

J. Rustemeyer¹, U. Dicke²,
A. Bremerich¹

Bivalentes Wirkungsspektrum von FK 506 (Tacrolimus): Low Dose FK 506- Applikation (0,1 mg/KG) mit hoher neurotropher Wirkung bei der allogenen Nervenrekonstruktion am Tiermodell der Ratte

Hintergrund: Die Entwicklung von Nervenrekonstruktionsverfahren als Alternative zum bisherigen Standardverfahren der autologen Nervenrekonstruktion steht derzeit im Mittelpunkt der klinischen Forschung zur Nervenregeneration. Trotz der neuroregenerativen Wirkung des Immunsuppressivums FK 506 können die bisher erfolgreich eingesetzten hohen Dosierungen aufgrund der Nebenwirkungen nicht den klinischen Einsatz rechtfertigen. Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es daher, die neurotrophe Wirksamkeit von FK 506 bei einer allogenen Nervenrekonstruktion (Allograft) mit einer möglichst geringen Dosierung von FK 506 mit dem Standardverfahren zu vergleichen, um deren Wertigkeit hinsichtlich einer Nervenregeneration einschätzen zu können.

Material und Methode: Bei zwei Rattenstämmen (LEW und DA) erfolgte nach Entnahme eines 1,5 cm langen Segmentes des N. ischiadicus die Nervenrekonstruktion mittels Nervenrekonstruktat. Die Nervenrekonstruktion beinhaltete die Nervenrekonstruktion zwischen Tieren eines Stammes (Isograft, n=8) und zwischen beiden Stämmen unter FK 506-Applikation (Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG), n=8). Zur Beurteilung einer funktionellen Nervenregeneration wurden nach 4, 8, 12 und 16 Wochen Walking Track-Analysen mit Bestimmung des Sciatic Functional Index (SFI) und des Ankle Stance Angle (ASA) durchgeführt. Die histomorphometrische Auswertung der transversalen Nervenschnitte der experimentellen Seite und entsprechende Nervenschnitte der nicht-operierten Seite erfolgten nach 16 Wochen als Myelinisierungsgrad. Die erhobenen Daten von unbehandelten Tieren (n=8) dienten als Referenz.

Ergebnisse: In allen Tierversuchsgruppen kam es histomorphologisch zu einer Nervenregeneration. Die beste histomorphologische und funktionelle Nervenregeneration stellte sich in den Tierversuchsgruppen Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) ein. In dieser Versuchsgruppe zeigten die histomorphologischen Parameter und beide funktionellen Parameter eine signifikant bessere Nervenregeneration als in der Isograft-Gruppe. Histomorphologisch fanden sich nur in der Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Tieren.

Schlussfolgerung: Bei der minimaltherapeutischen Dosierung von FK 506 zeigt sich ein deutlicher neuroregenerativer Effekt auf Allograft-Nervenrekonstruktate. Dadurch besteht im Hinblick auf einen klinischen Einsatz die Möglichkeit, unter dieser Dosierung die Nebenwirkungen gering zu halten bei einer hohen Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Nervenregeneration.

Schlüsselwörter:

FK 506, Nervenrekonstruktion, Nervenrekonstruktion, Isograft, Allograft

¹Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen, Spezielle Schmerztherapie, Klinikum Bremen-Mitte, Bremen

²Institut für Hirnforschung, Abteilung für Verhaltensphysiologie und Entwicklungsneurobiologie, Universität Bremen

Bimodal Activity of FK 506 (Tacrolimus): Low Dose FK 506-Application (0,1 mg/KG) with High Neurotrophic Effectiveness on Allogeneous Nerve Transplants in Rats

Aim/Background: The development of nerve reconstruction procedures as an alternative to the present standard procedure of an autologous nerve transplantation is nowadays the focus of interest in clinical research of neural regeneration. Despite of the neuro-regenerative effect of the immunosuppressive drug FK 506, the high doses used successfully up to now cannot justify the clinical application for neural regeneration with regard to the side effects. Hence, the aim of this animal experimental study was to compare the neurotrophic effectiveness of a low dose FK 506 treatment on allogeneous nerve transplants (allograft) with outcomes of autologous nerve transplants (isograft) to be able to estimate the valency concerning neural regeneration.

Material/Methods: The left sciatic nerve of rats of two strains (LEW and DA) was harvested at a distance of 1,5 cm. Nerve reconstruction consisted of nerve transplants between rats of the same strain (Isograft n=8) and between both strains (Allograft n=8) with FK 506-application (0,1 mg/KG). 8 rats underwent no operation and were served as an untreated control group. For the appraisal of a functional neural regeneration analyses, the Sciatic Functional Index (SFI) and the Ankle Stance Angle (ASA) were carried out after 4, 8, 12 and 16 weeks post operationem. The histomorphometric evaluation consisted of the density of Myelin Basic Proteine (MBP) in immunohistochemically stained transversal semi-thin sections of the nerves of the experimental sides and of the non-operated sides after 16 weeks. Data of untreated animals served as references.

