

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor Antikörper
zur Verminderung der inflammatorischen Immunantwort sowie des assoziierten
Ischämie-/Reperfusionsschadens nach Nierentransplantation in einem Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité –Universitätsmedizin Berlin

von

Fabian Beiglböck
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

Diese Arbeit ist meiner Familie und meinem verstorbenen
Vater Dr. med. Volker Beiglböck gewidmet

Schlagwörter: Hirntod, Nierentransplantation, IL-6, akute- und chronische Abstoßung

Abstract

Der Hirntod des Spenders und die konsekutive generalisierte massive IL-6 Produktion und Sezernierung beeinflussen maßgeblich die Immunogenität des Spenderorgans, verstärken den Ischämie-/Reperfusionsschaden und führen in der Folge vermehrt zu akuten Abstoßungen, einer reduzierten initialen Transplantatfunktion und einer beeinträchtigten Langzeitfunktion des Transplantats. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer einmaligen Vorbehandlung des hirntoten Spenders (BD) mit einem monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor Antikörper (IL-6R mAb) auf die frühe und späte Immunantwort des Empfängers und den Ischämie/Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation (NTx) in einem Rattenmodell untersucht. Es wurden Nieren hirntoter (BD) und lebender (LD) F-344-Spenderratten in Lewis-Empfängerratten transplantiert. Der Hirntod wurde im Spender 6 Stunden (h) vor der Organentnahme und Transplantation induziert. BD und LD Spenderratten wurden 1 h nach Hirntodinduktion mit anti-IL-6R/CD126 mAb behandelt. Empfänger von Transplantaten unbehandelter Spender dienten als Kontrollen. Um den Effekt einer Spendervorbehandlung zu überprüfen, wurden zu den Zeitpunkten 18 h, 7 Tage und 5 Monate nach Transplantation Genexpressionsanalysen (RT-TaqMan-PCR) spezifischer Entzündungsmarker (IL-6, IL-10, IL-4, TNF α , IFN γ , IP-10, CCL19/-20) , histologische und immunhistologische Färbungen (ED1+, MHCII+, CD4+, CD8+) sowie durchflusszytometrische (T-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen (APZ), NK-, NKT-Zellen) und ELISA-Untersuchungen (IL-6, TNF α , IFN γ) durchgeführt . Die Langzeittransplantatfunktion wurde zusätzlich durch serielle Messungen der Urin-Proteinkonzentration (Proteinurie) und der Kreatinin-Clearance bewertet.

Es zeigte sich, dass durch die Vorbehandlung hirntoter Spender mit einem mAb gegen den IL-6-Rezeptor die Schädigung von Nierentransplantaten in der frühen Phase nach Transplantation deutlich minimiert werden kann. Die Genexpression pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α , IFN γ , IL-4, IL-10) und Chemokine (CCL-19, -21) wurde durch die Vorbehandlung reduziert. Weiterhin zeigte sich unter Vorbehandlung eine geringere Infiltration spezifischer Entzündungszellen (ED1+, CD8+ T-Zellen, APZs, DCs, NK-T-Zellen) in das Allograft sowie signifikant geringere histomorphologische Schädigungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzliche Analysen ergaben eine Reduktion transplantatinfiltrierender Zellen (durchflusszytometrische Untersuchungen von Transplantatgewebeproben) sowie geringere

Serumproteinkonzentrationen der Zytokine IL-6, TNF α , und IFN γ (ELISA) in der Gruppe vorbehandelter Hirntodspender im Vergleich zur Kontrolle (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Im Unterschied zur frühen Phase nach Transplantation scheint eine einmalige Spendervorbehandlung die Ausbildung einer Chronischen Allograft Nephropathie nicht ausreichend unterdrücken zu können. Zwar zeigte sich unter Spendervorbehandlung nach 5 Monaten eine geringere Genexpression verschiedener Zyto- und Chemokine (IL-6, IFN γ , TNF α , IL-10, IP-10, und CCL19/-21) und immunhistologisch eine geringere Allograftinfiltration (MHCII+, ED1+, und CD8+ Zellen), jedoch keine suffiziente Reduktion immunkompetenter Zellen (NKT, NK-, CD4+ Zellen, APZs).

Durch eine Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem anti-IL-6R mAb kann zum einen die inflammatorische Immunantwort in der frühen Phase nach Transplantation im Empfänger deutlich reduziert, zum anderen der pathophysiologische Einfluss des Ischämie-/Reperfusionsschadens erheblich gemindert werden. Empfänger von Lebendspenden scheinen dagegen nicht von einer Spendervorbehandlung zu profitieren. Eine einmalige Therapie des Spenders scheint nicht ausreichend für die Verbesserung der Transplantat-Langzeitfunktion zu sein.

Keywords: brain death, kidney transplantation, IL-6, acute rejection, chronic allograft nephropathy

Abstract:

Brain death (BD) of the donor and the subsequent up-regulation of IL-6 production and secretion significantly influence graft immunogenicity and ischemia/reperfusion injury, thus, leading to a considerable impairment of initial and long-term graft function.

In a rat kidney transplant model we evaluated the efficacy of a single pretreatment of brain dead donor rats with an anti-IL-6 receptor (IL-6R/CD126) monoclonal antibody (mAb) to decrease the inflammatory immune response and the associated ischemia/reperfusion injury (IRI) after kidney transplantation (NTx). Kidneys of BD and living (LD) F-344 donor rats were transplanted into Lewis recipient. BD was induced in the donor 6 hours (h) before organ recovery and transplantation. Both BD and LD donor rats were treated with anti-IL-6R mAb 1 h after BD induction. Recipients of grafts from untreated donors served as controls. To assess the effect of donor pretreatment was evaluated by gene expression analyses of inflammatory markers (IL-6, IL-10, IL-4, TNF α , IFN γ , IP-10, CCL19/-20; RT-TaqMan PCR), by histological and immunohistochemical staining (ED1+, MHCII+, CD4+ , CD8+ cells) and flow cytometry (T-cells, antigen presenting cells (APC), NK, NKT cells) and ELISA protein analyses (IL-6, TNF α , IFN γ). The long-term graft function was evaluated by serial measurement of urinary protein secretion (proteinuria) and creatinine clearance.

Pretreatment of BD donors by anti-IL-6 receptor mAb minimized BD associated graft injury compared to the control group. Gene expression of specific cytokines (IL-6, TNF, IFN γ , IL-4, IL-10) and chemokines (CCL-19, -21) was reduced. Furthermore, the number of graft infiltrating cells (ED1+, CD8+ cells, APCs, DCs, NK-T cells) was significantly lower, and fewer histomorphological lesions were observed in recipients of pretreated organs, compared to the control group. Flow cytometry analysis of PBMCs revealed reduced numbers of APCs. Moreover, lower protein concentrations of IL-6, TNF, IFN γ ; (ELISA) were detected recipients of pretreated donor organs.

While a single donor pretreatment with anti IL-6R mAb is able to reduce the early inflammatory immune response, chronic allograft nephropathy cannot be sufficiently prevented.

In summary donor treatment with anti-IL-6R mAb markedly reduced the inflammatory immune response in the early phase after transplantation of grafts from BD donors, while recipients of

LD grafts do not seem to benefit. Furthermore, it can be assumed that the pathophysiological effects of IRI could be significantly reduced by pretreatment. A single treatment of the donor does not seem to be sufficient for the improvement of long-term graft function.

1	EINLEITUNG	4
1.1	Organtransplantation	4
1.1.1	Geschichte der Nierentransplantation	4
1.1.2	Das deutsche Transplantationsgesetz	5
1.2	Aktuelle Epidemiologie	6
1.3	Grundzüge der Abstoßungsreaktion:	7
1.3.1	Die Alloreaktion	7
1.3.2	T-Zellaktivierung	9
1.3.3	Abstoßung	9
1.3.3.1	Hyperakute Abstoßung	9
1.3.3.2	Akzelerierte Abstoßung	9
1.3.3.3	Akute Abstoßung	10
1.3.3.4	Chronische Abstoßung	10
1.4	Hirntod	10
1.4.1	Definition	10
1.4.2	Diagnose	11
1.4.3	Auswirkungen des Hirntodes:	12
1.4.3.1	Intrakranielle Folgen	12
1.4.3.2	Veränderung der Hämodynamik	12
1.4.3.3	Effekte auf das endokrine System und den Metabolismus	13
1.4.4	Einfluss des Hirntodes auf die Transplantatfunktion	13
1.4.4.1	Der Ischämie/Reperfusionsschaden	13
1.4.4.2	Inflammation und Immunogenität	15
1.4.4.3	Pathophysiologische Effekte auf die Niere	16
1.5	Interleukin-6 und Hirntod	17
1.5.1	Interleukin-6: Aufbau und Wirkung	17
1.5.2	IL-6: seine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Nierenschädigung nach Hirntod	18
1.5.2.1	Stimulation der NF- κ B-Synthese über MAP-Kinasen	19
1.5.2.2	Rekrutierung von Entzündungszellen über Th17-Stimulation	20
1.5.2.3	Stimulation der C3-Synthese in Tubuluszellen	20
2	STAND DER FORSCHUNG UND FRAGESTELLUNG	22
2.1	Therapeutischer Einsatz von Anit-IL-6R in der Medizin	22
2.2	Fragestellung	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Versuchsaufbau	24
3.1.1	Das Akute und Chronische Modell	24
3.1.2	Versuchsgruppen	25
3.1.3	Versuchstiere, Haltung, Markierung	27

3.2	Operationstechnik	27
3.2.1	Anästhesie und Spendervorbehandlung	27
3.2.2	Nephrektomie des Spenders	28
3.2.3	Hirntodmodell	28
3.2.4	Orthotope Nierentransplantation	29
3.2.5	Kontralaterale Nephrektomie und Postoperative Therapie	30
3.2.6	Organentnahmen am Ende des Beobachtungszeitraumes	30
3.3	Überwachung der Transplantatfunktion	31
3.3.1	Datenerhebung	31
3.3.1.1	Bestimmung der Kreatinin-Clerance	31
3.3.3.2	Bestimmung der Proteinurie	31
3.4	Histologische Untersuchung	32
3.4.1	Auswertung Histologie	32
3.5	Immunhistologische Untersuchung	33
3.5.1	Auswertung Immunhistologie	34
3.6	TaqMan-Real-Time-PCR	35
3.6.1	RNA-Isolierung und Quantitative RNA-Bestimmung	37
3.6.2	cDNA-Synthese	38
3.6.3	TaqMan-Real-Time-PCR – Protokoll	38
3.6.4	TaqMan-Real-Time-PCR – Auswertung	39
3.7	Statistische Verfahren	39
3.8	Material	40
4	ERGEBNISSE – AKUTES MODELL	42
4.1	Histologie	42
4.2	Immunhistologie	47
4.2.1	Infiltration von ED1+ Zellen	47
4.2.2	Infiltration von Antigenpräsentierenden Zellen der MHC Klasse II	50
4.2.3	Infiltration von CD4+ T-Zellen	53
4.2.4	Infiltration von CD8+ T-Zellen	56
4.3	Zytokin- u. Chemokinexpression im Nierenallograft	59
4.3.1	IL-6 und TNF- α	59
4.3.2	IL-4	62
4.3.3	Interferon- γ und Interleukin-10	64
4.3.4	CCL-19 und CCL-21	67

5	ERGEBNISSE – CHRON. MODELL	71
5.1	Kreatinin-Clearance und Proteinurie	71
5.2	Histologie	72
5.3	Immunhistologie	75
5.3.1	Infiltration von ED1+ Zellen und APZ der MHC-Klasse-II	75
5.3.2	Infiltration von CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen	78
5.4	Zytokin- u. Chemokinexpression im Nierenallograft	81
5.4.1	IL-6, TNF α , IFN γ und IP 10	81
5.4.2	CCL19, CCL21 und Interleukin-10	84
6	DISKUSSION	87
6.1	Der zeitliche Aspekt – Versuchsaufbau und Therapienutzen	89
6.2	Akute Abstoßung	93
6.3	I/R-Schaden	99
6.4	Chron. Abstoßung	101
7	ZUSAMMENFASSUNG	104
8	LITERATURVERZEICHNIS	106
9	ANHANG	114
9.1	Glossar	114
9.2	Publikationsverzeichnis	114
9.3	Curriculum Vitae	115
10	DANKSAGUNG	117
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	119

1 EINLEITUNG

1.1 Organtransplantation

1.1.1 Geschichte der Nierentransplantation

Die Transplantationsmedizin begründete sich ursprünglich aus der plastischen Chirurgie mit dem Ziel des Behebens von Behinderungen und Missbildungen sowie der Deckung äußerlicher Verletzungen. Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts versuchten einige Pioniere, durch Organtransplantationen Krankheiten zu therapieren. So verpflanzte der Berner Chirurg Theodor Kocher 1883 einem Patienten, dem zuvor die Schilddrüse entfernt wurde, Schilddrüsengewebe unter die Haut, um so seinen Mangel an Schilddrüsenhormonen zu kompensieren. [1]

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation an einem Hund wurde durch den Wiener Chirurgen Emerich Ullmann 1902 beschrieben. [2] Bei dieser Autotransplantation verpflanzte er die Niere in den Nacken des Hundes, während der Harnleiter durch die Haut nach außen geleitet wurde, um die Harnproduktion zu dokumentieren. Alexis Carell, dem Begründer der modernen Gefäßchirurgie, gelang es wenige Jahre später, die Anastomosetechnik entscheidend zu verfeinern und so auch neue Maßstäbe in der Transplantationschirurgie zu setzen. Für seine Leistungen in der Chirurgie erhielt er 1912 den Nobelpreis. [3] Mit der Entdeckung der erworbenen Immuntoleranz durch den britischen Zoologen Peter Medawar konnte 1943 gezeigt werden, dass die Transplantatabstoßung die Folge einer aktiven Immunisierung des Empfängers durch sein Transplant ist. [4] 1958 wurde dieses Bild durch die Entdeckung des HLA-Systems (Human Leukozyten-Antigen) durch den Immunologen Jean Dausset vervollständigt. Als Grund für die Gewebeunverträglichkeit machte er bestimmte Oberflächenantigene auf den Leukozyten verantwortlich. [5] Beide erhielten Jahre später den Nobelpreis.

1954 gelang dem Team um Dr. Joseph Murray, Hartwell Harrison und John Merrill die erste erfolgreiche Nierentransplantation in Boston überhaupt. Bei dieser Isotransplantation transplantierten sie eine Niere zwischen den eineiigen Zwillingen Robert und Ronald Herrick. Nach heutiger Kenntnis ist die Organtransplantation bei monozygoten Zwillingen die einzige Konstellation, in der es zu keiner Abstoßungsreaktion aufgrund der körpereigenen Abwehr kommt. Erst 9 Jahre später verstarb der Empfänger Richard am Rezidiv seiner Grunderkrankung. Mit dem Einzug der Dialyse als Nierenersatztherapie in die Klinik stieg in den 50er Jahren die Zahl terminal niereninsuffizienter Patienten und damit das Klientel potenzieller Empfänger rasant an. Im gleichen Zeitraum wurden die immunsuppressiven Eigenschaften des Zytostatikums

6-Mercaptourin beobachtet und 1962 erstmals sein Derivat, Azathioprin, in einer Langzeitstudie in Boston eingesetzt. In dieser Studie gelang es Murray, das Überleben eines allonien-transplantierten Patienten zu erreichen. [6-8] Für seine herausragenden Verdienste auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin wurde Murray 1990 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. [7] Die erste erfolgreiche Nierentransplantation in Deutschland erfolgte 1964 durch Borsig und Nagel in Berlin. [9]

Bis Ende der 70er-Jahre wurde Azathioprin prophylaktisch als Immunsuppressivum nach Allotransplantationen eingesetzt, wodurch die 1-Jahres-Funktionsrate der Transplantate auf 60 % anstieg. In der Kombination mit niedrig dosierten Corticosteroiden erhöhte sich zwar das 1-Jahresüberleben nierentransplantierte Patienten auf 90 %, die 1-Jahres-Funktionsrate der Transplantate stagnierte aber bei 60 %. Mit der Einführung des Calcineurininhibitors Cyclosporin (CyA) Anfang der 80er-Jahre konnte schließlich eine 1-Jahres-Funktionsrate von über 80 % erreicht werden. [10, 11] Calcineurininhibitoren (CNI), wie Cyclosporin, Tacrolimus (FK 506) und Sirolimus, sind allerdings nephrotoxisch und zeigen ein vermehrtes Auftreten opportunistischer Infektionen und anderer Folgeschäden. [12] In der ELIE-SYMPHONIE-STUDIE konnte gezeigt werden, dass CNIs möglichst niedrig dosiert zu Gunsten eines längeren Transplantatüberleben eingesetzt werden sollten. [13] Neben den CNIs werden heute neue Wirkstoffklassen, wie z. B. Zytostatika (Mofetil), Biologicals (Belatacept) oder monoklonale Antikörper, zur Abstoßungsprophylaxe eingesetzt. Belatacept stellt eine ernstzunehmende Alternative zu den klassischen CNI, da es im Vergleich zu CNI eine bessere glomeruläre Filtrationsrate (GFR) respektive Nierenfunktion zeigt. [14, 15]

1.1.2 Das deutsche Transplantationsgesetz

Am 01. Dezember 1997 trat das deutsche Transplantationsgesetz (TPG) in Kraft. Seitdem ist nach jahrzehntelangen Verhandlungen die Organtransplantation in Deutschland rechtlich geregelt. [16] Zuvor hatten Organtransplantationen in einer organisatorischen sowie rechtlichen und ethischen Grauzone stattgefunden. [17] Neben den Rechten und Pflichten aller beteiligten Institutionen sind in diesem Gesetz die Spende, Entnahme, Vermittlung und Übertragung von Organen, die nach dem Tode oder zu Lebzeiten gespendet werden, festgeschrieben. Außerdem verbietet es den Organhandel, stellt diesen unter Strafe und beschränkt die Verpflanzung von Organen auf bestimmte Transplantationszentren. Weiterhin ist die Feststellung des Hirntodes als Zeichen des Todes gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer zu einer unerlässlichen Voraussetzung für eine Organspende gesetzlich festgeschrieben.

Die sog. „erweiterte Zustimmungslösung“ ist die Grundlage des Transplantationsgesetzes. Dabei hat der Wille des Verstorbenen zu Lebzeiten Vorrang. Ist dieser nicht dokumentiert oder bekannt, entscheiden die nächsten Angehörigen auf der Grundlage des mutmaßlichen Willens des Verstorbenen über die Spende der Organe. Seit dem 27. Juni 2000 ist die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) als bundesweite Koordinierungsstelle für die Durchführung und Vorbereitung der Organspende verantwortlich. Die Organvermittlung wird durch die gemeinnützige Stiftung Eurotransplant in den Niederlande organisiert, zu deren Einzugsgebiet rund 120 Millionen Menschen zählen. [18]

1.2 Aktuelle Epidemiologie

Durch ständige Weiterentwicklungen der OP-Techniken, Organkonservierungen und der immunsuppressiven Therapie ist die Nierentransplantation (NTx) Therapie der Wahl des terminalen Nierenversagens. Ursache dafür sind die primär-insulinabhängige Diabetes mellitus mit Nierenkomplikation und die polyzystische Niere. Über 11.000 Dialysepatienten warten durchschnittlich 6-7 Jahre im Eurotransplantraum auf eine Nierentransplantation. Ihre Zahl ist damit mehr als doppelt so hoch wie die der pro Jahr übertragenen Organe. 2013 wurden im Eurotransplantraum 4.601 Nierentransplantationen durchgeführt und mit einem Rückgang von 5.2 % gegenüber dem Vorjahr ein neuer Tiefstwert seit 2008 erreicht. Dieser Rückgang ist überwiegend auf die geringe Spenderbereitschaft der deutschen Bevölkerung zurückzuführen, welche als Folge der Transplantationsskandale der Organallokation sowie der Transplantation im Allgemeinen mit einer großen Verunsicherung gegenübersteht. Gleichzeitig hat vor dem Hintergrund einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit von Dialysepatienten im selben Zeitraum die Zahl der jährlichen Neuanmeldung für eine Nierentransplantation im Eurotransplantraum mit 6.068 einen neuen Rekordwert erreicht. [19, 20] Während dieser Bedarf noch in den letzten Jahren durch die tatsächlich realisierten Transplantationen annähernd kompensiert werden konnte und so die Warteliste seit 2008 zumindest nicht anwuchs, warteten 2013 über 11.000 Patienten auf eine Spenderniere. (Abb. 1) Dies entspricht einem Anstieg von 5.7 % im Vergleich zu 2012 und ist vor allem der Verunsicherung der Deutschen Bevölkerung gegenüber der Organspende als Nachwirkung der Transplantationsskandale geschuldet.

Die stetige Steigerung möglicher Spendernieren, welche für eine Transplantation in Frage kamen, war u. a. nur durch die Erweiterung der Spenderkriterien bzw. durch die Akzeptanz sog. „marginaler Organe“ möglich, welche gegenüber optimalen Spenderorganen eine größere

Anfälligkeit gegenüber transplantationsassoziierten Schädigungsmechanismen besitzen und damit eine geringere Transplantatüberlebensdauer zeigen. Als Konsequenz werden immer neue Strategien zur Verbesserung der Organqualität marginaler Organe entwickelt. Durch optimierte Operationstechniken wird versucht, die Schäden durch Ischämie und Reperfusion zu minimieren oder negative Einflüsse des Hirntodes durch Vorbehandlung hirntoter Spender, wie z. B. durch Abfangen pro-inflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) oder Interferon- γ (IFN γ), zu vermindern.

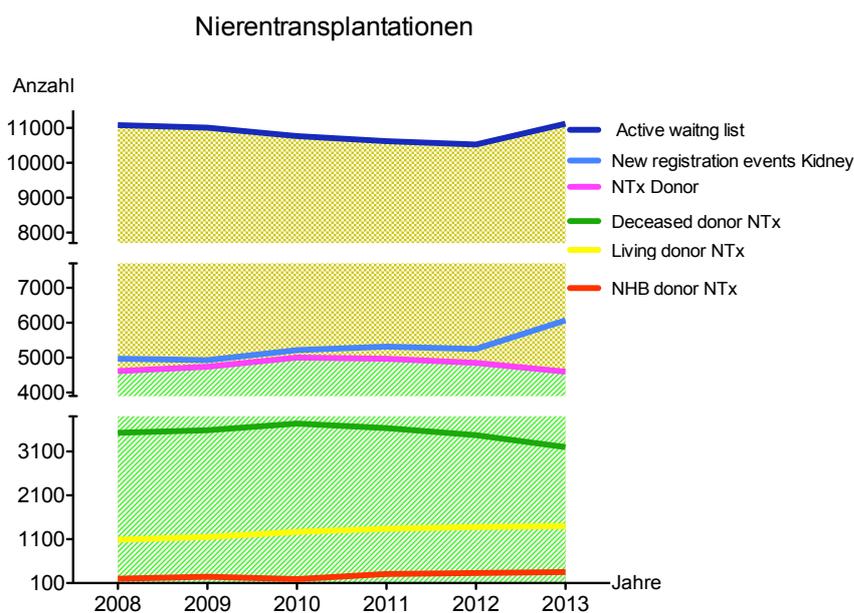


Abb. 1 Jährlich erfolgte Nierentransplantationen, unterteilt in postmortale Spende, Lebend- und Hirntodspende sowie jährlich neu registrierte Patienten und Gesamtheit aller Patienten, welche auf eine NTx warten; 2008-2013. [18, 21]

1.3 Grundzüge der Abstoßungsreaktion

1.3.1 Die Alloreaktion

Bei dieser Immunantwort reagiert der Organismus des Empfängers auf das „fremde“ Organ des Spenders - auf das sog. Allotransplantat (allogen = genetisch nicht-identische Spender gleicher Spezies). Proteine werden ständig durch Proteasomen im Cytosol abgebaut. Anschließend werden ihre Peptide über MHC-I-Moleküle (MHC-I-Mo) an der Zelloberfläche anderen Zellen

präsentiert, um zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden. In der Organtransplantation lösen körperfremde MHC-I- und MHC-II-Moleküle eine Immunantwort aus. Diese antigen-abhängige Immunreaktion des Empfängers auf sein Allotransplantat hängt dabei entscheidend von der MHC-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger ab. [22]

Im Falle der Organtransplantation werden 3 Mechanismen, welche eine Alloreaktion auslösen können, unterschieden: Bei der sog. "direct allorecognition" wandern Antigenpräsentierende Zellen (APZ), vor allem interstitielle dendritische Zellen des Donors, welche allogene MHC-I-Mo tragen, aus dem Transplantat über die Lymphflüssigkeit in die sekundären Lymphorgane wie Milz und Lymphknoten. Dort werden zirkulierende naive CD8⁺ T-Zellen, die für Antigene des Allotransplantates spezifisch sind, aktiviert. Die "direct allorecognition" wird für die akute Abstoßung verantwortlich gemacht, da die Donorzellen die Fähigkeit besitzen, auf „direktem Weg“ alloreaktive T-Effektorzellen zu aktivieren und hierdurch initial die Organdestruktion induzieren.

Ein zweiter Mechanismus der T-Zellaktivierung, erfolgt über den MHC-II-Rezeptor von APZ des Empfängers. Hierbei werden allogene Proteine durch APZ des Empfängers erkannt, durch Endozytose aufgenommen und schließlich über Empfänger-eigene MHC-II-Mo als Allopeptide an CD4⁺ T-Zellen in den sekundären Lymphorganen präsentiert. [23] Diese „indirect allorecognition“, durch Lechler und Batchelor erstmals beschrieben, entspricht der physiologischen Präsentation extrazellulärer Antigene. [24, 25] Im sog. „semidirect allorecognition pathway“ werden schließlich APZ des Empfängers durch direkte Zellinteraktion/Kontakt mit APZ des Spenders aktiviert: Hierbei nehmen APZ des Empfängers spenderspezifische MHC Komplexe auf und können dadurch CD8⁺T- als auch CD4⁺ T-Zellen aktivieren.

Für die Nierenabstoßung sind alle drei Wege der Antigenpräsentation relevant. Da mit der Zeit die Population empfängerspezifischer APZs im Transplantat abnimmt, beeinflusst vermutlich der indirekte Weg über die Aktivierung von Makrophagen und konsekutiver Destruktion des Transplantates stärker das langfristige Überleben des Transplantates und damit die chronische Abstoßung als der direkte. Dieser ist demnach hauptsächlich verantwortlich für späte Abstoßungen im Rahmen einer Chronischen Allograft Nephropathie (CAN). [25-28]

1.3.2 T-Zellaktivierung

Dendritische Zellen (DCs) sind im Vergleich zu Monozyten/Makrophagen und B- bzw. Gedächtniszellen, die potentesten APZs, da sie ubiquitär in Geweben zirkulieren sowie antigenspezifische bzw. alloreaktive T-Zellen direkt stimulieren und hierdurch die Transplantatabstoßung initiieren. Diese wird durch den operativen Eingriff, welcher auf die Antigenpräsentation stimulierend wirkt, zusätzlich gefördert. [29, 30] Nach der Aktivierung differenzieren sich CD4⁺ naive T-Zellen zu CD4⁺ T_{H1}-Zellen oder CD4⁺ T_{H2}-Zellen. CD4⁺ T_{H1}-Zellen sezernieren TNF α , IL-2 sowie IFN γ und aktivieren dadurch Natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen.

