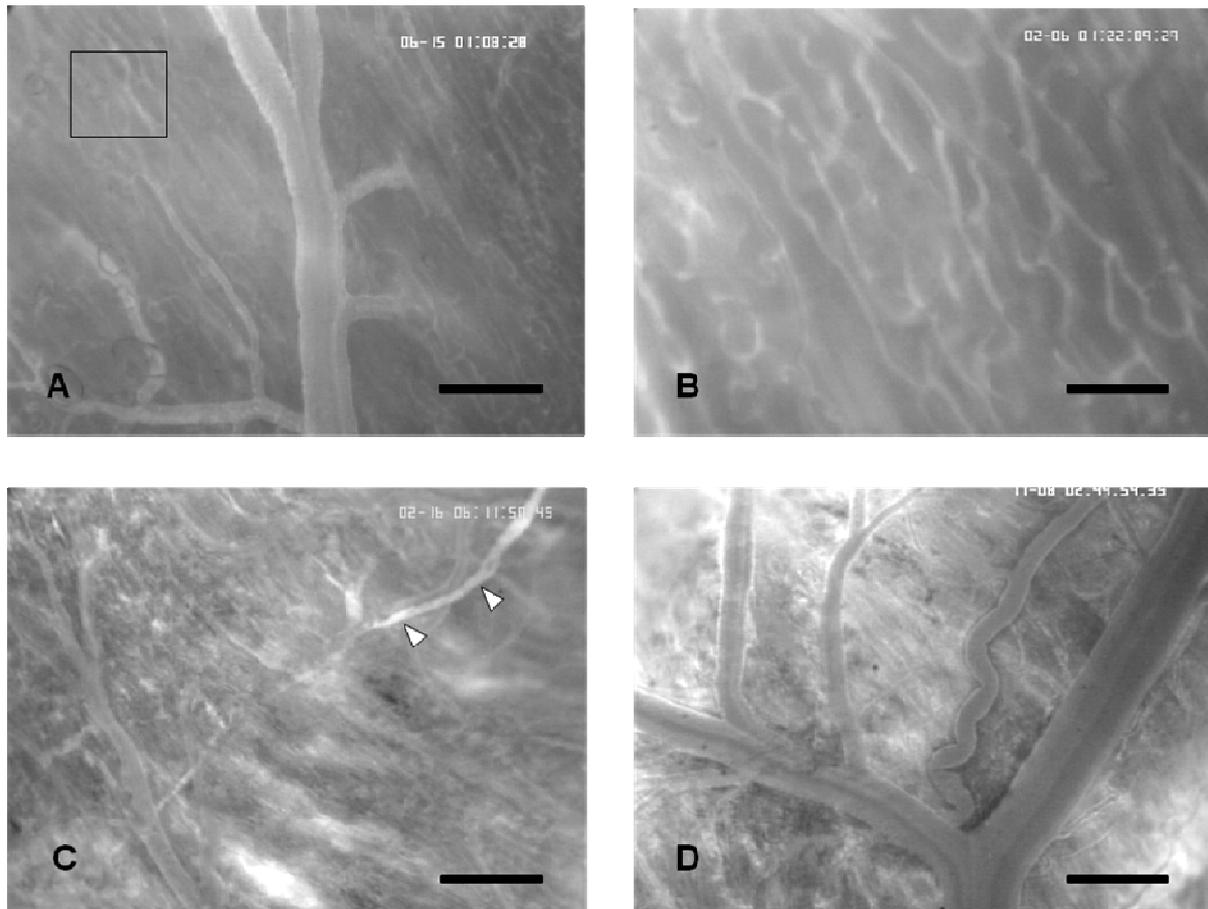


Abb. 10: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie der kardialen Mikrozirkulation von allogenen transplantierten Mäuseherzen. Die intravitale, fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen beispielhaft die kardiale Mikrozirkulation bestehend aus postkapillaren Venolen (A), versorgenden Kapillaren (B), intramyokardialen Lymphgefäßen (C, weiße Pfeile) und Arteriolen (D) nach 180 Minuten kalter Ischämie. Der in (A) markierte Ausschnitt wird vergrößert in Abbildung B gezeigt um das kapillare Fließmuster zu veranschaulichen. Das Fließmuster der benachbarten Kapillaren war hauptsächlich gemischt gleich- und gegenläufig mit zahlreichen Querverbindungen. Die Kontrastverstärkung wurde durch Injektion von FITC-Dextran (150.000 Dalton) erzielt. Der Maßstab in Bild A repräsentiert 100 μm , der Maßstab in B 40 μm , die Maßstäbe in C und D 200 μm .

4.1.1.1 Funktionelle Kapillardichte

Nach Transplantation nahm in der Kontrollgruppe die funktionelle Kapillardichte von $351,49 \pm 73,05 \text{ cm/cm}^2$ auf $239,24 \pm 41,55 \text{ cm/cm}^2$ ab. Die Abnahme der FCD war statistisch nicht signifikant. Eine Epo-Behandlung hatte keinen relevanten Einfluss auf die postischämische FCD. In der Epo-Empfänger-Gruppe zeigte sich eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Abnahme der FCD, während diese in der Epo-Spender-Gruppe eher konstant blieb. Die Unterschiede der FCD waren im Vergleich zwischen den Gruppen zu keinem Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikant (Abb. 11).

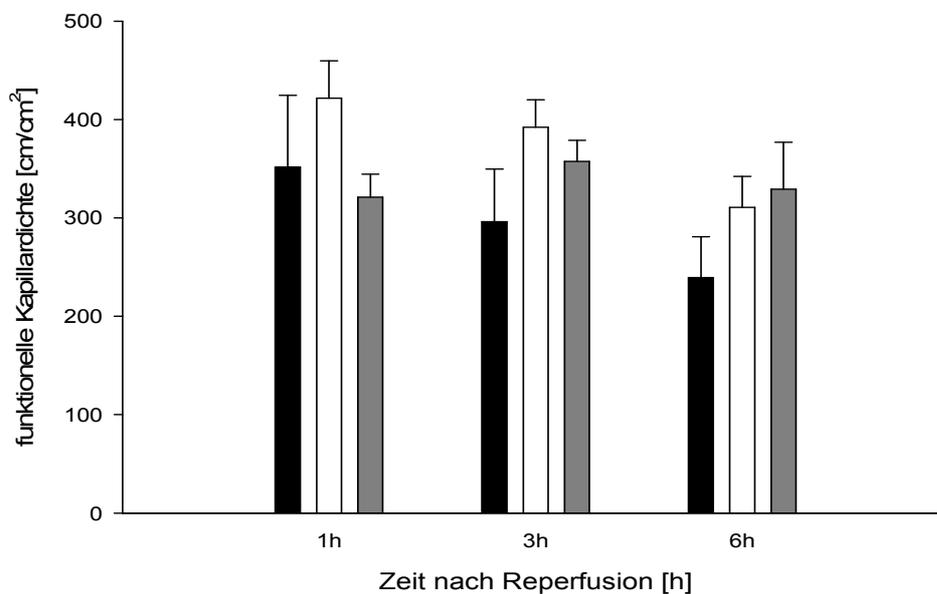


Abb. 11: Funktionelle Kapillardichte im subepikardialen, rechtsventrikulären Myokard allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.1.2. Kapillare Blutflussgeschwindigkeit

Die kapillare Blutflussgeschwindigkeit lag bei den Kontrollen nach 1 h Reperfusion bei $0,34 \pm 0,04$ mm/s. Eine Epo-Behandlung hatte keinen nennenswerten Effekt auf die kapillare Blutflussgeschwindigkeit, weder wenn die Empfänger noch wenn die Spender behandelt wurden. In allen drei Gruppen blieben die kapillaren Blutflussgeschwindigkeiten bis nach 6 h Reperfusion konstant. Zwischen den untersuchten Gruppen gab es zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 12).

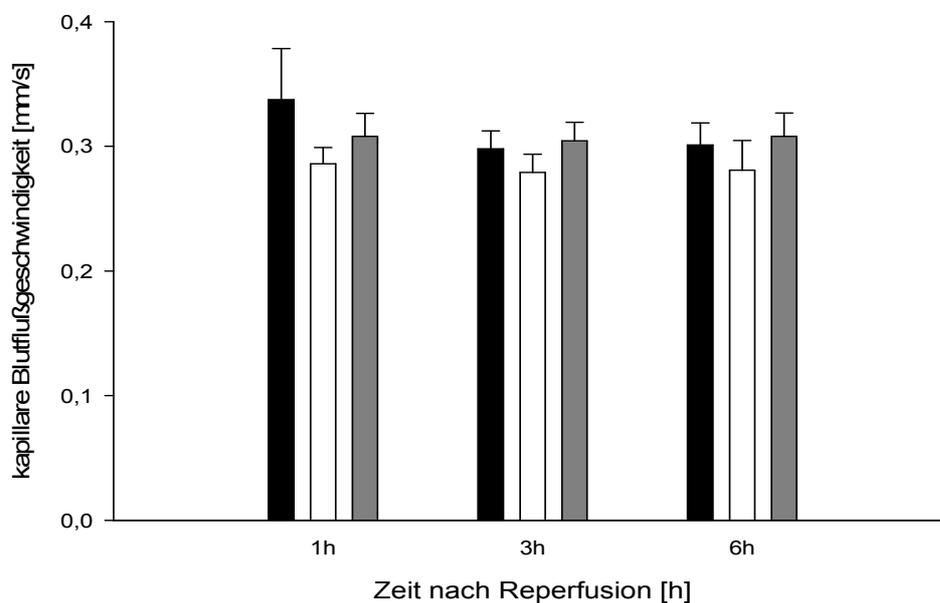


Abb. 12: Blutflussgeschwindigkeit in den nutritiven Kapillaren des subepikardalen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.1.3. Kapillardurchmesser

Der mittlere Durchmesser der Kapillaren lag in allen experimentellen Gruppen im gesamten Versuchsverlauf zwischen 4 μm und 5 μm . Über den Beobachtungszeitraum änderte sich der Kapillardurchmesser in den Gruppen nicht relevant. Eine Behandlung mit Erythropoietin hatte auf den mittleren, kapillaren Durchmesser keinen Einfluss. Die kapillaren Durchmesser waren zwischen den Untersuchungsgruppen zu jedem Untersuchungszeitpunkt nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 13).

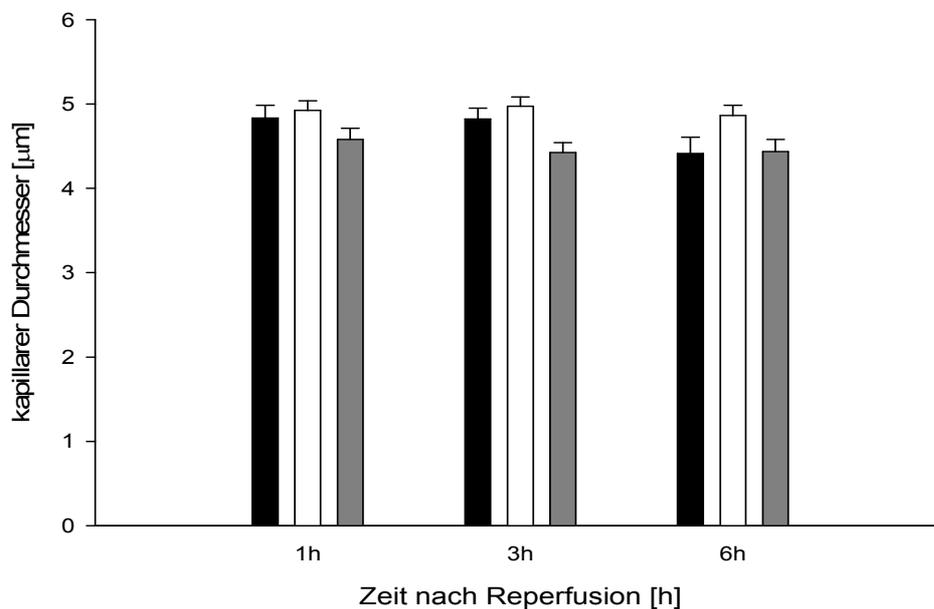


Abb. 13: Durchmesser der nutritiven Kapillaren des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.1.4. Venöse Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit, welche in den postkapillaren Venolen des rechtsventrikulären subepikardialen Myokards gemessen wurde, lag in allen Untersuchungsgruppen und zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwischen 0,8 und 1,0 mm/s. Während des Untersuchungszeitraums zeigten sich die venösen Blutflussgeschwindigkeiten in allen Gruppen konstant und auch zwischen den Untersuchungsgruppen gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 14).

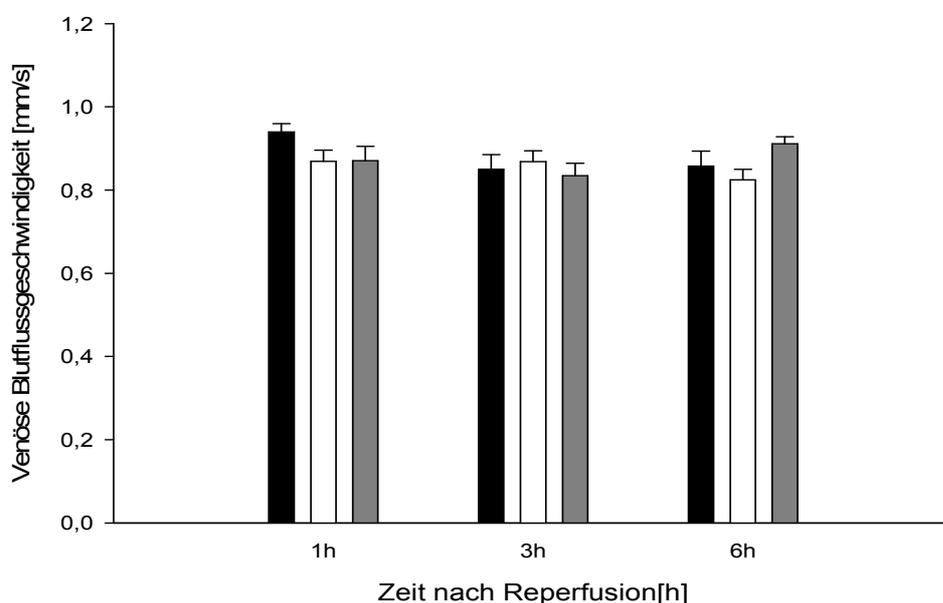


Abb. 14: Blutflussgeschwindigkeit in postkapillaren Venolen des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.2. Postischämische Entzündung

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen fanden nahezu ausschließlich in postkapillaren Venolen statt (Abb. 15). In Arteriolen waren keine Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zu beobachten.

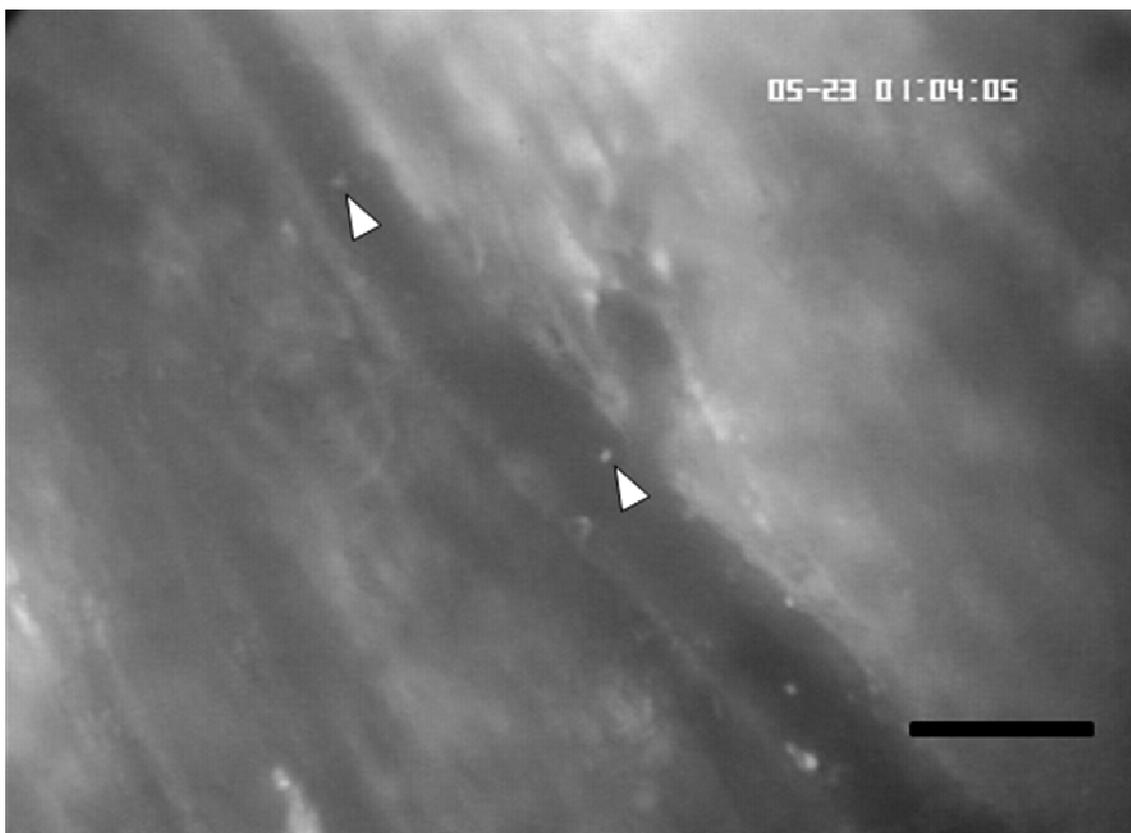


Abb. 15: Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der kardialen Mikrozirkulation nach Transplantation. Die exemplarische intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme wurde unter Verwendung von grünem Auflicht und Kontrastverstärkung durch Rhodamin G6 erzeugt. Adhärente Leukozyten sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstab bildet 40 μm ab.