Results: In all experimental groups neural regeneration occurred. Superior histomorphometric and functional outcomes were seen in the group Allograft plus FK 506 (0.1 mg / kg). In this group the histomorphometric parameter and both functional parameters showed a significantly better nerve regeneration than in the Isograft group. Only in the group Allograft plus FK 506 (0.1 mg / kg) no significant differences to untreated animals were found histomorphometrically.

Conclusion: With low dose of FK 506 a clear neuro-regenerative effect on Allograft nerve grafts appeared. Thereby it is possible to keep the side effects low with a high effectiveness of neural regeneration with regard to a clinical application.

Key words:

FK 506, nerve transplantation, nerve reconstruction, isograft, allograft

Einleitung

Schwere Verletzungen peripherer Nerven erfordern eine möglichst rasche chirurgische Kontinuitätswiederherstellung. Bei Verlust von Nervengewebe oder bei ausgedehnten Weichgewebsmazerationen wird eine Defektüberbrückung zwischen Nerventümpfen notwendig. Das Standardverfahren hierzu

stellt derzeit die autologe (Isograft-) Nerven transplantation dar, bei dem ein Nerveninterponat von anderen Körperregionen des Patienten gewonnen wird und zur Kontinuitätswiederherstellung an den entsprechenden Nerventümpfen adaptiert wird. Die Erfolge dieser Verfahrenstechnik sind allerdings ernüchternd und mit den Nachteilen verbunden, dass einerseits ein gesunder

Nerv des Patienten geopfert werden muss und andererseits Komplikationen an der Hebestelle entstehen können. Des Weiteren bestehen häufig Unterschiede im Durchmesser und in der Beschaffenheit zwischen Nerven transplanteden und den zu rekonstruierenden Nerven, welche zu Misserfolgen führen können (1, 2). Wegen dieser Nachteile und aufgrund der Tatsache, dass das Angebot an geeigneten Isografts begrenzt ist, erscheinen allogene Transplantate (Allograft) eine viel versprechende Alternative darzustellen. Allerdings würde dieses Verfahren eine immunsuppressive Therapie erfordern, um Abstoßungsreaktionen kontrollieren zu können. In diesem Zusammenhang erscheint es durchaus fragwürdig, ob eine lang andauernde und hochdosierte immunsuppressive Therapie bei einer nicht vitalen Indikation, wie sie bei der Rekonstruktion peripherer Nerven vorliegt, aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen indiziert und ethisch zu vertreten ist (3, 4).

Dennoch ist sowohl für die Grundlagenforschung zur peripheren Nervenregeneration als auch für klinische Studien FK 506 (Tacrolimus) von großem Interesse (5, 6, 7, 8). Das bivalente Wirkungsspektrum, einerseits Immunsuppression und andererseits Neuroregeneration, führt in tierexperimentellen Studien und in klinischen Einzelfalldarstellungen zu einer besseren und schnelleren Nervenregeneration von allogenen Nerven transplanteden im Vergleich zu autologen Transplantaten (9, 10). Allerdings wurden in diesen Studien hohe Dosierungen von FK 506 bis zu 10 mg/KG/d zur Erzielung eines neuroregenerativen Effektes eingesetzt, welche für einen breiten klinischen Einsatz nicht geeignet erscheinen (11, 12). Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es daher, die neurotrophe Wirksamkeit einer deutlich niedrigeren „Low-Dose“ Dosierung (0,1 mg/KG/d) von FK 506 nach einer allogenen Nerven transplantation (Allograft) zu untersuchen und mit den Regenerationserfolgen von autologen Transplantaten (Isograft) zu vergleichen.

Material und Methode

Versuchstiere

Für den tierexperimentellen Teil dieser Studie wurden insgesamt 24 adulte

männliche Ratten (Lewis (LEW/HanHsd) (n = 12) und Sprague Dawley (DA/OlaHsd) (n = 12)) im Alter von 12 Wochen und mit einem durchschnittlichen Gewicht von 140 g verwendet. Die Auswahl der Tierstämme erfolgte hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendung einer Allograft-Nerven- transplantation. Deshalb wurden zwei Rattenstämme gewählt, welche hinsichtlich des dem humanen MHC analogen RT1- Komplexes identisch waren und lediglich eine mögliche Variabilität in einem von vier Haplotypen des RT1- Komplexes (RT1. C) aufwiesen (13). Nach Nierentransplantationen zwischen diesen beiden Stämmen wird über eine Überlebenszeit der transplantierten Nieren von mehr als 100 Tagen ohne Immunsuppression berichtet, während Hauttransplantate in diesem Zeitraum eine massive Abstoßungsreaktion aufweisen sollen (14).

Die Tierversuche wurden von der Ethikkommission des Landes Bremen genehmigt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen in einem klimatisierten Raum mit konstanter Raumtemperatur (21°C), konstanter Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 Prozent und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Wasser und Futter waren frei zugänglich und standen ad libitum zur Verfügung. Die Ratten wurden präoperativ getrennt nach Stämmen in großen Nagerkäfigen, postoperativ für sieben Tage paarweise in Standard-Makrolon-Käfigen der Größe IV mit einer angereicherten Umwelt gehalten.