Die Ausschüttung des Zytokins IFN γ steigert die Expression der MHC-Mo, wodurch u. a. die Wahrscheinlichkeit für MHC-I beladene Zellen des Allograft, durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erkannt und zerstört zu werden, zunimmt. Neben der zellvermittelten- wird über CD4⁺ T_{H2}-Zellen die humorale Immunantwort induziert. T_{H2}-Zellen stimulieren über sezernierte Interleukine, wie IL-4, -IL-5 und IL-6, B-Zellen zur Antikörperproduktion. CD8⁺ T-Zellen differenzieren nach Kontakt mit MHC tragenden APZs zu zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, welche über bestimmte Zytokine, Gramenzyme sowie Perforine oder über den FAS-Liganden Apoptose induzieren und so das Transplantat schädigen. Erhöhte Konzentrationen von TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4 und IL-6 werden in Nierenbiopsien bei akuten Abstoßungen nachgewiesen. [25, 31]

1.3.3 Abstoßung

1.3.3.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung tritt bereits während der Transplantation auf und beruht auf präformierten Antikörpern gegen HLA-Antigene. Diese bilden sich durch vorangegangene Sensibilisierungen, wie z. B. nach Transfusionen oder Schwangerschaften. Binden diese Antikörper am Endothel, folgen zytotoxische Reaktionen und Komplementaktivierungen, welche zu Zellnekrosen und Mikrothromben führen. Dies führt zur Zerstörung des Transplantates. Ein vor Transplantation durchgeführtes „Cross match“ zwischen zirkulierenden Antikörpern des Empfängers mit Spenderlymphozyten schließt in der Regel eine hyperakute Reaktion aus. [32]

1.3.3.2 Akzelerierte Abstoßung

Diese Form der Abstoßung wird innerhalb der ersten Tage post transplantationem (p. t.) beobachtet und begründet sich in präsensibilisierten zytotoxischen T-Zellen (T_{zyt}). Meist tritt sie

nach Zweit- oder Dritt-Transplantationen auf. Sie ist häufig therapierefraktär und führt zum Transplantatverlust. [32]

1.3.3.3 Akute Abstoßung

Diese tritt gewöhnlich ca. 7-10 Tagen p. t. auf und ist die häufigste Form der Abstoßung nach allogener Nierentransplantation. Sie umfasst die zelluläre und humorale Abstoßungsreaktion und wird nach Biopsie über die Banff-Klassifikation graduiert. Durch die überwiegend CD4+/CD8+ T-Zell vermittelte zelluläre Abstoßung kommt es durch Infiltration von Monozyten, Plasmazellen und Lymphozyten zur Destruktion des Transplantates. Bei der Antikörper-abhängigen humoralen Reaktion führt die Ablagerung von Antikörpern am Gefäßendothel zur Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems. Klinisch zeigt sich dadurch das Bild einer Vaskulitis. [32]

1.3.3.4 Chronische Abstoßung

Für die Chronische Abstoßung ist typisch, dass sie sich in Form einer chronischen Transplantatnephropathie (CAN) langsam progredient entwickelt und mit einer funktionellen Organverschlechterung einhergeht. Über Monate bis Jahre kommt es zur Atrophie und zum Funktionsverlust des Allotransplantats. Dabei verursacht die chronische Entzündung morphologische Veränderungen in der Niere: Auf die chronische Reizung des Gefäßendothels folgt eine überschießende Proliferation der glatten Muskulatur in den Gefäßwänden mit konsekutiver Intimafibrose und -hyalinose. Nachfolgend wird das Nierenparenchym durch Stenosierung der Kapillaren empfindlich geschädigt, wodurch es zur Abnahme des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) kommt. Klinisch zeigen sich steigende Nierenretentionswerte sowie Proteinurie, was schließlich zum Funktionsverlust der Niere führt. [32-34]

1.4 Hirntod

1.4.1 Definition

Der Hirntod wird im TPG als Zustand der irreversibel erloschenen Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms definiert. [35] Durch diese Definition ist die Transplantation von Organen von Leichenspendern, die noch eine Herzaktion aufweisen,

gesetzlich abgesichert. Eine Überarbeitung der herkömmlichen Definition des Todes, wurde mit dem Einzug der künstlichen Beatmung in die Klinik Ende der 50er-Jahre und der daraus resultierenden Möglichkeit, Atem- sowie Herzaktion aufrechtzuerhalten, nötig; bis dato war der Hirntod erst mit Eintritt des Herzkreislaufstillstandes festgeschrieben. In der Folge definierte 1968 das Ad Hoc Committee der Havard Medical School erstmals die bis heute gültige bestehende Symptomtrias des Hirntodes aus: Apnoe, Verlust der Hirnstammreflexe und irreversibles Koma. [35-37]

1.4.2 Diagnose

Der Hirntod lässt sich durch verschiedene vorgeschriebene Untersuchungen zweifelsfrei feststellen. Die Hirntod-Diagnostik wird gemäß TPG nur durch Ärzte vorgenommen, die weder an der Entnahme noch an der Organtransplantation beteiligt sind. Außerdem müssen die Untersuchungen von zwei Ärzten unabhängig voneinander durchgeführt und dokumentiert werden. [9] Die Sicherheit der Diagnose basiert auf einem dreistufigen Untersuchungsschema sowie speziellen Anforderungen an die Qualifikation, Neutralität und Zahl der untersuchenden Ärzte:

1. *Voraussetzung für Diagnosestellung*
 - 1.1 Vorliegen einer akuten schweren primären oder sekundären Hirnverletzung
 - 1.2 Ausschluss von Intoxikation, dämpfender Wirkung von Medikamenten, neuromuskulärer Blockade, primärer Unterkühlung, Kreislaufchock, Koma bei endokriner, metabolischer oder entzündlicher Erkrankung als mögliche Ursache oder Mitursache des Ausfalls der Hirnfunktion im Untersuchungszeitraum
2. *Klinische Symptome des Ausfalls der Hirnfunktion*
 - 2.1 irreversible Bewusstlosigkeit (Koma)
 - 2.2 Ausfall der Spontanatmung (Apnoe),
 - 2.3 Verlust der Hirnstammreflexe (ausbleibende Schmerzreaktion im Trigeminusbereich, Fehlen des Okulozephal-, Korneal-, Pharyngeal-, Trachealreflexes sowie Lichtstarre beider Pupillen bei Ausschluss von Mydriatikum-Applikation)
3. *Irreversibilitätsnachweis des Hirnausfalles*
 - 3.1 Die Irreversibilität des vollständigen Gehirnausfalls und damit der Hirntod sind bewiesen, wenn die klinischen Ausfallsymptome (siehe 2) in der Beobachtungszeit von 12 bis 72 Stunden (je nach Ursache der Hirnschädigung) wiederholt übereinstimmen. Bei Kindern

< 2 Jahren ist wegen der Unreife des Gehirns ein kombiniertes Vorgehen aus klinischen und apparativen Untersuchungen verpflichtend.

3.2 Beweisende apparative Diagnostik kann alternativ die Irreversibilität nachweisen:

- Null-Linien-EEG kann den Hirntod ohne weitere Beobachtungszeit sofort beweisen
- erloschene Evozierte Potenziale sind nur als Nachweis bei supratentorieller oder sek. Hirnschädigung verwertbar
- zerebrale Perfusionsszintigrafie oder Dopplerszintigrafie zum Nachweis des Zirkulationsstillstandes bei ausreichendem Systemblutdruck sind zulässig. [35, 37]

1.4.3 Auswirkungen des Hirntodes

1.4.3.1 Intrakranielle Folgen

In Deutschland waren 2012 intrakranielle Blutungen mit mehr als 50 %, ischämisch-hypoxische Hirnschäden mit rund 15 % und Hirninfarkten mit fast 13 % – also mehr als 80 % atraumatische Ursachen, für das Eintreten des Hirntodes verantwortlich. Weniger als 20 % waren Folgen von Traumata. [38] Diesen Entitäten ist eine gemeinsame Endestrecke gemein:

Auf die Kompression von Hirngewebe durch Bildung eines Hirnödems folgt die transtentorielle Herniation. Durch diese wird die Medulla oblongata des Hirnstammes im Bereich des Foramen magnum komprimiert und damit die resultierende Symptomatik wie Koma, Hirnstammreflexie, Apnoe sowie Störung der zentralen Herz-Kreislauf-Zentren induziert. [39]

1.4.3.2 Veränderung der Hämodynamik

Die Hirndurchblutung wird über den autonomen Cushing-Reflex gesteuert, um die Sauerstoffversorgung auch bei niedrigen Perfusionsdrücken zu garantieren. Bei massiven Hirndrücken bricht dieser Regulationsmechanismus allerdings zusammen. Es folgt ein Durchblutungsstillstand und damit ein Kompletinfarkt der gefäßversorgten Hirnregionen. [40] Im Folgenden finden tiefgreifende hämodynamische Veränderungen im ganzen Organismus statt. Die Herniation löst eine sehr starke Sympathikus-Aktivierung mit überschießender Katecholaminausschüttung, konsekutiver Vasokonstriktion und folgender massiver Hypertension aus. [41] Auf diesen „autonomen Sturm“ folgt eine hypotone Phase mit Abfall des Herzzeitvolumens, einer generellen Minderdurchblutung sowie ansteigenden Serum-Laktat-Spiegeln aufgrund resultierender Ischämie in allen Organen. [37, 39, 42] Weiter kommt es nicht nur zu einer

ausgedehnten Schädigung der Endothelzellen, sondern auch zum Zusammenbrechen der Blut-Hirnschranke und nachfolgender Freisetzung von Hormonen und pro-inflammatorischen Mediatoren, wie z. B. IL-6 in den Blutkreislauf. [43]

1.4.3.3 Effekte auf das endokrine System und den Metabolismus

Trotz dieses plötzlichen, irreversiblen und massiven zentralneurologischen Traumas bleibt auch nach dem Hirntod für eine gewisse Zeit vitales und damit sekretionsfähiges Hirngewebe erhalten. So konnten bis zu einer Woche nach Hirntod noch zirkulierende Hormone aus dem Hypophysenvorderlappen nachgewiesen werden. [44, 45] Allerdings sind auch substantielle Beeinträchtigungen der hypothalamo-hypophysären Achse nach Hirntod bestätigt:

So zeigen aufgrund der Dysfunktion des Hypophysenhinterlappens bis zu 90 % der Organspender nach Hirntod eine reduzierte bis nicht nachweisbare ADH-Konzentration im Blut und bis zu 80 % einen neurogenen Diabetes insipidus. [46, 47] Dieser führt zu schwerer Hypovolämie mit konsekutiver Verschlechterung von Perfusion und Sauerstoffversorgung der Spenderorgane. Darüber hinaus berichteten Novitzky et al. über eine deutliche Abnahme von Schilddrüsenhormonen und Cortisol im Blut hirntoter Spender. [48-50] Diese hormonellen Veränderungen, insbesondere der Mangel an freiem Trijodthyronin, seien einer der Hauptgründe für die erniedrigte mitochondriale Stoffwechselleistung sowie den Wechsel in einen anaeroben Stoffwechsel mit einhergehender Akkumulation von Laktat und Verbrauch energiereicher Verbindungen (Kreatininphosphat, ATP). Durch das Leerlaufen der Energiespeicher und den raschen Verlust von Fe^{3+} wird der Energiehaushalt der Zellen und damit die Organfunktion entscheidend beeinträchtigt. [51, 52]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Eintritt des Hirntodes die Ischämie und die daraus resultierende Schädigung eines potenziellen Spenderorganes beginnen. Somit ist der Hirntod als ein nicht-immunologischer spenderspezifischer Risikofaktor anzusehen, der die Funktion des Transplantates maßgeblich beeinflusst.

1.4.4 Einfluss des Hirntodes auf die Transplantatfunktion

1.4.4.1 Der Ischämie/Reperfusionsschaden

Im Rahmen einer Transplantation tritt im Transplantat durch temporäre Abkopplung des Spenderorgans vom Blutkreislauf sowie nach erneuter Reperfusion durch den

Empfängerkreislauf ein sogenannter Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) auf. Das heißt, die hirntodassoziierte Ischämie wird nach Unterbrechung der Perfusion noch verstärkt: Die Zellen des Transplantates verbrauchen im Zuge der Hypoxie vermehrt weiter ihre ATP-Speicher, worauf Azidose und Elektrolytentgleisungen (Hypokalämie) beobachtet werden. [53]

Dies hat weitreichende Folgen:

- Aufgrund der Na^+/K^+ -ATPase werden durch intrazellulär steigende Konzentrationen von Na^+ , Cl^- und Ca^{2+} , Zellödeme sowie durch Schäden an allen Zellkompartimenten, wie am Endoplasmatischen Retikulum, an den Peroxisomen oder Mitochondrien, Apoptose induzierende Prozesse ausgelöst. [53-55]
- Durch die ATP-Verarmung und beschädigten Peroxisomen ist die Hypoxanthin-Oxidation beeinträchtigt, wodurch verschiedene Sauerstoffradikale (Wasserstoffperoxid, Superoxide) kumulieren und Schäden an Proteinen, RNA und DNA induzieren. Eine massive Bildung dieser reaktiven Sauerstoffintermediate (ROI) wird bereits 25 Minuten nach warmer Ischämie in Herzzellen beobachtet. [56] Normalerweise inaktivieren verschiedene Enzym – gesteuerte Entgiftungsmechanismen (Katalase, Glutathionperoxidase, Superperoxid-dismutase) ROI, die aber aufgrund des Energiemangels nur eine eingeschränkte Entgiftungskapazität aufweisen. [57, 58]
- Der ansteigende intrazelluläre Calciumspiegel aktiviert u. a. Phospholipase A2 und begünstigt dadurch die Bildung von Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), welcher neben Erhöhung der Gefäßpermeabilität zu einer Vasokonstriktion sowie Thrombozytenaggregation führt. [59]
- Das Zusammenspiel aus anschwellenden Endothelzellen, Vasokonstriktion sowie Adhäsion von Thrombozyten und anderen Zellen an die Gefäßwand führt zur relativen Abnahme des Gefäßdurchmessers und schließlich zur Verstärkung von Minderperfusion und Hypoxie. [54] Hypoxie und rezeptorvermittelte Kaskaden führen dann direkt zur Apoptose von Zellen.
- Weiterhin lösen sinkender pH-Wert und PAF die Zell-Zell-Interaktionen benachbarter Zellen, wodurch die Migration von Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten in das Transplantatgewebe v. a. nach Reperfusion erleichtert wird. Diese bilden wiederum ROI, Proteasen und Zytokine, wodurch die Entzündungsreaktionen sowie Schäden in Form von Apoptose und Nekrose der Zellen im Transplantat verstärkt werden. [60, 61]

1.4.4.2 Inflammation und Immunogenität

Neben den beschriebenen Folgen, wird durch den Hirntod zusätzlich eine massive systemisch-inflammatorische Reaktion ausgelöst, die nicht nur die Organe schädigt und damit die Transplantatüberlebenszeit verkürzt, sondern die Immunogenität des Transplantates entscheidend erhöht. Dies wird deutlich am besseren Outcome nach Transplantation von Organen nicht verwandter Lebendspender in Form einer besseren Kurz- und Langzeitfunktion des Transplantates sowie einer geringeren Inzidenz akuter Abstoßungen im Vergleich zu hirntoten Spendern. [62-66] Kusaka et al. verglichen in einem Rattenmodell die Leukozyteninfiltration, die morphologischen Veränderungen des Transplantates sowie die Zytokinausschüttung in Empfängern von Organen hirntoter Spender mit Lebendspendern nach Nierentransplantation. Dabei beobachteten sie eine stärkere Zytokinausschüttung und Zellinfiltration in Nieren hirntoter Ratten. [67]

Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen in Rattennieren nach Hirntodinduktion im Gegensatz zu Lebendspenden eine gesteigerte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen (Selektinen, ICAM-1, beta2-Integrine) nach. So ist u.a. die Expression von E-Selektin in der Frühphase der Inflammation hochreguliert, wodurch initial die Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten vermittelt bzw. erleichtert wird. [62, 67-69]

Weiter konnten Terasaki et. al. nachweisen, dass die Transplantatüberlebenszeiten von verwandten und nicht-verwandten Lebendspendern ähnlich gute Ergebnisse aufweisen und damit den Stellenwert von Antigen-unabhängigen Risikofaktoren, wie Kalte Ischämie, Blutdruckschwankungen und Hirntod, unterstreichen. [70]

Dass die pro-inflammatorischen Veränderungen hirntoter Spender weniger auf systemischer Hypotension beruhen, als primär auf direkter Hirntod assoziierter Schädigung von Hirngewebe zurückzuführen sind, beobachteten Pratschke et al. in einem von ihnen etablierten Modell zur graduellen langsamen Hirntodinduktion bei Ratten. [71, 72] Mit dem Untergang von Hirngewebe werden u. a. Mikroglia-Zellen aktiviert, welche verstärkt Zytokine ausschütten. [43] Pratschke et al. zeigten erstmalig, dass der Hirntod im humanen Organspender zu einer signifikanten Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-10, IFN γ sowie TNF α , führt und Spenderorgane somit bereits vor Transplantation immunologisch aktiviert werden. Dieser unspezifischen Aktivierung folgt dann, wie in 1.4.4.1 beschrieben, ein verstärkter Ischämie-/Reperfusionsschaden sowie eine verstärkte Empfänger-Immunantwort. [64] Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch eine Vorbehandlung hirntoter Leberspender mit Methylprednisolon, die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF α , IL-6 und ICAM-1, im Transplantat vermindert werden kann. Konsekutiv war die Organfunktion der

vorbehandelten Hirntodspender aufgrund verminderter inflammatorischer und geringerer Ischämie-/Reperfusionsschäden wesentlich besser als die unbehandelte Spenderorgane. In der gleichen Kohorte zeigte sich eine Abnahme der Inzidenz akuter Abstoßungen. [73, 74]

Primär wird also eine vermehrte Expression und Ausschüttung verschiedener Zytokine durch die Schädigung von neuronalem Hirngewebe unmittelbar nach dem Hirntodeintritt induziert bzw. ausgelöst. Folgend verstärken „Katecholamin-Sturm“, anaerober Stoffwechsel und Hypotension eine globale Ischämie, die zur Endothelaktivierung und damit zur weiteren Freisetzung von Zytokinen führt und hierdurch eine weitere Schädigung des Transplantates verursachen. [75]

1.4.4.3 Pathophysiologische Effekte auf die Niere

Als Ergebnis der zerebralen Schädigung bzw. des Hirntodes führt die erhöhte Anzahl zirkulierender Zytokine auch zu einer lokalen Entzündungsreaktion in der Niere. [43, 51] Durch den Hirntod kommt es, wie in 1.4.3.2 erwähnt, zu starken hämodynamischen Veränderungen:

Als Folge der starken hypotonen Phase kommt es zu einem massiven Abfall der Durchblutung und zur Ischämie der Nieren. Es folgt eine starke Schädigung des Nierenparenchyms durch Apoptose und generelle Entzündungsreaktionen.

So zeigen Microarray Untersuchungen in der Niere nach Eintritt des Hirntodes eine Zunahme der Genexpression verschiedener Reparaturenzyme sowie inflammatorischer Zytokine. [76, 77]

In Nullbiopsien transplanteder Nieren untersuchten Kotsch et al. das Expressionsmuster verschiedener messenger-RNAs (mRNA) in Organen von Lebend- und Hirntodspendern. Sie beobachteten in Nieren von Hirntodspendern eine signifikant gesteigerte Induktion der Chemokine CCL-19 und CCL-21. [78] Beide binden an den Chemokinrezeptor 7 (CCR7), welcher auf APZ und naiven T-Zellen exprimiert wird. [79] Durch chemotaktische Migration wandern diese Zellen in die Lymphknoten und andere sekundäre Lymphorgane ein, wodurch, wie in weiteren Studien postuliert, die Immunogenität entscheidend gesteigert wird. [80-82] Bei allogenen Nierentransplantationen von Mäusen konnte durch eine Behandlung mit einem CCL-19-IgG Antikörper eine signifikant längere Überlebensdauer gegenüber unbehandelten Empfängermäusen erreicht werden. [83]

Des Weiteren beobachteten Welmoet et al. in einer kleinen Kohortenstudie eine erhöhte Konzentration von Angiopoietin-2 sowie einen kleineren Angiopoietin-1/Angiopoietin-2-Quotienten (Ang-1/Ang-2) in den Nieren hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern. [84] Beide, Ang-1 und Ang-2, werden in Endothelzellen der Blutgefäße gebildet und triggern als kompetitive Antagonisten zueinander über den Angio-Tie-Rezeptor, Angiogenese und

Permeabilität der Blutgefäße. Während Ang-1 anti-inflammatorisch wirkt, fördert Ang-2 die Entzündungsreaktion und Permeabilität an Endothelzellen. Dieses relative Missverhältnis zugunsten Ang-2, so Ma et al., korreliert dabei mit der Entwicklung der chronischen Transplantatnephropathie (CAN), welche eine der Hauptursachen für den späten Verlust des Transplantates darstellt. In ihrem Rattenmodell zeigten sie, je größer der Banff-Score, desto kleiner die Ang-1 und desto größer die Ang-2 bzw. Angio-Tie-Rezeptor Expression. [85]

1.5 Interleukin-6 und Hirntod

1.5.1 Interleukin-6: Aufbau und Wirkung

IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches maßgeblich die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (APP) in Entzündungsprozessen reguliert und eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Nierenschäden nach Eintritt des Hirntods spielt. Es wird von T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Mikroglia- sowie mesangialen und Tubulusepithelzellen im Rahmen von Gewebeschäden bei Infektionen, Verbrennungen oder Traumata verstärkt sezerniert. [86] Weiter ist es in der Lage, aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften die Blut-Hirnschranke zu überwinden. IL-6 ist ein aus 186 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, welches auf dem Chromosomenabschnitt 7p21 kodiert ist und dessen Transkription durch den Transkriptionsfaktor (TF) NF- κ B induziert wird. Andere physiologische IL-6-stimulierende Zytokine sind IL-1 und TNF α , IL-10 dagegen wirkt antagonistisch. Der IL-6 Rezeptor besteht aus einem Komplex zweier Transmembranproteine: einem signalübertragenden Transducer- und einem IL-6 bindenden Protein, welches in gelöster und gebundener Form vorliegen kann. (Abb.2) [87] Als gebundener Proteinkomplex, bestehend aus Transducer-Protein (CD 130) mit der IL-6 bindenden Rezeptorkomponente (CD 126/ IL-6R), wird dieser Proteinkomplex in Hepatozyten, Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und einigen Lymphozyten exprimiert. Einzelne, d. h. ohne IL-6 bindende Rezeptorkomponente, liegt das Transducer-Protein (CD 130) dagegen in den meisten Zellen des menschlichen Organismus vor. Die lösliche Rezeptoreinheit (sIL-6R) findet sich vor allem im Serum und wird bei Gewebeschäden vermehrt sezerniert. [88] Nach Binden von IL-6 an seinen CD 126/IL-6-Rezeptor kommt es zur Dimerisierung des Transducer-Proteins (CD 130) und über Aktivierung von STAT/Janus-Kinasen zu einer gesteigerten Bildung verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF), wie z. B. NF- κ B. [43, 89] Hierdurch wird wiederum die Synthese von IL-6, TNF α und anderen Zytokinen potenziert. Daneben aktiviert IL-6 zytotoxische T-Zellen und sorgt als Wachstumsfaktor für die

Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen, wodurch sich auch seine immunsystemaktivierende Eigenschaft erklären lässt.

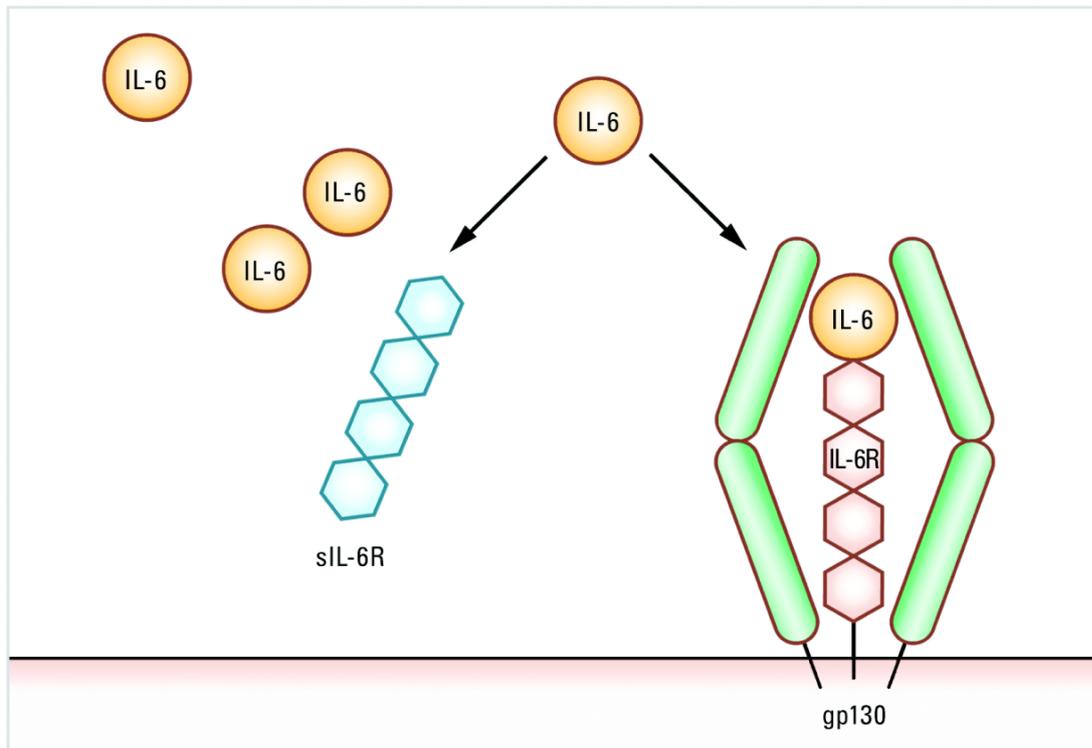


Abb. 2 Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) und der gebundene membranständige IL-6-Rezeptor (IL-6R); [87]

1.5.2 IL-6: seine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Nierenschädigung nach Hirntod

Die bisher beschriebenen negativen Einflüsse des Hirntods auf das Transplantat stehen direkt und indirekt mit IL-6 im Zusammenhang: Klinische und experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Hirntod Veränderungen im Spenderorgan verursacht, die mit einem signifikanten Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine assoziiert sind und in der Folge nicht nur zu einem verstärktem I/R-Schaden, sondern auch zu einem schlechteren Outcome nach Transplantation im Vergleich zur Lebendspende führen. [67, 90-92] In einer klinischen Studie beobachteten Weiss et al. in Lebertransplantaten hirntoter Spender vor Organentnahme eine bis zu 100-fach gesteigerte Induktion von IL-6 im Vergleich zu Transplantaten von Lebendspendern. [64] Dies konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. [63, 91, 93, 94]

Interessanterweise wird auch bei SHT-Patienten eine stark erhöhte IL-6 Konzentration in Serum beobachtet, was einen mittelbaren Zusammenhang zwischen dem raschen IL-6 Anstieg und dem

Untergang von neuronalem Hirngewebe nahelegt. [43, 95, 96] Diese Kausalität beschrieben Boama et al. in einer möglichen Enzymkaskade wie folgt:

Bei einer neuronalen Hirnverletzung, wie nach Hirntod, wird in Mikrogliazellen pro-IL-1 β durch Kaspase-1 intrazellulär in seine aktive Form IL-1 β gespalten. Durch Nekrose und/oder über sekretorische Lysosomen, während der Apoptose wird es dann in das Hirnparenchym freigesetzt. Nach Binden von IL-1 β an Rezeptoren der Gliazellen wird über intrazelluläre Signalwege die Transkription von NF- κ B und IL-6 stark aktiviert. [43] Konsekutiv kommt es zu einer massiven Ausschüttung von IL-6; bereits 1 Stunde nach Hirntod lässt sich eine signifikant erhöhte Konzentration im Serum nachweisen. [94] Nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke induziert zirkulierendes IL-6 über seine CD130-Rezeptoreinheit an verschiedenen Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher systemischer Entzündungsprozesse:

1.5.2.1 Stimulation der NF- κ B-Synthese über MAP-Kinasen (Mitogen-activated-protein-kinasen)

MAP-Kinase-Signalwege gehören zu den wichtigsten Signaltransduktionswegen, welche bei der Induktion der Entzündungsreaktion in der Niere beteiligt sind. Sie werden durch Stress-Stimuli aktiviert und regulieren neben der Entzündungsreaktion, auch die Zelldifferenzierung und Apoptose der Zellen. Nach Binden von IL-6 an seinen Rezeptor aktiviert das Transducer-Protein (CD 130) durch Phosphorylierung STAT-Kinasen, die ihrerseits das Enzym p38 phosphorylieren und damit aktivieren. Durch das nachgeschaltete Enzym Casein-Kinase II, welches über p53 auch einen Zellzyklusarrest und Apoptose einleitet, werden weitere intrazelluläre Enzymkaskaden aktiviert, an deren Ende eine gesteigerte Synthese von NF- κ B zu beobachten ist. [97] Diese Aktivierung von NF- κ B erfolgt rasch nach der Induktion des Hirntodes und wird maßgeblich von IL-6 getriggert. [98] Nach Translokation von NF- κ B in den Zellkern leitet es über Inhibition bestimmter kernlokalisierter JN-Kinasen (c-Jun N-terminal activated kinase) die Aktivierung spezifischer Kaspasen ein, sodass die Zelle in die Apoptose übergeht. Als TF reguliert es zum anderen entscheidend die Genexpression der Zelle und somit die systemische Entzündungsantwort. So induziert NF- κ B die Expression von TNF α , IL-6 und E-Selektin. [99-101] Zusammenfassend autoregulierte IL-6 seine Synthese über die NF- κ B-Bildung und schädigt die Niere durch Infiltration von Entzündungszellen und Apoptose. Ebenso wurde eine inverse Korrelation zwischen Serumspiegel von IL-6 und dem Überleben von Nierentransplantaten nachgewiesen. [102, 103]