4.1.2.1. Rollende Leukozyten

Das Rollen der Leukozyten nahm in der Kontrollgruppe während der Reperfusion von $63,6 \pm 16,3$ n/min/mm nach 1 h auf $19,9 \pm 15,9$ n/min/mm nach 6 h ab. Die Behandlung der Epo-Empfänger-Gruppe hatte keinen relevanten Einfluss auf das Rollen der Leukozyten. In der Epo-Spender-Gruppe rollten verglichen mit den unbehandelten Kontrollen nach 1 h Reperfusion etwa halb so viele Leukozyten am postkapillaren venösen Endothel. Insgesamt war die Anzahl rollender Leukozyten im gesamten Untersuchungszeitraum in der Epo-Spendergruppe relativ konstant. Zu keinem Zeitpunkt war die Anzahl rollender Leukozyten im Vergleich zwischen den drei Gruppen statistisch signifikant verschieden (Abb. 16).

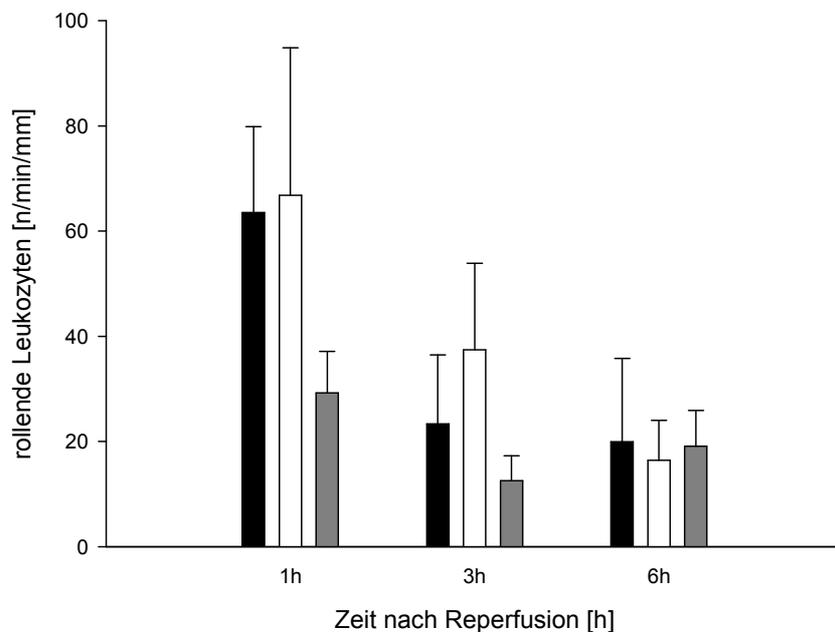


Abb. 16: Anzahl der rollenden Leukozyten in postkapillaren Venolen des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.2.2. Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten

Die Geschwindigkeiten der rollenden Leukozyten nahm in der Kontrollgruppe von $0,038 \pm 0,009$ mm/s nach 1 h Reperfusion auf $0,024 \pm 0,005$ mm/s nach 6 h leicht ab. Eine Behandlung mit Erythropoietin hatte keinen relevanten Einfluss auf die Geschwindigkeit des Rollens. Die entsprechenden Werte in der Epo-Empfänger- und Epo-Spender-Gruppe waren zu allen Untersuchungszeitpunkten vergleichbar mit der Kontrolle. Auffällig war lediglich eine transiente, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung der Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten in der Epo-Spender-Gruppe nach 3 h Reperfusion. Insgesamt war die Abnahme der Rollgeschwindigkeit der Leukozyten über den Beobachtungszeitraum in allen drei Gruppen nicht signifikant (Abb. 17).

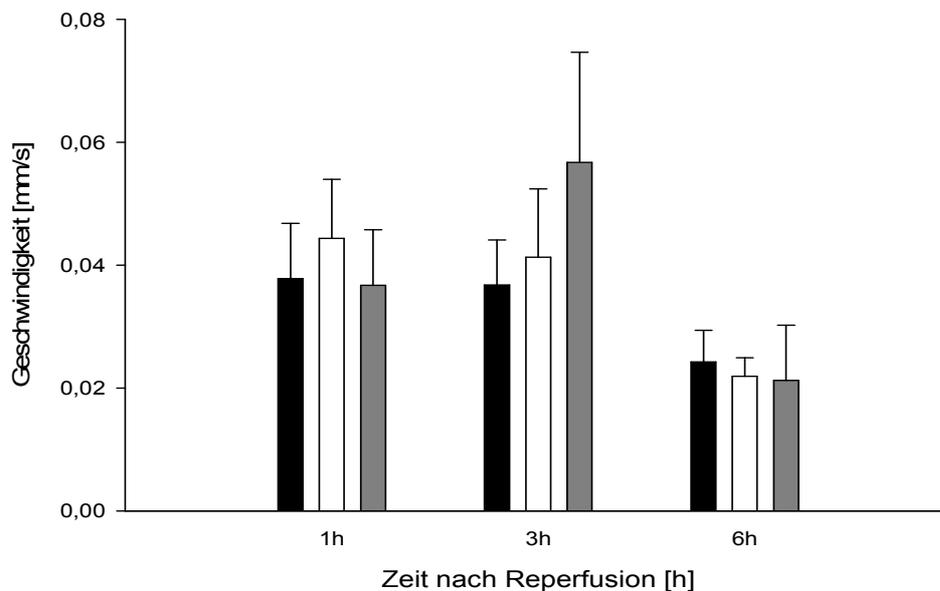


Abb. 17: Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten in postkapillaren Venolen des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogenen transplantierten Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.2.3. Adhärenente Leukozyten

Die Anzahl der fest am Endothel der postkapillaren Venolen adhärierenden Leukozyten nahm in der Kontrollgruppe von $237,9 \pm 84,0$ n/mm^2 nach 1 h Reperfusion auf $478,9 \pm 154,0$ n/mm^2 nach 6 h zu. In der Epo-Spender-Gruppe fand sich die feste Leukozytenadhärenz vergleichbar mit der Kontrolle. Die Zunahme der fest adhärenenten Leukozyten während der Reperfusion war in der Kontrolle und der Epo-Spender-Gruppe statistisch nicht signifikant. Anders verhielt es sich in der Epo-Empfänger-Gruppe. Hier stieg die Zahl der fest adhärenenten Leukozyten von 1 bis 3 h moderat an, fiel dann aber bei 6 h Reperfusion wieder ab. Die Zahl der fest adhärenenten Leukozyten war in der Epo-Empfänger-Gruppe nach 6 h Reperfusion signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 18).

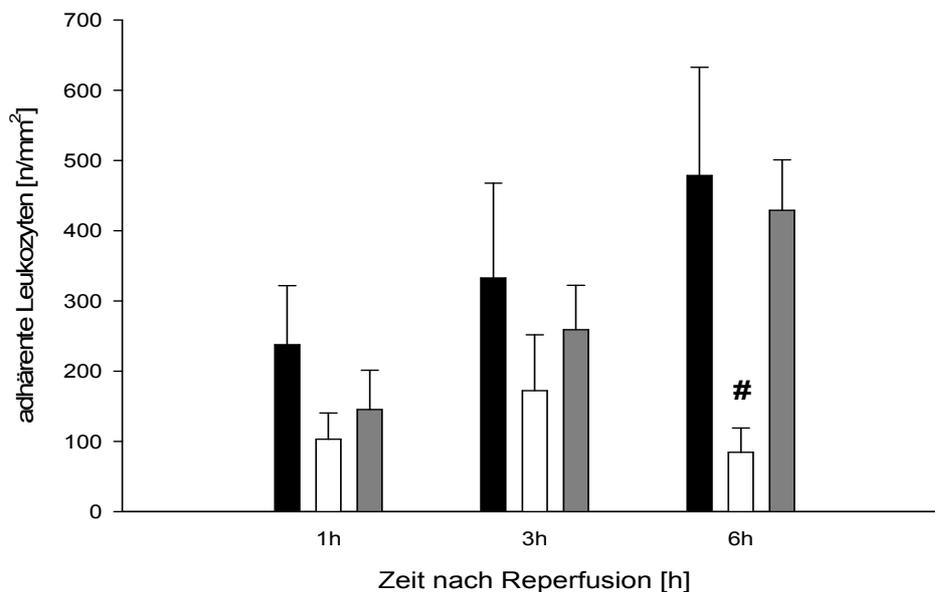


Abb. 18: Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten in postkapillaren Venolen des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplantierte Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle

4.1.2.4. Kapillares Leukozyten-Plugging

Die Anzahl der Leukozyten, die fest in den Kapillaren hafteten, lag in der Kontrollgruppe zwischen 5 und 6 Leukozyten pro Gesichtsfeld (HPF) und war über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. In der Epo-Spender-Gruppe fanden sich ebenfalls über den Beobachtungszeitraum vergleichbar mit den Kontrollen konstant ca. 5 - 6 Leukozyten pro Gesichtsfeld. In der Epo-Empfänger-Gruppe war das Leukozytenplugging deutlich vermindert. Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa nur halb so viele Leukozyten pro Gesichtsfeld. Diese Unterschiede waren zu allen untersuchten Zeitpunkten statistisch signifikant (Abb. 19).

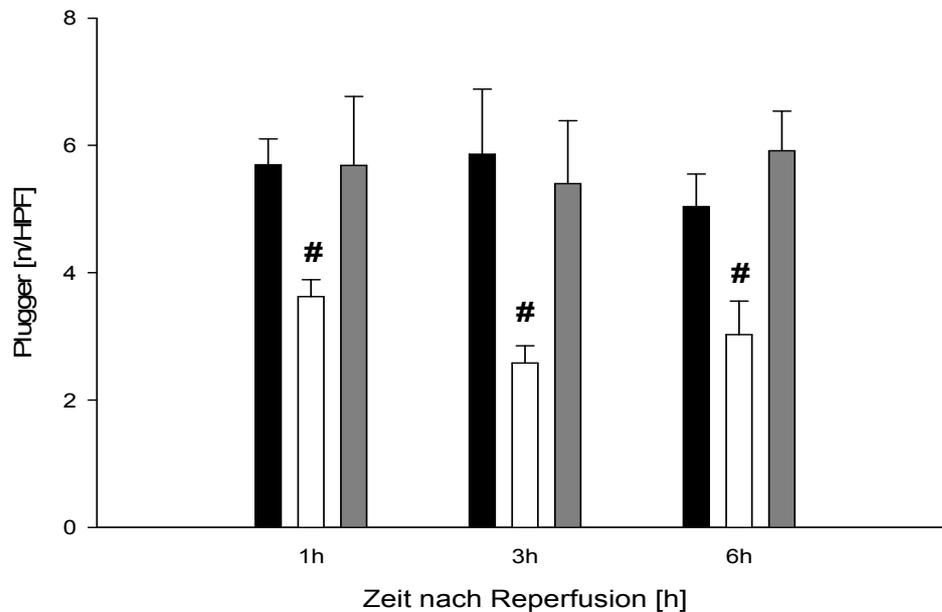


Abb. 19: Anzahl der adhärenen Leukozyten in den Kapillaren des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogenen transplantierten Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.1.2.5. Makromolekulare Leakage

Die makromolekulare Leakage als Maß für die mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität stieg in allen Gruppen während 6 h Reperfusion diskret an.

In der Epo-Spender-Gruppe zeigte sich nach 3 und 6 h Reperfusion eine signifikant niedrigere makromolekulare Gefäßpermeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Epo-Empfänger-Gruppe gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 20).

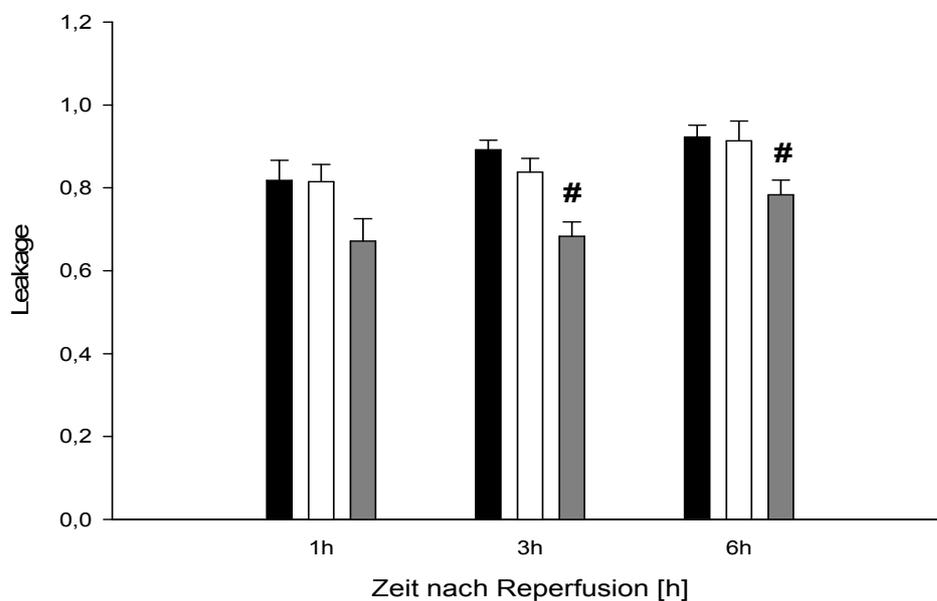


Abb. 20: Makromolekulare Leakage in postkapillaren Venolen des subepikardialen, rechtsventrikulären Myokards allogener transplanteder Herzen 1, 3 und 6 h nach Reperfusion der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.1.3. Blutbildanalyse

Die nach 6-stündiger Reperfusion bestimmten Blutbilder unterschieden sich in Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen. Eine Epo-Behandlung ging mit einer Erniedrigung der Leukozytenzahl einher. In der Epo-Empfänger-Gruppe war dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant (Tabelle 4).

Tabelle 4: Blutbildanalyse

Parameter	Kontrollgruppe	Epo-Empfänger-Gruppe	Epo-Spender-Gruppe
Leukozyten [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	$5,6 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,5 \#$	$4,0 \pm 0,6$
Erythrozyten [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	$7,4 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,4$
Thrombozyten [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	$797,0 \pm 72,0$	$706,8 \pm 135,7$	$763,8 \pm 150,7$
Hämoglobin [g/dl]	$12,1 \pm 0,4$	$11,3 \pm 0,5$	$12,0 \pm 0,4$
Hämatokrit [%]	$39,3 \pm 1,8$	$37,2 \pm 3,2$	$38,0 \pm 1,4$

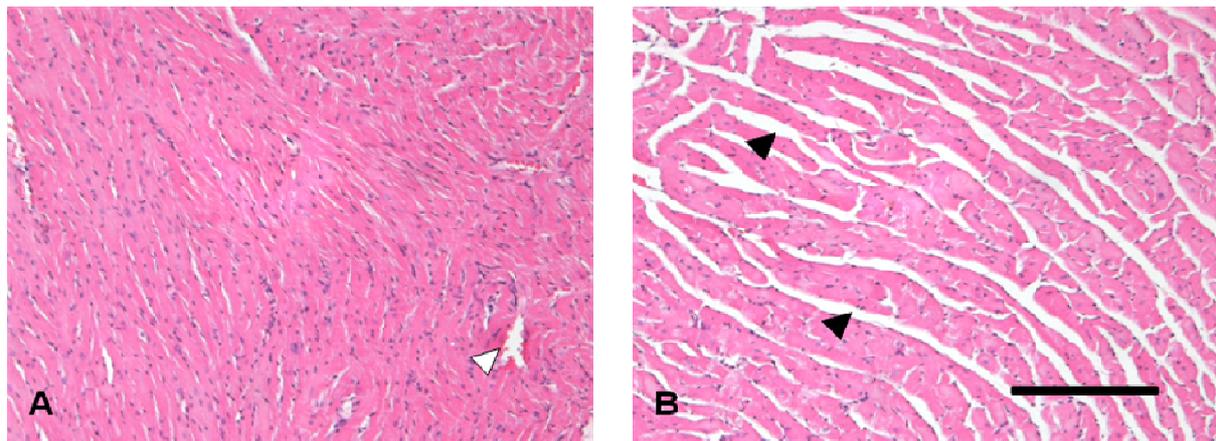
Blutbildanalyse 6 h nach Reperfusion nach allogener Herztransplantation in der Kontrollgruppe (n = 6), der Epo-Empfänger-Gruppe (n = 6) und der Epo-Spender-Gruppe (n = 6). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.1.4. Histologie und Immunhistochemie

Bei den Gewebeproben der Akutversuche war histologisch keine nennenswerte Abstoßung zu beobachten (Abb. 21B). Nach 6 h Reperfusion war keine relevante lymphozytäre oder monozytäre Infiltration nachweisbar. Dies galt für alle drei experimentelle Gruppen der Akutversuche.