Tierversuchsgruppen und Operationen

Die Versuchstiere wurden für den experimentellen Teil zufällig drei gleich starken Gruppen zugeordnet. Gruppe I (LEW n=4, DA n=4) erhielt keine Nerven- transplantate und diente als unbehandelte (normale) Kontrollgruppe. Bei allen weiteren Versuchstieren wurden unter tiefer Narkose (Chloralhydrat intraperitoneal, 42 mg/100g) Nerven- transplantationen durchgeführt. Unter aseptischen Bedingungen wurde bei diesen Tieren (Gruppe II und III) nach Splitting des M. gluteus maximus der linke N. ischiadicus freipräpariert. Anschließend wurde der Nerv auf einer Länge von 15 mm, 3mm proximal seiner Trifurkation, entnommen. In der Tierversuchsgruppe II (LEW n=4, DA n=4) erfolgte die Nervenrekonstruktion

durch ein entsprechendes Nerven- transplantat von einem Tier desselben Stammes (Isograft), in Gruppe III (LEW n=4, DA n=4) durch ein Nerven- transplantat von einem Tier des jeweilig anderen Stammes (Allograft). Die gehobenen Nervensegmente wurden zwischen den proximalen und distalen Stümpfen des Empfängertieres platziert unter Beachtung der faszikulären und longitudinalen Orientierung. Die Nerven- anastomosen erfolgten mittels zwei oder drei 9-0 resorbierbaren perineuralen Nähten. Muskel- und Hautschichten wurden mit 3-0 resorbierbaren Einzelknopfnähten versorgt. Die kontralaterale Extremität blieb unbehandelt und diente als intraindividuelle Kontrolle (nicht operierte (Kontroll-) Seite). Tiere der Versuchsgruppe III (Allograft) erhielten täglich eine intramuskuläre Applikation von FK 506 (0,1 mg/KG/d, Astellas GmbH, München, Deutschland). Vor jeder Injektion wurden diese Tiere gewogen, um entsprechende Dosisanpassungen durchzuführen.

Messung der funktionellen Nervenregeneration

Die Bewertung einer funktionalen Nerven- regeneration wurde mit Hilfe von "Walking Track"-Aufzeichnungen mit Vermessung des „Ankle Stance Angle“ (ASA, 15) und mit Berechnung des „Sciatic Functional Index“ (SFI, 16) durchgeführt. Nach 4, 8, 12 und 16 Wochen post operationem wurden beide funktionellen Parameter von zwei unabhängigen Untersuchern doppel-blind erhoben. Die interindividuelle Korrelation der Untersucher betrug für den ASA 0,91 und für den SFI 0,94 als Zeichen einer hohen Reliabilität der Verfahren.

Um den SFI zu bestimmen, wurde ein offener Korridor (150 x 8 cm) mit weißem Papier ausgelegt. Die Fußsohlen der Hinterläufe der Versuchstiere wurden mit blauer Tinte bestrichen und die Tiere animiert den Korridor entlang zu laufen. Anhand der entstandenen Fuß- abdrücke konnte der SFI nach Ausmes- sung der einzelnen Parametern nach der Formel von De Medinaceli et al. (16) berechnet werden:

$$SFI = \left[\frac{ETOF - NTOF}{NTOF} + \frac{NPL - EPL}{EPL} + \frac{ETS - NTS}{NTS} + \frac{EIT - NIT}{NIT} \right] \times \frac{220}{4}$$

Erläuterung:

NTOF: Normal distance To Opposite Foot, ETOF: Experimental distance To Opposite Foot (Schrittlänge auf der nicht- (N) bzw. auf der operierten Seite (E)), NPL: Normal Print Length, EPL: Experimental Print Length (Länge des Fußabdruckes auf der nicht- (N) bzw. operierten Seite (E)), NTS: Normal Toe Spread ETS: Experimental Toe Spread (Abstand zwischen 1. und 5. Endphalanx auf der nicht- (N) bzw. operierten Seite (E)), NIT: Normal Intermediary Toe spread, EIT: Experimental Intermediary Toe spread (Abstand zwischen 2. und 4. Endphalanx auf der nicht- (N) bzw. auf der operierten Seite (E)), 220/4: Empirisch ermittelter, konstanter Faktor.

Ein SFI von 0 % deutet auf eine maximale Nervenregeneration hin, ein SFI von -100 % auf eine fehlende funktionelle Regeneration.

In einer zweiten Versuchsanordnung erfolgte die Bestimmung des ASA in der „Midstance Phase“ des Bewegungszyklus, in der Phase, in der das Versuchstier gerade die kontralaterale Extremität aufsetzen will und eine maximale Belastung der ipsilateralen Extremität durch das Körpergewicht vorliegt. Der ASA- Winkel wird gebildet zwischen einer Geraden vom Calcaneus zur Patella und einer Geraden vom Calcaneus zum Metatarsalknochen IV. Zur Bestimmung des ASA wurde eine digitale Video-Kamera in 1 Meter Abstand zum Walking Track-Korridor positioniert. Nach Aufzeichnung des gesamten Bewegungsablaufes des Tieres wurde ein Bild, welches eine typische „Midstance Phase“ zeigte, herausgeschnitten und zur Berechnung des ASA verwendet (Abb. 1).