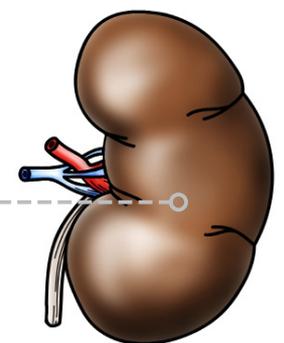
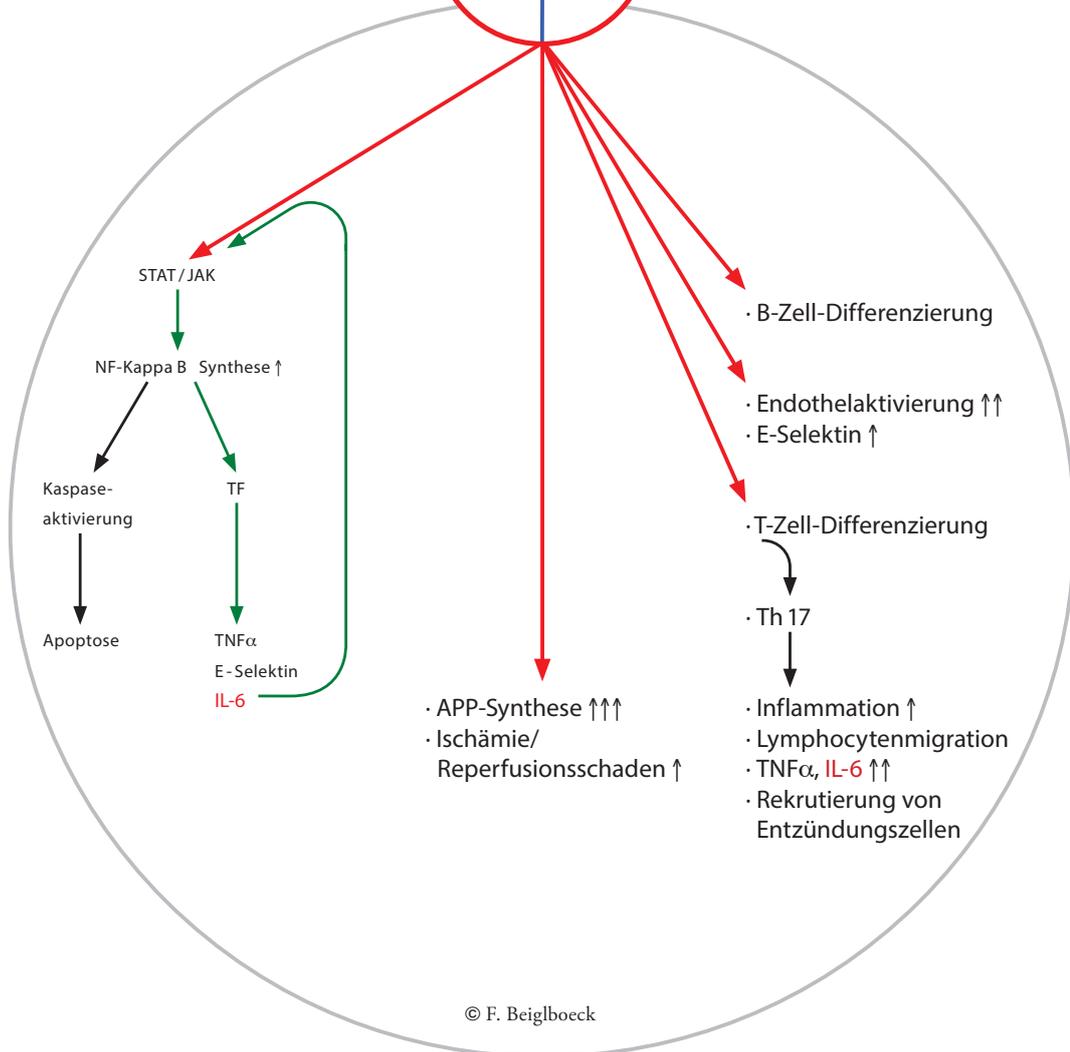
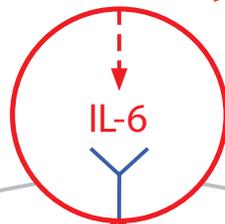
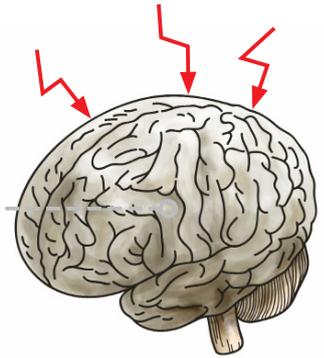
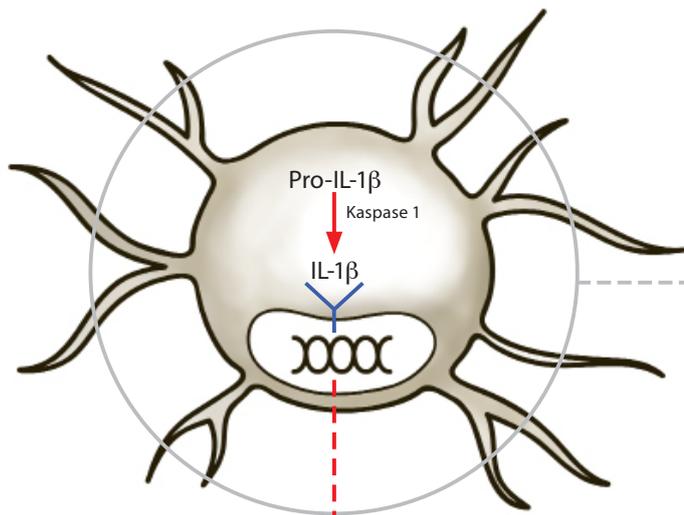
1.5.2.2 Rekrutierung von Entzündungszellen über T_{H17}-Stimulation

Verschiedene Studien zeigen, dass ein erhöhter IL-6-Gradient die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_{H17}-Zellen, nicht aber zu CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) induziert. [104, 105] T_{H17}-Zellen sezernieren vermehrt Interleukin-17, wodurch wiederum die IL-6 Synthese über die NF-κB- Aktivierung verstärkt wird. Daneben werden Entzündungszellen wie Neutrophile Granulozyten rekrutiert und die TNFα- sowie IL-6 Bildung durch Makrophagen im Transplantat gesteigert. [105, 106]

1.5.2.3 Stimulation der C3-Synthese in Tubuluszellen

Akute-Phase-Proteine (APP), wie Komplement C3 (C3) oder Fibrinogen-beta (FBG), werden zwar vorwiegend in Leberzellen gebildet, allerdings ist auch eine extrahepatische Expression in Lungen, Herz, Milz und Nieren nachgewiesen. [107] Es ist bekannt, dass IL-6 einer der Hauptstimuli für die Aktivierung der Akuten-Phase-Reaktion (APR) ist. Ebenfalls wird diese unspezifische Immunantwort durch lokale oder iatrogen verursachte Gewebeschäden, wie bei einer Organexplantation, aktiviert. Die Funktion der APP ist allgemein die Wiederherstellung der Homoöstase, wobei FBG vor allem gerinnungsfördernd und C3 stimulierend auf Immunzellen, wie Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten, wirkt. [108] Daneben ist C3 der zentrale Induktor der Komplement-Aktivierung. Die Bedeutung der lokalen renalen C3-Synthese in der Pathogenese der Nierenschädigung nach Transplantation wurde von mehreren Gruppen beschrieben.

So korreliert die Bildung von C3 mit dem Auftreten akuter und chronischer Nierenabstoßungen. [108-110] Pratt et al. zeigten, dass Spendernieren von C3-knock-out-Mäusen ein signifikant besseres Transplantatüberleben aufwiesen als Nieren von Wildtyp-Mäusen. [110] Darüber hinaus erwiesen sich experimentelle Studien zur Inhibition der Komplementaktivierung als vorteilhaft in Bezug auf eine Abschwächung des Ischämie-Reperfusionsschadens und Verbesserung des Nierentransplantatüberlebens. [111, 112] Eine wichtige Rolle bei der lokalen C3-Synthese spielt IL-6: Damman et al. beobachteten, dass die lokale C3-Induktion in den Nieren hirntoter Spender, verglichen zu den Lebendspendern, signifikant erhöht ist und dies mit einer reduzierten Allografffunktion nach Transplantation einhergeht. Sie zeigten sowohl in vitro als auch in vivo in einem Rattenmodell, dass zum einen die C3-Synthese in epithelialen Tubuluszellen durch IL-6 potenziert wird und zum anderen die IL-6 Konzentration sowie die konsekutive C3-Expression vor Transplantation in Hirntodspendern gegenüber Lebendspendern bereits nach 4h signifikant erhöht ist. [94]



2 STAND DER FORSCHUNG UND FRAGESTELLUNG

2.1 Therapeutischer Einsatz von Anti-IL-6 in der Medizin

Aufgrund der erwiesenen massiven IL-6 Expression in Organen hirntoter Spender sowie erhöhter IL-6-Serumspiegel erscheint eine Spendervorbehandlung mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen den CD126 IL-6-Rezeptor (IL-6R) vielversprechend. Der therapeutische Einsatz mAb gegen den IL-6R zur Blockierung der IL-6-Synthese zeigte experimentelle und klinische Erfolge. So konnte im Colitismodell der Maus gezeigt werden, dass eine Blockade des IL-6-Signalweges durch anti-IL-6R mAb nicht nur die Apoptoseresistenz von T-Zellen der Lamina propria aufhebt, sondern auch die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen reduziert und somit die Entzündung deutlich herabsetzt oder verhindert. [113] Morbus Crohn Patienten zeigten bereits nach einmaliger Infusion des anti-IL-6R mAb Tocilizumab eine normalisierte APR. [114] Andere Untersuchungen im experimentellen Modell der Multiplen Sklerose (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) ergaben, dass die Induktion von reaktiven T_{H1} - sowie T_{H17} T-Zellen durch anti-IL-6 mAb inhibiert und somit die Entwicklung der EAE unterdrückt werden kann. [115] In der Organtransplantation wird insbesondere in Bezug auf die T_{H17} T-Zellen angenommen, dass eine Blockierung von IL-6 einen Shift vom T_{H17} - zum regulatorischen T-Zell Phänotyp bewirkt und damit eine Remission von Entzündungsprozessen oder akuten Abstoßungsreaktionen nach Transplantation erreicht werden kann. [116] Weiter konnte durch einmalige Gabe eines anti-IL-6 mAb direkt nach Transplantation in einem experimentellen Nierentransplantationsmodell eine verzögerte Transplantatfunktion (delayed graft function, DGF) mit massiver tubulärer Schädigung verhindert werden. Ebenso wurde die kritische Rolle des IL-6/IL-6R-Signalweges im akuten Nierenversagen sowie die Reduzierung des I/R-Schadens nach NTx durch Blockierung des IL-6R beschrieben. [117-119]

2.2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte (F-344-nach-Lewis) der Einfluss einer anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung auf das Zytokinmuster, die Alloreaktivität sowie die frühe Transplantatfunktion und Langzeitfunktion von Transplantaten hirntoter Spender untersucht. Dabei sollten Aussagen über folgenden Fragen getroffen werden:

1. Führt eine Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R) Antikörper
 - a) zu einer reduzierten inflammatorischen Immunantwort im Empfänger?
 - b) zu einer Verminderung des Reperfusionsschadens und der Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen?

2. Führt eine Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R) Antikörper
 - a) zu einer Verbesserung der Langzeit-Transplantatfunktion?
 - b) zu einer Verminderung chronischer Abstoßung?

3. Profitieren Empfänger von Lebendspenden von einer Spendervorbehandlung mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R) Antikörper?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Das Akute und Chronische Modell

Zur Untersuchung der anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung auf die frühe Transplantfunktion sowie Langzeitfunktion von Nierentransplantaten hirntoter Spender wurde ein etabliertes allogenes Nierentransplantationsmodell der Ratte gewählt: Fischer-Ratten (F-344, RT1v1) dienten als Spender und Lewis-Ratten (RTv1) als Empfänger. Diese Spender-/Empfängerkombination ist ein Modell der chronischen Transplantatabstoßung nach Nierentransplantation (NTx), welches 1969 von White et al. etabliert und Tilney et al. weiterentwickelt wurde. [33, 120] Die beiden Inzuchtstämme unterscheiden sich in 2 Loci des MHC-I-Klasse-Gens und Nicht-MHC-Loci (minor histo-compatibility antigen), wodurch nach NTx progrediente parenchymatöse Veränderungen bis zum Transplantatversagen im Transplantat induziert werden. Um eine akute Abstoßung zu vermeiden, wird eine Kurzzeitimmunsuppression empfohlen.

Zur Untersuchung der Langezeitfunktion des Allograft wurde in dieser Arbeit eine Kurzzeitimmunsuppression mit Cyclosporin A (CsA: 1.5 mg/kg kg/d) für 10 Tage (d) nach NTx durchgeführt. Dadurch kommt es zu einer reproduzierbaren Ausprägung charakteristischer Kriterien der chronischen Transplantatnephropathie (CAN). Die kontralateral verbliebene Niere wurde nach 10d entfernt und die Langzeitnierenfunktion durch Bestimmung der Nierenfunktionsparameter, der Proteinurie sowie Kreatinin-Clearance über serielle Blut- und Urinkontrollen überprüft. Organ- und Blutentnahmen erfolgten durchschnittlich nach 150d am Versuchsende. Das gleiche Modell wurde ebenfalls für die Untersuchung des I/R-Schadens sowie akuter Abstoßungsreaktionen genutzt, wobei hier auf die CsA-Induktionstherapie verzichtet wurde. Hierbei kommt es zu einer akuten Destruktion des Allograft, wodurch sich die durchschnittliche Überlebenszeit der Nierentransplantate verringert. 24 Stunden (h) und 7d nach NTx erfolgten Organ- und Blutentnahmen. In beiden Fällen erfolgte die Spendervorbehandlung mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R; Klon D7715A7, Isotyp Rat IgG2b κ , BioLegend/Biozol, Eching, Germany), welcher 1h nach Hirntodinduktion bzw. 5h vor NTx in einer Dosis von 0,5mg/Ratte i. v. injiziert wurde. In beiden Modellen dienten als Kontrollen neben nicht-konditionierten hirntoten Spendern sowie vorbehandelten und unbehandelten Lebendspendern, auch Nativtiere, die nicht transplantiert wurden, aber denen anti-Maus/Ratte IL-6R injiziert wurde bzw. unbehandelt blieben. Aus dem Studiendesign ergaben sich folgende Gruppen:

Akutes Modell ohne CsA-Induktionstherapie		Chronisches Modell mit CsA-Induktionstherapie, 10d	
1) BD ohne IL-6R-mAb	3) LD ohne IL-6R-mAb	1) BD ohne IL-6R-mAb	3) LD ohne IL-6R-mAb
2) BD mit IL-6R-mAb	4) LD mit IL-6R-mAb	2) BD mit IL-6R-mAb	4) LD mit IL-6R-mAb
NATIVTIERE: mit + ohne IL-6R, aber keine NTx/keine BD-Induktion/CsA-Therapie			
BD (Brain Death) LD (Living Donor)			

3.1.2 Versuchsgruppen

BD-Gruppen akutes Modell:

Für das akute Modell wurden die Spender/Empfängerratten in 4 Gruppen aufgeteilt (behandelt/unbehandelt x 2 Zeitpunkte, n= 7-9/Gruppe), wobei die finale Allograftentnahme zu 2 verschiedenen Beobachtungszeitpunkten stattfand: Der 1. Zeitpunkt wurde auf 18h p. t. bzw. 24h nach Hirntodinduktion festgelegt, der 2. Zeitpunkt auf 7d nach NTx, da hier die Inzidenz akuter Abstoßungen am größten ist. Das Ende des Beobachtungszeitraumes wurde durch die Organ- und Blutentnahme nach Transplantation der Empfängertiere definiert, die je nach Gruppenzugehörigkeit, eine Niere eines vor- bzw. unbehandelten hirntoten Spendertieres erhalten hatten. Das entnommene Allograft, die Milz und Blutproben wurden aufgearbeitet bzw. Proben asserviert. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

Methoden	Nierenallograft	Blut	Empfängermilz
Histopathologie	x	-	-
Immunhistologie	x	-	-
real-time RT-PCR	x	-	x
<i>FACS-Analysen*</i>	x	x	-
<i>ELISA-Analysen*</i>	x	x	x

(*Ergebnisse werden durch eine weitere Doktorandin der Arbeitsgruppe noch veröffentlicht)

LD-Gruppen akutes Modell:

Die Versuchstiere der Lebendspendergruppen im akuten Modell wurden ebenso in 4 Gruppen eingeteilt (behandelt/unbehandelt x 2 Zeitpunkte, n= 3/Gruppe). In diesen Gruppen erfolgte keine Hirntodinduktion im Spender; die Probenentnahme und -analyse erfolgte analog zu den Gruppen der Hirntodspender.

BD-Gruppe chron. Modell:

Im chronischen Modell wurden die Versuchstiere in 2 Gruppen eingeteilt (behandelt/unbehandelt x 1 Zeitpunkt, n= 4-5/Gruppe), die Organentnahme erfolgte durchschnittlich an Tag 150 p. t.. Abweichend zum akuten Modell erfolgte die Explantation der kontralateralen Niere nicht während der Transplantation, sondern erst am Tag 10 nach NTx. Um eine frühe akute Abstoßung zu verhindern, erhielten die Tiere zusätzlich eine CsA-Induktionstherapie über 10d. Serielle Blut- und Urinkontrollen zur Beurteilung der Funktion des Allografts, erfolgten an den Tagen 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Tag nach NTx. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde das Allograft, die Milz und Blut für die im akuten Modell beschriebenen Untersuchungen entnommen.

LD-Gruppe chron. Modell

Die Versuchstiere wurden hier in 2 Gruppen eingeteilt (behandelt/unbehandelt x 1 Zeitpunkt, n= 4-5/Gruppe). Es erfolgte keine Hirntodinduktion, jedoch eine CsA-Induktionstherapie über 10d sowie die kontralaterale Nephrektomie an Tag 10 p.t.. Serielle Blut und Urinkontrollen sowie Untersuchungen der entnommen Organe am Ende es Beobachtungszeitpunktes erfolgten analog zur BD-Gruppe.

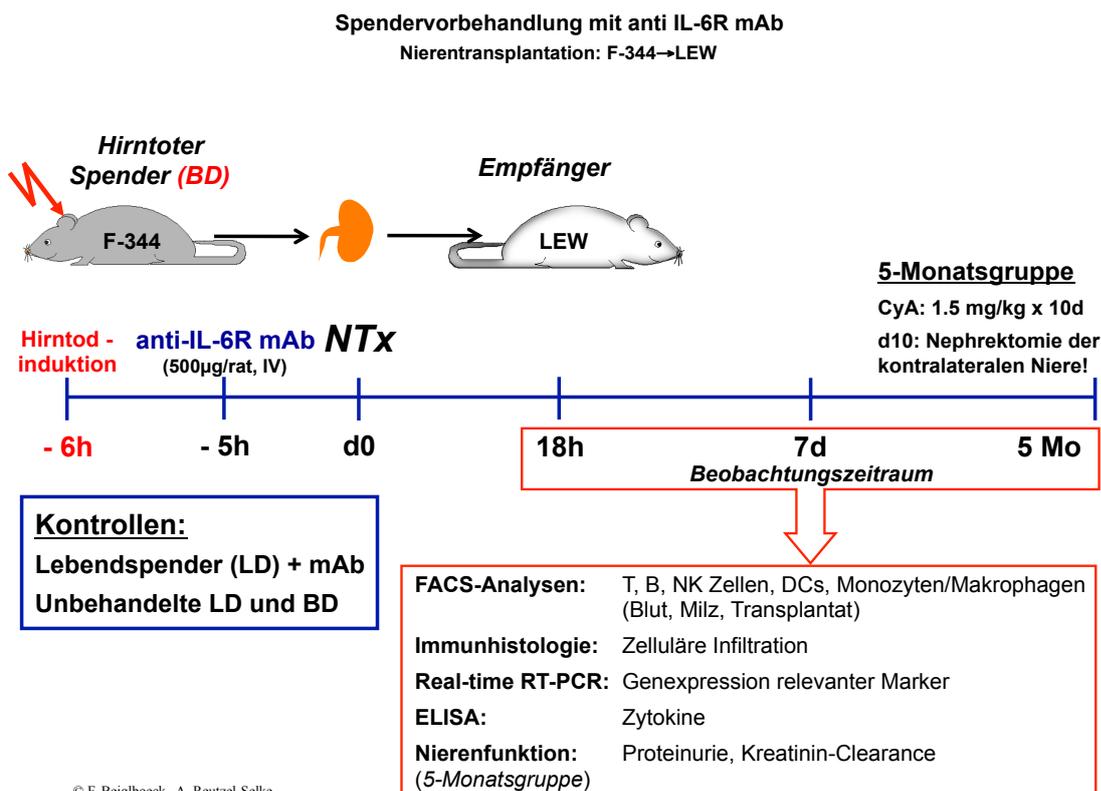


Abb. 4 Versuchsaufbau

3.1.3 Versuchstiere, Haltung, Markierung

Für die experimentellen Untersuchungen wurden ausschließlich 3 Monate alte männliche, 200-250g schwere Ratten der Inzuchtstämme Fischer (F344) und Lewis verwendet. Als Spender dienten Fischer-Ratten, deren Nieren in Lewis-Ratten transplantiert wurden. Alle Ratten wurden bei Harlan Winkelmann (Bochum, Deutschland) käuflich erworben. Die Tierversuche dieser Arbeit wurden durch das zuständige Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G 0069/05). Betreuung und Aufsicht erfolgte in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité unter Leitung von Herrn PD. Dr. med. vet. C. Große-Siestrup.

Je 4-6 Ratten wurden in einem Standardkäfig (BHT 60x20x40cm, Tecniplast, Buguggiate, Italien), bei 22°C Raumtemperatur, einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus sowie freiem Zugang zu Wasser und Futter, artgerecht gehalten. Zur Identifikation wurden die Ratten an der Schwanzwurzel mittels wasserunlöslicher Farbe markiert.

3.2 Operationstechnik

3.2.1 Anästhesie und Spendervorbereitung

Die Induktion der Narkose wurde mit Isofluran (4 Vol%) durchgeführt. Anschließend wurde den Versuchstieren das Abdomen rasiert, die Ratten in Rückenlage auf einer mit einem OP-Tuch abgedeckten Korkunterlage unter dem Operationsmikroskop fixiert und die Bauchdecke desinfiziert. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde ein Inhalationsgemisch aus 2 Vol% Isofluran und Sauerstoff verwendet, welches kontinuierlich über eine Mund-Nasen-Maske appliziert wurde. Durch Änderung der Isoflurankonzentrationen konnte die Narkosetiefe den Operationsbedingungen angepasst werden.

Für alle Transplantationen wurde gewöhnlich die linke Niere gewählt, da ihre anatomische Lage und Gefäßverlauf die Operation erleichtern. Alle chirurgischen Eingriffe fanden unter sauberen, nicht aber unter sterilen Bedingungen statt. Über die Penisvene wurde zu Beginn jeder Spender prophylaktisch mit 100 IE Heparin heparinisiert. [11, 34]

3.2.2 Nephrektomie des Spenders

Zur Explantation der Spenderniere wurde in der Mittellinie mit einer stumpfen Präparierschere längslaprotomiert. Ein Retraktor gewährleistete die Sicht auf den Situs. Um eine freie Sicht auf die Niere zu bekommen, wurde das Darmpaket zur Gegenseite mobilisiert und mit feuchten Kompressen (0.9 NaCl) fixiert. Mithilfe von Tupfern wurde unter 16-facher Vergrößerung neben Arteria und Vena renales der Ureter sowie Aorta und Vena cava inferior (VCI) freipräpariert. Periureterales Fettgewebe wurde am Ureter zu dessen besseren Versorgung belassen und mögliche renale Kollateralgefäße mit 6-0 Seide legiert. Anschließend wurde die Niere gelöst und der Ureter zwischen Blase und Niere mit einem Scherenschlag abgesetzt. Zum Auswaschen von Erythrozyten bzw. Spülen der Niere wurde nun die Aortenbifurkation mit einem Venenverweilkatheter punktiert und Aorta sowie VCI subdiaphragmal abgeklemmt. Eine bifurkationsnahe Inzision der VCI garantierte den Abfluss während der Perfusion. Zum Entfernen der Erythrozyten aus den Nierengefäßen wurde mit 2,5 ml 0,9% NaCl-Lösung über den Katheter perfundiert. Zur Konservierung wurde mit 1,5 ml UW-Lösung nochmals gespült. Schließlich wurde zum Erhalt des natürlichen Ostiums der Art. renalis die Art. renalis mit einem kleinen Patch aus der Aorta herausgeschnitten und die Ven. renalis nahe der Aorta abgesetzt. Zum Schluss wurde die Niere aus dem Situs entnommen und bis zur Transplantation in UW-Lösung bei 4°C gelagert. [11, 34]

3.2.3 Hirntodmodell

Jede Hirntodinduktion erfolgte standardisiert nach einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Protokoll. Wie die Lebendspender, wurden auch alle Hirntodspender mit Isofluran betäubt und fixiert, wobei Hals- und Kopfpattie sowie die Leisten zusätzlich neben der Bauchdecke rasiert und desinfiziert wurden. Um nach Eintritt des Hirntodes die Beatmung zu garantieren, mussten die Atemwege endotracheal gesichert werden. Nach einem zervikalen Längsschnitt mit der Präparierschere wurde die zervikale Muskulatur soweit stumpf manipuliert, bis eine adäquate Sicht auf die Vorderwand der Trachea gegeben war. Nun wurde die Vorderwand mit zwei Haltefäden fixiert. Für die Intubation mit einer stumpfen Kanüle wurde die Vorderwand mit einem kleinen Schnitt transversal eröffnet, um anschließend einen längeren Vertikalschnitt zu ermöglichen. Nach erfolgter Intubation wurde die Haut mit einer 7-0 Hautnaht genäht. Für die direkte Blutdruckmessung, erfolgte eine laterale Inzision der Leiste, um die Arteria femoralis zu explorieren. Zur Mobilisierung wurde die Arteria femoralis vorsichtig von der benachbarten

Vene freipräpariert und mit vorgelegten Fäden separiert. Nach proximaler Abklemmung und kaudaler Ligatur wurde die Arterie mit einem Skalpell inzidiert, um das Lumen mit einer Mikropinzette behutsam zu dilatieren. Mit Entfernung der proximalen Klemme wurde der Blutdruckkatheter vorgeschoben und per Ligatur fixiert. Dieser wurde dann mit einem mit isotonischer Kochsalzlösung befüllten Transducer und Detektor verbunden. Zuletzt wurde die Leiste genäht. Ratten mit einem arteriellen Mitteldruck (MAP) von ≥ 80 mmHg über 6 h wurde in die Studie aufgenommen, während Ratten mit kleinerem MAP aufgrund der gewebeschädigenden Hypotension ausgeschlossen wurden. Für einen leichteren Zugang zur parietalen Kopfparte und um einer Luxation des Blutdruckkatheters bei möglichen tonisch-klonischen Krämpfen vorzubeugen, wurden die Ratten für die folgende Hirntodinduktion in Bauchlage umgelagert. Anschließend erfolgte dorsoparietal die Entfernung von Kopfschwarte und Periost sowie das Bohren eines Loches in die Sutura sagittalis, in welches ein Fogarty Katheter (Gr.3) eingeführt wurde. Durch vorsichtiges Aufblasen des Ballons stieg der intrakranielle Druck an, bis die Spenderratte das Stadium des Hirntodes erreichte. Bedingungen für diesen waren: maximal dilatierte Pupillen, Apnoe als Zeichen des Aussetzens der Atemaktivität sowie das Erlöschen der Reflexe. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Spendertier aktiv beatmet. Gehörte der Spender zur BD-Gruppe mit Spendervorbehandlung, so wurde diesem 1h nach BD anti-Maus/Ratte IL-6R Antikörper i.v. injiziert. Nach 6h wurde das Spendertier wieder in Rückenlage umgelagert und die Spenderniere auf gleiche Weise, wie bei der in 3.2.2 beschriebenen Methode, entnommen. [121]

3.2.4 Orthotope Nierenimplantation

Die Vorbereitung der Empfängertiere entsprach dem Protokoll der Nicht-Hirntod-Spender. Zur Explantation der linken Empfängerniere wurde ebenfalls längslaparatomiert, das Darmpaket zur Gegenseite luxiert und dieses zwischen feuchten Kompressen fixiert. Nach Freipräparierung der Nierengefäße wurden Aorta und V. cava durch die atraumatischen „De Bakey“-Anastomoseklemme distal und proximal der Vasa renalis geklemmt. Nach Absetzen der Nierenvene und Ureter wurde die Art. renalis aus der Aorta mit einem Patch herausgelöst und die Niere aus dem Situs entfernt. Es folgte das Vorlegen von Eckfäden mit 10-0 Prolene im kranialen und kaudalen Winkel der Aorteninzision. Nun wurde die Spenderniere orthotop im linken Nierenlager des Empfängers so platziert, dass sich die Gefäßstümpfe knapp berührten. Anschließend wurden die Gefäßstümpfe mit der Mikropinzette passiv gedehnt und mit 0.9 %-

tiger NaCl-Lösung gesäubert. Die vorgelegten Eckhaltefäden wurden nun mit dem Aortenpatch legiert. Hierauf erfolgte die End-zu-Seit-Anastomose mit 10-0 Prolenefäden bei einer bis zu 40-fachen Vergrößerung unter dem Operationsmikroskop. Die Anastomose von Ureter und Vene erfolgte nach der etablierten End-zu-End-Technik ebenfalls mit 10-0 Prolenefäden. Durch Öffnen der De-Bakey-Klemme wurde die Spenderniere an das Kreislaufsystem des Empfängers angeschlossen und reperfundiert. Dabei wurde neben der gleichmäßigen Verfärbung der Niere als Folge der Reperfusion auch auf eventuelle Anastomoseninsuffizienzen geachtet. Nach Bedarf wurden diese durch weitere Einzelknopfnähte behoben. Bei Blutverlust oder schwachen Kreislauf erfolgte die Gabe von 1,0 ml NaCl über die Penisvene; die Warmischämie betrug ca. 15 min., die kalte ca. 45 min.. Nach Reponierung der Bauchorgane wurde zunächst das Abdomen und anschließend die Haut (UPS 4-0) fortlaufend genäht sowie die Wunde desinfiziert. Es folgte als Flüssigkeitsdepot die Injektion von je 5 ml NaCl in die rechte und linke Beinbeuge. [11, 34]

3.2.5 Kontralaterale Nephrektomie und Postoperative Therapie

Um die Transplantatfunktion später anhand der Nierenfunktionsparameter beurteilen zu können, wurde den Empfängern im chron. Modell am 10.d p. t. die kontralaterale Niere entfernt. Im akuten Modell erfolgte diese während der Transplantation. Vorbereitung, Narkotisierung und Zugang zur rechten Niere entsprachen der beschriebenen Nephrektomie der Spendertiere. In situ wurden zunächst die Vasa renalis arortennah und der Ureter unterbunden (6-0 Seide) und dann durchtrennt. Zuletzt wurde die Niere aus dem Situs entfernt, das Darmpaket zurückverlagert und das Abdomen wie bekannt verschlossen. Zur Analgesierung wurde den transplantierten Ratten postoperativ 5mg/kg Carprofen s. c. über 2d injiziert sowie 400mg/100ml Metamizol 4d über die Trinklösung verabreicht. Zum Aufwachen wurden die Empfängerratten unter einer Wärmelampe beobachtet und für einen Tag im Käfig isoliert. Um eine akute Abstoßungsreaktion zu vermeiden, wurden im chron. Modell allen Ratten Cyclosporin A (CsA, 1.5mg/kg) über 10d intramuskulär injiziert. [11, 34]

3.2.6 Organentnahmen am Ende des Beobachtungszeitraumes

Am Ende der Beobachtungsperioden wurden die Ratten analog zu 3.2.1 vorbereitet und narkotisiert. Folgend wurde wie in 3.2.2 beschrieben das Retroperitoneum freigelegt. Für die

spätere FACS-Blut-Analyse wurden 5 ml Blut nach Punktierung der Aorta über einen Venenverweilkatheter aspiriert und danach die Aorta subdiaphragmal mit einer Gefäßzange abgeklemmt. Im Folgenden wurde die Aorta inzidiert und die Niere solange über den Venenkatheter mit steriler 0.9 NaCl-Lsg gespült, bis sich diese homogen entfärbte. Nach Absetzen von Ureter und Nierengefäßen wurde die Niere entnommen. Die Tötung des Tieres erfolgte in tiefer Narkose und Einschneiden des Zwerchfelles und der großen herznahen Gefäße. Zuletzt wurde die Milz aus dem Situs entfernt, zweigeteilt und je zur Hälfte für die FACS-Analyse in RPMI-Medium bzw. für die Real-Time PCR in flüssigen Stickstoff konserviert. [11, 34]

3.3 Überwachung der Transplantatfunktion

3.3.1 Datenerhebung

Zur Überwachung der Nierenfunktion wurde im chronischen Modell die Proteinurie sowie die Kreatinin-Clearance der transplantierten Ratten an den Tagen 15, 30, 60, 90, 120 und 150 post transplantonem bestimmt. Wie in der Literatur beschrieben korreliert beim Menschen der Schweregrad der Proteinurie mit dem Transplantatüberleben [122, 123]. Auch bei der Ratte kommt es zu histomorphologischen Veränderungen im Rahmen einer chronischen Transplantationsnephropathie [124] Die Kreatinin-Clearance erlaubt einen Rückschluss auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), einem der wichtigsten Parameter der Nierenfunktion.