4.1.4.1. Postischämisches Myokardödem

Die planimetrische Bestimmung des interzellulären Raums in nativen Herzen und reperfundierten Allografts deutete auf eine relevante interstitielle Ödembildung in den Transplantaten hin. In allen drei Untersuchungsgruppen war die relative Fläche des Interstitiums in den Allografts signifikant größer als in den korrespondierenden Proben der nativen Herzen. Weder die Epo-Behandlung der Empfänger, noch die der Spender beeinflusste die relative Größe des Interzellularraums in nativen Herzen und Allografts (Abb. 21).



C

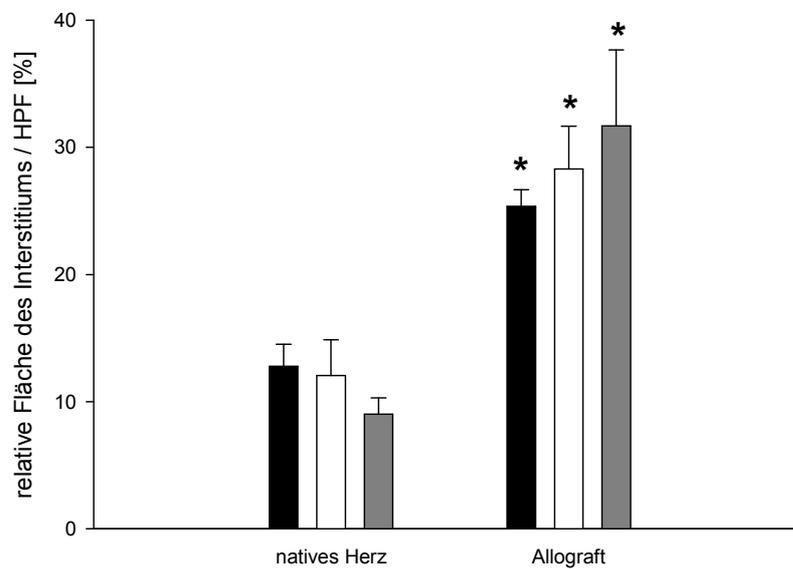


Abb. 21: (A) HE gefärbtes Myokard des nativen Herzens einer unbehandelten Kontrollmaus. Der Schnitt zeigt längs- und querschnittene Herzmuskelzellen. Eine Venole ist mit einer weißen Pfeilspitze gekennzeichnet. (B) HE gefärbtes Myokard des Allografts eines Epo-behandelten C57BL/6 Empfängers. Die schwarzen Pfeilspitzen weisen auf den deutlich vergrößerten interstitiellen Raum im Myokard des Transplantats hin. Der Maßstab bildet 200 μm ab. (C) Ausmaß des interstitiellen Myokardödems 6 h nach Reperfusion in nativen Herzen und in Allografts der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spender-Gruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. * $p < 0,05$ vs. natives Herz.

4.1.4.2. Detektion des Epo-Rezeptors

Der Epo-Rezeptor konnte immunhistochemisch im gesamten Myokard der Allografts nachgewiesen werden. Eine schwach positive Färbung war insbesondere im Bereich der Plasmamembran der Kardiomyozyten zu finden. Eine stark positive Färbung wurde auf den Granula der perivaskulären Mastzellen gefunden (Abb. 22A).

4.1.4.3. Mastzelldegranulation

Um herauszuarbeiten, ob Epo seine Wirkung auf den Ischämie-Reperfusionsschaden nach allogener Herztransplantation durch Einfluss auf die Degranulation von Mastzellen erwirkte, wurde die Anzahl von degranulierten Mastzellen und nicht-degranulierten Mastzellen bestimmt (Abb. 22B). Der Mastzelldegranulationsindex wurde aus dem Verhältnis von degranulierten zu intakten Mastzellen gebildet. Der Mastzelldegranulationsindex zeigte, dass etwas weniger als die Hälfte der kardialen Mastzellen degranuliert waren. Die Unterschiede zwischen den drei experimentellen Gruppen waren statistisch nicht signifikant (Abb. 23).

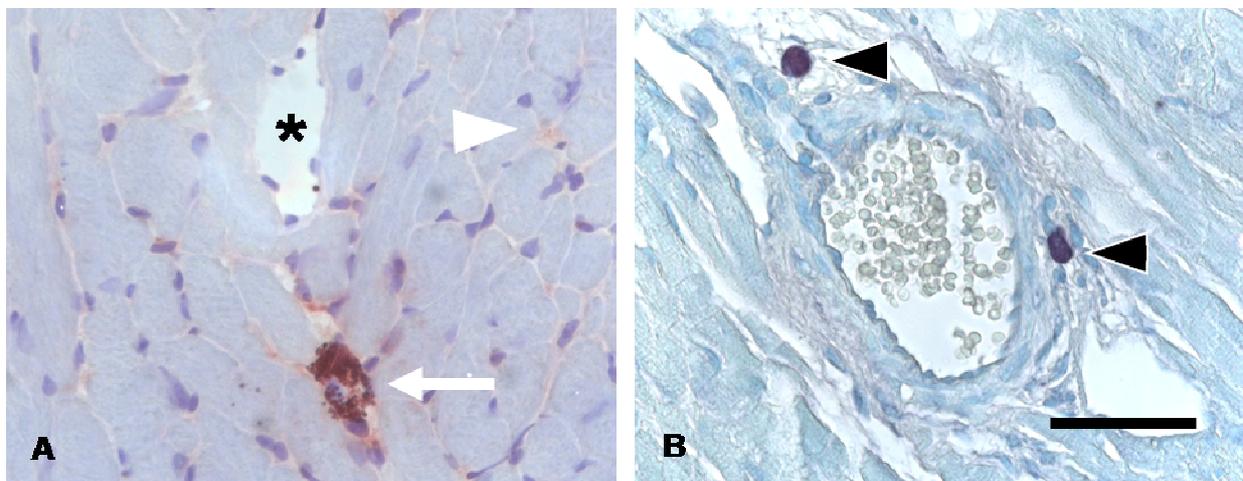


Abb. 22: (A) zeigt die immunhistochemische Färbung des Epo-Rezeptors in einem repräsentativen Ausschnitt des Myokards eines Allografts aus einer Epo-behandelten C57BL/6 Maus. Der weiße Pfeil kennzeichnet die deutlich positive Färbung der Granula einer degranulierten, perivaskulären Mastzelle. Die weiße Pfeilspitze deutet auf die schwach positive Färbung an der Oberfläche der Kardiomyozyten hin. Der Stern markiert das Lumen einer myokardialen Venole. (B) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des mit Toluidinblau gefärbten Myokards eines Transplantats aus einer C57BL/6 Maus der Kontrollgruppe. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren zwei intakte Mastzellen in der unmittelbaren Nähe einer koronaren Arteriole. Der Maßstab bildet 20 μm ab (A und B).

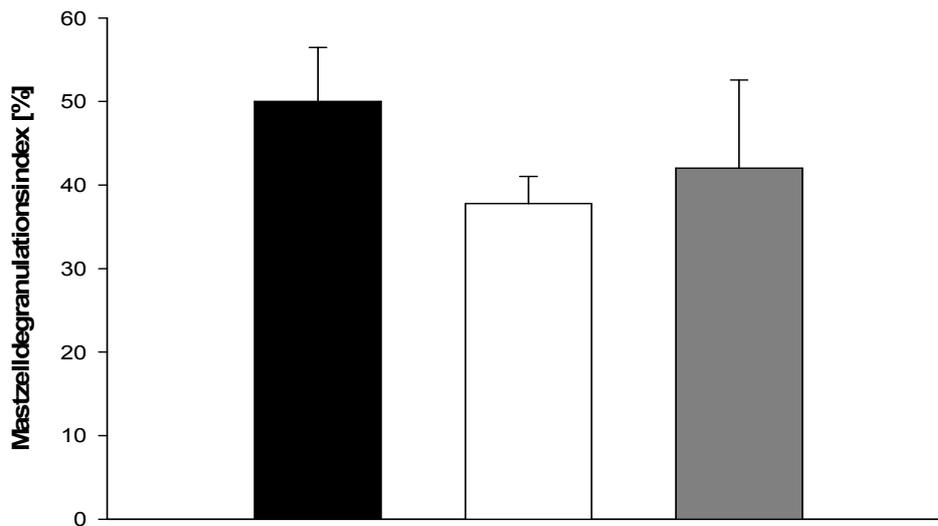


Abb. 23: Mastzelldegranulationsindex als Verhältnis von degranulierten zu intakten Mastzellen in Toluidinblau gefärbten Gewebeschnitten der Transplantate der Kontrollgruppe (schwarze Säulen, $n = 6$), der Epo-Empfänger-Gruppe (weiße Säulen, $n = 6$) und der Epo-Spendergruppe (graue Säulen $n = 6$). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

4.1.5. Western Blot-Analyse

In getrennt von den Transplantationen durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss von Epo auf die myokardiale Proteinexpression bei Mastzell-abhängiger Entzündung untersucht. Die proteinbiochemische Analyse der myokardialen NF κ B-Expression während CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung zeigte nach Epo-Behandlung eine signifikante Abnahme des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe (Abb. 24).

Die proteinbiochemische Analyse der myokardialen ICAM-1 Expression während CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung zeigte nach Epo-Behandlung eine deutlich geringere Expression des Integrin-Rezeptors im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen (Abb. 25).

Die proteinbiochemische Analyse der myokardialen Expression des Epo-Rezeptors während CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung zeigte nach Epo-Behandlung eine deutliche Zunahme des Rezeptors im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen (Abb. 26).

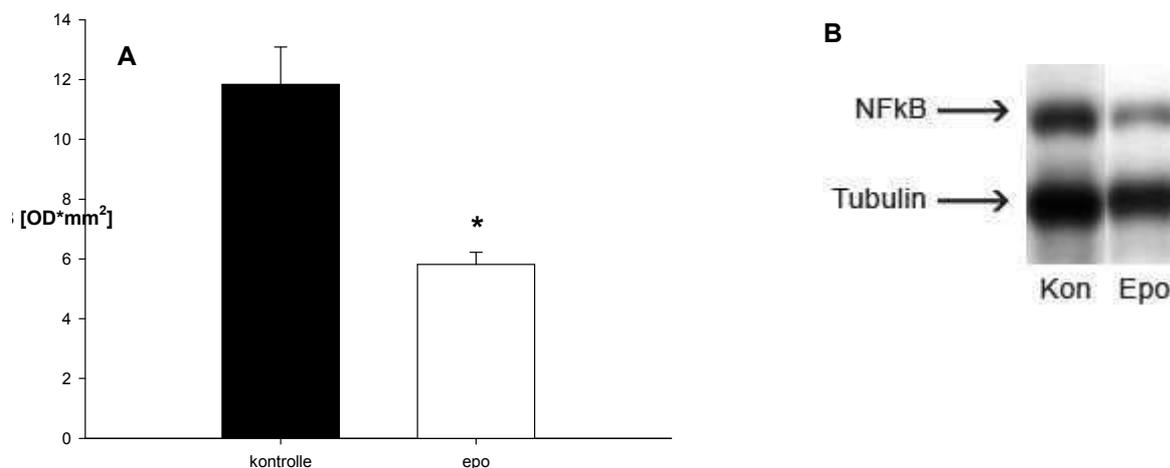


Abb. 24: Myokardiale Expression von NFκB bei CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung. (A) zeigt die quantitative Auswertung der densitometrischen Signalbestimmung der Myokardproben von jeweils 8 Kontrolltieren (schwarze Säule) und Epo-behandelten C57BL/6 Mäusen (weiße Säule). (B) zeigt ein repräsentatives Proteinsignal aus dem Myokard eines Kontrolltiers und einer Epo-behandelten C57BL/6 Maus. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. * $p = 0,001$.

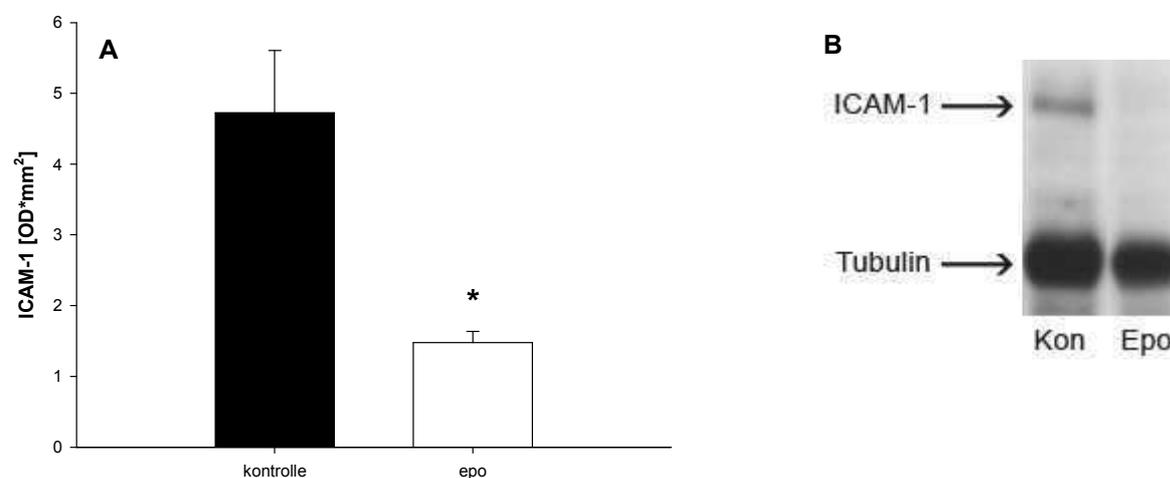


Abb. 25: Myokardiale Expression von ICAM-1 bei CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung. (A) zeigt die quantitative Auswertung der densitometrischen Signalbestimmung der Myokardproben von jeweils 8 Kontrolltieren (schwarze Säule) und Epo-behandelten C57BL/6 Mäusen (weiße Säule). (B) zeigt ein repräsentatives Proteinsignal aus dem Myokard eines Kontrolltiers und einer Epo-behandelten C57BL/6 Maus. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. * $p = 0,002$.

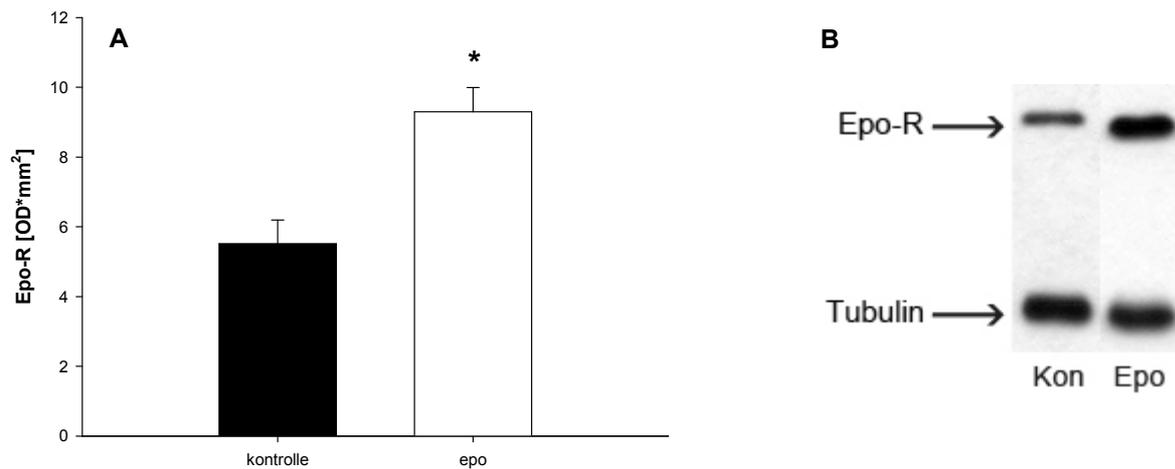


Abb. 26: Myokardiale Expression von Epo-R bei CMP48/80-induzierter Mastzell-abhängiger Entzündung. (A) zeigt die quantitative Auswertung der densitometrischen Signalbestimmung der Myokardproben von jeweils 8 Kontrolltieren (schwarze Säule) und Epo-behandelten C57BL/6 Mäusen (weiße Säule). (B) zeigt ein repräsentatives Proteinsignal aus dem Myokard eines Kontrolltiers und einer Epo-behandelten C57BL/6 Maus. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. * $p = 0,003$.