Abb. 1: Eingezeichneter Ankle Stance Angle (ASA) in der "Midstance Phase" des Gangzyklus der Ratte

Histomorphometrische Messungen

Nach 16 Wochen wurden die Versuchstiere durch Applikation einer Letaldosis von Chloralhydrat geopfert. Die Nerven- und Transplantate der operierten Seiten wurden zusammen mit 3 mm angrenzenden proximalen und distalen Segmenten entnommen. Mit den Nerven der Kontrollextremitäten und von unbehandelten Tieren wurde entsprechend in gleicher Weise verfahren.

Die entnommenen Nerven wurden in Glutaraldehyd-Paraformaldehyd (3%) fixiert und in drei Teile geschnitten; entsprechend proximal und distal des Transplantates sowie median durch das Transplantat. Nach Einbettung in O.C.T.-Compounds und Herstellung von Semi-Dünnschnitten (0,4 µm) wurden diese mit primären polyklonalen Antikörpern (Rabbit Anti-Myelin Basic Protein; Chemicon International, Inc) und sekundären Antikörpern inkubiert (Goat-Anti-Rabbit (1:200), Vector Lab. Inc). Nach Zugabe eines Avidin-Biotin-Komplexes (ABC, Vector Lab. Inc.) und von Diaminobenzidin (DAB)-Lösung erfolgte die Reduktion des DAB durch H₂O₂. Der entstehende dunkle Fall-out erlaubte die spätere Quantifizierung des basischen Myelinproteins (MBP). Die Schnitte wurden anschließend durch eine Alkoholserie dehydriert und eingedeckelt.

Mit Hilfe einer digitalen Kamera wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung aufgenommen und eingescannt. Für die morphometrische Analyse des MBP wurden 100 x 100 µm Masken zufällig über die Schnittbilder gelegt und diese mit einer digitalen morphometrischen Analysesoftware verarbeitet (Matrox Inspector). Im Schwarz/weiß-Bildmodus konnte die Quantifizierung des MBP als Anzahl der schwarzen Pixel pro 100 x 100 µm Maske erfolgen und damit der Myelinisierungsgrad bestimmt werden.

Statistik

Zur statistischen Berechnung von signifikanten Unterschieden wurde der Mann-Whitney U-Test eingesetzt. Unterschiede oberhalb des 95%igen Vertrauensniveaus ($p < 0,05$) wurden als signifikant eingestuft. Korrelationskoeffizienten wurden durch die Pearson-Korrelation ermittelt bei Vorliegen ei-

ner Normalverteilung im Kolmogoroff-Smirnow-Test. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS for Windows (Version 14.0) durchgeführt.

Ergebnisse

Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Tierstämmen (LEW und DA) pro Gruppe bestanden nicht. Der durchschnittliche Anteil des MBP pro Gesichtsfeldmaske (Myelinisierungsgrad) von unbehandelten Tieren betrug $17,33 \pm 3,80$ % ohne signifikante Unterschiede zwischen den proximalen, medianen und distalen Schnitten. Der mittlere ASA unbehandelter Tiere lag bei $45,02 \pm 2,23^\circ$, der SFI bei $-3,22 \pm 9,95$ %. Alle funktionellen und morphometrischen Daten von operierten Tieren wurden in Relation gesetzt zu den Daten unbehandelter Tiere (100%). Die proximalen, medianen und distalen Nervenschnitte von der nicht-operierten (Kontroll-) Seite der Tiere der Gruppen II (Isograft) und III (Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG)) zeigten ebenso wie die transversalen Nervenschnitte unbehandelter Tiere keine signifikanten Unterschiede zueinander in den prozentualen Anteil des MBP pro Gesichtsfeldmaske.

Morphometrische Ergebnisse

Alle Nerven- und Transplantate waren bei Hebung der Nerven am Ende der Studie in continuitatem zu den proximalen und distalen Nervenstümpfen. Das Ergebnis der Quantifizierung des Myelinisierungsgrades variierte zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Der Myelinisierungsgrad in der Gruppe III (Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG)) war in allen transversalen Nervenschnitten ((Kontroll-) Seite, proximal, median und distal auf der operierten Seite) signifikant höher als in Gruppe II (Isograft, $p < 0,05$, Abb. 2). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich zwischen den Schnitten der (Kontroll-) Seite und den Schnitten der operierten Extremität in der Versuchsgruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG, Tab. 1)). In der Isograft-Gruppe fand sich nur in den proximalen Schnitten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu dem Myelinisierungsgrad der (Kontroll-) Seiten. Deutlich wurde der Erfolg der Nervenregeneration in der Versuchsgruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) auch im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die Myelinisierungsgrade in den proximalen und distalen Nervenschnitten sowie der Myelinisierungsgrad in den Schnitten der nicht-operierten (Kontroll-) Seiten ergaben keinen signifikanten Unterschied zu Nervenschnitten unbehandelter Tiere ($p > 0,05$). Nur der Myelinisierungsgrad in