3.3.3.1 Bestimmung der Kreatinin-Clearance

Nach erfolgter Narkotisierung, wie in 3.2.1 beschrieben, wurde über die Schwanzvene 1ml Blut in eine EDTA-Monovette aspiriert. Die Serum- und Urinkreatininkonzentrationen wurden im Institut für Labormedizin und Pathobiochemie der Charité nach modifizierter Jaffé-Reaktion bestimmt und die Kreatinin-Clearance nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kreatininclearance (C) (ml/min)} = \frac{\text{Urinvolumen/Zeit (ml/min)} \times \text{Kreatinin im Urin (mg/ml)}}{\text{Kreatinin im Serum (mg/ml)}}$$

3.3.1.2 Bestimmung der Proteinurie

Hierfür wurden die Tiere isoliert für einen Tag in einem Metabolischen Käfig gehalten und der 24-Stunden-Urin gesammelt. Das Urinvolumen und die Aufenthaltsdauer im Käfig wurden notiert. Neben der Elektrolyt- und Harnstoffkonzentrationsbestimmung des Sammelurins

erfolgte die Determinierung der Proteinurie über die Benzethoniumchloridreaktion im Institut für Labormedizin und Pathobiochemie der Charité.

3.4 Histomorphologische Untersuchung

Zuerst wurden die in 10%igem Formaldehyd fixierten Proben des Nierenallografts im verwendeten Paraffinautomaten maschinell in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration entwässert und in Paraffin eingebettet. Durch das Intermedium „Paraclear“ wurde hierbei der Alkohol verdrängt und die Paraffinaufnahme in das Gewebe gefördert. Die Paraffinierung der Proben erfolgte langsam bei 55-62°C. Mit dem Mikrotom wurden Schnitte von 5µm angefertigt und in einem Wasserbad (30°C) gestreckt, auf einen Objektträger aufgetragen und über Nacht getrocknet. Auf die Entparaffinierung mit Xylolersatz, folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration. Nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (H&E), folgten die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie eine Inkubation (2x15 min.) im Paraclearbad. Zuletzt erfolgte die Fixierung der Schnitte in einem xylolhaltigen Einbettmedium.

3.4.1 Auswertung Histologie

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich durch eine IL-6R-Spendervorbehandlung histologische Zeichen einer akuten Abstoßungsreaktion und einer CAN im Rahmen der Alloreaktion entwickeln. Alle Gewebeschnitte wurden verblindet ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit des entsprechenden Tieres auf Grundlage eines für diese Arbeit entwickelten Bewertungssystems unter dem Mikroskop (400-fache Vergrößerung) evaluiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an 3 Zeitpunkten: 18 Stunden und 7 Stunden zur Beurteilung einer evtl. akuten Abstoßung sowie nach 5 Monate zur Beurteilung einer möglichen CAN.

Hierbei wurde der Grad (°) der zellulären Infiltration, tubulären und glomerulären Atrophie sowie Arteriosklerose mittels einer semi-quantitativen Skala von „0“ bis „3“ anhand von 20 Gesichtsfeldern je Schnitt beurteilt: Während „0“ einer morphologisch intakten Niere entsprach, zeigte „3“ dagegen eine sehr stark pathologisch veränderte Niere bis hin zur kompletten Destruktion. Weiter wurde jeder Schweregrad durch einen spezifisch prozentualen Schweregrad definiert: [0] kein 0 %, [1] leicht < 50 %, [2] mäßig stark = 50 %, [3] sehr stark > 50 %. Wird eine Tubulitis mit einer signifikanten interstitiellen Infiltration von Entzündungszellen (> 25%

des Parenchyms betroffen) nachgewiesen sowie zusätzlich entzündliche Veränderungen der Lamina intima der Arterien bis zur Entzündung aller 3 Wandschichten und /oder fibrinoide Veränderungen, so liegt histomorphologisch eine akute Abstoßung vor.

Nach der Banff Klassifikation definieren Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose die CAN; der Grad der Glomerulopathie gibt erste Hinweise. Lichtmikroskopisch (400-fache Vergrößerung) wurden in 20 Gesichtsfeldern alle sichtbaren Glomeruli auf eine etwaige Glomerulosklerose evaluiert. Im chronischen Modell wurden zur Beurteilung der Glomerulopathie zusätzlich die pathologisch veränderten Glomeruli pro Schnitt auf die Gesamtzahl aller pro Schnitt gezählten Glomeruli prozentual ins Verhältnis gesetzt. Ebenso galten Kapillarsklerosierung, Verdickung der Bowman'schen Kapsel mit Verbreiterung des Mesangiums als Kriterien (im Gesunden sind Tubuluswand und Kapillarwände gleich dick) für eine CAN. Da IL-6 die Proliferierung des Mesangiums direkt stimuliert, war hier schon eine erste Aussage zum therapeutischen Nutzen der Spendervorbehandlung möglich. [125]

Grad	0 „keine“	1 „leichte“	2 „mäßig stark“	3 „sehr stark“
zelluläre Infiltration	0%	< 50%	50%	> 50%
Tubulusemorphologie	0%	< 50%	50%	> 50%
Gefäßmorphologie	0%	< 50%	50%	> 50%
Glomerulomorphologie	0%	< 50%	50%	> 50%
Glomerulosklerose (CAN Kriterium)	Anzahl destrukturierter Glomeruli/Gesamtzahl der Glomeruli pro Schnitt			
Arteriosklerose (CAN Kriterium)	Anzahl arteriosklerotisch veränderter Arteriolen/Gesamtzahl der Arteriolen pro Schnitt			

Tabelle 1 Bewertungssystem zur histologischen Einschätzung des Schweregrades der Transplantatschädigung nach allogener Nierentransplantation

3.5 Immunhistologische Untersuchung

Bei akuten und chronischen Abstoßungen ist eine Infiltration des Nierentransplantats durch immunologisch aktive Zellen zu beobachten. Mit der von Cordell beschriebenen APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) können Zellen zellulärer Infiltrate im Transplantat anhand ihrer Oberflächenmoleküle weiter differenziert werden. [126] Im ersten Schritt dieser Methode bindet ein primärer Maus-Anti-Ratte Antikörper mit Spezifität

für bestimmte Oberflächenmoleküle an einen sekundären Kaninchen- Anti-Maus Antikörper. Im zweiten Schritt wird ein tertiärer, gegen den Sekundärantikörper gerichteter Anti-Kaninchen AK, der an den APAAP-Komplex gekoppelt ist, eingesetzt. Im finalen Schritt wird ein Chromogen/Substrat Komplex verwendet, der Naphtol-AS-Bi-Phosphat als Substrat für die Alkalische Phosphatase (AP) sowie Neufuchsin als Chromogen enthält (roter Farbumschlag). Aus den asservierten Nierenproben wurden Kryoschnitte angefertigt. Kryoschnitte von Milzproben nativer Ratten dienten als Positiv-Kontrollen. Mit dem Kryotom wurden je Organ 8-10 Gefrierschnitte von je 4 µm Schnittdicke (-23°C Blocktemperatur, -26°C Boxtempertur,) angefertigt. Nach 10 min Fixierung in Aceton wurden die Schnitte 24 h luftgetrocknet und bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Vor Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, nochmals in Aceton fixiert (10 min) und luftgetrocknet. Nach der Inkubation mit Normal-Kaninchenserum (300 µl/Objektträger, 30 min, bei RT, im Dunkeln) zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen, folgten drei Waschvorgänge mit Tris-gepufferter NaCl-Lösung (TBS, pH= 7,4). Diese wurden nach jedem weiteren Inkubationsschritt wiederholt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen monoklonalen Primärantikörper (Maus Anti-Ratte) in entsprechender Verdünnung (200 µl/Objektträger, 90 min, bei RT, im Dunkeln). Nach anschließender Inkubation der Schnitte mit dem Brückenantikörper (Kaninchen Anti-Maus-IgG, 1:150, 60 min, bei RT, im Dunkeln) wurde der APAAP-Komplex auf die Objektträger aufgetragen (1:100, 60 min, bei RT, im Dunkeln). Zuletzt wurden die Immunkomplexe mit dem Substrat/Chromogen System visualisiert und mit Hämatoxylin (2 min) gegengefärbt. Die Eindeckelung der Objektträger erfolgte mit Kaiser's-Glyceringelantine. Schnitte ohne Primär- bzw. Sekundärantikörper dienten als Negativkontrollen.

3.5.1 Immunhistologische Auswertung

Wie erwähnt, führt der Hirntod im Spender zu einer gesteigerten IL-6-Ausschüttung, welche vor der eigentlichen Transplantation zu einer gesteigerten Immunogenität des Transplantats führt. Zusammen mit den negativen Einflüssen des I/R-Schadens kommt es hierdurch im Empfänger zu einer funktionellen und morphologischen Einschränkung des Transplantats bis hin zur totalen Transplantatdysfunktion. Wir nahmen an, dass eine Spendervorbehandlung mit anti-IL-6R mAb zu einer Inhibierung des IL-6-Moleküls führen und sich konsekutiv eine Minimierung der initialen Transplantschädigung sowie der chronische Transplantatveränderungen einstellen wird.

Der Schweregrad, der durch den Hirntod und I/R-Schaden induzierten inflammatorischen Reaktionen im Transplantat wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Expression und Infiltrationsrate von Entzündungszellen (ED1+ Makrophagen/Monozyten, CD4+/CD8+ T-Zellen) sowie von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) der MHC Klasse II im Nierenallograft evaluiert. Hierfür sowie zur Unterscheidung der transplantatinfiltrierenden Leukozyten und der Differenzierung der histomorphologischen Veränderungen des Allograft erfolgten immunhistologische Untersuchungen mittels der APAAP-Methode 18h, 7d und 5 mths nach Reperfusion. Hierbei wurde immunhistochemisch gegen folgende Antigene gefärbt:

Typ	Klon	Verdünnung*
Maus Anti-Ratte ED1 (Antigen Monozyten/Makrophagen)	ED1, Isotyp Maus IgG1,	(1:400)
Maus Anti-Ratte CD8 (Antigen zytotoxische T-Zellen)	MRC OX8, Isotyp Maus IgG	(1:400)
Maus Anti-Ratte CD4 (Antigen CD4+ T-Helfer Zellen)	W3/25, Isotyp Maus IgG1	(1:200)
Maus Anti-Ratte IA (MHC-II, Ia-Antigen auf Antigen-präsentieren Zellen)	OX3, Isotyp Maus IgG1	(1:400)

Alle Gewebeschnitte wurden verblindet unter dem Mikroskop (400 fache Vergrößerung) evaluiert. Es wurden in mindestens 20 Gesichtsfeldern pro Schnittpräparat die spezifisch angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld im Transplantat ausgezählt. Abschließend wurde das arithmetische Mittel der transplantatinfiltrierenden Zellen pro Gesichtsfeld gruppenabhängig ermittelt.

3.6 TaqMan-Real-Time-PCR

1984 entwickelte Kary Mullis die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Abschnitten bekannter Sequenzen. Auf dieser Methode basiert die Real-Time PCR über die mittels Fluoreszenzfarbstoffe die Zunahme von PCR-Produkten in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Detektion spezifischer Gene oder Genabschnitte erfolgt über sequenzspezifische Sonden-Hybridisierung und den sog. Fluoreszenz -Energietransfer (FET). Bei der Sonde handelt es sich um ein fluorogenes Oligonucleotid, welches hochspezifisch für das zu amplifizierende Gen ist und am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszenin-Derivat) bzw. am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markiert ist; zusätzlich ist das

3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert, wodurch die Sondenextension unterbunden wird. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch den Fluoreszenz-Energietransfer (FET) supprimiert. [127, 128]

In den durchgeführten Genanalysen verwendeten wir Sonden, welche am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff FAM (6-Carboxy-fluoreszin) markiert waren.

Während der PCR hybridisiert zunächst die Sonde mit den Primern an dem Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft dann die Taq Polymerase auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe - und damit auch der FET - zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Dadurch wird die Reporterfluoreszenz durch den Quencher nicht mehr ausgelöscht und kann über die CCD-(Charge-coupled Device) Kamera des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System im Thermocycler detektiert werden. (Abb. 5) Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Anzahl der Zyklen zu. Die Fluoreszenzkurve zeigt daher einen exponentiellen Verlauf, welcher mit Verbrauch der Reaktionspartner (Primer, Nucleotide) in ein Plateau übergeht. Nur in der exponentiellen Phase erfolgte die Detektion, da nur dort optimale Reaktionsbedingungen herrschen. [128]

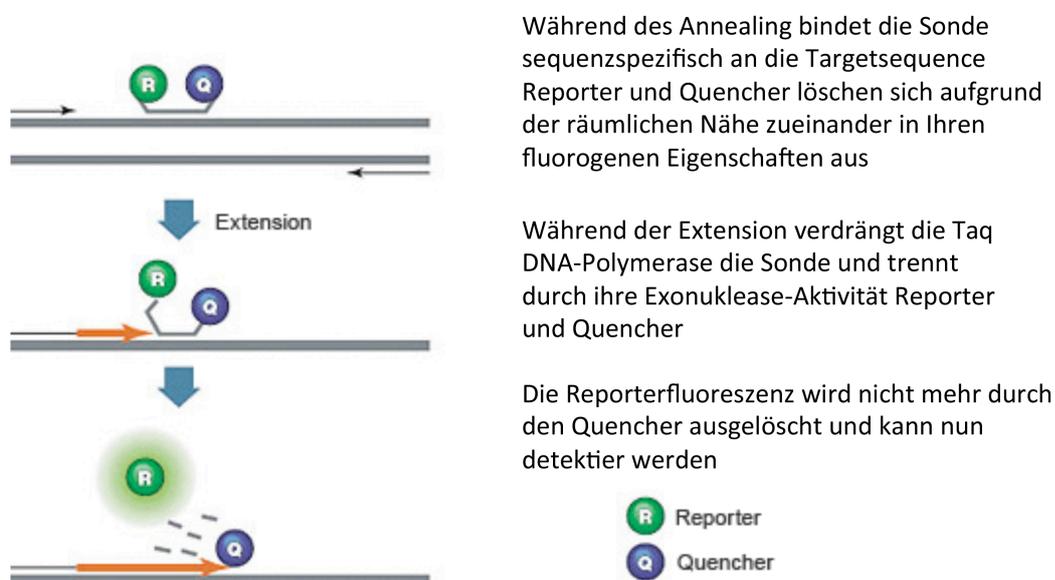


Abb. 5 TaqMan-Real-Time-PCR; angelehnt an [129]

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung der ursprünglichen mRNA und damit der Genexpression der zu untersuchenden Chemo- und Zytokine zu einem Referenz- bzw. „Housekeeping-Gen“. Für jenes Gen ist charakteristisch, dass es nicht-genreguliert, also unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen, konstant exprimiert wird. Als „Housekeeping-Gen“ wurde β -Actin verwendet, welches als Matrix-Protein ubiquitär in allen humanen Zellen vorkommt. Setzt man die Expression des Housekeeping-Gens mit der des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis, so ist eine quantitative Bestimmung der Änderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf möglich.

3.6.1 RNA-Isolierung und Quantitative RNA-Bestimmung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Isolation NucleoSpin RNA II-Kit der Firma Machery-Nagel. Dafür wurden ca. 300 mg der kryokonservierten Organproben (Niere/Milz) in 2000 μ l Lysis-Puffer (RA-1)-Lösung sowie 2-Mercaptoethanol (20 μ l) gelöst und mit dem Ultraturrax-Gewebe-Homogenisator (Jahnke und Kunkel, Staufen i. Breisgau, Deutschland) (30 sec., max. Stufe) mechanisch homogenisiert. 1600 μ l des Homogenisats wurden bei -80°C für evtl. Nachmessungen zwischengelagert. Das restliche Homogenisat (400 μ l) wurde zur Aufreinigung und Viskositätsminderung über den NucleoSpin Filter bei Raumtemperatur (RT) filtriert und zentrifugiert (11000 rpm, 1 min). Zur Ausfällung der Nucleinsäuren wurde das Filtrat mit 400 μ l 70%igem Ethanol versetzt und gevortext. Zur Aufreinigung und Trennung der Nucleinsäuren von Zellbestandteilen wurde das Filtrat in eine Silicagel-Membran (NucleoSpin RNA II Column) überführt und zentrifugiert (30 sek RT, 11000rpm). Hier binden die Nucleinsäuren bei hoher Salzkonzentration an die Silicagel-Membran und werden mittels mehrerer Waschschriffe gereinigt. Die Entsalzung der Membran wurde mit Hilfe eines Membran-Desalting-Buffer (400 μ l) und erneuter Zentrifugation (30 sek. RT, 11000 rpm) durchgeführt. Zur Auftrennung von DNA und RNA erfolgte ein DNA-Verdau mit DNase reaction mix (95 μ l, bei RT, 30 min). Durch 3 Waschschriffe wurde die rDNase deaktiviert und die Membran von dann befreit. Zuletzt wurde die RNA mit 60 μ l RNase freiem H_2O inkubiert (3 min) und von der Membran eluiert (RT, 11000 rpm 1min).

Die RNA-Konzentrationen der Proben wurde photometrisch mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer (NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer, Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren. Hierbei

gilt, dass eine Absorptionseinheit A_{260} 40 μg ssRNA/ml entspricht.* Zusätzlich wurden durch graphische Darstellung des Absorptionsspektrums der Wellenlängen von 220 - 350 nm im Nano-Drop® mögliche Verunreinigungen (Lösungsmittel/Proteine) der Proben detektiert. Für reine RNA galt eine Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} von ca. 1,9 - 2,1. Verunreinigungen bzw. Absorptionsquotienten $< 1,7$ kamen nicht vor. Dreimal wurde die Konzentration je Probe bestimmt und das arithmetische Mittel gebildet.[103]

3.6.2 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Zytokinexpression mittels rt-PCR muss die mRNA der gewonnenen Proben zunächst in cDNA transkribiert werden. Diese sog. cDNA liegt dann als Einzelstrang-DNA vor. Die cDNA-Synthese bestand aus zwei Arbeitsschritten: Im ersten Schritt wurden die RNA-Proben möglichen DNA-Kontaminationen durch einen DNA-Verdau befreit; im zweiten erfolgte die cDNA-Synthese. Zunächst wurden 2 μg RNA in DEPC-H₂O in insgesamt 18 μl gelöst und mit 2 μl odT-Primer (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Danach wurde die Lösung gevortext, abzentrifugiert und für die Denaturierung der Primer bei 75°C (10 min) inkubiert. Es folgte der Verdau durch Zugabe von 18,5 μl des Mixansatzes** und Erwärmung für 30 Minuten bei 37°C im Thermocycler. Zur DNase-Inaktivierung wurden die Proben erhitzt (75°C, 5 min). Im zweiten Schritt wurde für die Umschreibung in cDNA jeweils 1 μl Reverse-Transkriptase und RNase-Inhibitor hinzugefügt und das Gemisch erwärmt (42°C, 60 min). Zur Transkriptaseinaktivierung wurde das Gemisch erhitzt (94°C, 5 min) und die erhaltene cDNA bei -20°C gelagert.

*Best. der RNA-Konz.:

$$c \frac{\mu\text{gRNA}}{\text{ml}} = A_{260} \times 40$$

**Der Mixansatz bestand aus:

8	μl	Reactionbuffer
4	μl	dNTPs (2,5 mM)
4	μl	Aqua dest.
2	μl	DNase
0.5	μl	RNase-Inhibitor (40u/ μ)

3.6.3 TaqMan-Real-Time-PCR – Protokoll

Zunächst wurde 1 μl der cDNA der zu untersuchenden Proben in MicroAmp® Optical Tubes vorgelegt sowie mit den für die rtPCR benötigten Bestandteilen (TaqMan®- Master Mix bestehend aus AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase, dNTPs mit dUTP)

wie dem genspezifischen Primer, der genspezifischen Sonde und Aqua. dest. vermischt. Anschließend folgten 40 PCR-Zyklen nach einem definierten Temperatur- und Zeitprotokoll. Für jede Probe wurde ein Doppelwert bestimmt. Der Ansatz der Negativkontrollen enthielt keine cDNA.

Da nicht aus jeder Probe der verschiedenen Gruppen, Werte detektiert werden konnte, erfolgte in Ausnahmefällen eine Doppelmessung einzelner Proben verschiedener Gruppen.

Zyklen	Zeit	°C			Probe	NTC	
40	2 min	50°	UNG-Verdau		TM-Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
	10 min	95°	Inaktivierung der UNG/ AmpliTaqGold Aktivierung		Primermix	6 µl	6 µl
					Aqua. dest.	4,5 µl	5,5 µl
					Sonde	1 µl	1 µl
	15 sec	95°	Denaturierung		cDNA	1 µl	0 µl
60 sec	60°	komb. Annealing/Extension					

3.6.4 TaqMan-Real-Time-PCR – Auswertung

Nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte die Berechnung der relativen Quantifizierung der Genexpression zwischen dem Referenzgen (β -Actin) und dem Zielgen. Zuerst wurde der Ct-Wert (Cycle Threshold) beider Gene bestimmt. Dieser Schwellenwert zeigt an, wann die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser ist frei wählbar, muss aber nach logarithmischer Auftragung im linearen Teil der Kurve liegen. Je größer die Ausgangskonzentration der Zielsequenz ist, desto weniger Zyklen müssen durchlaufen werden bis der Schwellenwert erreicht wird; je kleiner also der Ct-Wert desto höher die Expression des Zielgens. Zur Normierung auf das Referenzgen wurde der Ct-Wert von β -Actin vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert (ΔC_t). Die Berechnung des relativen Expressionniveaus des Zielgens erfolgt nach der $2^{-\Delta C_t}$.

3.7 Statistische Verfahren

Die Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte elektronisch nach üblichen Verfahren der deskriptiven Statistik mit der Software GraphPad Prism Version 5.0c und 6.0e (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Alle Werte wurden als MW \pm SA und SF grafisch dargestellt. Mithilfe des D'Agostino & Pearson omnibus normality test wurde die

Normalverteilung der Daten überprüft. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der Students t-test bzw. der nicht-parametrische Mann Whitney-Test verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen (> 2 Gruppen) wurde die einfaktorische "Analysis of Variance" (ANOVA) bzw. der nicht parametrische Kuskal-Wallis test mit den jeweiligen post-hoc tests (Dunn's bzw. Holm-Sidak's multiple comparison tests) eingesetzt. Im Falle zweier Variablen wurde eine zweifaktorielle ANOVA (Two-way ANOVA) angewandt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt.

3.8 Material

Alle verwendeten Materialien sind den folgenden Tabellen zu entnehmen:

OP-Instrumente	
Operationsmikroskop (Model M690)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Präparierschere (Modell No. 14519-14)	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikropinzetten (Model No. 11252-40)	Codman, Norderstedt, Deutschland
Mikroschere (Model No. 15020-15)	"
Mikrogefäßklemmen (Model No. 18320-11)	"
Mikronadelhalter (Model 80-2003)	"
Narkosezylinder / -maske	Eigenbau
Laborgeräte	
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrotom (HM 400)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tischmikroskop (EX41)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Cryotom (HM 500 OM)	Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
Macintosh PC	Apple Corporation, Cupertino, CA, USA
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg
ELISA-Photometer (Fluostar Galaxy®)	BMG, Offenburg, Deutschland
ELISA-Software (Fluostar Galaxy® Ver. 4.21-0)	"
Photometer Fluostar Galaxy	"
Real-Time PCR Systeme:	Applied Biosystems, Darmstadt
- ABI PRISM 7700	"
- ABI 7500	"
DNS Thermo Cycler (TC1)	"
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech, Osterode /Harz, Deutschland
Verbrauchsmaterial	
Faden USP 10-0 (Prolene®)/4-0 (Vicryl®)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Seide, 6/0 „E“	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Cryogefäß, 1,8ml (Nalgene® Cryogenic Vial)	Nalgene Nunc, Rochester, NY, USA
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kompressen 10x10 cm	Lohmann Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Cryoschnitt-Medium	Killik, Mailand, Italien
DAKO-Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
ELISA-Platten, Module je 16 Wells (F16 Maxisorp Loose®; Nr. 469914)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Eppendorf-Gefäße, 2ml	Sarstedt AG&Co, Numbrecht, Deutschland

Li-Heparin-Monovette, 5,5 ml	“
Blutmonovetten	“
Zellsieb, 70 µm (Falcon® Cell Strainer)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Venenverweilkanüle (REF 393204)	“
Kunststoffröhrchen, 14 ml (Falcon®-Tube)	”
Spritzen und Kanülen, versch. Größe	”
Stickstofftanks	Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA
Zellkulturloch Platten	Falcon, Oxnard, USA
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	“
Zellsiebe, 40 und 100 µm Porengröße	“
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	“
Petrischale	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich

Pharmaka

anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R; Klon D7715A7, Isotyp Rat IgG2b κ)	BioLegend/ Biozol, Eching, Germany
Cyclosporin A (CsA, 1.5mg/kg) (Remicade®)	Centocor, Leiden, Niederlande
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
0,9%ige NaCl-Lösung, steril	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Pentazocin (Fortral®)	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland
Heparin (Liquemin®)	Roche, Grenzach-Whyllen, Deutschland
UW-Lösung (ViaSpan®)	DuPont, Bad Homburg, Deutschland

Allgemeine Reagenzien und Lösungen

Ethanol, 100 Vol%, denaturiert	Herbeta, Berlin, Deutschland
Fomaldehyd-Lösung, 4%, gepuffert	“
Aceton, pro analysi	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Paraffin (Kendall Paraplast Plus®)	Tyco, Mansfield, MA, USA
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschl
Tween-20	“

Reagenzien / Lösg. H&E Färbung / Immunhistologie

Hämatoxylin-Lösung (Nr. HHS32-1L)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin-Lösung	“
Kaisers Glyceringelatine (Nr. 1.09242.0100)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Der Waschpuffer enthielt:</i>	
Trizma® Base (Nr. T-1503), 0,9 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizma® Hydrochlorid (Nr. 3253), 6,85 g	“
Natriumchlorid, 8,78 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest., 1 l	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
<i>Die BSA-Verdünnungslösung enthielt:</i>	
Waschpuffer (siehe oben), 10 ml	
Bovines Serumalbumin, 96%ig, 0,1 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Das Neufuchsin-Substrat enthielt:</i>	
Waschpuffer (siehe oben), 105 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propandiol-Lösung, 0,2 M, 37,5 ml	“
Levamisole, 0,06 g	“
Napthol-AS-Biphosphat, 0,075 g	“
N,N-Dimethylformamid, 900	“
Natriumnitrid, 0,03 g	“
Neufuchsin-Lösung, 300	“

Antikörper und Farbreagenzien

ED1 Mouse Anti-Rat (Nr. MCA341R)	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
CD4 Mouse Anti-Rat (MCA55G)	“
CD8 Mouse Anti-Rat (Nr. MCA48G)	“
OX3 Mouse Anti-Rat (MCA45G)	“
Rabbit Anti-Mouse Ig (Nr. Z-0259)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Reagenzien und Lösungen TaqMan-Real-Time-PCR

NucleoSpin RNA II-Kit	Machery-Nagel
NanoDrop®- Spektrophotometer	Fa.NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
TaqMan®- Master Mix	Machery-Nagel

Tabelle 3 Aufstellung verwendeter Instrumente, Geräte, und Verbrauchsmaterialien

4 ERGEBNISSE – AKUTES MODELL

4.1 Histologie

BD Gruppe

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Vorbehandlung hirntoter Spender mit anti-IL-6R mAb eine signifikant reduzierte histomorphologische Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Antikörperbehandlung beobachtet: Es zeigte sich ein signifikant geringerer Schädigungsgrad bei Nierentransplantaten von anti-IL-6R mAb vorbehandelten Hirntodspendern sowohl nach 18h p. t. als auch nach 7d p. t. Bei Transplantaten aus vorbehandelten Hirntodspendern war 18h p. t. im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Schädigung der Glomeruli ($p = 0,0017$), der Tubuli ($p = 0,0031$) und der Gefäße ($p = 0,0054$) sowie eine geringere Zellinfiltration ($p = 0,0026$) festzustellen. Nach 7d waren Zellinfiltration ($p = 0,0430$) und Glomerulischädigung signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ($p = 0,0430$). (siehe Abb. 6,7,8 und Tab. 3)

LD Gruppe

Tendenziell zeigten sich vergleichbare histologische Ergebnisse bei Nierentransplantaten von Lebendspendern, allerdings erreichten die Unterschiede zwischen Transplantaten aus vorbehandelten Lebendspendern und der unbehandelten Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede.