4.1.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass Epo bei CMP48/80 induzierter Mastzell-abhängiger generalisierter Entzündung nur marginale Veränderungen der Adhäsionsmolekülexpression auf zirkulierenden Lymphozyten (Tabelle 5), Granulozyten (Tabelle 6) und Monozyten (Tabelle 7) bewirkte. Eine Epo-Behandlung führte zu einer statistisch signifikant niedrigeren Expression von CD11b auf Lymphozyten (Tabelle 5). Die Expression von CD162 (PSGL-1) war im Vergleich zur Kontrolle auf Granulozyten nach Epo-Behandlung statistisch signifikant erhöht (Tabelle 6).

Tabelle 5: Adhäsionsmolekülexpression auf Lymphozyten

Parameter	Kontrollgruppe	Epo-Gruppe
CD 11a	31,2 ± 1,6	34,5 ± 1,6
CD 11b	16,5 ± 5,9	1,4 ± 0,3#
CD 31	52,6 ± 3,0	57,2 ± 3,3
CD 62	20,2 ± 3,0	18,5 ± 1,3
CD 162	266,0 ± 14,3	234,5 ± 18,4
VAP 17-88	1,1 ± 0,4	0,3 ± 0,3
VAP 17-106	1,8 ± 0,4	-0,7 ± 0,3

Mittels Durchflusszytometrie wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität für die Oberflächenexpression von CD11a, CD11b, CD31, CD62, CD162, VAP17-88, VAP17-106 auf zirkulierenden Lymphozyten während Mastzell-abhängiger Entzündung in der Kontrollgruppe (n = 8) und Epo-Behandlungsgruppe (n = 8) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. # p < 0,05 vs. Kontrolle.

Tabelle 6: Adhäsionsmolekülexpression auf Granulozyten

Parameter	Kontrollgruppe	Epo-Gruppe
CD 11a	97,4 ± 4,6	88,4 ± 2,5
CD 11b	34,6 ± 11,9	62,3 ± 10,4
CD 31	312,2 ± 38,4	201,9 ± 66,3
CD 62	15,3 ± 2,3	21,1 ± 3,6
CD 162	328,8 ± 95,1	651,4 ± 113,5#
VAP 17-88	0,5 ± 0,3	-0,4 ± 0,6
VAP 17-106	10,8 ± 2,8	11,7 ± 3,2

Mittels Durchflusszytometrie wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität für die Oberflächenexpression von CD11a, CD11b, CD31, CD62, CD162, VAP17-88, VAP17-106 auf zirkulierenden Granulozyten während Mastzell-abhängiger Entzündung in der Kontrollgruppe (n = 8) und Epo-Behandlungsgruppe (n = 8) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. # p = 0,044 vs. Kontrolle.

Tabelle 7: Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten

Parameter	Kontrollgruppe	Epo-Gruppe
CD 11a	59,0 ± 6,9	61,8 ± 9,2
CD 11b	46,3 ± 15,2	62,5 ± 9,0
CD 31	115,0 ± 9,9	85,3 ± 30,3
CD 62	52,5 ± 9,7	39,7 ± 3,2
CD 162	673,0 ± 74,8	742,4 ± 91,1
VAP 17-88	5,6 ± 1,9	1,2 ± 1,2
VAP 17-106	17,3 ± 9,9	-0,2 ± 12,7

Mittels Durchflusszytometrie wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität für die Oberflächenexpression von CD11a, CD11b, CD31, CD62, CD162, VAP17-88, VAP17-106 auf zirkulierenden Monozyten während Mastzell-abhängiger Entzündung in der Kontrollgruppe (n = 8) und Epo-Behandlungsgruppe (n = 8) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

4.2. Chronische Experimente zur Transplantatabstoßung

4.2.1. Mittleres Allograft-Überleben

Um herauszufinden inwieweit die durch Epo induzierte Inhibition der postischämischen Leukozytensequestration zu einer verzögerten oder sogar zur Verhinderung einer akuten Transplantatabstoßung führt, wurde das durchschnittliche Transplantatüberleben bei Epo-behandelten Empfängern (n=3) und Kontrolltieren (n=6) bestimmt. Eine Behandlung mit Erythropoietin beeinflusste das durchschnittliche Transplantatüberleben nicht. In den mit Epo-behandelten Tieren wurde eine Abstoßung nach 9 ± 1 Tagen festgestellt. Nach 7 ± 2 Tagen trat die Abstoßung in der Kontrollgruppe ohne Epogabe auf. Eine Verlängerung des Transplantatüberlebens konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, wenn die Epogabe als Ergänzung zu einer immunsuppressiven Therapie mit Ciclosporin A erfolgte. In der mit Epo und Ciclosporin A behandelten Gruppe (n=3) trat die Abstoßung nach 8 ± 2 Tagen ein und nach 11 ± 1 Tagen in der ausschließlich mit Ciclosporin A-behandelten Gruppe (n=5).

4.2.2. Histologie

Die histologischen Untersuchungen zeigten in allen abgestoßenen Transplantaten ausgeprägte Anzeichen einer hochgradigen Gewebeabstoßung (Abb. 27). Die Rejektionsscores lagen bei $3,0 \pm 0,0$ und $3,4 \pm 0,3$ in den mit Epo-behandelten Tieren ($n=3$) und den Kontrolltieren ($n=6$). Die Rejektionsscores der Tiere, die ausschließlich mit Ciclosporin A behandelt wurden ($n=5$), waren $4,0 \pm 0,0$, während die Rejektionsscores der Tiere, die kombiniert mit Epo und Ciclosporin A behandelt wurden ($n=3$), $3,7 \pm 0,3$ waren.

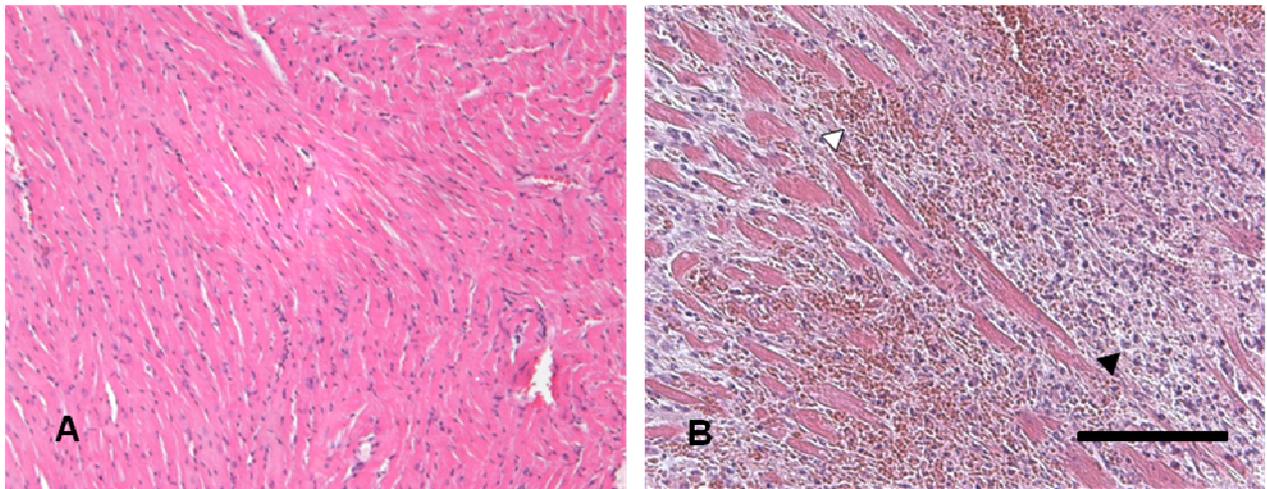


Abb. 27: (A) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des HE gefärbten Myokards eines nativen Mäuseherzens. (B) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des HE gefärbten Myokards eines Allografts, welches nach akuter Abstoßung an Tag 8 entnommen wurde. Die weiße Pfeilspitze kennzeichnet eine Einblutung. Die schwarze Pfeilspitze deutet auf ein Infiltrat mononukleärer Zellen hin.

4.2.3. Blutbildanalyse

Die nach Abstoßung bestimmten Blutbilder unterschieden sich in Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Blutbildanalyse

Parameter	Kontrolle	Ciclosporin A	Erythropoietin	Epo + Ciclosporin A
Leukozyten [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	6,1 \pm 1,0	10,6 \pm 1,7	5,8 \pm 0,5	6,3 \pm 0,5
Erythrozyten [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	6,5 \pm 0,3	5,8 \pm 0,3	6,2 \pm 0,6	6,3 \pm 0,4
Thrombozyten [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	736,0 \pm 117,0	584,5 \pm 154,5	772,8 \pm 366,5	661,8 \pm 146,0
Hämoglobin [g/dl]	10,4 \pm 1,0	9,3 \pm 0,8	9,3 \pm 1,0	10,7 \pm 0,5
Hämatokrit [%]	Nicht bestimmt	28,5 \pm 0,0	Nicht bestimmt	32,0 \pm 1,7

Blutbildanalyse 6 h nach Reperfusion nach allogener Herztransplantation in der Kontrollgruppe, der Gruppe, die mit Ciclosporin A behandelt wurde (n = 5), der Gruppe, die mit Epo behandelt wurde (n = 3) und der Gruppe, die kombiniert mit Ciclosporin A und Epo behandelt wurde (n = 3). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

5. Diskussion

5.1. Diskussion von Material und Methoden

5.1.1. Die heterotope Herztransplantation

Die experimentelle heterotope Herztransplantation ist ein zur Untersuchung transplantationsimmunologischer Fragestellungen hervorragend geeignetes Modell. Prinzipiell wird hierbei die Koronarzirkulation des Transplantates an den Systemkreislauf des Empfängers angeschlossen. Das Transplantat wird mit anhängender Aorta ascendens und Arteria pulmonalis communis entweder an die großen abdominellen Gefäße, in der Regel infrarenale Aorta abdominalis und Vena cava inferior oder an die Halsgefäße, Arteria carotis communis und Vena jugularis interna, angeschlossen. Der Empfänger ist nicht vital von der Pumpfunktion des Transplantates abhängig, so dass eine genaue Untersuchung von Abstoßungsreaktionen ermöglicht wird. Anders als bei der experimentellen Transplantation von beispielsweise Leber, Niere oder Lunge kann die Funktion eines heterotop transplantierten Herzens sehr leicht durch visuelle Inspektion und Palpation des Abdomens bzw. der lateralen Halsregion detektiert werden (Heron et al., 1971; Xiu et al., 2001).

In der vorliegenden Studie wurde das Mausmodell gewählt, da es durch die einfache und kostengünstige Haltung der Versuchstiere und der immer größer werdenden Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern sowie genetisch manipulierter Stämme vorteilhaft ist. Nachteil des Mausmodells ist sicherlich die Notwendigkeit mikrochirurgischer Techniken zur Anastomosierung des Transplantats an den Empfängerkreislauf. Allerdings wurde bereits 1971 durch die von Heron beschriebene Cuff-Anastomose eine Vereinfachung der heterotopen Herztransplantation im Rattenmodell erreicht (Heron et al., 1971), welche dann schließlich von Matsuura et al. erfolgreich im Mausmodell umgesetzt werden konnte (Matsuura et al., 1991). Im Vergleich zur Nahttechnik, die vor allem klinische Relevanz besitzt, hat die Cuff-Methode eine geringere Rate an Blutungskomplikationen und kann in relativ kurzer Zeit erlernt werden. Die Benutzung dieser Technik verursacht ein geringeres chirurgisches Trauma und vereinfacht die Anwendung des Modells an der Maus (Xiu et al., 2001). Mittlerweile handelt es sich um eine weit verbreitete Technik, die von zahlreichen Wissenschaftlern angewendet wird. Die Cuff-Technik sieht allerdings nur eine End-zu-End-Anastomosierung von Gefäßen vor, weshalb sie für den Anschluss des Transplantates an die großen abdominellen Gefäße (End-zu-Seit-Anastomose) nicht genutzt werden kann. Sollte die abdominelle Implantation gewünscht sein, kann dies durch die Cuff-Anastomose

des Grafts an renale Gefäßenden nach einseitiger Nephrektomie erreicht werden (Schramm et al., 2006b). Die zervikale Implantation ist im Vergleich zur abdominellen Implantation zusätzlich von Vorteil, da die Empfängeroperation weniger traumatisch ist, die unmittelbar subkutane Lokalisation am Hals eine einfachere Überwachung der Transplantatfunktion durch Palpation oder perkutan abgeleitetes Elektrokardiogramm ermöglicht und die peritoneale Höhle eine Vielzahl an immunologisch aktiven Zellen (Mastzellen, Makrophagen, etc.) enthält, die immunologische Prozesse beeinflussen (Schramm et al., 2006b).

Grundsätzlich empfiehlt es sich, Studien zur Mikrozirkulation an in vivo Modellen durchzuführen, da diese ein detailliertes Monitoring der vaskulären Durchblutung und der zellulären Interaktionen ermöglichen. In vitro Modelle können nur Teile des komplexen Zusammenspiels der verschiedenen Komponenten eines Gesamtorganismus nachahmen (Menger et al., 2003). Die intravitale Mikroskopie dürfte wohl zur Zeit als der Goldstandard zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation durch direkte Visualisation der einzelnen Gefäße mit höchster Auflösung betrachtet werden. Die intravitale Mikroskopie ist eine Technik zur direkten Sichtbarmachung der versorgenden Zirkulation in Geweben, durch deren Verwendung die direkte Messung der Blutversorgung in den einzelnen Segmenten der Mikrozirkulation bis auf Kapillarebene erfolgen kann. So ist beispielsweise die Laser Doppler Flowmetrie verglichen mit der Intravitalmikroskopie nicht in der Lage das genaue Perfusionsmuster und die Inhomogenitäten der Kapillarperfusion zu erfassen (Arvidsson et al., 1988).

Solche in vivo Untersuchungen mittels intravitaler Mikroskopie waren am Herz limitiert, weil die Tiere nach der Thorakotomie eine Beatmung benötigen und die Bewegung von Herz und Lunge die hochauflösenden mikroskopischen Aufnahmen beeinträchtigen. Die extrathorakale Lage des transplantierten Herzens in unserem Modell hat den Vorteil auf eine invasive Ventilation verzichten zu können. Sie schließt die störenden Bewegungen der Lunge aus und erleichtert die Inspektion des schlagenden Herzens. Außerdem wird durch eine relativ stabile Oberfläche während der Herzaktion die Durchführung der Intravitalmikroskopie erleichtert. Die Stabilität der Oberfläche ist auch darauf zurückzuführen, dass das heterotop transplantierte Herz nicht normal kontrahiert. Das Transplantat erfährt nur eine marginale Füllung in der Diastole und kann daraufhin auch nur ein geringes systolisches Volumen auswerfen. Der linke Vorhof und Ventrikel hypotrophieren in chronischen Experimenten deutlich aufgrund der fehlenden Füllung (Heron et al., 1971). Das Modell der heterotopen Herztransplantation an der Maus ist den klassischen Experimenten mit LAD Okklusion zur Analyse des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden überlegen (Fishbein et al., 1978). Nach Herztransplantation ist das gesamte Myokard gleichermaßen einem definierten Ischämie-Reperfusionsschaden ausgesetzt, während die Infarktgröße nach LAD Okklusion in der Ausprägung variiert und vorwiegend das subendotheliale Myokard betroffen ist, welches

der intravitalen Epi-Illuminationsmikroskopie nicht zugänglich ist (Samsamshariat et al., 2005).

In dieser Studie wurde der postischämische myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden auf Mikrozirkulationsebene in einem Akutversuch untersucht. Im Akutmodell besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass die physiologischen Mikrozirkulationsbedingungen durch das chirurgische Trauma und die erforderliche Anästhesie verändert und die mikrohämodynamischen Parameter wie Fließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser beeinflusst werden (Lindbom et al., 1982; Yamauchi et al., 1999). Um die Alteration der untersuchten Gewebe zu minimieren, erfolgte die möglichst schonende Präparation unter einem Stereomikroskop mit mikrochirurgischem Arbeitsgerät. Der Einsatz der Inhalationsanästhesie bietet den Vorteil, dass sie für den Chirurgen einfach zu steuern und für das transplantierte Tier weniger toxisch ist und hämodynamisch besser vertragen wird. Sie kann genau auf die individuellen Bedürfnisse angepasst werden und gewährleistet über den gesamten Untersuchungszeitraum eine stabile Narkosetiefe und Dauer. Mit einer reinen Injektionsnarkose sind diese Bedingungen nicht zu erreichen (Dedja et al., 2005).

Das Modell der heterotopen Herztransplantation kann zur Untersuchung verschiedenster Krankheitszustände genutzt werden, einschließlich der Alloreaktivität des adaptiven Immunsystems (Corbascio et al., 2002). Da die Wiedereröffnung des Operationsgebiets aufgrund der Bildung von Granulationsgewebe erschwert ist, kann die Anwendung eines adoptiven Zelltransfers im akuten Modell hilfreich sein, um die Mechanismen von adaptiven Immunreaktionen zu untersuchen. So kann man beispielsweise dem Empfänger alloreaktive Lymphozyten injizieren und deren Verhalten in der Mikrozirkulation des Transplantates mittels intravitaler Mikroskopie erfassen. Sicherlich eignet sich das Modell ebenso die Auswirkungen verschiedener Organkonservierungsstrategien und verschiedene immunsuppressive Therapieregime an der postischämischen Mikrozirkulation zu untersuchen.