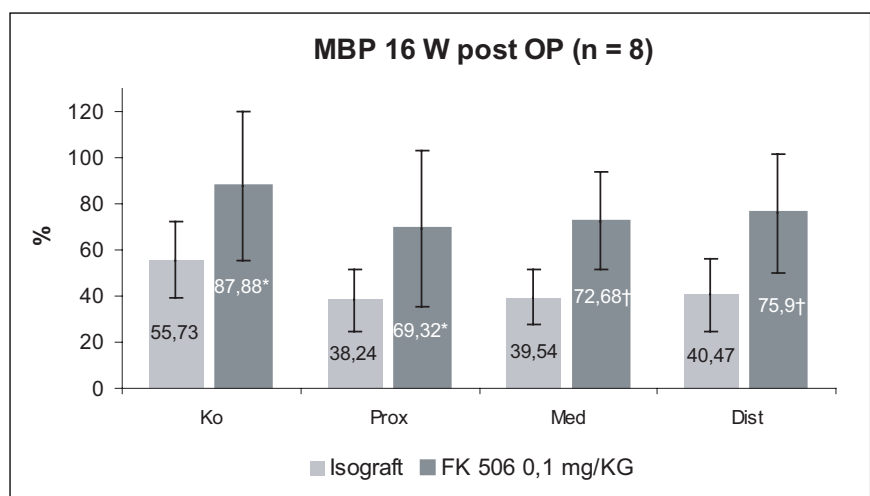


Abb. 2: Myelinisierungsgrad der Nervenschnitte für die Tierversuchsgruppen Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) und Isograft. Der Myelinisierungsgrad unbehandelter Tiere dient als Referenz (100 %). Ko: Nicht operierte (Kontroll-) Seite, Prox: Proximal des Nerven- und Transplantates, Med: Median durch das Nerven- und Transplantat, Dist: Distal des Nerven- und Transplantates.

* Signifikant zur Isograft-Gruppe für $p < 0,05$

† Signifikant zur Isograft-Gruppe für $p < 0,01$

Tab. 1: Signifikanzen in den Versuchsgruppen Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) und Isograft zwischen den transversalen Nervenschnitten der operierten Seiten (Prox, Med, Dist) zu den nicht operierten (Kontroll-) Seiten (Ko) und zu unbehandelten Tieren

Nervenschnitte	Signifikanz vs (Kontroll-) Seiten (Ko)		Signifikanz vs unbehandelten Tieren	
	Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG)	Isograft	Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG)	Isograft
Ko			0,921	<0,001†
Prox	0,13	0,028*	0,188	<0,001†
Med	0,13	0,083	0,041*	<0,001†
Dist	0,505	0,13	0,428	<0,001†

* signifikant $p < 0,05$; † signifikant $p < 0,01$

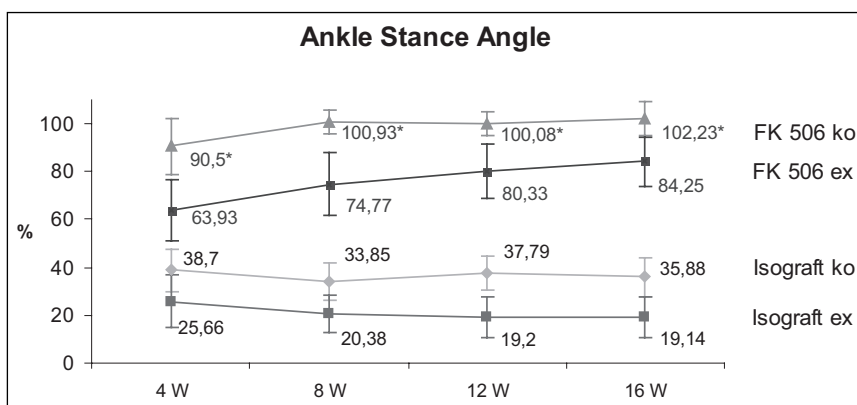


Abb. 3: Verlauf der Messungen des Ankle Stance Angle (ASA) von der 4. bis zur 16. Woche post operationem. Alle Messergebnisse der Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/Kg) sind signifikant höher als die Ergebnisse der Isograft-Gruppe ($p < 0,05$). Ko: Nicht operierte (Kontroll-) Seite, ex: Operierte Seite
* Kein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Tieren

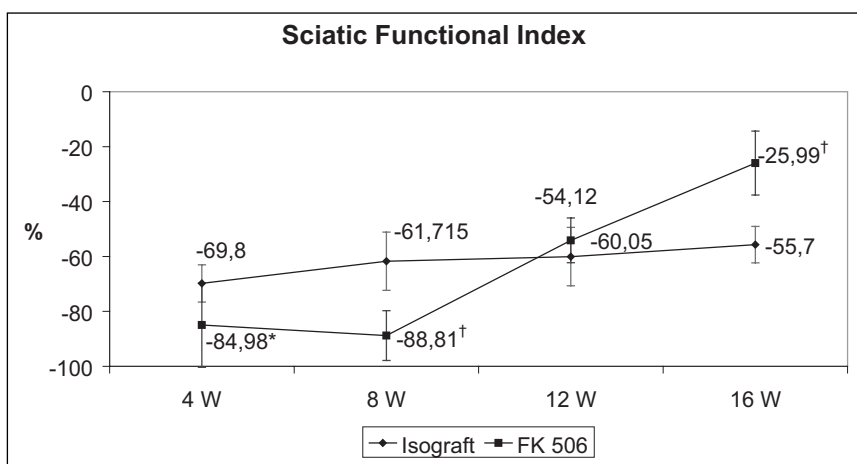


Abb. 4: Verlauf der Messungen des Sciatic Functional Index (SFI) von der 4. bis zur 16. Woche post operationem. Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/Kg) zeigt in der 16. Woche ein signifikant besseres Ergebnis als die Isograft-Gruppe.
* Signifikant zur Isograft-Gruppe für $p < 0,05$
† Signifikant zur Isograft-Gruppe für $p < 0,01$

den medianen Nervenschnitten war geringer ($p=0,041$). In der Isograft-Gruppe hingegen war der mittlere Myelinisierungsgrad aller Nervenschnitte sowohl der operierten als auch der nicht operierten (Kontroll-) Seiten signifikant niedriger im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($p < 0,01$).