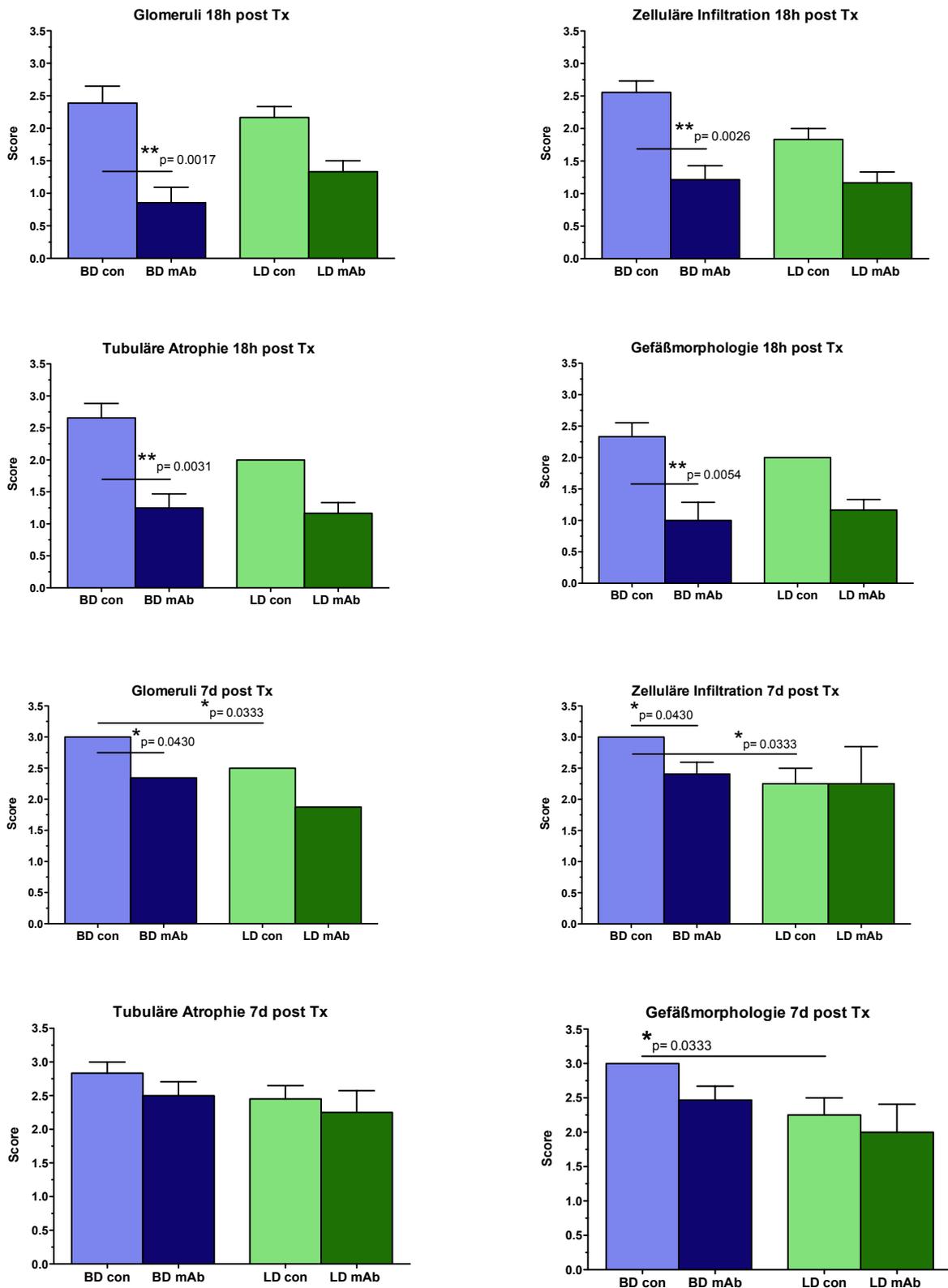


Abb. 6 Histologische Bewertung der allogenen transplantierten Niere (Score 0-4; s. auch Tab. 1)
Die Auswertung der Transplantate erfolgte 18h und 7d nach Reperfusion.

Glomeruli 18h post NTx

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	2,389	0,8571	$p = 0,0017$	2,167	1,333	ns
SA	0,7817	0,6268		0,2887	0,2887	
SF	0,2606	0,2369		0,1667	0,1667	
n	9	7		3	3	

Tubuläre Atrophie 18h post NTx

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	2,656	1,250	$p = 0,0031$	2,000	1,167	ns
SA	0,6400	0,5774		0,0	0,2887	
SF	0,2263	0,2182		0,0	0,1667	
n	8	7		3	3	

Zelluläre Infiltration 18h post NTx

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	2,556	1,214	$p = 0,0026$	1,833	1,167	ns
SA	0,5270	0,5669		0,2887	0,2887	
SF	0,1757	0,2143		0,1667	0,1667	
n	9	7		3	3	

Gefäßmorphologie 18h post NTx

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	2,333	1,000	$p = 0,0054$	2,000	1,167	ns
SA	0,6614	0,7638		0,0	0,2887	
SF	0,2205	0,2887		0,0	0,1667	
n	9	7		3	3	

Glomeruli 7d post NTx

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	3,000	2,344	$p = 0,0430$	2,500	1,875	ns
SA	0,0	0,5967		0,4082	1,031	
SF	0,0	0,2110		0,2041	0,5154	
n	6	8		4	4	

Tubuläre Atrophie 7d post NTx

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	2,833	2,500	ns	2,450	2,250	ns
SA	0,4082	0,5825		0,4472	0,6455	
SF	0,1667	0,2059		0,2000	0,3227	
n	6	8		5	4	

Zelluläre Infiltration 7d post NTx

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	3,000	2,406	$p = 0,0430$	2,250	2,250	ns
SA	0,0	0,5335		0,5000	1,190	
SF	0,0	0,1886		0,2500	0,5951	
n	6	8		4	4	

Gefäßmorphologie 7d post NTx

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	LD con	LD mAb	p-Intervall
MW	3,000	2,469	ns	2,250	2,000	ns
SA	0,0	0,5738		0,5000	0,8165	
SF	0,0	0,2029		0,2500	0,4082	
n	6	8		4	4	

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF), Stichprobe (n)

Tabelle 3 Histomorphologische Auswertung 18h und 7d nach NTx

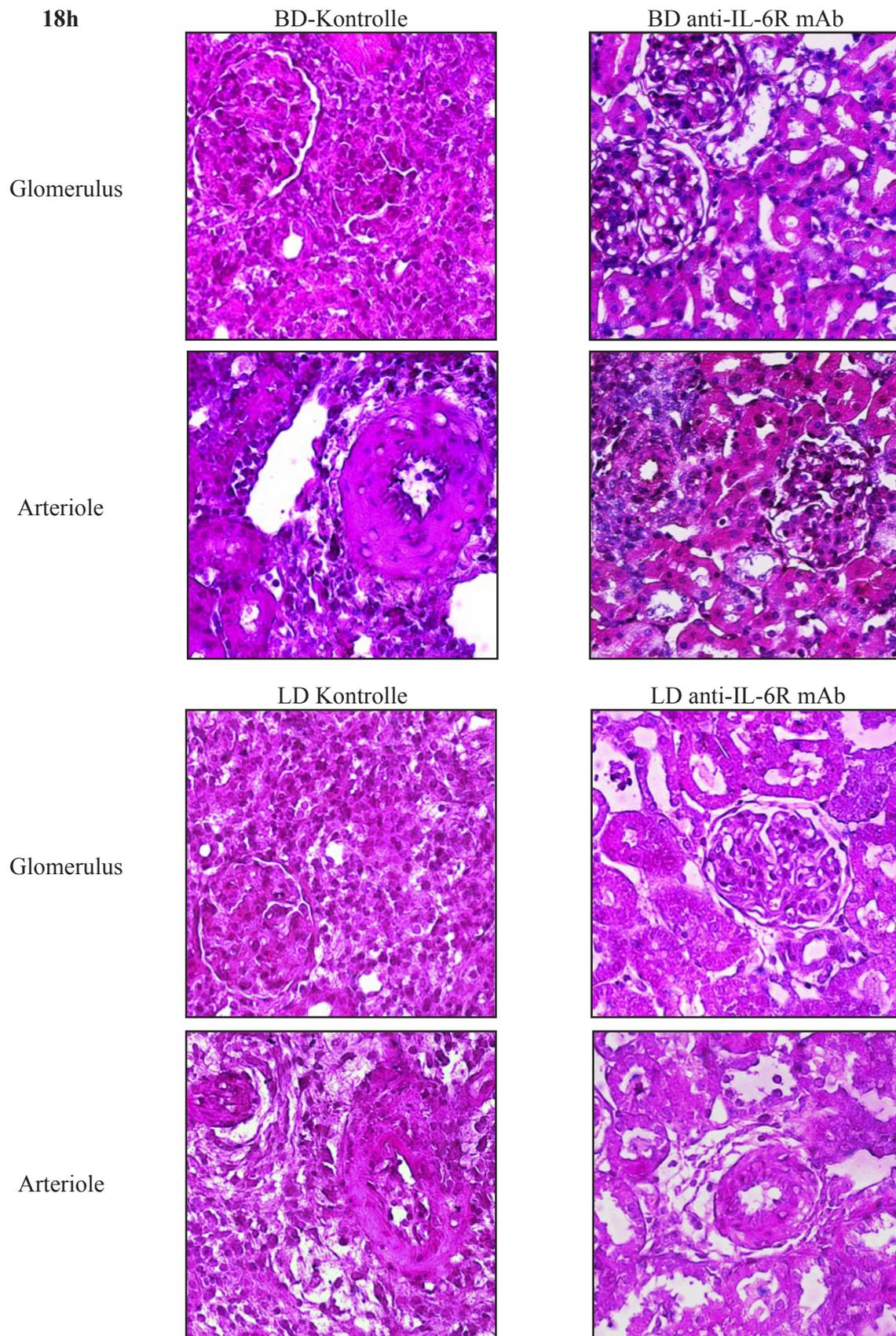


Abb. 7 H&E Färbung (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 18h nach NTx der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

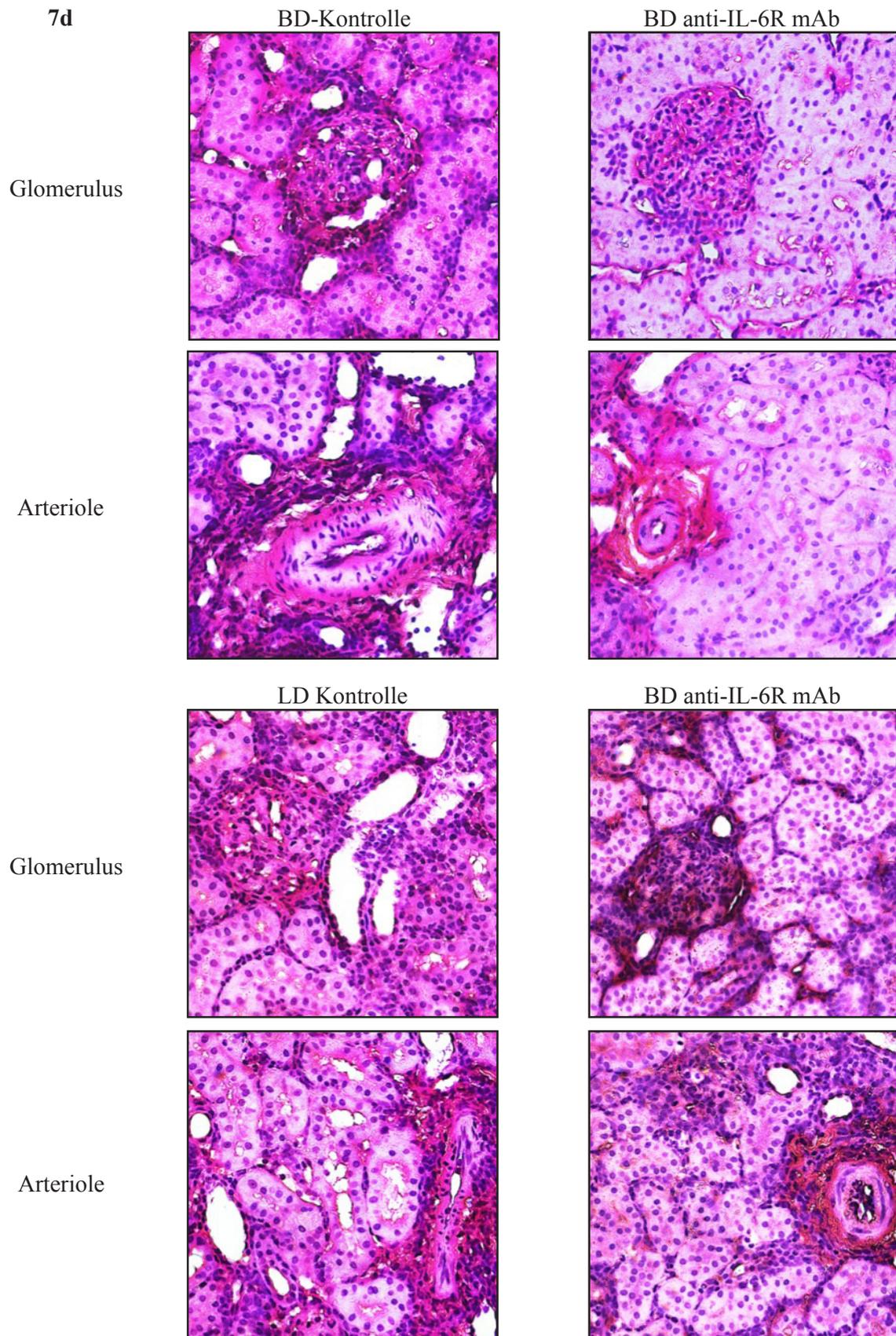


Abb. 8 H&E Färbung (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 7d nach NTx der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

4.2 Immunhistologie

4.2.1 Infiltration von ED1+ Monozyten/Makrophagen

BD 18h und 7d

18h p. t. zeigte sich eine stärkere Inifiltration von ED1+ Monozyten/Makrophagen in der BDmAb-Gruppe im Vergleich zur BDcon-Gruppe. Die Infiltrationsrate der BDmAb-Gruppe war im Vergleich zur BDcon-Gruppe um den Faktor 1,6 erhöht, ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht.

7d p. t. hingegen war die Anzahl ED1+ Zellen in Nierentransplantaten beider Gruppen etwa gleich groß; in der BDmAb-Gruppe im Vergleich zur BDcon-Gruppe war die Infiltration um den Faktor 0,9 reduziert; ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

Über die Zeit (18h vs. 7d) zeigte sich in beiden BD-Gruppen ein signifikanter Anstieg ED1+ Zellen im Transplantat. Während in der BDcon-Gruppe die Infiltration um den Faktor 57,6 ($p < 0,0001$) anstieg, vergrößerte sich unter anti-IL-6R mAb Vorbehandlung die Infiltration jedoch nur um den Faktor 33,3 ($p < 0,0001$).

LD 18h und 7d

Bei Transplantaten aus Lebendspendern zeigte sich 18h p. t. eine tendenziell geringere Infiltration von ED1+ Zellen unter Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Hingegen wurde 7d p. t eine tendenziell stärkere Infiltration von ED1+ Zellen in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur LDcon-Gruppe beobachtet, allerdings erreichten die Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl der Versuchstiere in diesen Gruppen keine statistische Signifikanz.

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde auch hier eine signifikante Zunahme ED1+ Monozyten/Makrophagen im Transplantat beobachtet: Die Infiltrationsrate vergrößerte sich um den Faktor 344,7 ($p < 0,0001$) in der LDmAb-Gruppe. In der LDcon-Gruppe zeigte sich eine Zunahme um den Faktor 38,9 ($p < 0,0165$).

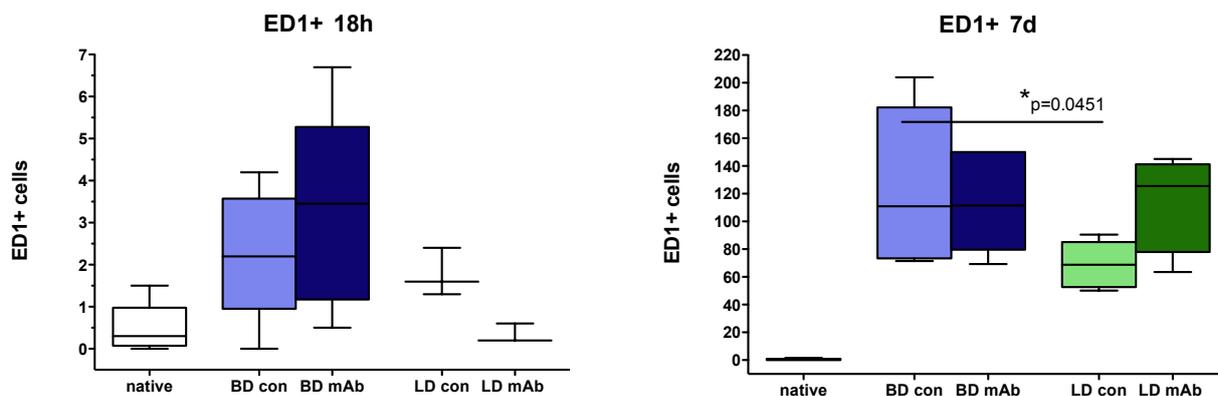


Abb. 9 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung ED1+ Zellen im Nieren-transplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen an 2 verschiedenen Zeitpunkten (18h u. 7d) nach NTx.

ED 1+

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	2,138	3,383	ns	1,6	1,767	0,3333	ns	0,2
SA	1,453	2,248			0,5686	0,2309		
SF	0,5137	0,9178			0,3283	0,1333		
n	8	6			3	3		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	123,2	112,6	ns	0,9	68,88	114,9	ns	1,7
SA	54,42	33,75			16,78	35,60		
SF	19,24	13,78			7,505	17,80		
n	8	6			5	4		
x fach (18h vs. 7d)	57,6 p<0,0001	33,3 p<0,0001			38,9 p<0,0165	344,7 p<0,0001		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 4 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung ED1+ Monozyten/Makrophagen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h und 7d nach NTx.

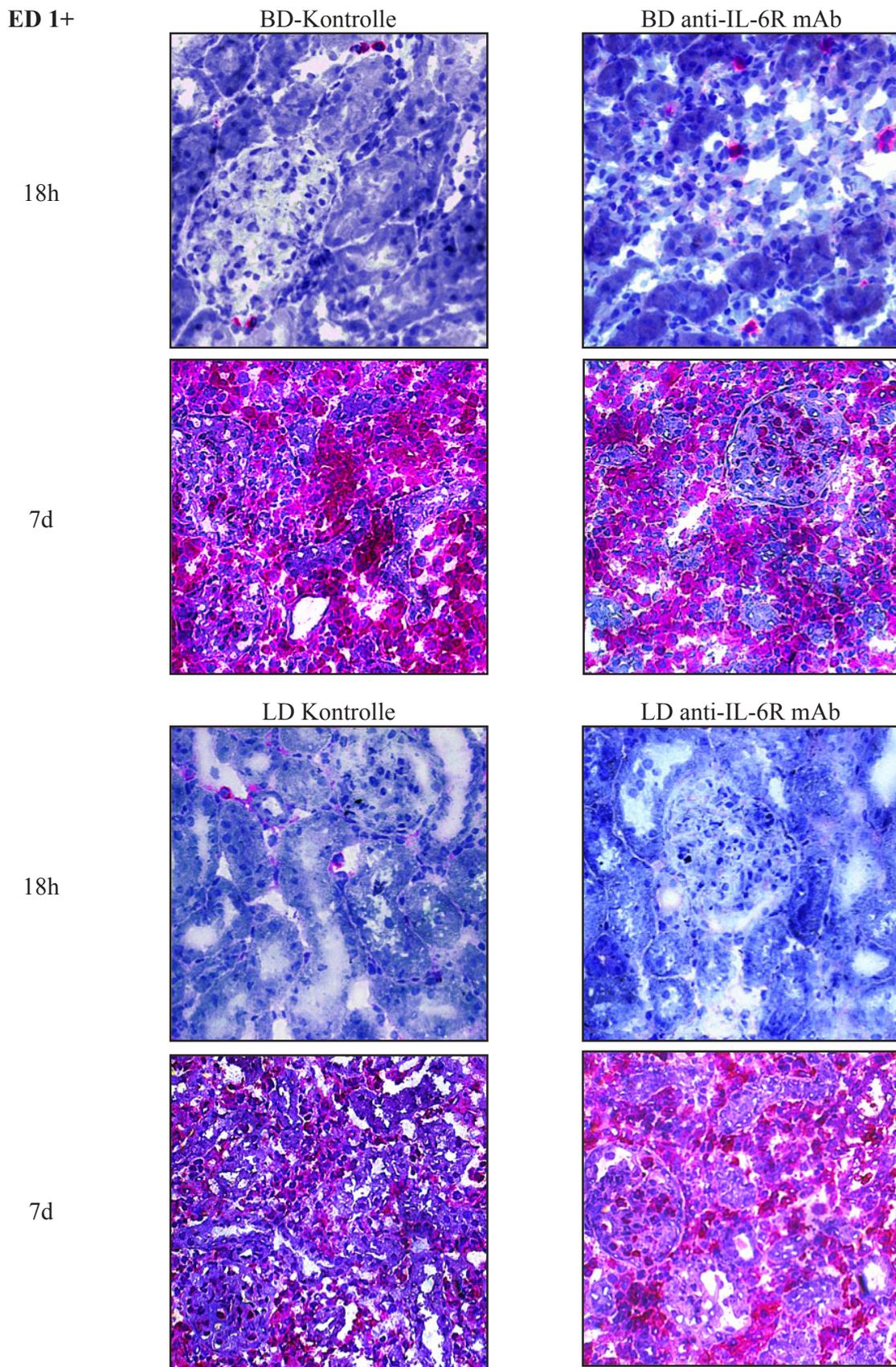


Abb. 10 Immunhistologische Färbungen von ED1+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 18h und 7d nach NTx der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

4.2.2 Infiltration von APZ der MHC-Klasse II

BD 18h und 7d

Wie schon im Falle ED1+ Zellen zeigte sich auch hier 18h p. t. in der Hirntodgruppe unter Spendervorbehandlung eine tendenziell stärkere Transplantatinfiltation von MHC-Klasse-II+ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (BDmAb vs BDcon: $28,80 \pm 17,73$ vs. $12,73 \pm 7,22$; $p = 0,532$).

Derselbe Trend zeigte sich auch nach 7d: Die Anzahl MHC-Klasse II+ APZ war in der BDmAb-Gruppe im Vergleich zur BDcon-Gruppe leicht erhöht, ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht.

Über die Zeit (18h vs. 7d) zeigte sich wiederum eine signifikante Zunahme der Infiltration von MHC-Klasse II+ Zellen: Während in den BDcon-Gruppen die Infiltration um den Faktor 11,2 anstieg ($p=0,0069$), wurde unter anti-IL-6R mAb Vorbehandlung jedoch nur ein 5,6-facher Anstieg ($p=0,0023$) detektiert.

LD 18h und 7d

Bei Verwendung von Transplantaten aus Lebendspendern zeigte sich auch hier 18h p. t. eine tendenziell geringere Infiltration von MHC-Klasse II+ APZ unter Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

7d p. t wurde dagegen eine geringfügig erhöhte Anzahl MHC-Klasse II+ APZ in Transplantaten der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur LDcon-Gruppe beobachtet. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Über die Zeit (18h vs. 7d) zeigte sich auch hier eine starke Zunahme der APZ-MHC-Klasse II Infiltration, allerdings erreichten die Ergebnisse keine statistische Signifikanz.

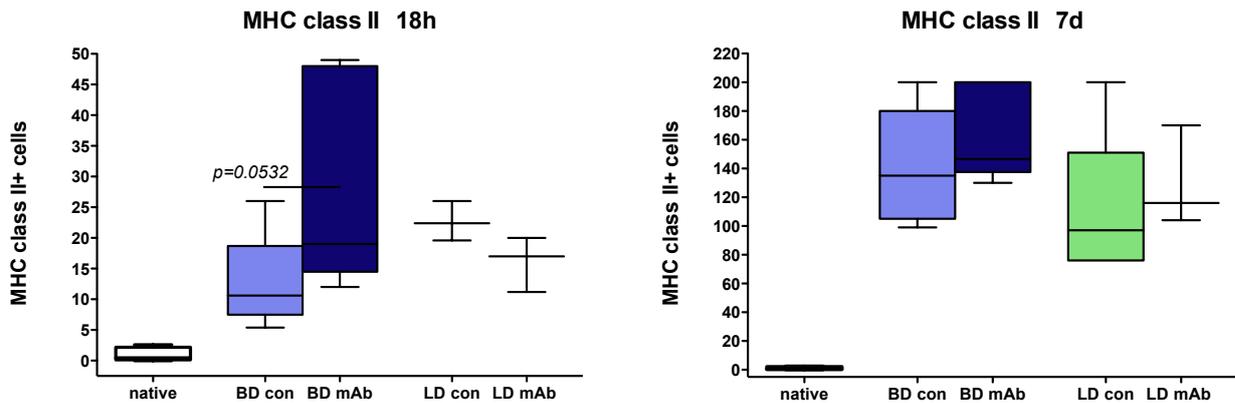


Abb. 11 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung MHC-Klasse-II+ APZ im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h und 7d nach NTx.

MHC II+

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	12,73	28,80	p = 0,0532	2,3	22,67	16,07	ns	0,7
SA	7,218	17,73			3,208	4,474		
SF	2,728	7,927			1,852	2,583		
n	7	5			3	3		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	142,7	160,5	ns	1,1	110,2	130,0	ns	1,2
SA	37,15	31,27			51,59	35,16		
SF	14,04	12,76			23,07	20,30		
n	7	6			5	3		
x fach (18h vs. 7d)	11,2 p=0,0023	5,6 p=0,0069			4,9 p=0,2466	8,1 p=0,1346		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

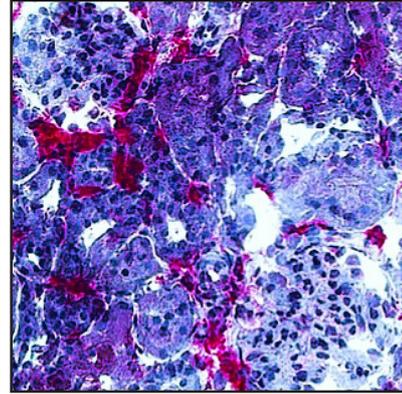
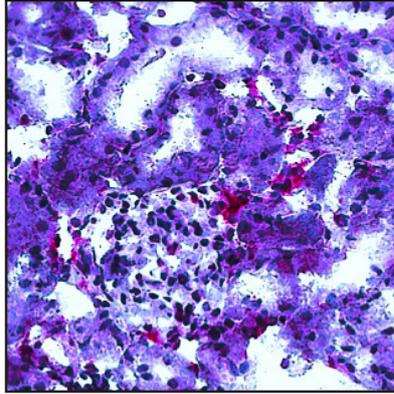
Tabelle 5 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung MHC-Klasse-II+ APZ im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h u. 7d nach NTx.

MHC II+

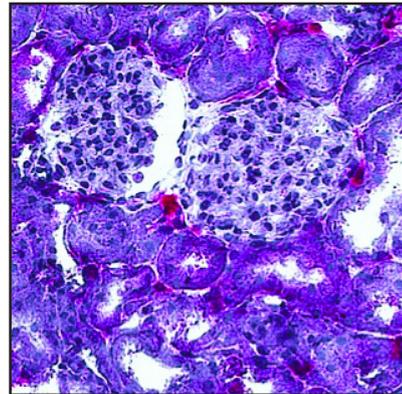
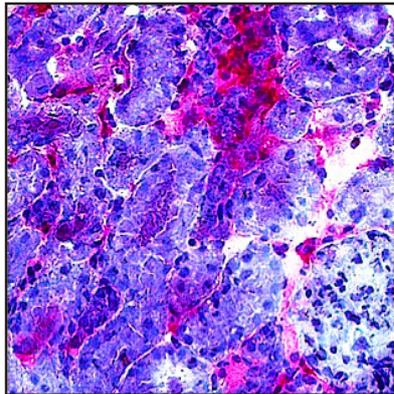
BD-Kontrolle

BD anti-IL-6R mAb

18h



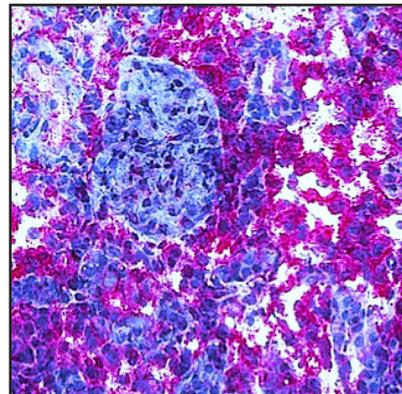
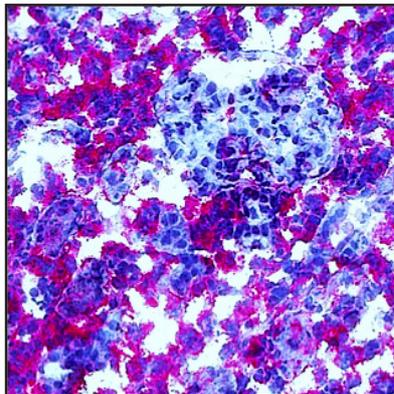
7d



LD Kontrolle

LD anti-IL-6R mAb

18h



7d

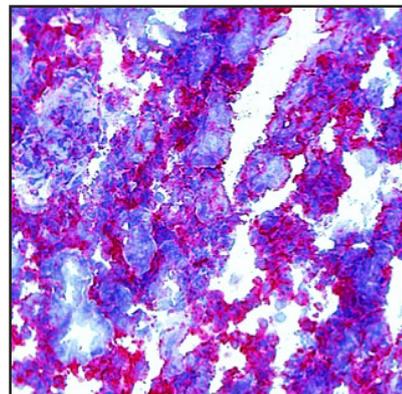
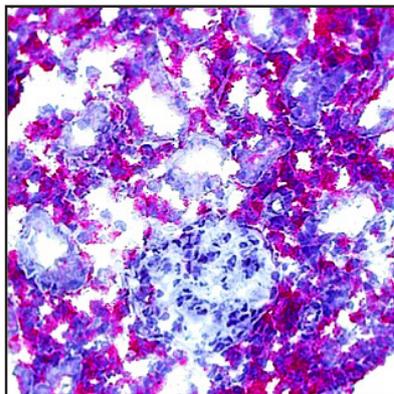


Abb. 12 Immunhistologische Färbungen von MHCII+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 18h und 7d nach NTx der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

4.2.3 Infiltration von CD4+ TH-Zellen

BD 18h und 7d (168 h)

Auch in der immunhistologischen Untersuchung von CD4+ TH-Zellen zeigte sich 18h p.t. in der Hirntodgruppe unter Spendervorbehandlung eine tendenziell erhöhte Zellinfiltration im Vergleich zur Kontrollgruppe: ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

7d p. t. war die Anzahl CD4+ TH-Zellen in Transplantaten der BDmAb-Gruppe signifikant größer als in der unbehandelten Kontrollgruppe (BDmAb vs. BDcon: $77,72 \pm 9,75$ vs. $52,63 \pm 5,38$; $p = 0,0331$)

Über die Zeit (18h vs. 7d) zeigte sich hier ebenfalls eine signifikant gesteigerte Infiltration mit CD4+ TH-Zellen: In der BDcon-Gruppe nahm die Infiltration um den Faktor 11,7 zu ($p < 0,0001$), in den BDmAb-Gruppen um den Faktor 15,1 ($p < 0,0001$).