Zur Organkonservierung während der Ischämiezeit wurde eine spezielle Konservierungslösung benutzt. Diese schützt nicht nur das Myokard, sondern gewährleistet auch, dass das Blut des Spenders vollständig aus der Zirkulation des Herzens ausgewaschen wird. Eine Stase des Bluts in der koronaren Mikrozirkulation würde das kapillare "no-reflow" während der Reperfusion verstärken und die Spenderleukozyten könnten zusätzlich eine "graft-versus-host" Reaktion verursachen (Schramm et al., 2006b). Anstelle von Konservierungslösungen werden auch häufig NaCl oder Ringer-Lösung in experimentellen Studien eingesetzt. Diese sind allerdings in der Organprotektion unterlegen (Michel et al., 2002).

5.1.2. Die intravitale Mikroskopie

Die beschriebene heterotope Herztransplantation an der Maus erlaubt mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie die quantitative Analyse mikrohäodynamischer Parameter der koronaren Mikrozirkulation des rechten Ventrikels. Hierzu gehören Arteriolen, nutritive Kapillaren und postkapillare Venolen. Im Allgemeinen ziehen die Arteriolen in ihrem Verlauf schon früh vom Epikard in die Tiefe des Myokards, so dass sie der intravitale Epi-Illuminationsmikroskopie nur schwer zugänglich sind. Mittels Intravitalmikroskopie lassen sich Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, mikrovaskuläre Permeabilität und Häodynamik quantitativ analysieren.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde unter anderem deshalb als Untersuchungstechnik gewählt, weil sie die direkte Visualisierung der Mikrozirkulation ermöglicht. Während andere Verfahren zur Beurteilung der Mikrozirkulation, wie beispielsweise die Mikrosphärentechnik, Xenon-Clearance-Technik, die photoelektrische Plethysmographie oder die Laser-Doppler-Flowmetrie nur indirekte Analysen zulassen, können durch die in dieser Studie verwendete intravitale Fluoreszenzmikroskopie die einzelnen Segmente der Mikrozirkulation, wie Arteriolen, Kapillaren und postkapillare Venolen, getrennt voneinander auf verschiedene Parameter hin untersucht werden (Arvidsson et al., 1988; Hendel et al., 1983; Rudolph et al., 1967; Webster et al., 1976). Diese selektive Betrachtungsmöglichkeit stellt den entscheidenden Vorteil der intravitale Mikroskopie dar. Mit Einführung quantitativer intravitale mikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation und deren Kombination mit Videotechniken ist die detaillierte, quantitative Analyse der Mikrohäodynamik entscheidend verbessert worden (Arfors et al., 1975; Intaglietta et al., 1972). Prinzipiell steht neben der Epi-Illumination auch die Technik der Trans-Illumination zur Verfügung, allerdings ist diese Technik auf eine sehr dünne Gewebedicke angewiesen, was somit die Untersuchung des Herzens ausschließt. Die Epi-Illumination bietet zum einen den Vorteil, dass die Mikroskopie unabhängig von der Gewebedicke durchgeführt werden kann, zum anderen kann die Untersuchung aber durch eine begrenzte Anzahl verwertbarer Areale, mögliche mechanische Manipulationen im Rahmen der Präparation und durch mögliche Austrocknung während der Mikroskopie in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sein. Bei der Analyse der zweidimensionalen Aufnahmen dreidimensionaler Gefäßstrukturen im Intravitalmikroskop ist immer eine besondere Interpretation der Daten notwendig und durch das Modell bedingte Einflussgrößen zu berücksichtigen, um sie gegebenenfalls zu korrigieren. Dazu gehören in diesem Modell der potentielle Einfluss durch die Anästhesie und die Adhäsionskräfte des Deckglases. Das Deckglas ermöglicht es, eine möglichst plane Oberfläche im Fokus zu erhalten und erleichtert dadurch die detaillierte Darstellung myokardialer Gefäßstrukturen. Die

Kompression der koronaren Blutgefäße ist dabei vernachlässigbar. Eine Verlangsamung des Blutflusses wurde vorübergehend nur in der Systole beobachtet, während es in der Diastole sogar zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit kam.

Die nur geringe Autofluoreszenz der untersuchten Gewebe erlaubte die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Kontrastverstärkung. Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse und zur Bestimmung der venulären makromolekularen Extravasation diente FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150.000 Dalton. In der geeigneten Dosis (Harder et al., 2005) wurde damit eine optimale Kontrastverstärkung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erzielt. Die Markierung der Leukozyten erfolgte mittels Rhodamin-6G, das in adäquater Dosierung eine ausreichende Detektion der fließenden und stagnierenden Leukozyten, der Gefäßwände und Teilen von Parenchymzellen ermöglichte (Schramm et al., 2006a). Eine einmalige Injektion von Rhodamin-6G und FITC-Dextran zu Beginn der ersten Mikroskopie reichte zur konstanten Kontrastverstärkung bis zum Versuchsende nach 6 h nicht aus. Zur Optimierung der Aufnahmen zum zweiten und dritten Mikroskopiezeitpunkt wurden daher Rhodamin-6G und FITC-Dextran vor jeder Mikroskopie erneut appliziert. Potentiell ist die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen wie Rhodamin-6G denkbar (Higuti et al., 1980; Dietzmann et al., 1987). In der gewählten Dosis war jedoch eine Störung der Atmungskette und somit eine Auswirkung auf die Ergebnisse aufgrund pharmakotoxischer Eigenschaften des Farbstoffes unwahrscheinlich (Koyano et al., 1993).

5.1.3. Das experimentelle Protokoll

Die antiinflammatorischen Effekte von Epo wurden bisher in vielfältigen Versuchsprotokollen auch hinsichtlich optimaler Dosis, Zeitfenster und Anzahl der Injektionen untersucht. Wie auch in unseren Versuchen wurden in präklinischen tierexperimentellen Modellen verglichen mit der Dosierung, die zur Anämitherapie eingesetzt wird, sehr hohe Dosen Epo verwendet. Der Gebrauch hoher Dosen etablierte sich wahrscheinlich deshalb, weil im ZNS, wo erstmals die gewebeprotective Wirkung von Epo untersucht wurde, zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke hohe Dosen an Epo verabreicht wurden (Brines et al., 2006). Jedoch zeigten auch geringere Dosen eine gewebeprotective Wirkung. So zeigten Versuche von Harder et al., dass die Behandlung mit einer niedrigen, nicht-hämatopoetischen Epo Dosis eine bessere Gewebeprotektion in einem chronischen Ischämiemodell am Muskel erzielen kann als Epo in höherer Dosierung. Niedrige Dosen sind vor allem bei repetitiver Applikation vorteilhaft, da sie dann keinen messbaren Anstieg des Hämatokrits induzieren (Harder et al., 2009). Bei einmaliger Epo-Gabe sind hohe Dosen von Vorteil, da das therapeutische Zeitfenster durch

höhere Dosen verlängert wird (Contaldo et al., 2007), diese als effektiv und sicher gelten und nicht mit einem erhöhten Risiko unerwünschter Nebenwirkungen einhergehen (Belonje et al., 2008). Bei einer Studie von Sorg et al. zur Dosisfindung von Epo zur Gewebeprotektion an einem Modell zur dermalen Regeneration zeigte sich das Single-high-dose-Schema den übrigen Anwendungsschemata überlegen (Sorg et al. 2009). Wir wählten für unsere Untersuchungen die Bolusgabe einer hohen Dosis (5000 I.E/kg KG), weil zahlreiche experimentelle Studien sowie die klinische Studie HEBEIII diese Dosis bereits im Herzen verwendet haben (Belonje et al., 2008). Ein Anstieg des Hämatokrits war bei diesem Therapieregime nicht zu erwarten (Harder et al., 2009). Dementsprechend haben wir in der vorliegenden Studie keinen relevanten Unterschied des Hämoglobingehalts und des Hämatokrits zwischen den Gruppen gefunden. Daher lässt sich vermuten, dass die beobachteten antiinflammatorischen Effekte von Erythropoietin spezifisch sind und nicht von der Hämatopoese abhängen.

Das therapeutische Zeitfenster für Epo zur Gewebeprotektion ist in experimentellen Modellen typischerweise groß. Lipsic et al. führten eine Studie zum optimalen Verabreichungszeitpunkt von Epo zur postischämischen Kardioprotektion durch. Der protektive Effekt zeigte sich sowohl bei Applikation vor und während der Ischämie als auch bei Applikation nach Beginn der Reperfusion (Lipsic et al., 2004).

Die Möglichkeit einer erfolgreichen Prävention des Gewebes Schadens durch eine Vorbehandlung mit Epo ist insbesondere für iatrogen bedingte Gewebeschädigung, wie bei chirurgischen Eingriffen interessant. In unseren Experimenten verabreichten wir Epo zwei Stunden vor Reperfusion in der Epo-Empfängergruppe bzw. zwei Stunden vor Explantation in der Epo-Spender-Gruppe. Dieses Vorgehen ließe sich auch unter klinischen Bedingungen umsetzen. Die klinische Herztransplantation ist zwar primär kein elektiver Eingriff, jedoch verbliebe sicherlich ausreichend Zeit vor Implantation eine Epo-Behandlung zu initiieren.

Das Auftreten von Nebenwirkungen bei der chronischen Anwendung limitiert den Einsatz von Epo in chronischen Modellen. Durch den möglichen Anstieg der Erythrozytenzahl und der verstärkten Thrombozytenaggregation können Komplikationen wie Hypertonie und ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse auftreten (Brines et al., 2006). Die Tatsache, dass es zwei verschiedene Isoformen des Epo-Rezeptors gibt, einen der die hämatopoetischen und einen, der die nicht-hämatopoetischen Effekte von Epo vermittelt, kann eine selektive Gewebeprotektion ohne Beeinflussung des hämatopoetischen Systems ermöglichen. In verschiedenen präklinischen Modellen zeigen Epo-Analoga wie carbamylisiertes Epo oder Asialoerythropoietin eine wirksame Gewebeprotektion ohne eine messbare Stimulation des Knochenmarks, indem sie spezifisch an einen der Rezeptorsubtypen binden (Erbayraktar et al., 2003; Fiordaliso et al., 2005).

Der Endpunkt der Untersuchungen wurde 6 h nach Reperfusion gewählt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die letzte Mikroskopie. Dabei berufen wir uns auf die Erkenntnisse von Zhao et al., die zeigten, dass die Leukozytenakkumulation vor allem innerhalb der ersten 6 h nach Reperfusion im intravasalen Raum lokalisiert ist (Zhao et al., 2000). Da eine längere Lichtexposition während der intravitalen Mikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren kann (Celi et al., 2003), wurde die Belichtung eines Gesichtsfeldes und die Gesamtdauer der Mikroskopie pro Areal und die Anzahl der Mikroskopiezeitpunkte beschränkt (Menger et al., 1993).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Das Überleben nach Herztransplantation und die Transplantatfunktion werden in der frühen postoperativen Phase stark vom Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens beeinträchtigt. Der Ischämie-Reperfusionsschaden kann zusätzlich zu Abstoßungsreaktionen durch das adaptive Immunsystem des Empfängers beitragen (Menger et al. 2000). Zahlreiche experimentelle Studien haben sich mit dem Phänomen des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens, welcher sich aus mikrozirkulatorischer Dysfunktion, Entzündung, Gewebhypoxie, apoptotischem und nekrotischem Gewebeschaden, Produktion von Sauerstoffradikalen, Zytokinproduktion und Ödembildung zusammensetzt, beschäftigt (Baxter et al., 2002; Moens et al., 2005; Romson et al., 1983; Tanaka et al., 1993). Durch die gezielte Beeinflussung von bestimmten Molekülen und Signaltransduktionswegen wurde versucht den Gewebeschaden nach Transplantation zu minimieren. Mit der Entwicklung von Konservierungslösungen und -strategien sowie der organisierten Organallokation und damit verbundenen geringeren Ischämiezeiten ließen sich erhebliche Verbesserungen der Transplantationsergebnisse erzielen (Anaya-Prado et al., 2008; Southard et al., 1995). Das ideale therapeutische Ziel, durch gezieltes Eingreifen in das menschliche Immunsystem Toleranz erzeugen zu können, wurde bisher nicht erreicht und die Langzeitergebnisse der Herztransplantation sind trotz erheblicher Fortschritte weiterhin unbefriedigend.

Pleiotrope Substanzen gelten bei der Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens als vielversprechend (Menger et al., 2007). So konnte beispielsweise für bestimmte Statine pleiotrope Effekte nachgewiesen werden. Stalker et al. zeigten, dass Rosuvastatin eine bedeutende anti-inflammatorische Wirkung durch Hemmung der endothelialen Adhäsionsmolekülexpression ausübt und dass dieser protektive Effekt über die Freisetzung von endotheliale NO vermittelt wird (Stalker et al., 2001). Shimizu et al. zeigten an einem experimentellen Modell zur heterotopen Herztransplantation, dass Statine durch ihre anti-inflammatorische Wirkung Transplantat-Vaskulopathie in kardialen Allografts unabhängig von

ihrer lipidsenkenden Wirkung reduzieren (Shimizu et al., 2003). Als weitere erfolgversprechende Substanz hat sich Erythropoietin etabliert (Menger et al., 2007). Zahlreiche experimentelle Studien wiesen einen durch Epo vermittelten gewebeprotectiven Effekt, speziell unter ischämischen Bedingungen, durch anti-apoptotische (Bernaudin et al., 1999), antiinflammatorische (Agnello et al., 2002), Angiogenese-fördernde (Westenbrink et al., 2007) und vasomodulatorische Wirkung (Contaldo et al., 2007) nach. Im postischämischen Myokard führte eine Behandlung mit Erythropoietin zur Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Bogoyevitch et al., 2004). Daten aus experimentellen und klinischen Studien zeigten, dass diese gewebeprotectiven Effekte von Epo unabhängig von seiner hämatopoetischen Wirkung sind (Belonje et al., 2008; Fiordaliso et al., 2005; Lipsic et al., 2004). Die genauen Mechanismen der Epo-vermittelten Kardioprotektion sind unklar, diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Bedeutung einer reduzierten Leukozyteninfiltration im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens (Riu et al., 2005; Baxter et al., 2002). Es ist auch unbekannt, ob Epo zum Erhalt der nutritiven Kapillarperfusion in postischämischem, reperfundiertem Myokard führt, wie es in anderen ischämischen Geweben beschrieben wurde (Contaldo et al., 2007; Harder et al., 2009). Bislang gibt es nahezu keine Daten über protektive Effekte von Epo bei Herztransplantation.

5.2.1. Mikrozirkulation

Der Ischämie-Reperfusionsschaden wurde in nahezu allen Organsystemen beschrieben und führt generell zu bestimmten postischämischen Veränderungen in der Mikrohämodynamik. Während die makrohämodynamischen Parameter, wie systemischer mittlerer arterieller Blutdruck, Puls und arterielle Blutgase weitestgehend unverändert sein können, werden dennoch spezifische Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation beobachtet. Vollmar et al. untersuchten die hepatischen makro- und mikrozirkulatorischen Veränderungen mittels Intravitalmikroskopie in einem Modell zum Ischämie-Reperfusionsschaden an der Rattenleber durch selektiven Verschluss der hepatischen Lobargefäße. Mikrozirkulatorisch ist der Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber durch eine verminderte funktionelle Dichte der Sinusoide, den Verlust der Integrität des Endothels und durch eine späte postischämische, reaktive Hyperämie gekennzeichnet. Die reaktive Hyperämie wird als ein wichtiger kompensatorischer Mechanismus gedeutet, um die adäquate sinusoidale Perfusion aufrechtzuerhalten (Puhl et al., 2005; Vollmar et al., 1994). In Versuchen von Contaldo et al. wurde gezeigt, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden im quergestreiften Muskel durch eine verminderte funktionelle Kapillardichte, eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und

vermehrte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen während der frühen Reperfusion charakterisiert ist. Zusätzlich wurde eine ausgeprägte Konstriktion der Arteriolen und damit verbundene Verminderung des mikrovaskulären Blutflusses während der späten Reperfusion dokumentiert (Contaldo et al., 2007).

Daten über die koronare Mikrozirkulation und die hämodynamischen Veränderungen nach Ischämie-Reperfusion wurden zahlreich durch ex vivo Experimente an isolierten Mäuseherzen gewonnen (Glyn et al., 2008; Goebel et al., 2003; McDonagh et al., 1986) oder auch durch die Übertragung von Daten, die im quergestreiften Muskel erhoben wurden (Johns et al., 2005). Untersuchungen der Mikrozirkulation im postischämischen Myokard in vivo erfolgten zum großen Teil an tierexperimentellen Modellen zum Myokardinfarkt durch passagere Okklusion einer Koronararterie. In solchen Untersuchungen wurde analog zu den Beobachtungen in Leber und quergestreiftem Muskel als charakteristische postischämische Veränderung der myokardialen Mikrozirkulation das "no-reflow" Phänomen beschrieben, welches sich durch verminderte Blutflussgeschwindigkeit und eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte auszeichnet (Hale et al., 2008; Lautamäki et al., 2009; Reffermann et al., 2006).