Funktionelle Ergebnisse

Die Ergebnisse der ASA-Messungen zeigten eine signifikant bessere funktionelle Nervenregeneration in der Gruppe III (Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG)) als in der Versuchsgruppe II (Isograft, Abb. 3). Allerdings bestanden signifikante Unterschiede in der Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) auf der operierten Seite gegenüber unbehandelten Tieren während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Keine Unterschiede bestanden hingegen zwischen dem ASA der nicht-operierten Seiten dieser Versuchsgruppe und den Ergebnissen unbehandelter Tiere. Der SFI in der Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) zeigte bis zur 12. Woche einen signifikant niedrigeren Wert als Zeichen einer weniger guten Nervenregeneration im Vergleich zur Isograft-Gruppe. Nach 16 Wochen hingegen war der SFI der Gruppe Allograft plus FK 506 (0,1 mg/KG) signifikant höher entsprechend einer besseren funktionellen Nervenregeneration als in der Isograft-Gruppe, ohne jedoch das Ergebnis von unbehandelten Tieren zu erreichen (Abb. 4).

Korrelationen zwischen den Parametern

Funktionelle und morphometrische Parameter korrelierten in unserer Studie. Insbesondere fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den Myelinisierungsgraden medianer Schnitte und dem ASA (Korrelationskoeffizient (r): ASA operierte Seite 0,532, $p=0,034$, r: nicht operierte Seite 0,971, $p < 0,001$) und zu dem SFI (r: 0,704, $p=0,02$).

Diskussion

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass eine "Low Dose" Applikation von FK 506 eine periphere Nervenregeneration nach allogener Nerventrans-

plantation bewirkt. Unter der Dosis von 0,1 mg/KG/d waren im Mittel drei von vier ausgewertete Nervenschnitte pro Versuchstier nicht signifikant unterschiedlich zu der Normalgruppe unbehandelter, nicht-operierter Tiere. Die funktionellen Parameter der Versuchsgruppe Allograft plus 0,1 mg/KG/d erreichten 84,25 % des ASA und -25,99 % des SFI der Normalgruppe nach 16 Wochen. Nicht nur die mit Nerventransplantaten versorgten Extremitäten in der Gruppe Allograft plus FK 506 zeigten eine bessere Nervenregeneration als in der Isograft-Gruppe, sondern auch die nicht operierten (Kontroll-) Seiten. Insbesondere die signifikanten Korrelationen zwischen morphometrischen und funktionellen Parametern spiegeln den Einfluss einer erfolgreichen Nervenregeneration der operierten Seite auf die nicht-operierte (Kontroll-) Seite wider. Seit Gold et al. (18) zeigen konnten, dass die neuroregenerative Wirkung von FK 506 unabhängig von dem eine Immunsuppression vermittelnden FK-Bindungsprotein-12 (FKBP-12) eintritt, sondern von einem anderen Immophilin, FK-Bindungsprotein-52 (FKBP-52), abhängig ist, konnte in verschiedenen Studien ein Wachstum von Neuriten nach lokaler Applikation von FK 506 über eine gesteigerte Expression des „Nerve Growth Factor“ erreicht werden (17). Während die lokale Applikation von FK 506 nachweislich zu einer Nervenregeneration in vitro führen kann, ist diese Applikationsweise nach In-vivo-Nerventransplantationen genauso wie das kontinuierliche Aufbringen von neuronalen Wachstumsfaktoren nur schwer umsetzbar. In klinischer Anlehnung an die Dosierungen von FK 506 als Immunsuppressivum nach Lebertransplantationen bei Menschen (0,2 – 0,3 mg/KG/d) zeigen unsere Ergebnisse, dass eine intramuskuläre Applikation in einer niedrigeren Dosierung von 0,1 mg/KG/d im Tierversuch zu dem therapeutischen Effekt einer Nervenregeneration führt. Damit konnte eine auch in dieser Dosierung vorliegende systemische Wirksamkeit hinsichtlich einer Nervenregeneration gezeigt werden. Insbesondere dieser Punkt ist für einen möglichen klinischen Einsatz von FK 506 zur Nervenregeneration von großer Bedeutung, denn die in dieser Studie eingesetzte Dosierung von FK 506 bleibt deutlich unter den bisher in der Literatur als optimal angesehenen Dosierungen. Udina et al. (11) und