LD 18h und 7d

In Transplantaten von Lebendspendern zeigten sich weder nach 18h p. t. noch nach 7 Tagen signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl CD4+ TH-Zellen zwischen der vorbehandelten und der Kontrollgruppe.

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde sowohl in der vorbehandelten Gruppe als auch in der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme CD4+ TH-Zellen festgestellt (LDmAb, 18h vs. 7d: $p = 0,0037$, Faktor 5,1; LDcon, 18h vs. 7d: $p = 0,0003$, Faktor 10,6).

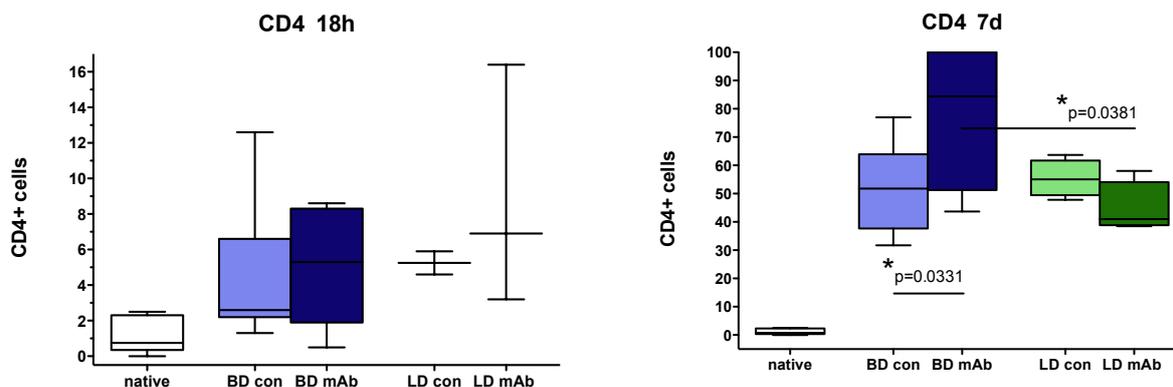


Abb. 13 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für CD4+ TH-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h und 7d nach NTx.

CD 4+

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	4,514	5,140	ns	1,1	5,250	8,833	ns	1,7
SA	3,951	3,358			0,9192	6,809		
SF	1,493	1,502			0,6500	3,931		
n	7	5			2	3		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	52,63	77,72	p=0,0331	1,5	55,41	44,63	ns	0,8
SA	15,21	23,88			6,526	9,047		
SF	5,379	9,747			3,263	4,524		
n	8	6			4	4		
x fach (18h vs. 7d)	11,7 p<0,0001	15,1 p<0,0001			10,6 p = 0,0003	5,1 p = 0,0037		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 6 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für CD4+ TH-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h u. 7d nach NTx.

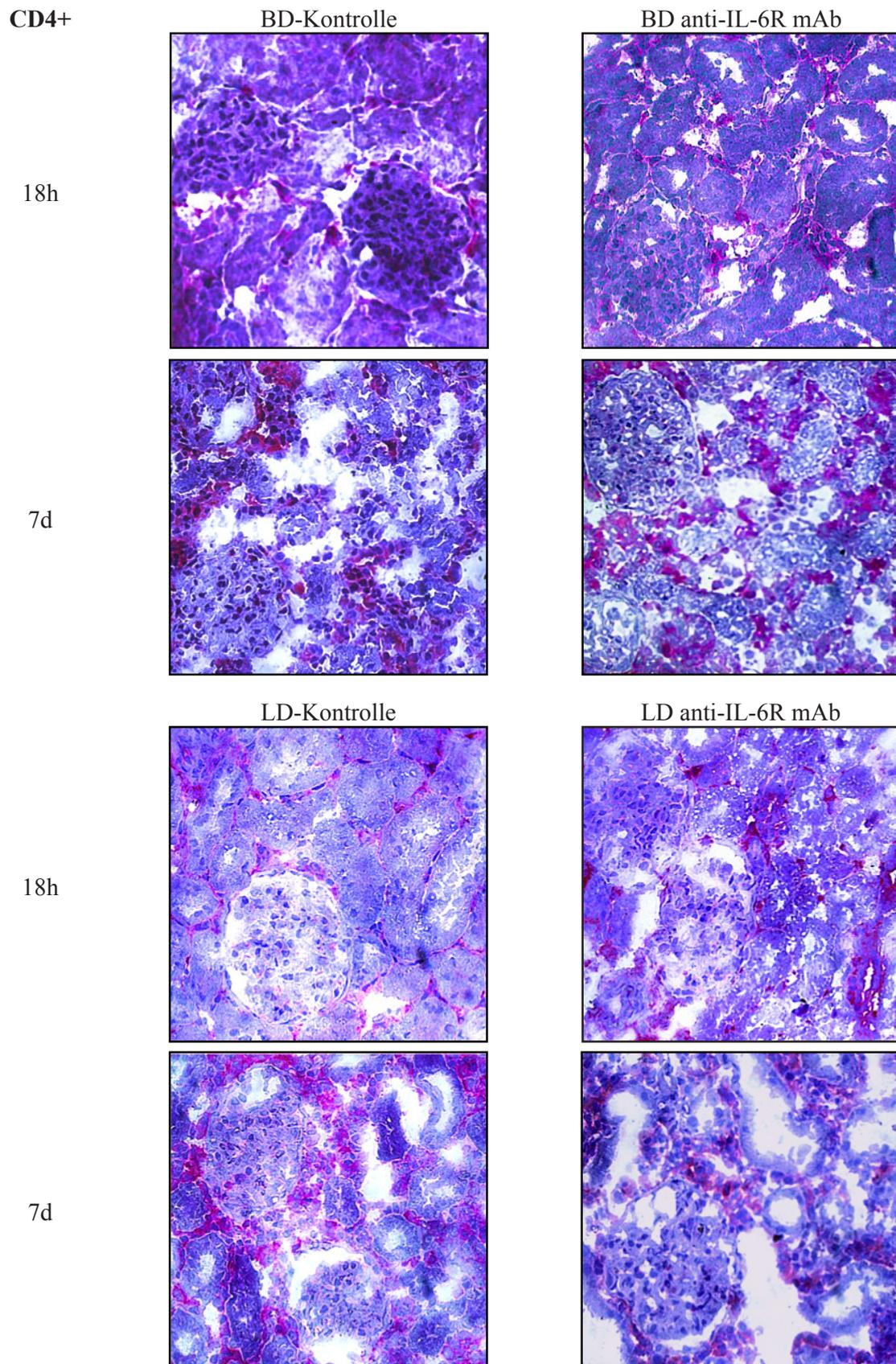


Abb. 14 Immunhistologische Färbungen von CD4+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 18h und 7d nach NTx der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL-6R mA behandelten und unbehandelten Hirntodspender

4.2.4 Infiltration von CD8+ T-Zellen

BD 18h und 7d (168h)

Sowohl 18h als auch 7d p.t. zeigte sich in der Hirntodgruppe unter Spendervorbehandlung eine geringere Infiltration von CD8+ Zellen in das Transplantat im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

Über die Zeit (18h vs. 7d) war auch hier eine signifikant gesteigerte Infiltration von CD8+ T-Zellen zu beobachten: In der BDcon-Gruppe nahm die Infiltration um den Faktor 102,9 zu ($p < 0,0001$), in der BDmAb-Gruppe um den Faktor 89,1 ($p < 0,0001$).

LD 18h und 7d

Auch in der Gruppen der vorbehandelter Lebendspender wurde 18h als auch 7d p.t. eine geringere Infiltration von CD8+ T-Zellen in das Transplantat im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert. In allen Gruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde hier eine starke Zunahme der CD8+ T-Zell-Infiltration mit signifikanten Unterschieden gemessen: In der LDcon-Gruppe vergrößerte sich die Infiltration um den Faktor 54,1 ($p < 0,0001$); in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 155,1 ($p < 0,0001$).

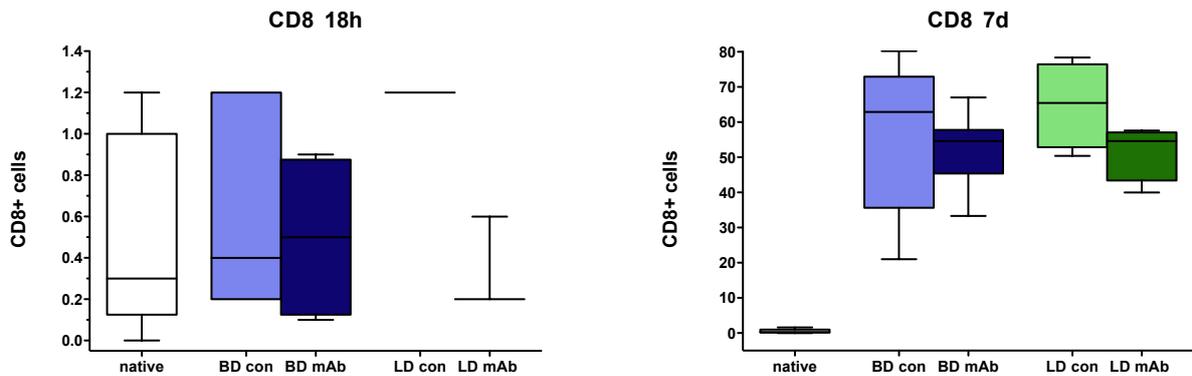


Abb. 15 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung CD8+ T-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h und 7d nach NTx.

CD 8+

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,6286	0,5000	ns	0,8	1,200	0,3333	ns	0,3
SA	0,4386	0,4082			0,0	0,2309		
SF	0,1658	0,2041			0,0	0,1333		
n	7	4			2	3		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	56,02	51,44	ns	0,9	64,93	51,70	ns	0,8
SA	22,28	10,77			12,19	7,969		
SF	9,962	4,069			6,097	3,985		
n	7	5			4	4		
x-fach (18h vs. 7d)	89,1 p<0,0001	102,9 p<0,0001			54,1 p<0,0001	155,1 p<0,0001		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 7 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung CD8+ T-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 18h und 7d nach NTx.

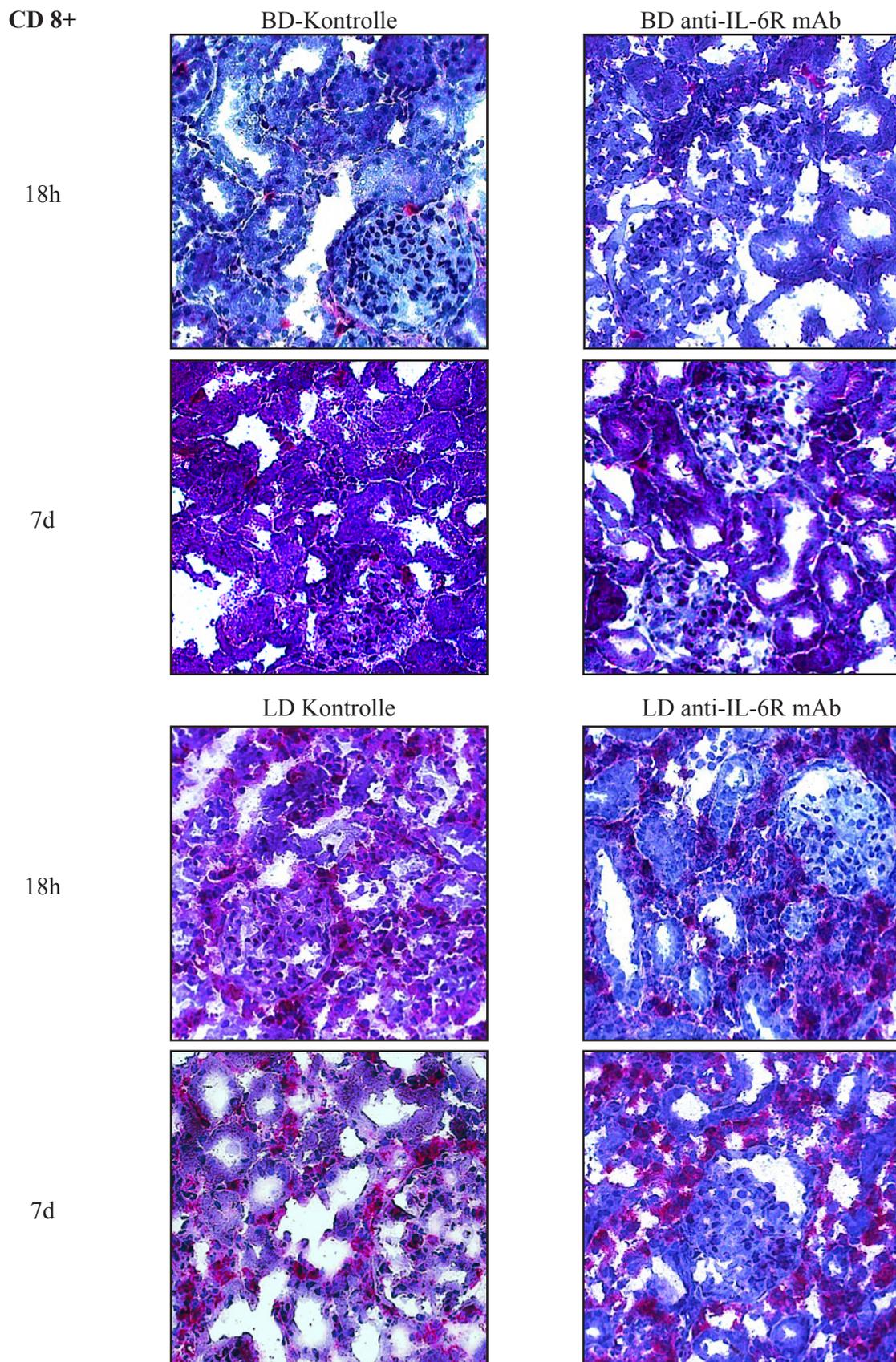


Abb. 16 Immunhistologische Färbungen von CD8+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 18h und 7d nach NTx der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL-6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

4.3 Zytokin- u. Chemokinexpression im Nierenallograft

Unsere Annahme war, dass durch eine Vorbehandlung mit anti-IL-6R mAb nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf der Ebene der Genexpression eine verminderte Expression diverser inflammatorischer Mediatoren und konsekutiv eine geringere Transplantatschädigung zu erreichen wäre. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Aktivierungszustand des Immunsystems anhand der Expression verschiedener Zytokine und Chemokine, welche typischerweise mit Eintreten des Hirntodes sowie im Rahmen des I/R-Schadens hoch- bzw. herunterreguliert werden, analysiert. Es wurde untersucht, inwieweit eine Spendervorbehandlung die Genexpression der Chemokine CCL-19, CCL-21 und IP-10 sowie der Zytokine IL-6, TNF α , IFN γ und IL-10 beeinflusst. Die Expressionsmuster dieser Gene wurde mittels quantitativer Echtzeit-Fluoreszenz-PCR (TaqMan-Real-Time-RT-PCR) aus den Proben des Allografts im akuten und chronischen Modell sowie aus Empfängermilzproben im chronischen Modell analysiert.

4.3.1 Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α

Interleukin-6

BD 18h und BD 7d (168 h)

Im Nierentransplantat wurde anti-IL-6R mAb vorbehandelter Hirntodspender, der BDmAb-Gruppe, eine geringfügig kleinere IL-6 Expression, sowohl 18h als auch 7d nach NTx gegenüber nicht vorbehandelten Hirntodspendern, der BDcon-Gruppe, detektiert. So war die IL-6 Genexpression vorbehandelter Hirntodspender 7d p.t. etwa um den Faktor 0,5 gegenüber den unbehandelten Hirntodspendern reduziert. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

Interessanterweise war die IL-6 Genexpression in allen BD-Gruppen 7d p. t. gegenüber 18h p. t. geringfügig reduziert. Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde eine nicht signifikante Reduktion der IL-6 Expression in der BDmAb Gruppe (Faktor 0,2) sowie in der BDcon-Gruppe (Faktor 0,3) beobachtet.

LD 18h und 7d

Sowohl 18h als auch 7d p.t. zeigte sich eine nicht signifikant größere IL-6 Expression im Nierenallograft anti-IL-6R mAb vorbehandelter Lebendspender gegenüber der Kontrollgruppe. Die IL-6 Expression reduzierte sich über die Zeit (18h vs. 7d) in der LDmAb-Gruppe um den

Faktor 0,8 ($p > 0,9999$), vergrößerte sich aber um den Faktor 1,2 ($p > 0,9999$) in der LDcon-Gruppe. In beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

Tumor-Nekrose-Faktor- α

BD 18h und 7d

In allen BD-Gruppen zeigte sich eine vergleichbare konstante TNF α -Expression ohne signifikante Unterschiede. Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde eine signifikante Zunahme der TNF α -Expression in den BD-Gruppen gemessen: In der BDmAb-Gruppe vergrößerte sich die Expression um den Faktor 3,4 ($p=0,0022$); in der unbehandelten BDcon-Gruppe sogar um den Faktor 5,9 ($p < 0,0001$).

LD 18h und 7d

Bei Verwendung von Transplantaten aus Lebendspendern zeigte sich 18h p. t. eine tendenziell kleinere TNF α -Expression unter Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

7d p. t wurde durch eine Spendervorbehandlung eine knapp nicht signifikante Reduktion der TNF α -Expression um den Faktor 0,5 detektiert. (LDmAb vs. LDcon: $0,01406 \pm 0,003175$ vs. $0,00678 \pm 0,001040$; $p = 0,0556$)

Über die Zeit (18h vs. 7d) zeigte sich in den LDmAb-Gruppen ein signifikanter Anstieg der TNF α -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während in der LDmAb-Gruppe die Expression um den Faktor 4,9 ($p=0,0012$) anstieg, wurde in der LDcon-Gruppe sogar ein 9,98-facher Anstieg ($p=0,0033$) beobachtet.

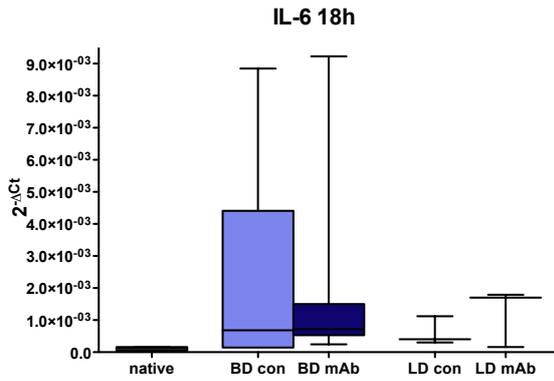


Abb. 17 a

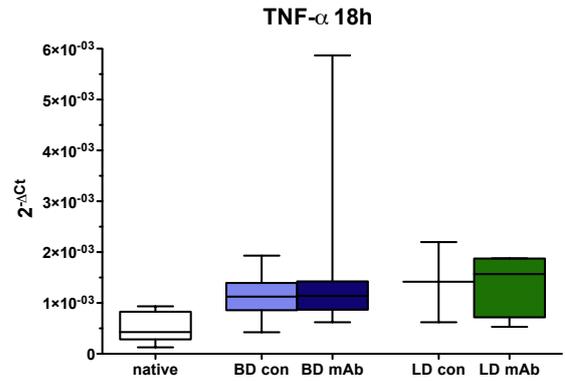


Abb. 18 a

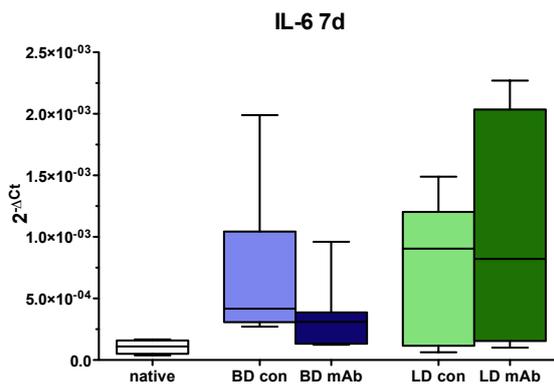


Abb. 17 b

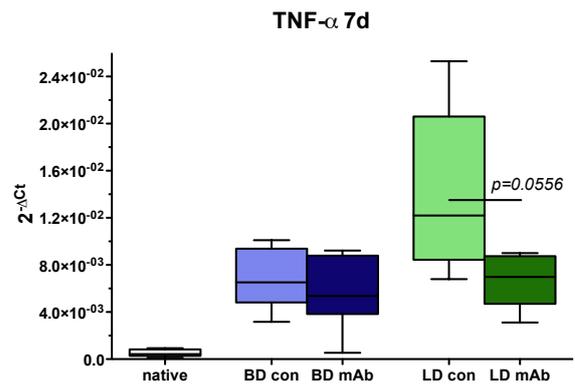


Abb. 18 b

Abb. 17 a-b und Abb. 18 a-b

IL-6 und TNF α Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-RT-PCR 18h und 7d nach NTx.

Interleukin 6

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,002219	0,002005	ns		0,0006087	0,001217	ns	
SA	0,003391	0,003214			0,0004455	0,0009151		
SF	0,001130	0,001215			0,0002572	0,0005283		
n	9	7			0,9	3		

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,0006974	0,0003626	ns		0,0007089	0,001004	ns	
SA	0,0005995	0,0002818			0,0005919	0,001000		
SF	0,0002119	0,0001065			0,0002647	0,0005000		
n	8	7			0,5	5		

x fach (18h vs. 7d)	0,3 p=0,4880	0,2 p=0,5063			1,2 p> 0,9999	0,8 p> 0,9999		
------------------------	------------------------	------------------------	--	--	-------------------------	-------------------------	--	--

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tumor-Nekrose-Faktor- α

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,001145	0,001665	ns		0,001413	0,001388	ns	
SA	0,0004431	0,001720			0,0007900	0,0006353		
SF	0,0001567	0,0006082			0,0004561	0,0003177		
n	8	8			1,5	3		

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,006754	0,005605	ns		0,01406	0,00678	p = 0,0556	
SA	0,002471	0,003007			0,007099	0,002326		
SF	0,0008738	0,001136			0,003175	0,001040		
n	8	7			0,8	5		

x fach (18h vs. 7d)	5,9 p<0,0001	3,4 p=0,0022			9,95 p=0,0033	4,9 p=0,0012		
------------------------	------------------------	------------------------	--	--	-------------------------	------------------------	--	--

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 8 IL-6 und TNF α Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

4.3.2 Interleukin 4

Interleukin-4

BD 18h und BD 7d

Im Nierentransplantat anti-IL-6R mAb vorbehandelter Hirntodspender wurde 18h p. t. eine tendenziell verringerte IL-4 Genexpression im Vergleich zu nicht vorbehandelten Hirntodspendern detektiert. 7d p.t. zeigte sich unter Spendervorbehandlung sogar eine signifikante Reduktion der IL-4 Expression im Vergleich zur Gruppe nicht vorbehandelter Hirntodspender. (BDmAb vs. BDcon: $8,320e-005 \pm 1,389e-005$ vs. $0,0002218 \pm 4,295e-005$; **p = 0,0035**)

Über die Zeit (18h vs. 7d) blieb die IL-4 Expression unter Spendervorbehandlung nahezu konstant, während in der Gruppe un behandelter Hirntodspender eine tendenzielle Reduktion gemessen wurde. In beiden Gruppen war das Ergebnis nicht signifikant.

LD 18h und 7d

18h p.t. war die IL-4 Genexpression im Nierenallograft anti-IL-6R mAb vorbehandelter Lebendspender im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa gleich groß, während 7d p.t. unter Spendervorbehandlung eine deutliche Reduktion der IL-4 Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe gemessen wurde.

Die IL-4 Expression reduzierte sich über die Zeit (18h vs. 7d) in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 0,7 ($p=0,9161$), vergrößerte sich aber um den Faktor 1,4 ($p=0,8458$) in der LDcon-Gruppe. In beiden Gruppen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied.

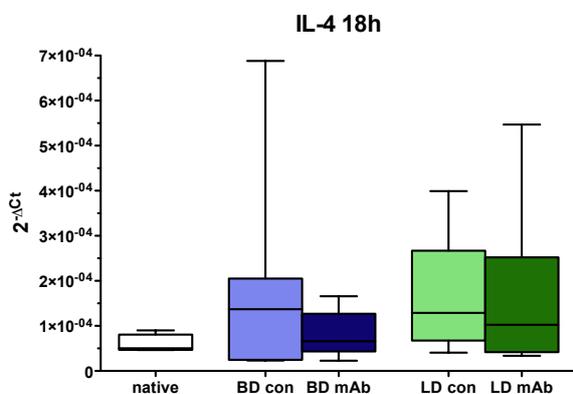


Abb. 19 a

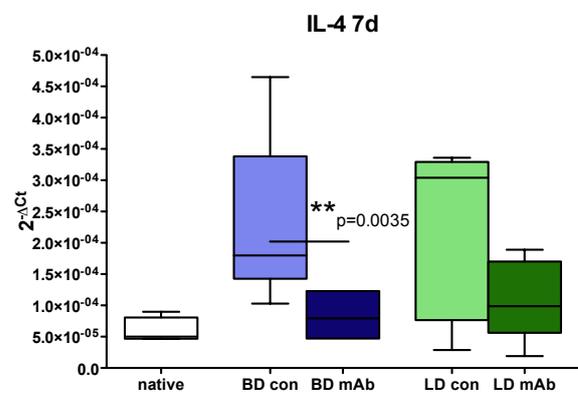


Abb. 19 b

Abb. 19 a-b

IL-4 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu un behandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

Interleukin 4

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD mAb	LD con	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,001144	8,336e-005	ns	0,1	0,0001640	0,0001596	ns	0,97
SA	0,002449	4,822e-005			0,0001931	0,0001390		
SF	0,0008165	1,392e-005			7,883e-005	6,216e-005		
n	7	12			6	5		

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD mAb	LD con	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,0002218	8,320e-005	p = 0,0035	0,4	0,0001088	0,0002176	ns	0,5
SA	0,0001424	3,403e-005			6,322e-005	0,0001373		
SF	4,295e-005	1,389e-005			1,999e-005	4,341e-005		
n	5	3			5	6		

x fach (18h vs. 7d)	0,2 p=0,8024	0,99 p>0,9999			0,7 p=0,9161	1,4 p=0,8458		
------------------------	------------------------	-------------------------	--	--	------------------------	------------------------	--	--

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 9 IL-4 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

4.3.3 Interferon- γ und Interleukin-10

Interferon- γ

BD 18h und 7d

18h p.t. war die IFN γ -Expression in der BDmAb-Gruppe gegenüber der BDcon-Gruppe tendenziell erhöht. Ein konträres Bild zeigte sich hingegen nach 7d: Hier war unter Spendervorbehandlung die IFN γ -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell reduziert (BDmAb-Gruppe vs. BDcon-Gruppe: $0,04162 \pm 0,01402$ vs. $0,0767 \pm 0,01371$).

Über die Zeit (18h vs.7d) zeigte sich in beiden BD-Gruppen ein starker signifikanter Anstieg der IFN γ -Expression: In den BDcon-Gruppen vergrößerte sich die IFN γ -Expression um den Faktor 359 (p=0,0407), unter anti-IL-6R mAb Vorbehandlung dagegen nur um den Faktor 143 (p< 0,0001).

LD 18h und 7d

18h p.t. zeigte sich eine geringfügig kleinere IFN γ -Expression in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Faktor 0,81).

7d p.t. dagegen wurde eine leicht erhöhte IFN γ -Expression in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur LDcon-Gruppe detektiert (Faktor 1,3). In beiden Fällen bestand statistisch kein signifikanter Unterschied.