Schramm et al. haben erstmals die subepikardiale Mikrozirkulation heterotop transplanteder Herzen und den Einfluss verlängerter Ischämiezeiten auf die Hämodynamik in der Maus untersucht. Die Ergebnisse bestätigten, dass verlängerte Ischämiezeiten eine deutliche Zunahme der kapillaren Dysfunktion und eine damit verbundene Abnahme der funktionellen Kapillardichte verursachen (Schramm et al., 2007a). In unseren Versuchen konnte die durch den Ischämie-Reperfusionsschaden verursachte über die Zeit progrediente Abnahme der funktionellen Kapillardichte in der Kontrollgruppe ebenso bestätigt werden, welche auch in den anderen Organsystemen bereits beschrieben wurde (Contaldo et al., 2007; Puhl et al., 2005; Vollmar et al., 1994). Ursache der verminderten Kapillardichte ist das kapillare "no-reflow", welcher durch Endothelschwellung, intravasale Hämokonzentration, Verengung der Kapillaren aufgrund des durch Ödem angestiegenen interstitiellen Drucks und die Endothelin-1-vermittelte mikrovaskuläre Konstriktion (Menger et al., 2007) sowie durch kapillarenverlegende Leukozyten entsteht (Tillmanns et al., 1993).

Eine Rekrutierung einer funktionellen kapillaren Reserve durch Eröffnung kapillarer Querverbindungen oder kapillare Dilatation wurde in den gemessenen Zeitintervallen bei Schramm et al. (Schramm et al., 2007a) sowie in unseren jetzigen Versuchen nicht gefunden. Tatsächlich wurde eine koronare, kapillare Flussreserve über die Eröffnung kapillarer Querverbindungen und kapillare Dilatation nur während reaktiver Hyperämie nach 20s Okklusion der LAD beschrieben (Kiyooka et al., 2005). Das Fehlen einer Rekrutierung der kapillaren Perfusion deutet darauf hin, dass das heterotop transplantierte Herz eine deutliche Schädigung erfahren hat, so dass das Ischämie-Reperfusion-induzierte kapillare

“no-reflow“ ein eventuelles kapillares Rekrutment mittels Aktivierung einer kapillaren Flussreserve überschattet.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass Erythropoietin langandauernde Verbesserungen der Perfusion nutritiver Kapillaren im postischämischen, quergestreiften Muskel vorwiegend über Verminderung des kapillaren “no-reflow“, Gefäßdilatation und Angiogenese (Contaldo et al., 2007; Rezaeian et al., 2008) bewirkt. Die Gruppe um Contaldo et al. beschreibt, dass eine Epo-Behandlung zu einer Reduktion der kapillaren Dysfunktion und verminderter Gefäßpermeabilität während der frühen Reperfusionphase führt und in der späten Reperfusionphase die Konstriktion der Arteriolen im quergestreiften Muskel reduziert (Contaldo et al., 2007). Im Herzen konnte eine solche Reaktion nicht nachgewiesen werden (Schramm et al., 2006b). In unseren Versuchen beeinflusste eine Epo-Behandlung die koronaren, mikrozirkulatorischen Blutflusseigenschaften in kardialen Allografts während der frühen Reperfusion nicht. Eine Epo-Behandlung hatte keine Auswirkung auf die koronare Hämodynamik, weder wenn der Empfänger, noch wenn der Spender behandelt wurde. Unser Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 6 h, während Contaldo ein chronisches Modell mit einem Untersuchungszeitraum über mehrere Tage verwendete. Aufgrund der Größe des Schadens könnte das von uns gewählte Zeitintervall zu kurz sein, um Verbesserungen der Hämodynamik zu sehen, welche möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt eingetreten wären. Wir können nicht ausschließen, dass in unserem Modell zu einem späteren Zeitpunkt messbare Veränderungen der koronaren Mikrozirkulation auftreten. Dazu sollte berücksichtigt werden, dass der quergestreifte Muskel zwar durchaus strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem Herzmuskel hat, dennoch ist es vermutlich nicht möglich alle gewonnenen Erkenntnisse gleichermaßen auf beide Organsysteme anzuwenden.

Die Angiogenese-fördernde Wirkung von Erythropoietin ist hochwahrscheinlich nicht ursächlich für die akute kardioprotektive Wirkung, trägt aber möglicherweise zu der späteren positiven Beeinflussung des Remodelling Prozesses bei (Binbrek et al., 2007).

Postischämische mikrovaskuläre Dysfunktion wirkt sich schließlich auch auf die vaskuläre Permeabilität aus. Unsere Daten zeigen eine deutliche Störung der endothelialen Barrierefunktion in der postischämischen myokardialen Mikrozirkulation, wenn man berücksichtigt, dass ein Verhältnis zwischen intra- und extravasaler FITC-Dextran Fluoreszenzintensität von mehr als 0,5 für eine pathologische Erhöhung der Gefäßpermeabilität in Geweben ohne fenestriertes Endothel spricht (Menger et al., 1992). Die erhöhte, vaskuläre Permeabilität lag in den aktuellen Untersuchungen zwischen 71% und 99%. Diese Ergebnisse waren für Kontrollgruppe und Epo-Empfänge-Gruppe vergleichbar.

Das Potential von Epo der postischämischen Ödembildung vorzubeugen wurde bereits im Gehirn und an der Lunge nachgewiesen (Gunnarson et al., 2009; Wu et al., 2006). Über die Wirkung von Epo bei der myokardialen Ödembildung ist nur wenig bekannt, obwohl diese an der Ischämie-Reperfusion-induzierten, kardialen Dysfunktion maßgeblich beteiligt ist (Mehlhorn et al., 2001). Eine Reduktion des Myokardödems durch Epo konnte in unseren histologischen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Das Myokardödem in den kardialen Allografts war histologisch in allen Gruppen gleich ausgeprägt. Unsere Daten zeigen, dass eine vor Transplantation durchgeführte Vorbehandlung des Spenders mit Erythropoietin die Extravasation von FITC-Dextran verringert. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Behandlung des Organspenders mit Epo den während des Ischämie-Reperfusionsschaden aufgetretenen Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität abschwächen kann. Diese Feststellung wird von Ergebnissen, welche am quergestreiften Muskel erhoben wurden, gestützt. Dort stellte man ebenfalls fest, dass eine Epo-Behandlung sich günstig auf die postischämische Gefäßpermeabilität auswirkt (Contaldo et al., 2007). Contaldo et al. vermuteten, dass dies eine Konsequenz des antiinflammatorischen Effekts - und zwar der verminderten Leukozytensequestration - von Epo darstellt (Contaldo et al., 2007). Die Verminderung der Permeabilität und damit der Endothelschädigung ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Reduktion der Inflammation erklären, da in der Epo-Spendergruppe die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen nicht vermindert waren. In der Epo-Empfängergruppe war zwar die leukozytäre Antwort vermindert, die Permeabilität des Endothels jedoch vergleichbar mit den Kontrollen. Unsere Daten weisen daher eher auf eine von der Leukozyteninvasion unabhängige Ödembildung in postischämischen kardialen Allografts hin. Ein möglicher Erklärungsansatz der günstigen Auswirkungen der Epo-Gabe auf die Gefäßpermeabilität in der Spendergruppe wäre, dass Epo direkt die Endothelfunktion vor Eintritt des Ischämie-Reperfusionsschadens protektiv beeinflusste. Die These einer leukozytenunabhängigen Ödembildung wird von Ergebnissen der Arbeitsgruppe um McDonagh gestützt. Diese untersuchte die postischämische Mikrozirkulation isolierter Mäuseherzen, die einer leukozytendepletierten Perfusionslösung ausgesetzt waren. Es konnte nach Ischämie und Reperfusion durch Messung der Extravasation von fluoreszierendem Albumin trotz Abwesenheit von Leukozyten ein deutlicher Anstieg der Gefäßpermeabilität nachgewiesen werden (McDonagh et al., 1986).

5.2.2 Inflammation

Die Reperfusion von ischämischem Gewebe schädigt das Gewebe und kann eine Beeinträchtigung der Organfunktion zur Folge haben. So konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden beispielsweise in der Niere zur Abnahme der Funktion - gemessen an der glomerulären Filtrationsrate und den Retentionswerten - führt (Asaga et al., 2008; Rippe et al., 2006). In der Leber hat Ischämie und Reperfusion eine Abnahme der Syntheseleistung und metabolischen Funktion zur Folge (Vollmar et al., 1994). Am Herzen führt der Ischämie-Reperfusionsschaden zur Einschränkung der Pumpfunktion. So zeigten Fishbein et al. an einem Modell zum experimentell induzierten Myokardinfarkt in der Ratte, dass die Reperfusion von ischämischem Myokard das Gewebe schädigt und eine Beeinträchtigung der kontraktile Funktion zur Folge haben kann (Fishbein et al., 1978). In vivo Untersuchungen zum myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden zeigten, dass die Infiltration von neutrophilen Leukozyten in betroffenes Gewebe eine elementare Rolle bei der Entwicklung der kardialen Dysfunktion spielt (Entman et al., 1991; Granger et al., 1994). Und auch in anderen Organen, wie Leber und Niere wurde die Infiltration von Leukozyten für die Abnahme der Organfunktion als ursächlicher Mechanismus angesehen (Skoner et al., 2001). Smith et al. sind der Meinung, dass die Schwere des durch Ischämie und Reperfusion induzierten Schadens in direkter Relation zum Umfang der Neutrophilenakkumulation steht (Smith et al., 1988). Daher müsste eine Hemmung der Neutrophileninfiltration zur Verminderung des durch Ischämie und Reperfusion induzierten Schadens führen (Rui et al., 2001). Allerdings ist die Bedeutung der Neutrophileninfiltration bei der Entstehung des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens ein kontrovers diskutiertes Thema (Baxter et al., 2002). So konnte in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Leukozytenakkumulation und postischämischer kardialer Dysfunktion hergestellt werden (Romson et al., 1983; Tanaka et al., 1993), während Andere dies jedoch nicht bestätigen konnten (Birnbaum et al., 1997). Es werden verschiedene indirekte Methoden genutzt um neutrophile Leukozyten im Gewebe nachzuweisen und damit eine Messung der Inflammation vornehmen zu können. Die Färbung von perivasalen Leukozyteninfiltraten in histologischen Gewebeschnitten mittels Myeloperoxidasefärbung war eine der ersten und ist immer noch eine einfach anzuwendende und verbreitete Methode. Myeloperoxidase ist ein Enzym, welches vorwiegend in den azidophilen Granula der neutrophilen Granulozyten zu finden ist und zum Nachweis von ins Gewebe migrierten Leukozyten dient (Asaga et al., 2008). Nachteil dieser Methode ist, dass sie sich allerdings nur auf den Nachweis der ins Gewebe eingewanderten Leukozyten beschränkt. Die intravasal adhären und rollenden Leukozyten sind nicht sichtbar. Eine Quantifizierung der Leukozytenzahlen mittels MPO-Färbung ist im Vergleich

zur intravitalen Mikroskopie recht ungenau und erst ab einer bestimmten Anzahl von eingewanderten Leukozyten möglich. Der Tod des Tieres zur Untersuchung des Gewebes ist unvermeidlich und somit ist eine MPO-Detektion im Gewebe nur als Finalversuch durchführbar (Rui et al., 2005; Liu et al., 2006). Die intravitale Mikroskopie dagegen erlaubt die direkte, repetitive Darstellung der Leukozyten in vivo und die Visualisierung der gesamten Rekrutierungskaskade sowie die Darstellung aller Gefäßabschnitte.

Bei der Transplantation vaskularisierter Organe kommt es notwendigerweise immer zum Ischämie-Reperfusionsschaden. Neben Störungen der Mikrozirkulation führt der durch Ischämie und Reperfusion entstandene Schaden zur Akkumulation neutrophiler Leukozyten im transplantierten Organ. In einer intravitalmikroskopischen Studie zum Ischämie-Reperfusionsschaden bei Pankreastransplantation wurde gezeigt, dass eine deutliche intravasale Leukozytenakkumulation in den postkapillaren Venolen stattfindet, die durch Applikation eines Antikörpers gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 unterdrückt werden kann. Die prophylaktische Gabe dieses Antikörpers konnte sogar erfolgreich das Auftreten einer durch die Inflammation verursachten Transplantatpankreatitis vorbeugen (Keck et al., 2003). Auch bei Lebertransplantation haben eine Vielzahl von Studien eine Ischämie-Reperfusion-induzierte Akkumulation gewebescheidender neutrophiler Leukozyten nachgewiesen (Puhl et al., 2004; Wang et al., 2009).

In unserem Modell wurde ebenfalls eine deutliche Neutrophilenakkumulation während Reperfusion mittels intravitaler Mikroskopie nachgewiesen. Die Zahl der rollenden Leukozyten nahm nach Transplantation in den postkapillaren Venolen des Transplantats über die Zeit ab, während die Anzahl der fest am postkapillaren, venulären Endothel haftenden Leukozyten zunahm. Dies kann durch die Vorstellung erklärt werden, dass eine große Zahl der rollenden Leukozyten in den adhärenen Zustand übergehen.

In der vorliegenden Studie wurde durch die Epo-Behandlung des Empfängers die feste Leukozytenadhärenz in postkapillaren Venolen gehemmt. Epo hatte in unseren Versuchen aber keine Wirkung auf rollende Leukozyten. Im Gegensatz dazu dokumentierten Contaldo et al., dass sowohl die Zahl fest adhärenter wie auch rollender Leukozyten in den postkapillaren Venolen der quergestreiften Muskulatur vermindert war (Contaldo et al., 2007). Diesen Unterschied können wir aufgrund der vorliegenden Daten zurzeit nicht sicher erklären. Hier mögen spezifische Unterschiede der Adhäsionsmolekül-Expression zwischen muskulären und kardialen Mikrogefäßen eine Rolle spielen.

Engler et al. konnten in Versuchen an Herzen von Hunden zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen kapillarem Leukozytenplugging und Ausmaß der nicht durchbluteten Kapillaren besteht und dass das Leukozytenplugging in den Kapillaren während postischämischer, myokardialer Reperfusion dazu beiträgt, die vollständige

Wiederherstellung des kapillaren Blutflusses während Reperfusion zu verhindern (Engler et al., 1983). In unserer Arbeit war die Anzahl der Leukozyten, die das Lumen der Kapillaren verlegen über den Beobachtungszeitraum in allen Gruppen konstant. Eine Epo-Behandlung des Empfängers führte zu einer signifikanten Reduktion des kapillaren Pluggings. Die Dichte der perfundierten Kapillaren in den Allografts war durch eine Epo-Behandlung des Empfängers im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

Die Epo-Behandlung des Spenders hatte keinen Einfluss auf die postischämische, leukozytäre Entzündungsreaktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass Epo die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten, nicht aber die des Endothels beeinflusste. Allerdings war das koronare Endothel in den Allografts der Epo-Spendergruppe nur einer limitierten Zeit (2h) der Epo-Behandlung ausgesetzt, bevor die Perfusion mit kalter Konservierungslösung die Ischämie einleitete. Im Gegensatz dazu war das Endothel in Allografts der Epo-Empfängergruppe während der gesamten Reperfusion zirkulierendem Epo ausgesetzt. Aufgrund der vorliegenden Daten kann also nicht sicher ein relevanter Epo Effekt auf das Allograftendothel ausgeschlossen werden. Weiterführende Arbeiten müssen zeigen, ob ein längerfristiges Behandlungsintervall der Spender effektiv die postischämische, leukozytäre Entzündung in kardialen Allografts verhindern kann.

Die Kernaussage der vorliegenden Studie ist, dass eine akute Epo-Behandlung des Transplantatempfängers die postischämische Leukozytensequestration unterdrücken kann. Diese Beobachtung wird von Studien am Gehirn (Brines et al., 2000), am quergestreiften Muskel (Contaldo et al., 2007) und auch am Herzen (Rui et al., 2005) gestützt. Während in Untersuchungen von Rui et al. (Rui et al., 2005) und Liu et al. (Liu et al., 2006) ein reduzierter Myeloperoxidasegehalt im reoxygenierten Myokard nach Epo-Behandlung gemessen wurden, zeigen unsere Daten eingehend, dass der Effekt von Epo auf die Leukozytenrekrutierung in reperfundiertem Myokard äußerst spezifisch ist. Spezifisch in dem Sinn, dass ausschließlich die postkapillare und kapillare feste Adhäsion von Leukozyten durch Epo unterdrückt wird.

Die akut verminderte Anzahl von zirkulierenden Leukozyten in den Epo-behandelten Empfängern können wir zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erklären. Es sollte in diesem Zusammenhang aber eine vorsichtige Interpretation erfolgen. Die Leukozytenrekrutierung in den Extravasalraum ist ein genau definierter Prozess, der einem festgelegten Ablauf folgt (Jordan et al., 1999). Der sich mit dem Blutstrom bewegende Leukozyt benötigt eine initiale Kontaktaufnahme mit dem Endothel, um in den Zustand des Rollens überzugehen, was mit einer Zellaktivierung verbunden ist und die feste Leukozytenadhäsion und folgende Transmigration in das entzündete Gewebe zur Folge hat. Die Tatsache, dass in allen drei Gruppen eine vergleichbare Anzahl rollender Leukozyten gemessen wurde, weist darauf hin,

dass eine Epo-induzierte Reduktion der zirkulierenden Leukozyten nicht ursächlich für die Reduktion der festen Leukozytenadhäsion in postkapillaren Venolen und das verminderte kapillare Leukozytenplugging ist.