Wang et al. (12) fanden eine Dosis von FK 506 mit einer optimalen neuroregenerativen Wirkung von 5 mg/KG. Interessanterweise berichteten Udina et al. (19) aber in einer weiteren Arbeit über ein konzentrationsabhängiges Wirkungsspektrum von FK 506. Nach einer standardisierten Kompression des N. ischiadicus am Tiermodell der Maus zeigten sich signifikante axonale Regenerationsraten in der Dosierung von 0,2 mg/KG, 2 mg/KG und 5 mg/KG, während sich in Gruppen mit der Dosierung von 0,5 mg/KG, 1 mg/KG und 10 mg/KG keine Unterschiede zu Tieren ohne FK 506-Applikation zeigte. Basierend auf den doppelten Peak einer neuroregenerativen Antwort ($\leq 0,2$ mg/KG und $\geq 2 \leq 5$ mg /KG) müssen mindestens zwei neuroregenerative Mechanismen durch unterschiedliche Konzentrationen von FK 506 auslösbar sein. Nach einer Hypothese von Udina et al. (19) und nach Studienergebnissen von Yang et al. (9) kann eine niedrige Dosierung von FK 506 eine Aktivierung des Immunophilins FKBP-52 hervorrufen, ohne dass eine Immunsuppression vermittelnde FKBP-12 vollständig zu aktivieren. Mit einer ansteigenden Dosis jedoch könnte es zu einer höheren Bindungsaffinität von FK 506 zu FKBP-12 und einer niedrigeren zu FKBP-52 kommen. Die Wirkung wäre damit eine höhere immunsuppressive und eine reduzierte neuroregenerative Wirkung. Eine weitere Steigerung der Dosierung von FK 506 hätte zur Folge, dass sowohl FKBP-12 als auch FKBP-52 gleichermaßen aktiviert und damit beide Wirkungsspektren abgedeckt würden. Eine konzentrationsabhängige Affinität von FK 506 zu den Bindungsproteinen wurde bereits ebenfalls von Gold et al. (18) beschrieben, ohne jedoch hieraus exakte Folgerungen hinsichtlich des Wirkungsspektrums zu erlangen. Ein weiterer Faktor, welcher die Affinität von FK 506 zu den Bindungsproteinen beeinflussen kann, stellt möglicherweise auch eine hohe Antigenität des Nerventransplantates selbst dar (20), indem eine beginnende Abstoßungsreaktion zu einer höheren Affinität des FK 506 zu dem eine Immunsuppression vermittelnden FKBP-12 führen kann. Unsere Ergebnisse unterstreichen daher auch die Bedeutung des experimentellen Aufbaus der Tierversuche, indem Transplantationsantigene zwischen den verwendeten Tierstämmen größtenteils übereinstimmen und damit eine im-

munsuppressive Wirkung gegenüber einer neuroregenerativen Wirkung von FK 506 in den Hintergrund treten konnte. Dennoch ist eine, wenn auch gering ausgeprägte Abstoßungsreaktion notwendig. Dadurch werden während der ersten Wochen nach Transplantation allogene Schwann'sche Zellen zerstört, dabei aber die Struktur des Nerventransplantates erhalten. Im weiteren Verlauf sollen die azellulären Nerventransplantate durch körpereigene Schwann'sche Zellen, welche vom proximalen und distalen Nervent stumpf emigrieren, ersetzt werden (7, 12). Entsprechend hierzu kam es auch in unserer Studie bis zur 12. Woche post operationem zu keiner signifikanten funktionellen Nervenregeneration. Erst in der 16. Woche post operationem stellte sich sowohl morphometrisch als auch funktionell eine deutliche Nervenregeneration ein.

Die von einigen Arbeitsgruppen angewandten hohen Dosierungen von FK 506 über ein langes Zeitintervall zur Steigerung einer Nervenregeneration ist für klinische Bereiche wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen nicht zu rechtfertigen (6, 12, 18). Die Wirksamkeit einer „Low Dose“ FK 506-Dosierung konnte in dieser Studie gezeigt werden, sodass der Einsatz von hohen Dosierungen nicht mehr für eine neuroregenerative Antwort erforderlich erscheint. Offen bleibt die Frage nach der notwendigen Dauer der FK 506-Applikation. In einigen Studien zeigte sich nach Absetzen oder Ausschleichen von FK 506 ein funktioneller Verlust und ein Abfall von morphometrischen Parametern einer nachgewiesenen Nervenregeneration (12, 21). Nach den Ergebnissen unserer Studie sollte eine FK 506-Applikation für mindestens 16 Wochen bestehen bleiben. Um den genauen Zeitraum für eine mögliche Aussetzung der FK 506-Therapie zu ermitteln, ohne Defizite in der Qualität einer Nervenregeneration in Kauf nehmen zu müssen, werden weitere Studien erforderlich sein.