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde auch hier eine signifikante starke Zunahme der IFN γ -Expression beobachtet; in beiden Gruppen zeigte statistisch ein signifikanter Unterschied: In der

LDmAb-Gruppe vergrößerte sich die Expressionsrate um den Faktor 523,7 ($p=0,0046$), in der LDcon-Gruppe um den Faktor 323,2 ($p=0,0300$).

Interleukin-10

BD 18h und 7d

18h p.t. war die IL-10 Expression in der BDmAb-Gruppe gegenüber der BDcon-Gruppe um den Faktor 3,4 vergrößert. 7d p.t. zeigte sich ein gegensätzliches Bild: in der BDmAb-Gruppe wurde eine signifikant reduzierte IL-10 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt (BDmAb vs. BDcon: $0,004096 \pm 0,0007917$ vs. $0,01006 \pm 0,001713$; $p=0,0205$; Faktor 0,41).

Über die Zeit (18h vs. 7d) vergrößerte sich die IL-10 Expression in der BDmAb-Gruppe nur um den Faktor 14,2 ($p=0,9363$) in der BDcon-Gruppe dagegen um den Faktor 119,6 ($p=0,2055$). In beiden Gruppen war der Anstieg über die Zeit jedoch statistisch nicht signifikant.

LD 18h und 7d

In den LD Gruppen zeigte sich ein ähnliches IL-10 Expressionsmuster wie in den BD-Gruppen: 18h p.t. war die IL-10 Expression in der LDmAb-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe leicht vergrößert (Faktor 6,4).

7d p.t. zeigte sich wiederum ein konträres Bild: Die IL-10-Expression in der LDmAb-Gruppe war hier gegenüber der LDcon-Gruppe um den Faktor 0,3 reduziert. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht.

Über die Zeit (18h vs. 7d) stieg die IL-10 Expression in den LDcon-Gruppen um den Faktor 1450,99 ($p=0,0082$) signifikant an; unter Vorbehandlung der Lebendspender dagegen nur um den Faktor 67,9 ($p=0,8016$).

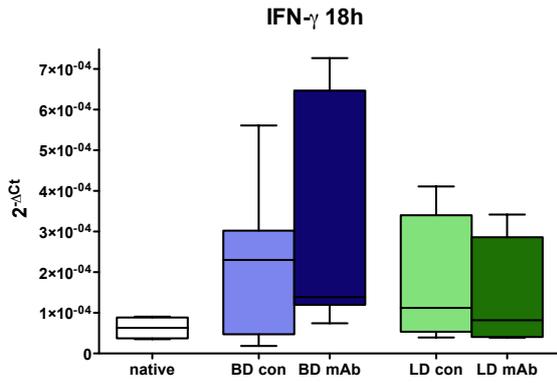


Abb. 20 a

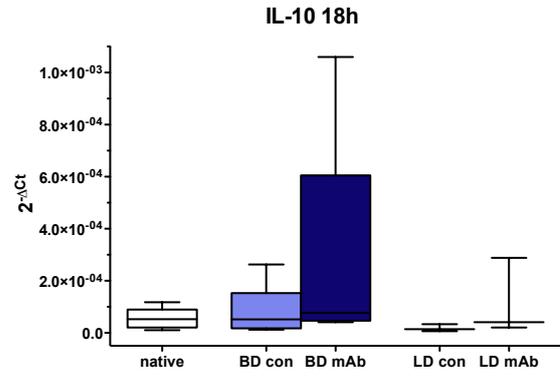


Abb. 21 a

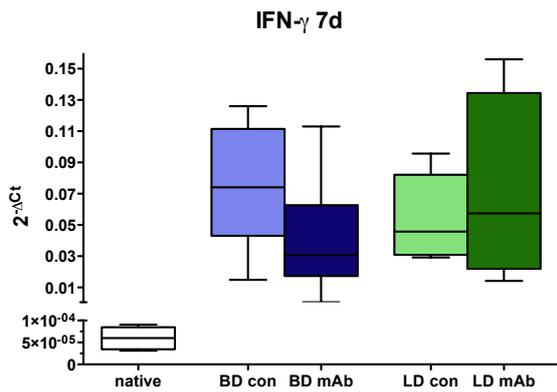


Abb. 20 b

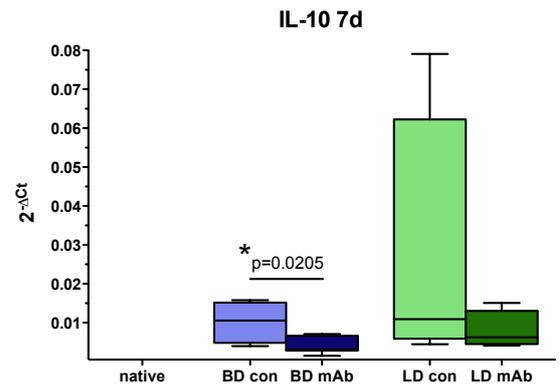


Abb. 21 b

Abb. 20 a-b und Abb. 21 a-b

IFN γ und IL-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

Interferon- γ

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,0002076	0,0002903	ns		0,0001687	0,0001361	ns	
SA	0,0001784	0,0002747			0,0001657	0,0001418		
SF	5,947e005	0,0001038			8,285e005	7,092e005		
n	9	7			1,3	4		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,0767	0,04162	ns		0,05436	0,07128	ns	
SA	0,03877	0,03711			0,02782	0,06089		
SF	0,01371	0,01402			0,01244	0,03045		
n	8	7			0,5	5		
x fach (18h vs. 7d)	369,5 p<0,0001	143,4 p=0,0407			322,2 p=0,0300	523,7 p=0,0046		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Interleukin-10

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	8,408e-005	0,0002879	ns		1,816e-005	0,0001165	ns	
SA	8,744e-005	0,0003952			1,395e-005	0,0001488		
SF	2,915e-005	0,0001494			8,051e-006	8,594e005		
n	9	7			3,4	3		
7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,01006	0,004096	p = 0,0205		0,02635	0,007915	ns	
SA	0,004846	0,002095			0,03530	0,004915		
SF	0,001713	0,0007917			0,01765	0,002457		
n	8	7			0,41	4		
x fach (18h vs. 7d)	119,6 p=0,2055	14,2 p=0,9363			1450,99 p=0,0082	67,9 p=0,8016		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 10 IFN γ - und IL-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

4.3.4 CCL-19 und CCL-21

CCL-19

BD 18h und 7d

18h p.t. wurde in der BDmAb-Gruppe eine um den Faktor 2,8 signifikant erhöhte CCL-19 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (BDmAb vs. BDcon: $0,08656 \pm 0,01851$ vs. $0,03056 \pm 0,01255$; **p = 0,0115**). Dagegen war 7d p.t. unter Vorbehandlung der Hirntodspender mit anti-IL-6R mAb im Vergleich zur Kontrollgruppe die CCL-19 Expression geringfügig reduziert (n.s.; Faktor 0,75).

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der CCL-19 Expression in der BDmAb-Gruppe um den Faktor 2,99 ($p=0,5605$), sowie in der BDcon-Gruppe um den Faktor 11,3 ($p=0,0555$) gemessen.

LD 18h und 7d

18h p.t. und 7d p.t. zeigte sich in der Gruppe vorbehandelter Lebendspender ebenfalls eine tendenziell kleinere CCL-19 Expression im Vergleich zu unbehandelten Lebendspendern. (18h: Faktor 0,6 und 7d: Faktor 0,8; n.s.). In beiden Fällen waren die Unterschiede nicht signifikant.

Über die Zeit (18h vs. 7d) war die CCL-19 Expression in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 4,7 ($p=0,1779$), in der LDcon-Gruppe um den Faktor 3,5 ($p=0,1058$) erhöht. Der Anstieg war jedoch in beiden Fällen statistisch nicht signifikant.

CCL-21

BD 18h und 7d

Hier zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie zuvor bei der Genexpression von CCL-19: 18h p.t. war die CCL-21 Expression in der BDmAb-Gruppe im Vergleich der Kontrollgruppe tendenziell vergrößert (Faktor 1,5; n.s.).

7d p.t. zeigte dagegen die Vorbehandlung eine signifikante Suppression der CCL-21 Expression: (BDmAb-Gruppe vs. BDcon-Gruppe: $0,01463 \pm 0,004008$ vs. $0,05504 \pm 0,01503$; **$p=0,0080$**).

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde in der BDmAb-Gruppe eine geringfügige, nicht signifikante Reduktion der CCL-21 Expression (Faktor 0,5; n.s.) detektiert, während sich in der BDcon-Gruppe die Expression leicht erhöhte (Faktor 2,7; n.s.).

LD 18h und 7d

Während 18h p.t. eine etwa gleich große CCL-21 Expression in beiden Gruppen detektiert wurde, konnte 7d p.t. eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der CCL-21 Expression in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur LDcon-Gruppe unter der Spendervorbehandlung erreicht werden.

Über die Zeit (18h vs. 7d) wurde eine nicht signifikante Steigerung der CCL-21 Expression in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 1,2 (n.s.); in der LDcon-Gruppe um den Faktor 1,4 (n.s.) detektiert.

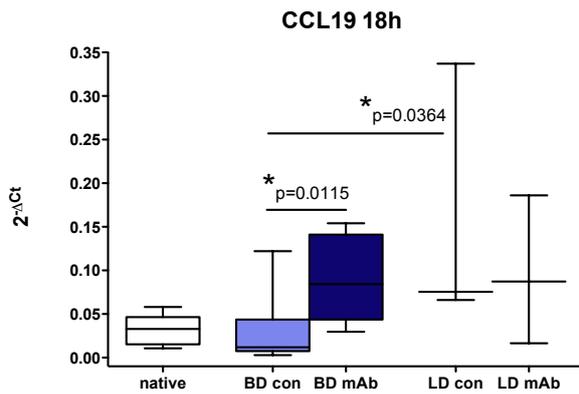


Abb. 22 a

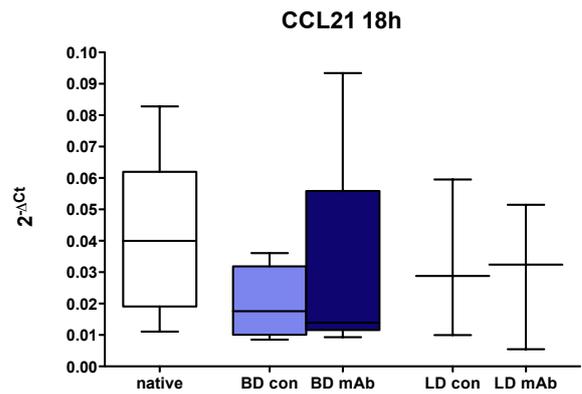


Abb. 23 a

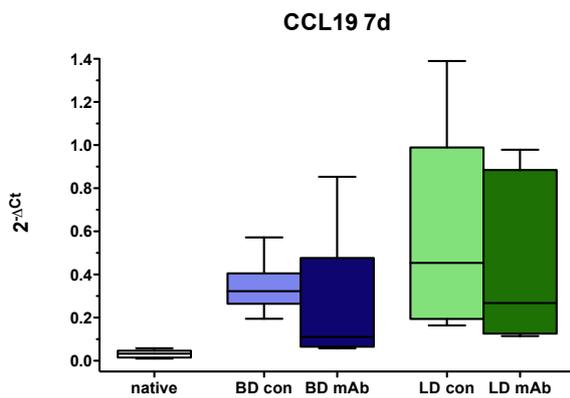


Abb. 22 b

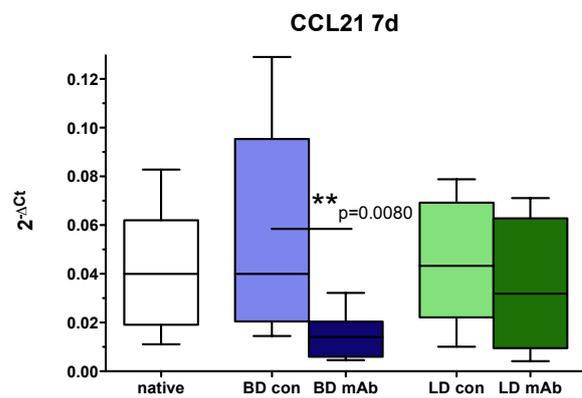


Abb. 23 b

Abb. 22 a-b und Abb. 23 a-b

CCL-19- und CCL-21 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

CCL 19

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,03056	0,08656	p = 0,0115		0,1595	0,09653	ns	
SA	0,03764	0,04898			0,1538	0,08518		
SF	0,01255	0,01851			0,08879	0,04918		
n	7	9			2,8	3		

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,3438	0,2584	ns		0,5642	0,4578	ns	
SA	0,1144	0,3108			0,4924	0,3995		
SF	0,03814	0,1269			0,2202	0,1787		
n	9	6			0,75	5		

x fach (18h vs. 7d)	11,3 p=0,0555	2,99 p=0,5605			3,5 p=0,1058	4,7 p=0,1779		
------------------------	-------------------------	-------------------------	--	--	------------------------	------------------------	--	--

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

CCL 21

18h NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,02007	0,02976	ns		0,03275	0,02980	ns	
SA	0,01076	0,03572			0,02501	0,02312		
SF	0,003804	0,01597			0,01444	0,01335		
n	8	5			1,5	3		

7d NTx	BD con	BD mAb	p-Intervall	Ratio (BD mAb vs. BD con)	LD con	LD mAb	p-Intervall	Ratio (LD mAb vs. LD con)
MW	0,05504	0,01463	p=0,0080 (Mann-Whitney)		0,04522	0,03474	ns	
SA	0,04251	0,009817			0,02596	0,02799		
SF	0,01503	0,004008			0,01161	0,01400		
n	8	6			0,3	5		

x fach (18h vs. 7d)	2,7 p=0,0664	0,5 p=0,8487			1,4 p=0,9568	1,2 p=0,9989		
------------------------	------------------------	------------------------	--	--	------------------------	------------------------	--	--

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 11 IL-6 und TNF α Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR 18h u. 7d nach NTx

5 ERGEBNISSE – CHRON. MODELL

5.1 Kreatinin-Clearance und Proteinurie

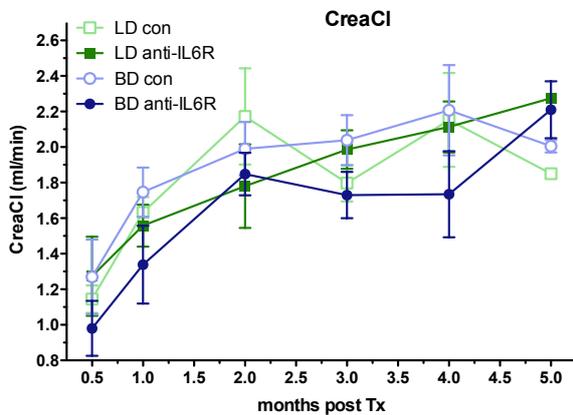


Abb. 23 Kreatinin-Clearance

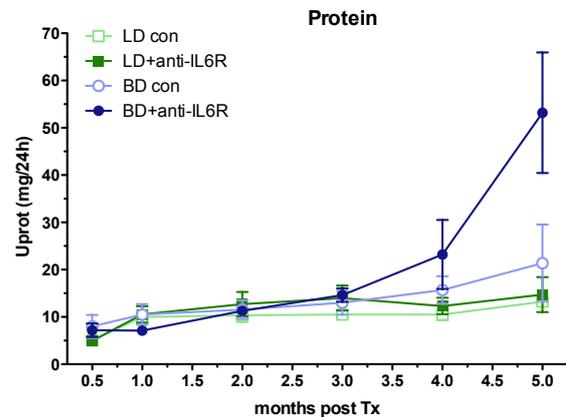


Abb. 24 Proteinurie

Kreatinin-Clearance

Am Ende des Beobachtungszeitpunktes zeigte sich in allen Versuchsgruppen eine ähnliche Kreatinin-Clearance ohne signifikante Unterschiede. Es wurde in den Kontrollgruppen eine geringfügig kleinere Kreatinin-Clearance und damit eine nicht wesentlich schlechtere Nierenfunktion gegenüber den vorbehandelten Gruppen beobachtet. Eine Spendervorbehandlung scheint die Langzeit-Transplantatfunktion somit nicht wesentlich zu beeinflussen.

Proteinurie

Am Ende des Beobachtungszeitpunktes nach 5 Monaten zeigte sich in der BD-Gruppe unter Spendervorbehandlung mit anti-IL-6R mAb eine signifikant erhöhte Proteinurie im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0005$); hier scheint eine Spendervorbehandlung hinsichtlich der Entwicklung einer Proteinurie prognostisch eher ungünstig. In den LD-Gruppen war die Proteinurie etwa gleich groß, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

Die Spendervorbehandlung in der BD-Gruppe zeigte im Vergleich zur LD-Gruppe eine marginal größere Proteinurie. Die Proteinurie war in beiden Kontrollgruppen (BDcon und LDcon) ähnlich niedrig, d.h. interessanterweise scheint in unseren Versuchen der Hirntod keine negativen Auswirkungen auf die Proteinurie zu haben.

5.2 Histologie

BD und LD

Anders als im akuten Modell stellte sich im chronischen Modell eine Spendervorbehandlung mit anti-IL-6R mAb als nicht suffizient dar. Sowohl Transplantate vorbehandelter Hirntod- als auch Lebendspender wiesen gegenüber den Kontrollgruppen histomorphologisch stärkere Anzeichen einer Transplantatschädigung bzw. einer chronischen Transplantatabstoßung auf. Insbesondere zeigte sich in Nierentransplantaten vorbehandelter Hirntodspender im Vergleich zur Kontrollgruppe neben einer signifikant größeren Zellinfiltration ($p = 0,0325$), eine ausgeprägtere Glomerulosklerose sowie eine signifikant stärkere Tubulusatrophie ($p = 0,0361$) und Arteriosklerose ($p = 0,0325$).

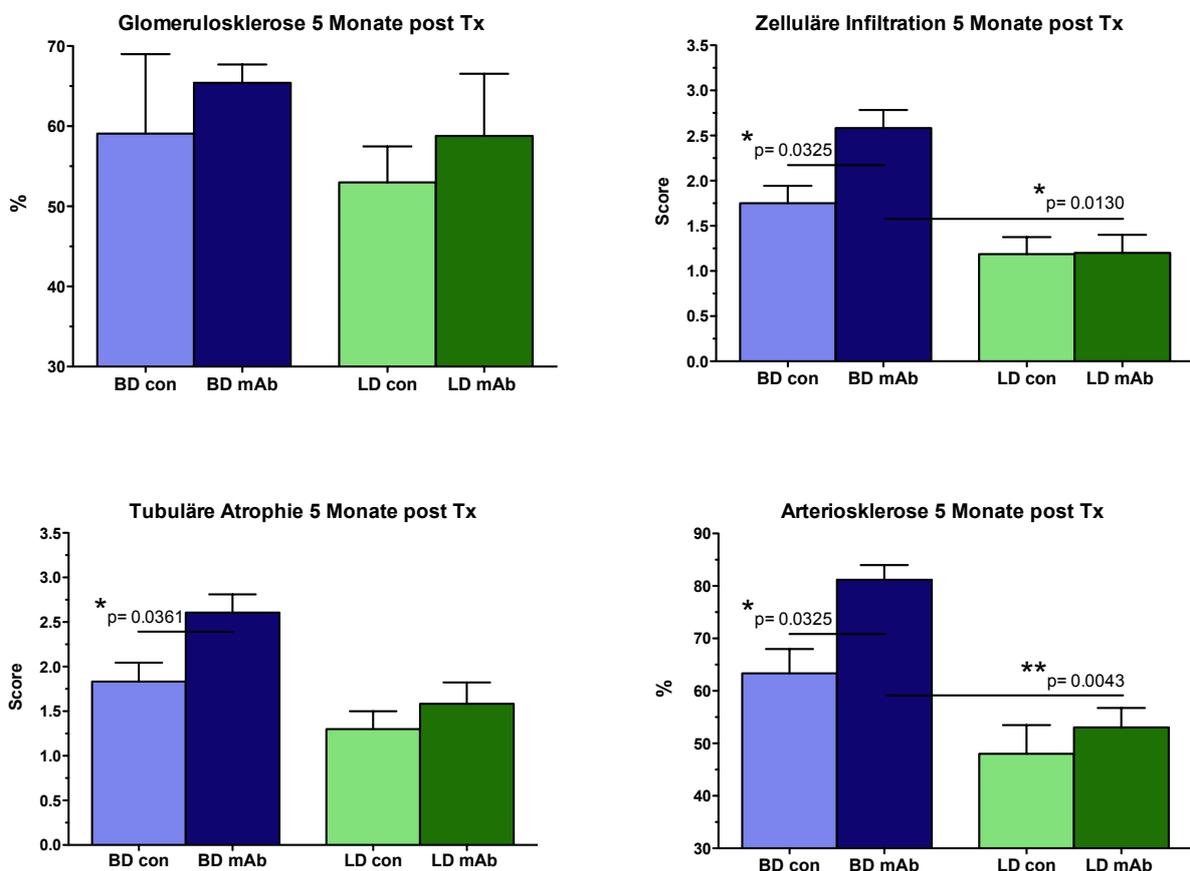


Abb. 25 Histologische Bewertung der allogenen transplantierten Niere anhand des in dieser Arbeit verwendeten Bewertungssystem zur Einschätzung des Grades der histologischen Schädigung (s. auch Tabelle 12). Die histologische Auswertung der Transplantate erfolgte 5 mths nach Reperfusion.

Glomerulosklerose (%) 5 mths post NTx

5 mths NTx	BD mAb	BD con	p-Intervall	LD mAb	LD con	p-Intervall
MW	65,42	59,08	ns	58,80	52,99	ns
SA	5,623	22,17		17,33	8,989	
SF	2,296	9,913		7,750	4,494	
n	6	5		5	4	

Tubuläre Atrophie 5 mths post NTx

5 mths NTx	BD mAb	BD con	p-Intervall	LD mAb	LD con	p-Intervall
MW	2,607	1,833	<i>p = 0,0361</i>	1,583	1,300	ns
SA	0,5373	0,5164		0,5845	0,4472	
SF	0,2031	0,2108		0,2386	0,2000	
n	7	6		6	5	

Zelluläre Infiltration 5mths post NTx

5 mths NTx	BD mAb	BD con	p-Intervall	LD mAb	LD con	p-Intervall
MW	2,583	1,750	<i>p = 0,0325</i>	1,200	1,188	ns
SA	0,4916	0,4330		0,4472	0,3750	
SF	0,2007	0,1936		0,2000	0,1875	
n	6	5		5	4	

Arteriosklerose (%) 5 mths post NTx

5 mths NTx	BD mAb	BD con	p-Intervall	LD mAb	LD con	p-Intervall
MW	81,20	63,34	<i>p = 0,0325</i>	53,05	48,01	ns
SA	6,829	10,36		8,293	10,97	
SF	2,788	4,634		3,709	5,486	
n	6	5		5	4	

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 12 Histomorphologische Auswertung 18 mths nach NTx

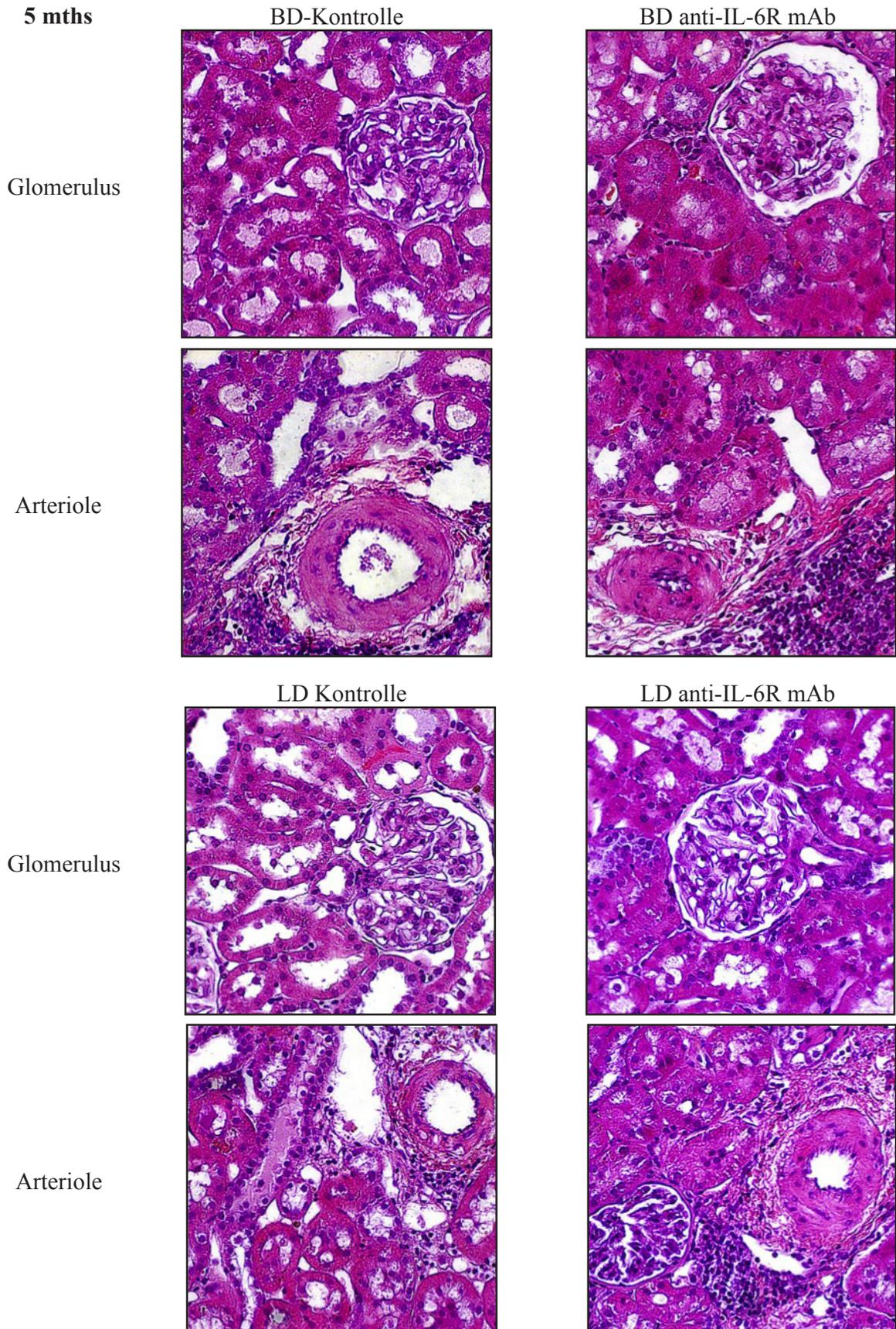


Abb. 26 H&E Färbung (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 5 mths nach NTx der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

5.3 Immunhistologie

5.3.1 Infiltration von ED1+ Zellen und APZ der MHC-Klasse-II

ED 1

BD 5 mths

5 mths p.t. zeigte sich unter der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung bei hirntoten Spendern eine signifikant geringere Infiltration von ED1+ Zellen in das Allograft im Vergleich zu nicht vorbehandelten Hirntodspendern (BDmAb-Gruppe vs. BDcon-Gruppe $1,600 \pm 0,2620$ vs. $3,767 \pm 0,4394$; $p= 0,0017$).

LD 5 mths

Ein konträres Bild ergab sich hingegen in der Lebendspendergruppe: Hier zeigte sich nach Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrolle eine um den Faktor 2,0 gesteigerte Infiltration von ED1+ Zellen in das Nierenallograft.

MHC II+

BD 5 mths

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch unter der Spendervorbehandlung bezüglich MHC-Klasse II+ antigenpräsentierenden Zellen: Auch hier wurde eine signifikant ($p = 0,0317$) kleinere Infiltration von MHC-Klasse II+ Zellen in der BDmAb-Gruppe ($8,000 \pm 1,405$) gegenüber der BDcon-Gruppe ($17,38 \pm 1,933$) gemessen.