Die Mechanismen, die dem antiinflammatorischen Effekt von Epo zugrunde liegen, umfassen sowohl Aktivierung als auch Hemmung intrazellulärer Signalkaskaden in kardialen Myozyten (Rui et al., 2005). In Anbetracht dessen wurde auf der Suche nach Mechanismen, die der beobachteten Epo-induzierten Reduktion der Leukozytenrekrutierung unterliegen, das Expressionsmuster des Epo-Rezeptors mittels Immunhistochemie gemessen. Die Immunhistochemie zeigte die Epo-R Expression ubiquitär im Myokard, aber besonders stark konzentriert auf den Granula von Mastzellen. Dies ist von Bedeutung, auch wenn die Expression von Epo-R durch Mastzellen an sich bereits zuvor bekannt war. So konnte beispielsweise bereits die Arbeitsgruppe von Isogai et al. an den Hautbiopsien von Patienten mit entzündlichen Hauterkrankungen, wie atopischer Dermatitis und Psoriasis den Epo-Rezeptor auf kutanen Mastzellen nachweisen (Isogai et al., 2006). Das deutet zusammen mit unseren Ergebnissen auf eine potentielle Rolle von Epo bei der Beeinflussung der Mastzellen hin, die eine bedeutende Rolle bei der Inflammation besitzen (Kanwar et al., 1994; Kanwar et al., 1998).

Mastzellen werden vorwiegend entlang der Mikrogefäße in Geweben gefunden. Reife Gewebemastzellen werden zum einen grob in Abhängigkeit ihrer anatomischen Lokalisation, zum anderen in Bezug auf die charakteristische Zusammensetzung ihrer Granula unterteilt (Irani et al., 1989). Sie spielen eine pathophysiologisch bedeutende Rolle bei zahlreichen, entzündlichen Reaktionen, wie Hypersensibilitätsreaktionen, Ischämie-Reperfusionsschaden und Rheumatoider Arthritis, und sind an der Gewebeabwehr gegen mikrobielle Infektionen beteiligt. Durch die Freisetzung eines vielfältigen Spektrums von proinflammatorischen Mediatoren, wie Zytokinen und Chemokinen, nehmen Mastzellen Einfluss auf die Koordination der Leukozytenrekrutierung (Schramm et al., 2004). Zu diesen Mediatoren gehören die Metaboliten der Arachnoidonsäure, einschließlich Leukotriene und Prostaglandine und Substanzen wie z.B. Histamine, bestimmte Proteasen und TNF-alpha, die in präformierten intrazellulären Granula gelagert und durch rasche Exozytose freigesetzt werden. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit verschiedene Aspekte der Inflammationsreaktion zu beeinflussen, einschließlich der Gefäßpermeabilität, Expression von Adhäsionsmolekülen und Freisetzung chemotaktisch wirkender Substanzen, was Gewebeödem und Leukozyteninfiltration verursacht (Raud et al., 1989).

Es ist bekannt, dass Mastzellen essentielle Zielzellen in IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen, wie z.B. allergischer Rhinitis oder atopischer Dermatitis sind (Skoner et al., 2001; Von Bubnoff et al., 2003). Die immunologische Aktivierung erfolgt durch die Bindung von IgE (Irani et al., 1989; Raud et al., 1989). Neben diesem klassischen

Aktivierungsweg wurden in zahlreichen Studien alternative nicht-immunologische (IgE-abhängige) Mechanismen beschrieben, die zur Mastzelldegranulation führen, wie beispielsweise physikalischer Stress wie Kälte, Ischämie-Reperfusion-induzierte Oxidantienproduktion, Komplement und das Polypeptidanalogen Compound 48/80 (Gibbs et al., 2001; Kanwar et al., 1994; Wang et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass Compound 48/80-getriggerte Mastzellaktivierung eine identische mikrovaskuläre Antwort und Histaminfreisetzung hervorruft, wie die Aktivierung mit Antigen nach primärer Sensibilisierung (Raud et al., 1989). Verschiedene Studien fanden heraus, dass Mastzell-regulierte Neutrophilenrekrutierung für eine wirkungsvolle angeborene Immunität entscheidend ist. Tannebaum et al. nutzten Compound 48/80, um spezifisch die Degranulation von Mastzellen auszulösen und provozierten somit einen raschen Einstrom von Neutrophilen in die Haut innerhalb von Stunden nach Aktivierung (Tannebaum et al., 1980). Wershil et al. zeigten an Mastzell-defizienten Mäusen, dass Mastzellen absolut notwendig für sowohl das Gewebeödem als auch Neutrophileninflux in der akuten Entzündung von nicht-immunologischem Ursprung sind (Wershil et al., 1988).

Da Mastzellen bei der Entzündungsreaktion durch Freisetzung von Mediatoren auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Ischämie-Reperfusionsschadens im Herzen spielen, stellte sich uns die Frage, ob Epo seine anti-inflammatorische Wirkung über die Beeinflussung der Degranulation von Mastzellen ausübt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen uns keine Daten zur Verfügung, die eine potentielle Rolle von Mastzellen bei der Epo-vermittelten Kardioprotektion nach Ischämie-Reperfusion untersucht hätten.

Hirose et al. führten Experimente zur Wirkung von Epo bei Myokarditis durch und fanden heraus, dass eine chronische Epo-Behandlung das Fortschreiten der Erkrankung durch Hemmung der kardialen Mastzelldegranulation und damit verbundene Hemmung der Leukozytenrekrutierung beeinflusst. Sie haben in ihrer Studie festgestellt, dass das Verhältnis von degranulierten Mastzellen zur gesamten Anzahl von Mastzellen bei Myokarditis erhöht war und dass dieser Anstieg durch eine Behandlung mit Epo signifikant unterdrückt wurde bei gleicher Gesamtzahl an Mastzellen (Hirose et al., 2007). Dies gibt Hinweise auf eine quantitative Beeinflussung der Mastzelldegranulation durch Erythropoietin. Um herauszuarbeiten, ob Epo seine Wirkung auf den Ischämie-Reperfusionsschaden nach allogener Herztransplantation durch Einfluss auf die Degranulation von Mastzellen erwirkt, wurde die Anzahl von degranulierten Mastzellen und nicht-degranulierten Mastzellen nach Stimulation mit dem Mastzelldegranulator CMP48/80 bestimmt. Im Gegensatz zu den Daten von Hirose konnten wir aber keine deutliche Abnahme der absoluten Anzahl der degranulierten kardialen Mastzellen im Transplantat der Epo-Empfänger bestätigen.

Da eine quantitative Einflussnahme auf die Mastzelldegranulation von Epo sich in unseren Ergebnissen somit nicht bestätigte, stellte sich die Frage, ob Erythropoietin über eine qualitative Einflussnahme auf die Mastzelldegranulation wirkt. Aufgrund ihrer speziellen Heterogenität sind Mastzellen je nach Anforderung in der Lage die Zusammensetzung ihrer Granula zu modifizieren und so auf verschiedene Reize angepasst zu reagieren (Beil et al., 2000). Die bekannte funktionelle und anatomische Heterogenität der Mastzellgranula veranlasste uns anzunehmen, dass Epo einen qualitativen statt quantitativen Effekt auf die Mastzelldegranulation während myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden und assoziierter leukozytärer Entzündung ausübt.

In den zusätzlich durchgeführten Experimenten konnten wir nachweisen, dass eine Epo-Behandlung die myokardiale Expression inflammatorischer Moleküle während der CMP48/80 stimulierten Mastzelldegranulation in Mäusen des Spenderstamms Balb/c verändert. Wir haben eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nachweisen können, welches bekannt dafür ist, der hauptsächliche endotheliale Gegenspieler für die β 2-Integrin-vermittelte feste Leukozytenadhäsion zu sein (Jordan et al., 1999). Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf zirkulierenden Leukozyten des mit Compound 48/80 behandelten Empfängerstamms C57BL/6 war weitgehend unbeeinflusst durch Epo. Dennoch handelt es sich hierbei nur um Hinweise, die uns vermuten lassen, dass Mastzellen eine vermittelnde Rolle bei dem beobachteten antiinflammatorischen Effekt von Epo während des Ischämie-Reperfusionsschadens im kardialen Allograft spielen. Es muss berücksichtigt werden, dass die Mastzelldegranulation abhängig von der Entität des Degranulationsstimulus variieren kann (Schramm et al., 2004). Berücksichtigt werden sollte in diesem Zusammenhang auch die Heterogenität der Mastzellen der verschiedenen Gewebe, die verschiedenen Anforderungen entsprechen müssen und die Heterogenität der Mastzellen in verschiedenen Spezies (Beil et al., 2000). Diese qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen kutanen und kardialen Mastzellen helfen uns möglicherweise zu erklären, warum andere Arbeitsgruppen einen Effekt von Epo auf die Mikrozirkulation in quergestreiftem Muskel und der Haut feststellten (Harder et al., 2009; Rezaeian et al., 2008).

Einen eindeutigen Nachweis über die Beteiligung der qualitativen Mastzelldegranulation am kardioprotektiven Effekt von Epo könnte durch den Einsatz von Modellen mit ausschließlicher Defizienz des Epo-R auf kardialen Mastzellen oder durch die spezifische Blockade des Epo-R auf kardialen Mastzellen erzielt werden. Nach unseren Kenntnissen sind solche Modelle zurzeit jedoch nicht verfügbar.

5.2.3. Transplantatabstoßung

Der beobachtete antiinflammatorische Effekt von Epo im Akutversuch konnte im chronischen Modell nicht in eine Verzögerung der Transplantatabstoßung übertragen werden, weder ohne, noch mit zusätzlicher immunsuppressiver Therapie mit Ciclosporin A. Schmeding et al. zeigten dagegen an einem Modell zur Transplantation von Fettlebern an Ratten, dass eine Behandlung mit Erythropoietin die Transplantatfunktion verbesserte und zu einem verlängerten Transplantatüberleben führte (Schmeding et al., 2010).

Es sollte dabei berücksichtigt werden, dass das von uns verwendete Transplantationsmodell innerhalb einer Woche zu einer relativ heftigen akuten Abstoßungsreaktion führte (Schramm et al., 2007b). Es ist möglich, dass der antiinflammatorische Effekt von Epo lediglich von der fulminanten Abstoßungsreaktion überschattet wurde und selbst die Therapie mit Ciclosporin A nicht ausreichte, um diese relevant abzumildern. Es bleibt festzustellen, ob eine Eskalation der immunsuppressiven Therapie oder der Einsatz eines Modells mit einer schwächer ausgeprägten Abstoßungsreaktion dazu führen würde, dass sich der immunmodulatorische Effekt von Epo auch in einer langanhaltenden Epo-vermittelten Kardioprotektion nach Herztransplantation äußert.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immune responses to tissue transplants. In: Cellular and molecular immunology. Philadelphia:Saunders 1994; 335-337
2. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res. 2002; 952:128-134
3. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:3974-3978
4. Anaya-Prado R, Delgado-Vazquez JA. Scientific basis of organ preservation. Curr Opin Organ Transplant 2008; 13:129-134
5. Arfors KE, Bergqvist D, Intaglietta M, Westergren B. Measurements of blood flow velocity in the microcirculation. Ups J Med Sci 1975; 80:27
6. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. Am J Physiol. 1988; 254:471-476
7. Asaga T, Ueki M, Chujo K, Taie S. JTE-607, an inflammatory cytokine synthesis inhibitor, attenuates ischemia/reperfusion-induced renal injury by reducing neutrophil activation in rats. J Biosci Bioeng 2008; 106:22-26
8. Aziz T, Burgess M, Khafagy R, Wynn Hann A, Campbell CS, Rahman A, Deiraniya A, Yonan N. Bicaval and standart techniques in orthotopic heart transplantation: medium-term experience in cardiac performance and survival. J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 118:115-122
9. Azuma H, Tilney NL. Chronic graft rejection. Curr Opin Immunol 1994; 6:770-776

10. Baran KW, Nguyen M, McKendall GR. Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Study Group. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI study). *Circulation* 2001; 104: 2778-2783
11. Barnard CN. The Operation: A human cardiac transplantation: An interim report of a successful operation performed at Groote-Schurr-Hospital, Capetown. *S Afr Med J* 1967; 1271-1274
12. Barnes PJ. Antiinflammatory actions of glucocorticoids: mole mechanisms. *Cli Sci* 1998; 94:557-572
13. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002; 97:268-275
14. Beil WJ, Schulz M, Wefelmeyer U. Mast cell granule composition and tissue location-- a close correlation. *Histol Histopathol* 2000; 15:937-946
15. Belonje A, Voors A, van Gilst WH, Anker S, Slart RH, Tio R, Zijlstra F, van Veldhuisen D. Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction : Rational and stuy design of a prospective randomized, clinical trial (HEBEIII). *Am Heart J* 2008; 155:817-822
16. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, McKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19:643-651
17. Bersztel A, Lorant T, Björkland A, Johnsson C, Tufveson G. Antibody resonses to xenogenic antigens- a study in the mouse to rat system. *Tissue antigens* 2006; 68:483-488
18. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91:379-387

19. Billingham ME, Cary NRB, Hammond ME. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection. Heart Rejection Study Group, J Heart Transplant 1990; 9: 587-93
20. Binbrek AS, Mittal B, Rao KN, Sobel BE. The potential of erythropoietin for conferring cardioprotection complementing reperfusion. Coron Artery Dis. 2007 ; 18:583-585
21. Birnbaum Y, Patterson M, Kloner RA. The effect of CY1503, a sialyl-Lewis (x) analog blocker of the selectin adhesion molecules, on infarct size and "no-reflow" in the rabbit model of acute myocardial infarction/reperfusion. J Mol Cell Cardiol 1997; 29:2013-2025
22. Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin: cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. Cardiovasc. Res. 2004; 63:208-216
23. Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer Jr RM, Balshaw D, Lathrop DA. Myocardial protection at a crossroads. The need for translation into clinical therapy. Circ Res 2004; 95:125-134
24. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97:10526-10531
25. Brines ML, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-haematopoietic functions: Biology and clinical promise. Kidney International 2006; 70:226-250
26. Buemi M, Aloisi C, Cavallaro E, Corica F, Floccari F, Grasso G, Laso A, Pettinato G, Ruello A, Sturiale A, Frisina A. Recombinant Erythropoietin: more than just the correction of uremic anemia. Nephrology 2002, 15:97-103
27. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. Cardiovasc Res 2006; 72:51-59
28. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell 1991; 67:1033-1036

29. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4802-4806
30. Carrel A, Guthrie CC. The Transplantation of veins and organs. *Am J Med* 1905; 10:1101
31. Celi A, Merrill-Skoloff G, Gross P, Falati S, Sim DS, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and widefield intravital microscopy. *J Thromb Haemost* 2003; 1:60-68
32. Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293:274-283
33. Corbascio M, Ekstrand H, Osterholm C, Qi Z, Simanaitis M, Larsen CP, Pearson TC, Riesbeck K, Ekberg H. CTLA4Ig combined with anti-LFA-1 prolongs cardiac allograft survival indefinitely. *Transpl Immunol* 2002; 10:55-61
34. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negativ interferences of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunolo* 2000; 164:825-832
35. Dedja A, Dall'olmo L, Cadrobbi R, Baldan N, Fante F, Calabrese F, Rigotti P, Ferrarresso M, Delriviere L, Cozzi E, Ancona E. Heterotopic cardiac xenotransplantation in rodents: report of a refined technique in a hamster-to-rat model. *Microsurgery* 2005; 25:227-234
36. Demikhov VP. Experimental transplantation of vital organs (authorized translation from the russian by Basil Haigh). Consultants bureau Enterprises Inc., New York 1962

37. Diaz B, Gonzales Vilchez F, Almenar L, Delgado JF, Manito N, Paniagua MJ, Crespo MG, Kaplinsky E, Pascual DA, Fernández-Yáñez J, Mirabet S, Palomo J; MITOS Study Group. Gastrointestinal complications in heart transplant patients: MITOS study. *Transplant Proc* 2007; 39:2397-2400
38. Dietzmann K, Letko G, Sokolowski A. Mitochondrial membrane potential in living cells: Evidence from studies with rhodamine 6 G as fluorescent probe. *Exp Pathol* 1987; 31:47-51
39. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between JAK-2 and NFkB signalling cascades. *Nature* 2001; 412:641-647
40. DSO Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland, Bundesweiterjahresbericht der DSO 2008
41. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leucocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999; 112:1-23
42. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8:495-505
43. Eisen HJ, Kobashigawa J, Keogh A, Bourge R, Renlund D, Mentzer R, Alderman E, Valentine H, Dureau G, Mancini D, Mamelok R, Gordon R, Wang W, Mehra M, Constanzo MR, Hummel M, Johnson J. Three-year results of a randomized, double-blind controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:517-525
44. Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983; 111:98-111
45. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J* 1991; 5:2529-2537
46. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:6741-6746