Literatur

1. Oritguela ME, Wood MB, Cahill DR (1987) Anatomy of the sural nerve complex. *J Hand Surg* 12: 1119-1123
2. Rappaport WD, Valente J, Hunter GC (1993) Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg* 166: 252-256

3. Neuhaus P, McMaster P, Calne R et al. (1994) Neurological complications in the European multicentre study of FK 506 and cyclosporin in primary liver transplantation. *Transpl Int* 7: 27-31
4. Rifai K, Klemptner J, Manns MP, Trassburg CP (2006) Sudden hearing loss associated with high levels of calcineurin inhibitors after liver transplantation. *Transplantationsmedizin* 18: 33-35
5. Lassner F, Schaller E, Steinhoff G, Wonigeit K, Walter GF, Berger A (1989) Cellular mechanisms of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation* 48: 386-392
6. Wang J, Liu X, Zhu J, Li W, Xiang J (2002) Study in vitro of populating autogenous Schwann cells into chemical extracted allogeneous nerve. *Chin J Traumatol* 5: 326-328
7. Katsube K, Doi K, Fukumoto T, Fujikura Y, Shigetomi M, Kawai S (1998) Successful nerve regeneration and persistence of donor cells after a limited course of immunosuppression in rat peripheral nerve allografts. *Transplantation* 66: 772-777
8. Hontanilla B, Auba C, Arcocha J, Gorria O (2006) Nerve regeneration through nerve autografts and cold preserved allografts using tacrolimus (FK 506) in a facial paralysis model: a topographical and neurophysiological study in monkeys. *Neurosurgery* 58: 768-779
9. Yang RK, Lowe JB, Sobol JB, Sen SK, Hunter DA, Mackinnon SE (2003) Dose-dependent effects of FK 506 on regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 112: 1832-1840
10. Martin D, Pinsolle V, Merville P, Moreau K, Pelissier P, Baudet J (2005) First case in the world of autograft transplantation of a limb associated with oral administration of an immunosuppressant agent (FK 506-Tacrolimus). *Ann Chir Plast Esthet* 50: 257-263
11. Wang MS, Zeleney-Pooley M, Gold BG (1997) Comparative dose-dependent study of FK506 and cyclosporine A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1084-1093
12. Udina E, Gold BG, Navarro X (2004) Comparison of continuous and discontinuous FK506 Administration on autograft or allograft repair of sciatic nerve resection. *Muscle Nerve* 29: 812-822
13. Günther E, Walter L (2001) The major histocompatibility complex of the rat (*rattus norvegicus*). *Immunogenetics*: 520-542
14. Stark O, Kun HW, Gill TJ 3rd (1979) Comparison of the haplotypes of the major histocompatibility complex in the rat. IV. The six original Ag-B haplotypes. *J Immunogenet* 6: 115-127
15. Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenaq S (1996) Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *J Reconstr Microsurg* 12: 173-177
16. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77: 634-643
17. Lyons WE, George EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH (1994) Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia; *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3191-3195
18. Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS (1999) Immunosuppressant FK 506-Binding Protein 12 (not FK 506-Binding Protein 1) mediates the neurotrophic action of FK 506. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1202-1210
19. Udina E, Ceballos D, Verdu E, Gold BG, Navarro X (2002) Bimodal Dose-dependence of FK 506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. *Muscle Nerve* 26: 348-355
20. Hebebrand D, Zohman G, Jones NF (1997) Nerve xenograft transplantation. Immunosuppression with FK-506 and RS-61443. *J Hand Surg* 22: 304-307
21. Gold BG, Gordon HS, Wang MS (1999) Efficacy of delayed or discontinuous FK 506 administration on nerve regeneration in the rat sciatic nerve crush model: lack of evidence for a conditioning lesion-like effect. *Neurosci Lett* 267: 33-36

Dr. Dr. Jan Rustemeyer
Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie
Plastische Operationen,
Spezielle Schmerztherapie
Klinikum Bremen-Mitte
28177 Bremen
E-Mail: janrustem@t-online.de

Karsten Conrad, Werner Schöbler, Falk Hiepe, Marvin J. Fritzler

Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases A Diagnostic Reference

2. Edition 2007

Autoantibodies are a very heterogeneous group of antibodies with respect to their specificity, induction, effects, and clinical significance. Testing for autoantibodies can be helpful or necessary for the diagnosis, differential diagnosis, prognostication, or monitoring of autoimmune diseases. In case of limited (forme fruste) disease or a single disease manifestation, the detection of serum autoantibodies can play an important role in raising the suspicion of evolving disease and forecasting prognosis. This book and reference guide is intended to assist the physician in understanding and interpreting the variety of autoantibodies that are being used as diagnostic and prognostic tools for patients with systemic rheumatic diseases. Autoantibodies observed in systemic autoimmune diseases are described in alphabetical order in Part 1 of this reference guide. In Part 2, systemic autoimmune disorders as well as symptoms that indicate the possible presence of an autoimmune disease are listed. Systemic manifestations of organ-specific autoimmune diseases will not be covered in this volume. Guide marks were inserted to ensure fast and easy cross-reference between symptoms, a given autoimmune disease and associated autoantibodies. Although the landscape of autoantibody testing continues to change, this information will be a useful and valuable reference for many years to come.

300 pages, ISBN 978-3-89967-420-0, Price: 40,- Euro

PABST SCIENCE PUBLISHERS

Eichengrund 28, 49525 Lengerich, Tel. ++ 49 (0) 5484-308, Fax ++ 49 (0) 5484-550,

E-Mail: pabst.publishers@t-online.de

Internet: www.pabst-publishers.de / www.transplantation.de