47. Feng D. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 1998; 187:903-915
48. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Ba A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:2046-2051
49. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978; 90:57-70
50. Gibbon JH. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37:171-180
51. Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol* 2001; 10:312-320
52. Glyn MC, Lawrenson JG, Ward BJ, Clark P. Rho Kinase-Mediated Reduction in Cardiac Capillary Endothelial Cell Dimensions, In Situ, Against Flow. *Microcirculation* Jan 2008; 28:1-16
53. Goebel S, Kuebler WM, Cornelissen AJ, Kuppe H, Pries AR, Habazettl H. In situ analysis of coronary terminal arteriole diameter responses: technical report of a new experimental model. *J Vasc Res* 2003; 40:442-448
54. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leucocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55:662-675
55. Grasso G, Buemi M, Alafaci C, Sfacteria A, Passalacqua M, Sturiale A, Calapai G, De Vico G, Piedimonte G, Salpietro FM, Tomasello F. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:5627-5631

56. Guillard C, Chretien S, Pelus AS, Porteu F, Muller O, Mayeux P, Duprez V. Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i)protein beta gammasubunit-initiated pathway. *J Biol Chem* 2003; 278:11050-11056
57. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:1602-1607
58. Gutierrez-Dalmau A, Campistol JM. Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs* 2007; 67:1167-1198
59. Hale SL, Mehra A, Leeka J, Kloner RA. Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:421-425
60. Halloran PF, Broski AP, Batiuk TD, Madrenas J. The molecular immunology of acute rejection: an overview. *Transplant Immunol* 1993; 1:3-27
61. Hamour IM, Lyster HS, Burke MM, Rose ML, Banner NR. Mycophenolate mofetil may allow cyclosporine and steroid sparing in de novo heart transplant patients. *Transplantation* 2007; 83:570-576
62. Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:297-329
63. Harder Y, Amon M, Schramm R, Georgi M, Banic A, Erni D, Menger MD. Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (HSP)-32-mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance. *Ann Surg* 2005; 242:869-879
64. Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkwow E, Matzen A, Rücker M, Vollmar B, Menger MD. Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery* 2009; 145:372-383

65. Hardy JD, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. Heart transplantation in man. Developmental studies and report of a case. *JAMA* 1964; 188:1132-1140
66. Hasegawa S, Becker G, Nagano H, Libby P, Mitchell R. Pattern of Graft- and Host-Specific MHC Class II Expression in Long-Term Murine Cardiac Allografts. *Am J of Path* 1998; 153:69-79
67. Helderma JH, Bennett WM, Cibrik DM, Kaufman DB, Klein A, Takemoto SK. Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant* 2003; 4:41-52
68. Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part I. *Plast Reconstr Surg* 1983; 71:387
69. Heron I. A technique of accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; 79:366-372
70. Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, Yoshimura T. Rhodamine 6G, inhibitor of both H⁺-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates. *Biochim Biophys Acta* 1980; 593:463-467
71. Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto M, Izawa A, Sato H, Ise H, Hongo M, Ikeda U. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007; 21:17-27
72. Humiston D, Tylor D, Kfoury A, et al. Mycophenolar mofetil history and introduction into clinical heart transplantation. *Cardiovaskular Engineering* 1997; 2:198
73. Intaglietta M, Tompkins WR. On-line measurements of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol* 1972; 32:546
74. Irani AM, Schwartz LB. Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:143-155
75. ISHLT. The registry of the international society for heart and lung transplantation. Annual report: Overall Heart and Adult Heart Transplantation Statistics 2009

76. Isogai R, Takahashi M, Aisu K, Horiuti Y, Aragane Y, Kawada A, Tezuka T. The receptor for erythropoietin is present on cutaneous mast cells. *Arch Dermatol Res* 2006; 297:389-394
77. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver International* 2006; 26:912-919
78. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer* 2002; 44
79. Johns DG, Ao Z, Willette RN, Macphee CH, Douglas SA. Role of p38 MAP kinase in postcapillary venule leukocyte adhesion induced by ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2005; 51:463-471
80. Jordan JE, Zhao Z, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1999; 43:860-878
81. Junk AK, Mammis A, Saviz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10659-10664
82. Kanwar S, Kubes P. Ischemia/reperfusion induced granulocyte influx is a multistep process mediated by mast cells. *Microcirculation* 1994; 1:175-182
83. Kanwar S, Hickey MJ, Kubes P. Postischemic inflammation: a role for mast cells in intestine but not in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 275:212-218
84. Kao A, Allen MT, Jessup M. Do older heart transplant recipients have a normal quality of life. *ISHLT report* 2002
85. Keck T, Werner J, Schneider L, Gebhard MM, Klar E. Characterization of ischemia/reperfusion injury after pancreas transplantation and reduction by application of monoclonal antibodies against ICAM-1 in the rat. *Surgery*. 2003; 134:63-71

-
86. Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leucocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120:3-10
 87. Kirklin J. Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump-oxygenator system (Gibbon-Type): report of eight cases. *Mayo Clin Proc* 1955; 30:201-206
 88. Kiyooka T, Hiramatsu O, Shigeto F, Nakamoto H, Tachibana H, Yada T, Ogasawara Y, Kajiya M, Morimoto T, Morizane Y, Mohri S, Shimizu J, Ohe T, Kajiya F. Direct observation of epicardial coronary capillary hemodynamics during reactive hyperemia and during adenosine administration by intravital video microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:1437-1443
 89. Koyano S, Araie M, Eguchi S. Movement of fluorescein and its glucuronide across retinal pigment epithelium-choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:531-538
 90. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other non-antigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005; 79:505-514
 91. Lautamäki R, Schuleri KH, Sasano T, Javadi MS, Youssef A, Merrill J, Nekolla SG, Abraham MR, Lardo AC, Bengel FM. Integration of infarct size, tissue perfusion, and metabolism by hybrid cardiac positron emission tomography/computed tomography: evaluation in a porcine model of myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2009; 2:299-305
 92. Ley K, Gaethgens P. Endothelial not haemodynamic, differences are responsible for preferential leucocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ. Res.* 1991; 69:1034-1041
 93. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Hguchi M Minatoguchi S, Fujiara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovascular Res* 2006, 71:684-694
 94. Lillehei C, DeWall R. Direct vision intracardiac surgery in man using a simple, disposable artificial oxygenator. *Dis Chest* 1956, 29:1

95. Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE. Blood flow of the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observations. *Acta Physiol Scand* 1982; 114:121
96. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:473-479
97. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia , Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rhEpo pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006; 78:2255-2264
98. Mann FC; Priestley JT; Markowitz J. Transplantation of the intact mammalian heart. *Arch Surg* 1933; 26:219
99. Matas AJ, Kandaswamy R. The current role of calcineurin inhibitors in posttransplant immunosuppression? *Am J Transplant* 2006; 6:2827-2829
100. Matsuura A, Abe T, Yasuura K. Simplified mouse cervical heart transplantation using a cuff technique. *Transplantation* 1991; 51:896-898
101. McDonagh PF, Roberts DJ. Prevention of transc coronary macromolecular leakage after ischemia-reperfusion by the calcium entry blocker nisoldipine. Direct observations in isolated rat hearts. *Circ Res.* 1986; 58(1):127-36
102. Mehlhorn U, Geissler HJ, Laine GA, Allen SJ. Myocardial fluid balance. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 20:1220-1230
103. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263:1901-1906
104. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993; 14:519-22
105. Menger MD, Vollmar B. Role of Microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000; 7:291-306

106. Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Thorlacius H, Rucker M. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388:281-290
107. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury as the Basis for novel Preventiv Strategies: Is it time for pleiotropic Compounds? *Transplantation Proceedings* 2007; 39:485-488
108. Michel P, Vial R, Rodriguez C, Ferrera R. A comparative study of the most widely used solutions for cardiac graft preservation during hypothermia. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21:1030-1039
109. Millán J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 2006; 8:113-123
110. Millington TM, Madsen JC. Innate immunity in heart transplantation. *Curr Opin* 2009; 14:571-576
111. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005; 100:179-190
112. Mueller XM. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:354-71
113. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia –reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88:581-609
114. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal L, Thompson R, Petrofski J, Matsumoto A, Stamler J, Koch WJ. Cardioprotective effects of Erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J biological chemistry* 2004; 279:20655-20662

115. Puhl G, Schaser KD, Pust D, Köhler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U. The delay of rearterialization after initial portal reperfusion in living donor liver transplantation significantly determines the development of microvascular graft dysfunction. *J Hepatol* 2004; 41:299-306
116. Puhl G, Schaser KD, Pust D, Köhler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11:555-563
117. Raud J. Intravital microscopic studies on acute mast cell dependent inflammation. *Acta physiol Scand Suppl* 1989; 578:1-58
118. Reffelmann T, Kloner R. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2006; 101:359-372
119. Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, Pittet B, Harder Y. Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann Surg* 2008; 248: 919-929
120. Rippe C, Rippe A, Larsson A, Asgeirsson D, Rippe B. Nature of glomerular capillary permeability changes following acute renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291:1362-1368
121. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of the myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983; 67:1016-1023
122. Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood outflow. *Circ Res* 1967; 21:163
123. Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, Kvietys PR. Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 2001; 281: 440-447

124. Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys P. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005; 65:719-727
125. Rusnak JM, Kopecky SL, Clements IP et al. An anti-CD11/CD18 monoclonal antibody in patients with acute myocardial infarction having percutaneous transluminal coronary angioplasty (the FESTIVAL study). *Am J Cardiol* 2001; 88:482-487
126. Samsamshariat SA, Samsamshariat ZA, Movahed MR. A novel method for safe and accurate left anterior descending coronary artery ligation for research in rats. *Cardiovasc Revasc Med* 2005; 6:121-123
127. Schleimer RP. An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 45:3-7
128. Schmeding M, Rademacher S, Boas-Knoop S, Roecken C, Lendeckel U, Neuhaus P, Neumann UP. rHuEPo reduces ischemia-reperfusion injury and improves survival after transplantation of fatty livers in rats. *Transplantation* 2010 27; 89:161-168
129. Schramm R, Schaefer T, Menger MD, Thorlacijs H. Acute mast cell-dependent neutrophil recruitment in the skin is mediated by KC and LFA-1: inhibitory mechanisms of dexamethasone. *J Leukoc Biol.* 2002 Dec; 72:1122-1132
130. Schramm R, Thorlacijs H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm Res* 2004; 82:226-236
131. Schramm R, Schäfers HJ, Harder Y, Schmits R, Thorlacijs H, Menger MD. The cervical lymph node preparation: a novel approach to study lymphocyte homing by intravital microscopy. *Inflamm Res* 2006(a); 55:160-167
132. Schramm R, Schäfers HJ, Hamacher J, Menger MD. Simplified technique for heterotopic vascularized heart transplantation in mice. *Microsurgery* 2006(b); 26:212-213

133. Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schäfers HJ. The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007(a); 134:210-217
134. Schramm R, Menger MD, Schmits R, Harder Y, Kirsch S, Meier C, Schäfers HJ. Role of PECAM-1 in acute rejection of fully major histocompatibility complex class II-mismatched cardiac allografts in mice. *Transplantation* 2007(b); 84:555-558
135. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via up-regulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:1481-1488
136. Sebening F, Klinner W, Meisner H, Schmidt-Habelmann P, Struck E, Spelsberg F. Bericht über die Transplantation eines menschlichen Herzens. *Dt Med Wschr* 1969; 94:883-889
137. Shimizu K, Aikawa M, Takayama K, Libby P, Mitchell RN. Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation* 2003; 108:2113-2120
138. Simpson PJ, Todd RF 3rd, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988; 81:624-629
139. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:2-8
140. Smith EF, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, Griswold DE. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255:1060-1068
141. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood* 1993; 81:2827-2843

142. Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B. Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *Faseb J* 2009; 23:3049-3058
143. Southard JH, Belzer FO: Organ preservation. *Annu Rev Med* 1995; 46:235
144. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol* 2001; 133:406-412
145. Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci. Res.* 2002; 44:391-403
146. Tanaka M, Brooks SE, Richard VJ. Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993; 87:526-535
147. Tannebaum S, Oertel H, Henderson W, Kaliner M. The biological activity of mast cell granules I. Elicitation of inflammatory responses in rat skin. *J Immunol* 1980; 125: 325-335
148. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005; 56:23-46
149. Tedder TF, Steeber DA, Chem A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9:866-873
150. Tillmanns H, Neumann FJ, Tiefenbacher C, Dorigo O, Parekh N, Waas W, Zimmermann R, Steinhausen M, Kuebler W. Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J* 1993; 14:82-86
151. Tomita Y, Zhang QW, Yoshikawa M, Uchida T, Nomoto K, Yasui H. Improved technique of heterotopic cervical heart transplantation in mice. *Transplantation.* 1997; 64:1598-1601

152. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers RJ, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308:990-994
153. Van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus H, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularisation and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:125-133
154. Ventura HO, Mehra MR, Smart FW, Stapleton DD. Cardiac allograft vasculopathy: current concepts. *Am Heart J* 1995; 129:791-799
155. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:481-497
156. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994; 145:1421-1431
157. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leucocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117:195-200
158. Von Bubnoff D, Novak N, Kraft S, Bieber T. The central role of FcεpsilonRI in allergy. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:184-187
159. Wang N, Lu JG, He XL, Li N, Qiao Q, Yin JK, Ma QJ. Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation. *Hepatol Res* 2009; 39:382-90
160. Wang Y, Zhang ZG, Rhodes K, Renzi M, Zhang RL, Kapke A, Lu M, Pool C, Heavner G, Chopp M. Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 2007; 151:1377-1384

161. Webster MH, Patterson J. The photoelectric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976; 29:182
162. Wershil BK, Murakami T, Galli SJ, Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. Mast cells are required for the full expression of the cutaneous acute inflammation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Immunol* 1988; 140: 2356-2360
163. Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, van der Harst P, Oeseburg H, Du Marchie Sarvaas GJ, Koster J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial growth factor mediated neovascularisation. *Eur Heart J* 2007; 28:2018-2027
164. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for rhEpo during ischemia-reperfusion injury. *Faseb* 2004; 18:1031-1033
165. Wu H. Inactivation of Erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1991; 126:3597- 3605
166. Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, Zheng X, Jing H. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006; 29:902-907
167. Xiu D, Uchida H, To H, Sugimoto K, Kasahara K, Nagai H, Fujimura A, Kobayashi E. Simplified method of heterotopic rat heart transplantation using the cuff technique: application to sublethal dose protocol of methotrexate on allograft survival. *Microsurgery* 2001; 21:16-21
168. Yamauchi J, Vollmar B, Menger MD. The role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 1999; 16:400
169. Yonekura S, Chern Y, Donahue KA, Feldmann L, Vanasse GJ, Sytkowski AJ. Erythropoietin receptors induced by dimethylsulfoxid exhibit positive cooperativity associated with an amplified biologic response. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2535-2539

170. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res* 2000; 94:1-12

7. Publikationen

1. Schramm R, **Kirsch S**, Schäfers HJ, Langer F, Scheuer C, Nickels R, Harder Y, Menger MD. Erythropoietin inhibits postischemic leukocyte adhesion, but does not affect rejection in murine cardiac allografts. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2010; 29:1185-1192
2. Schramm R, Menger MD, **Kirsch S**, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schäfers HJ. The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:210-217
3. Schramm R, Menger MD, Schmits R, Harder Y, **Kirsch S**, Meier C, Schäfers HJ. Role of PECAM-1 in acute rejection of fully major histocompatibility complex class II-mismatched cardiac allografts in mice. *Transplantation* 2007; 84:555-558

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben, bedanken. Vielen Dank für das angenehme Arbeitsklima und die nötigen Voraussetzungen für ein problemloses Arbeiten.

Großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. René Schramm für seine unermüdliche Geduld, seine Unterstützung in allen Bereichen und für die aufbauenden Worte, wenn sie nötig waren. Mit seinem Rat und seiner Hilfe sorgte er konsequent dafür, dass ich am Ball blieb. Ich genoss eine exzellente Betreuung und in vielen hilfreichen Gesprächen wurden meine Fragen und Probleme bezüglich der Arbeit jederzeit ausführlich diskutiert.

Herrn Prof. Dr. Menger danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seinem Institut unter diesen angenehmen Bedingungen tätig gewesen sein zu dürfen.

Weiterhin möchte ich mich für die große Hilfe in technischen Fragen bei Frau Janine Becker, Frau Elisabeth Gluding, Frau Claudia Scheuer und Frau Ruth Nickels bedanken.

Für die zahlreichen interessanten Diskussionen, die moralische Unterstützung und insbesondere für ihre Freundschaft gilt mein Dank Frau Annick Bächle, Frau Christina Körbel und Frau Christine Wittig.

Meinen Eltern danke ich für Ihr ausgesprochenes Interesse, Ihre Unterstützung -nicht nur während der Dissertation- und dafür, dass sie mir das Studium ermöglichten.