LD 5 mths

In der Gruppe der Lebendspender ergab sich ein ähnlicher Trend wie zuvor bei ED1+ Zellen: 5mths p.t. wurde eine stärkere Infiltration von APZ-MHC-Klasse II+ in der LDmAb-Gruppe gegenüber der LDcon-Gruppe detektiert (Faktor 1,2). Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

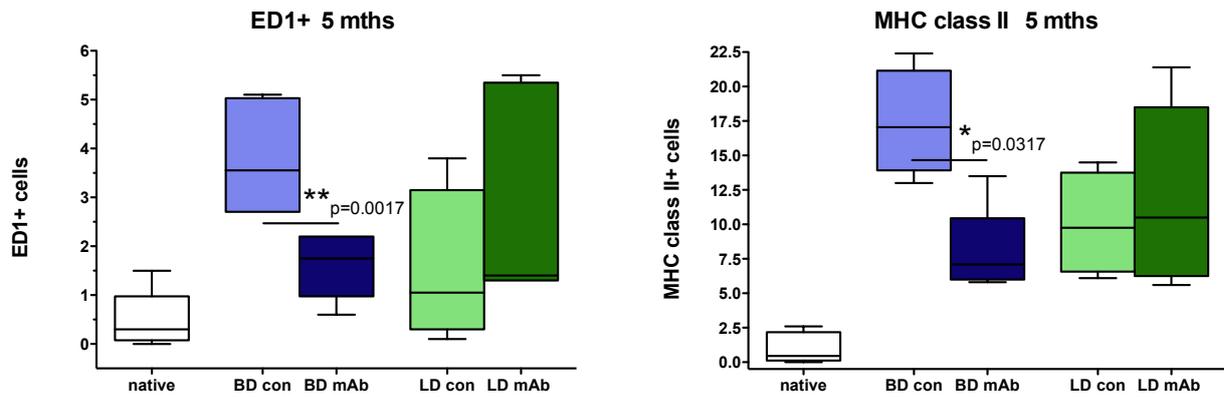


Abb. 27 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für ED1+ Zellen und Antigenpräsentierende Zellen (APZ) der MHC-Klasse II+ im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 5 Monate nach NTx

ED 1+

<i>5mths NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (BD mAb vs. BD con)</i>	<i>LD mAb</i>	<i>LD con</i>	p-Intervall	<i>Ratio (LD mAb vs. LD con)</i>
MW	3,767	1,600	<i>p</i> = 0,0017		2,940	1,500	ns	
SA	1,076	0,6419			2,203	1,602		
SF	0,4394	0,2620			0,9852	0,8010		
n	6	6			0,4	5		

MHC II+

<i>5mths NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (BD mAb vs. BD con)</i>	<i>LD mAb</i>	<i>LD con</i>	p-Intervall	<i>Ratio (LD mAb vs. LD con)</i>
MW	17,38	8,000	<i>p</i> = 0,0317		12,00	10,03	ns	
SA	3,866	3,142			6,530	3,729		
SF	1,933	1,405			2,920	1,864		
n	4	5			0,5	5		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 13 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für ED1+ Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) der MHC-Klasse II+ im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 5 Monate nach NTx

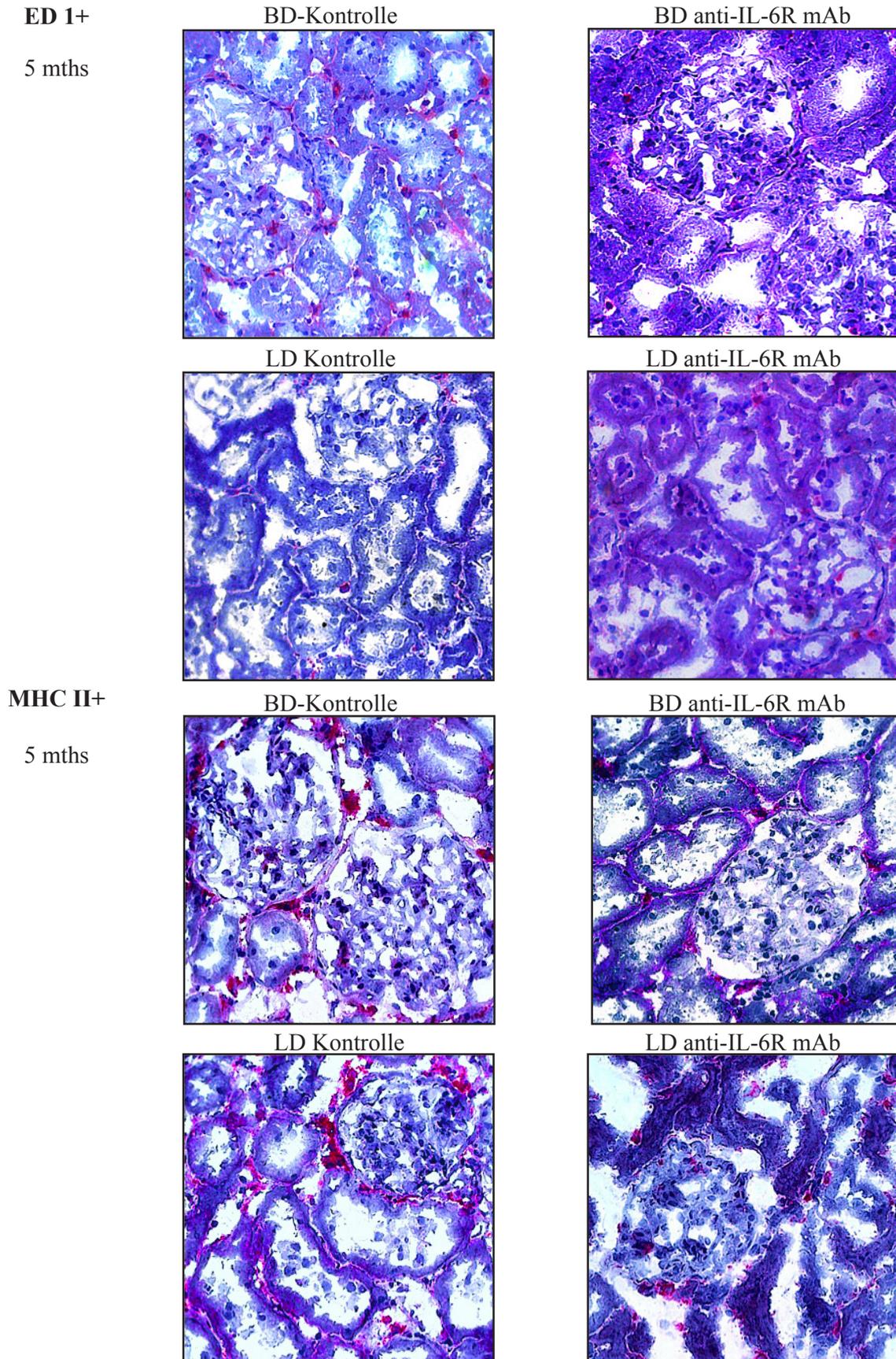


Abb. 28 Immunhistologische Färbungen von ED1+ und MHCII+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 5 mths nach NTx der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

5.3.2 Infiltration von CD4+ TH-Zellen und CD8+ T-Zellen

CD 4+

BD 5 mths

Vergleichbar mit den frühen Untersuchungszeitpunkten wurde 5 mths p. t. in der BDmAb-Gruppe gegenüber der BDcon-Gruppe eine tendenziell stärkere Infiltration (Faktor 1,4) von CD4+ TH-Zellen in das Transplantat gemessen. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($p = 0,0779$).

LD 5 mths

Interessanterweise zeigte sich in der Lebendspendergruppe ein konträres Bild: Hier wurde unter Spendervorbehandlung eine signifikante Reduktion der Infiltration von CD4+ TH-Zellen in das Transplantat gegenüber der Kontrollgruppe erreicht ($21,22 \pm 0,7671$ vs. $32,50 \pm 2,453$; $p = 0,0159$).

CD 8+

BD 5 mths

Wie schon zuvor bei ED1+ Zellen und MHC-Klasse II+ APZ beobachtet, war durch eine Spendervorbehandlung auch die Anzahl CD8+ T-Zellen im Nierentransplantat gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduziert (Faktor 0,4); eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht ($p = 0,0752$).

LD 5 mths

Ein ähnlicher Trend wurde auch in der LD-Gruppe beobachtet: Hier konnte ebenfalls unter Spendervorbehandlung eine tendenziell geringere Infiltration CD8+ T-Zellen in das Transplantat in der LDmAb im Vergleich zur LDcon-Gruppe gemessen werden (Faktor 0,8; n.s.).

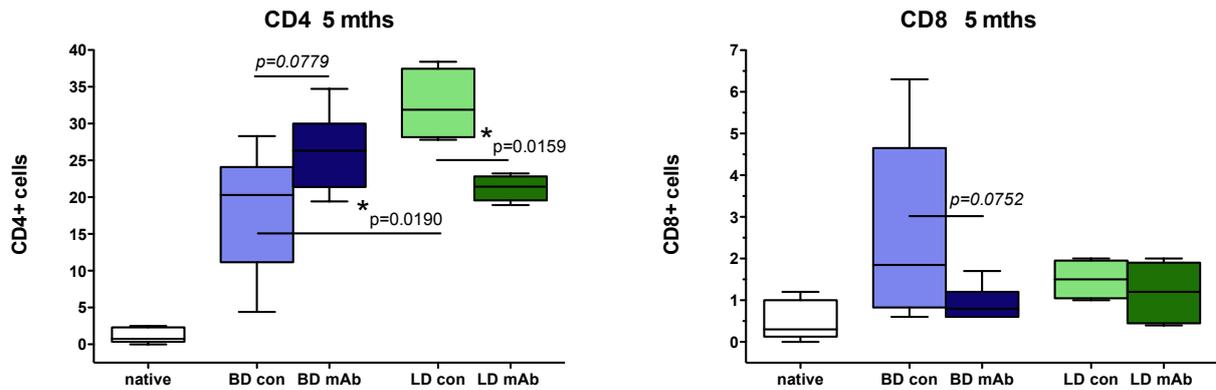


Abb. 29 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für CD4+ TH-Zellen und CD8+ T-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 5 nach NTx.

CD 4+

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	18,23	26,18	<i>p=0,0779</i>	1,4	32,50	21,22	<i>p = 0,0159</i>	0,7
SA	8,363	5,329			4,906	1,715		
SF	3,414	2,175			2,453	0,7671		
n	6	6			4	5		

CD 8+

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	2,600	0,9429	<i>p=0,0752</i>	0,4	1,500	1,180	ns	0,8
SA	2,207	0,3910			0,4761	0,7294		
SF	0,9011	0,1478			0,2380	0,3262		
n	6	7			4	5		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 13 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung für CD4+ TH-Zellen und CD8+ T-Zellen im Nierentransplantat von Hirntod- (BD) und Lebendspendern (LD) nach Behandlung mit anti-IL-6R mAb und in unbehandelten Kontrollen 5 nach NTx.

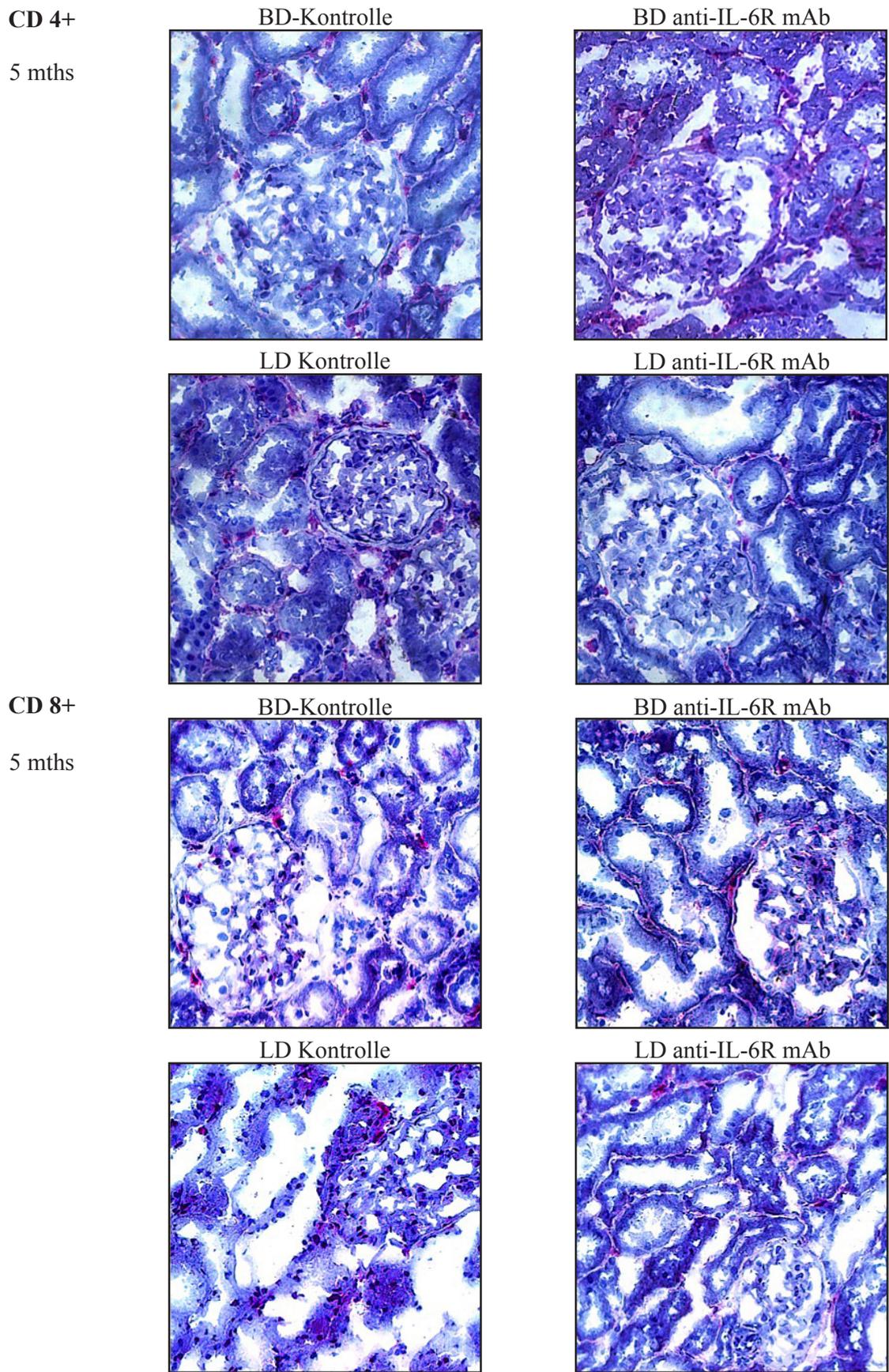


Abb. 30 Immunhistologische Färbungen von CD4+ und CD8+ Zellen (Lichtmikroskopie, 400x) des Nierenallograft 5 mths nach NTx der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Lebendspender bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten Hirntodspender

5.4 Zytokin- u. Chemokinexpression im Nierenallograft

5.4.1 Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interferon- γ und Interferon induziertes Protein 10

Interleukin-6

BD und LD 5 mths

5 mths p.t. wurde im Nierentransplantat anti-IL-6R mAb vorbehandelter Hirntodspender eine signifikant geringere IL-6-Expression detektiert (BDmAb-Gruppe vs. BDcon-Gruppe, $5,076e-005 \pm 6,943e-006$ vs. $0,0002232 \pm 5,444e-005$; $p = 0,0191$).

Ein konträres Bild zeigte sich dagegen in den LD-Gruppen: hier zeigte sich unter Vorbehandlung ein leichter Anstieg der IL-6 Expression in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur LDcon-Gruppe (Faktor 0,8; n.s.).

Tumor-Nekrose-Faktor- α

BD und LD 5 mths

Ein ähnliches Expressionsmuster wie bei IL-6, zeigte sich auch bei TNF α : In der vorbehandelten Gruppe der Hirntodspender wurde eine geringere TNF α -Expression gegenüber der Kontrollgruppedetektiert (Faktor 0,6; n.s.). In der Gruppe der Lebendspender hingegen wurde eine signifikant gesteigerte TNF α -Expression in der vorbehandelten im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (LDmAb vs. LDcon, $0,001555 \pm 0,0002757$ vs. $0,000825 \pm 9,092e-005$; $p = 0,0317$).

Interferon- γ

BD und LD 5 mths

Auch bezüglich der IFN γ -Expression wurde in der Antikörper-vorbehandelten Hirntodgruppe eine verringerte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Faktor 0,3; n.s.). Ein konträres Bild zeigte sich erneut in der in den LD-Gruppe: Hier war nach Spendervorbehandlung die IFN γ -Expression in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 3,2 gegenüber der LDcon-Gruppe vergrößert (n.s.).

Interferon- γ induziertes Protein 10

BD und LD 5 mths

Die IP-10 (Interferon- γ induziertes Protein 10) Genexpression war in beiden Hirntodgruppen etwa gleich groß (n.s.; Faktor 1,2). Dagegen zeigte sich in den LD-Gruppe ein signifikanter Unterschied: Hier war nach Spendervorbehandlung die IP-10 Expression in der LDmAb-Gruppe um den Faktor 8,7 gegenüber der LDcon-Gruppe vergrößert ($p=0,0357$).

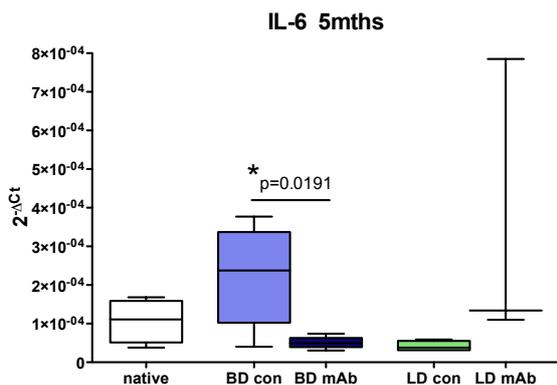


Abb. 31 a

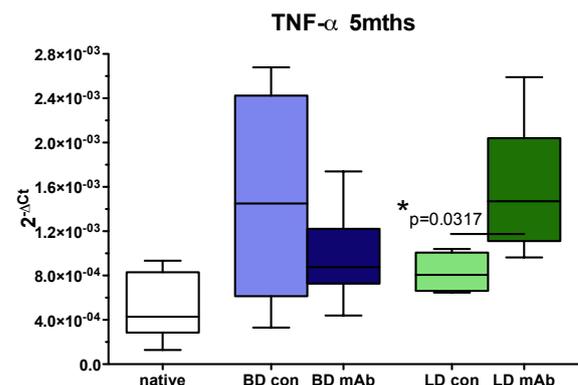


Abb. 31 b

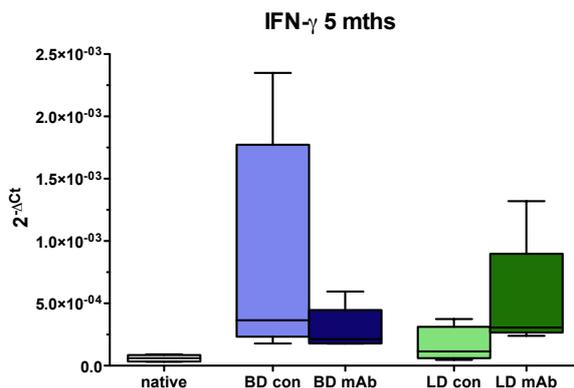


Abb. 31 c

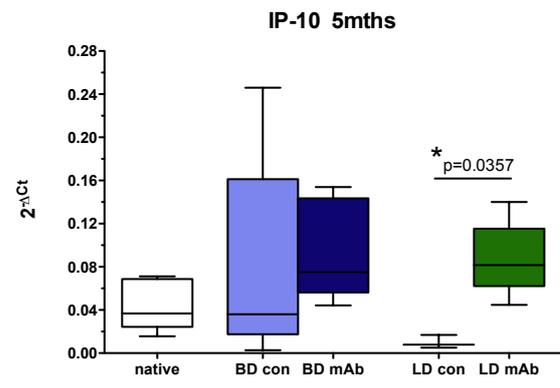


Abb. 31 d

Abb. 31 a-d

IL-6, TNF α , IFN γ und IP-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR nach 5 Monaten

Interleukin 6

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	0,0002232	5,076e-005	<i>p</i> = 0,0191		4,163e-005	0,000343	ns	
SA	0,0001334	1,552e-005			1,301e-005	0,0003830		
SF	5,444e-005	6,943e-006			6,505e-006	0,0002211		
n	6	5			0,2	4		

Tumor-Nekrose-Faktor- α

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	0,001493	0,0009678	ns		0,000825	0,001555	<i>p</i> = 0,0317	
SA	0,0009064	0,0004289			0,0001818	0,0006165		
SF	0,0003700	0,0001751			9,092e-005	0,0002757		
n	6	6			0,6	4		

Interferon- γ

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	0,0008482	0,0002924	ns		0,0001622	0,0005268	ns	
SA	0,0009025	0,0001760			0,0001451	0,0004523		
SF	0,0003685	7,869e-005			7,257e-005	0,0002023		
n	6	5			0,3	4		

Interferon- γ induziertes Protein 10

<i>5mths</i> <i>NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(BD mAb</i> <i>vs.</i> <i>BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio</i> <i>(LD mAb</i> <i>vs.</i> <i>LD con)</i>
MW	0,07936	0,09143	ns		0,009967	0,08728	<i>p</i> = 0,0357	
SA	0,09329	0,04479			0,006170	0,03424		
SF	0,03809	0,01829			0,003562	0,01531		
n	6	6			1,2	3		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 14 IL-6, TNF α , IFN γ und IP-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR nach 5 Monaten

5.4.2 CCL19, CCL21 und Interleukin-10

Interleukin 10

BD und LD 5 mths

5 mths p. t. zeigte sich in der BDmAb-Gruppe eine leicht verringerte IL-10 Expression im Vergleich zur BDcon-Gruppe (Faktor 0,7; n.s.).

Bei den Lebendspendern wurde hingegen unter Vorbehandlung ein signifikanter Anstieg der IL-10 Genexpression in der LDmAb-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert: (Faktor 11,9; LDmAb-Gruppe vs. LDcon: $7,66e-006 \pm 4,323e-006$ vs. $6,443e-005 \pm 1,632e-005$; **p = 0,0159**).

CCL19

BD und LD 5 mths

Unter Spendervorbehandlung zeigte sich in der BDmAb-Gruppe ebenfalls eine, wenn auch nicht signifikant verringerte CCL-19 Expression gegenüber der nicht vorbehandelten Kontrolle (Faktor 0,8; n.s.).

Hingegen wurde in der Gruppe der Lebendspender unter der Vorbehandlung eine nicht signifikante, aber tendenziell, gesteigerte CCL-19 Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (Faktor 3,6; n.s.).

CCL21

BD und LD 5 mths

Bezüglich der CCL-21 Expression zeigte sich 5 mths p.t. ein ähnlicher Trend wie zuvor bei CCL-19: In der BDmAb-Gruppe wurde ebenfalls eine leicht reduzierte CCL-21 Genexpression gegenüber der BDcon-Gruppe detektiert (Faktor 0,7; n.s.).

In den LD-Gruppen zeigte sich unter Spendervorbehandlung wiederum keine Suppression der CCL-21 Expression: In der LDmAb-Gruppe war die Expression gegenüber der LDcon-Gruppe erhöht (Faktor 2,3; n.s.).

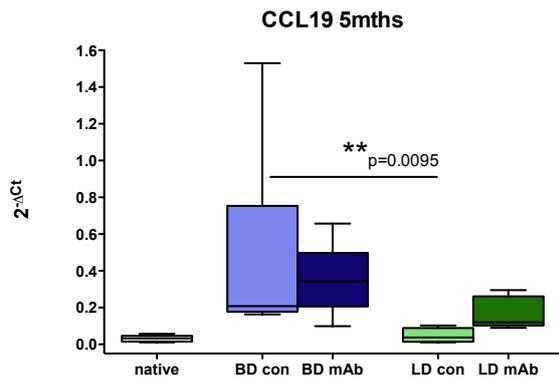


Abb. 32 a

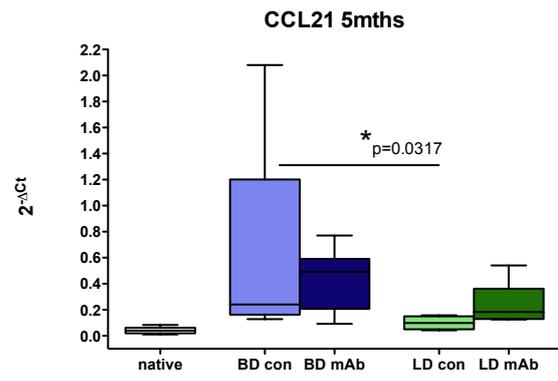


Abb. 32 b

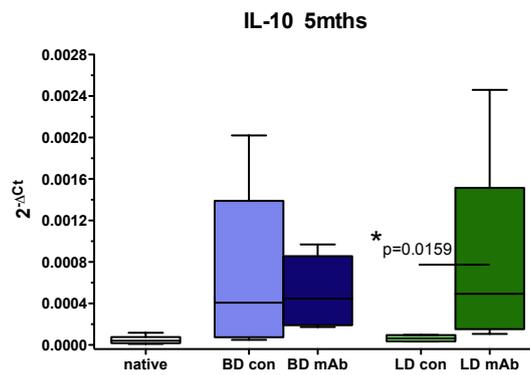


Abb. 32 c

Abb. 32 a-c

CCL19, CCL21 und IL-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR nach 5 Monaten

CCL19

<i>5mths NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (BD mAb vs. BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (LD mAb vs. LD con)</i>
MW	0,4645	0,3551	ns		0,04703	0,1694	ns	
SA	0,5363	0,1957			0,04012	0,08777		
SF	0,2189	0,07991			0,02006	0,03925		
n	6	6			0,8	4		

CCL21

<i>5mths NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (BD mAb vs. BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (LD mAb vs. LD con)</i>
MW	0,5936	0,4305	ns		0,09948	0,2334	ns	
SA	0,8339	0,2424			0,05171	0,1740		
SF	0,3729	0,09163			0,02585	0,07782		
n	5	7			0,7	4		

Interleukin 10

<i>5mths NTx</i>	<i>BD con</i>	<i>BD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (BD mAb vs. BD con)</i>	<i>LD con</i>	<i>LD mAb</i>	p-Intervall	<i>Ratio (LD mAb vs. LD con)</i>
MW	0,0006917	0,0005092	ns		6,443e-005	0,000766	<i>p</i> = 0,0159	
SA	0,0007898	0,0003443			3,264e-005	0,0009667		
SF	0,0003224	0,0001540			1,632e-005	0,0004323		
n	6	5			0,7	4		

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Standardfehler (SF)

Tabelle 15 CCL19, CCL21 und IL-10 Expression im Nierenallograft nach anti-IL-6R mAb Vorbehandlung von Hirntod- und Lebendspendern im Vergleich zu unbehandelten Hirntod- und Lebendspendern. Real-Time-PCR nach 5 Monaten

6 DISKUSSION

Die Nierentransplantation ist sowohl aus medizinischen als auch ökonomischen Gesichtspunkten die Therapie der Wahl des terminalen Nierenversagens. In erster Linie werden Organe Verstorbener, d. h. Nieren hirntoter Spender verwendet. Aufgrund der demografischen Entwicklung, einer großzügigeren Indikation zur Transplantation sowie der sinkenden Bereitschaft der Bevölkerung zur Organspende kommt es zu einer stetig steigenden Anzahl von Patienten auf den Wartelisten im Eurotransplantraum. Die resultierende Diskrepanz zwischen Organbedarf und verfügbaren Organen führt zudem zu einer steigenden Mortalität auf der Warteliste. Um den riesigen Bedarf decken zu können und das Überleben möglichst vieler Patienten zu garantieren, wurden die Spenderkriterien erweitert und die Transplantation so genannter „marginaler Organe“ akzeptiert. Auch im Falle der NTx steigt allerdings mit Akzeptanz dieser Organe das Risiko einer eingeschränkten Transplantatfunktion bzw. eines reduzierten Transplantatüberlebens, da diese Organe erheblich anfälliger gegenüber transplantationsassoziierten Schädigungsmechanismen sind. [130]

Der Hirntod als ein entscheidender Spender-spezifischer, Alloantigen-unabhängiger Risikofaktor induziert bereits vor der eigentlichen Transplantation eine massive systemische Inflammation im Spender. Hierdurch wird das Transplantat nicht nur (vor-)geschädigt und damit die Transplantatüberlebenszeit eingeschränkt, sondern auch die Immunogenität des Transplantates entscheidend gesteigert. [63, 64, 90] Tatsächlich zeigen Transplantate nicht verwandter Lebendspender gegenüber Organen hirntoter Spender eine bessere Kurz- und Langzeitfunktion sowie eine geringere Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungen. [131, 132]

Um die Organqualität und konsekutiv das Transplantat- und Patientenüberleben zu verbessern, werden heute verschiedene Therapien zur Minimierung potenzieller Schädigungen des Transplantats vor, während und nach NTx durchgeführt.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6, welches mit, während und nach Eintritt des Hirntodes massiv systemisch sowohl von Zellen des neuronalen Gewebes als auch von verschiedenen Zelltypen des Immunsystems sezerniert wird, spielt eine Schlüsselrolle bei der (Vor-)schädigung und Steigerung der Immunogenität der Spenderorgane (ausführliche Darlegung unter 1.5.2.1 - 1.5.2.3). Klinische Studien sowie experimentelle Untersuchungen belegen, dass nicht nur eine inverse Korrelation zwischen IL-6 Serumspiegel und dem Transplantatüberleben besteht, [102, 103] sondern auch durch IL-6 direkt akute und chronische Abstoßungen induziert werden können. [133, 134]

In der vorliegenden Arbeit wurde daher im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte (F-344 Spender-, Lewis Empfängertiere) der Einfluss einer Spendervorbehandlung mit einem monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor (CD126)-Antikörper auf das Zytokin-/Chemokinmuster, die Alloreaktivität sowie die frühe Transplantatfunktion und Langzeitfunktion von Transplantaten hirntoter Spender untersucht. Dabei sollten Aussage über folgenden Fragen getroffen werden:

4. Führt eine Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R)
 - c) zu einer reduzierten inflammatorischen Immunantwort im Empfänger?
 - d) zu einer Verminderung des Reperfusionsschadens und der Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen?

5. Führt eine Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R)
 - c) zu einer Verbesserung der Langzeit-Transplantatfunktion?
 - d) zu einer Verminderung der chronischen Allograftnephropathie?

6. Profitieren Empfänger von Lebendspenden von einer Spendervorbehandlung mit anti-Maus/Ratte CD126 (IL-6R)?

Hierzu verwendeten wir folgende Untersuchungsmethoden:

Histologische Untersuchungen

Immunhistologische Untersuchungen

Molekularbiologische Untersuchungen (rt PCR)

FACS- und ELISA-Untersuchungen (noch nicht veröffentlicht)

6.1 Der zeitliche Aspekt – Versuchsaufbau und Therapienutzen

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass durch eine Vorbehandlung hirntoter Spender mit einem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen den IL-6 Rezeptor (IL-6R) die Schädigung von Nierentransplantaten minimiert werden kann. Ferner konnte wir zeigen, dass die durch den Hirntod induzierte sowie durch den I/R-Schaden getriggerte Expression pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF α , INF γ , IL-4, IL-10, und von Chemokinen, wie CCL-19/-21, durch die Vorbehandlung merklich reduziert wird.

Ebenso zeigte sich unter der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung eine geringere Infiltration spezifischer Entzündungszellen (ED1+, CD8+, APZs, DCs, NK-T-Zellen) in das Allograft sowie signifikant geringere histomorphologische Schädigungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies legt den Schluss nahe, dass durch die Vorbehandlung nicht nur die inflammatorische Immunantwort des Empfängers reduziert wurde, sondern auch ein verminderter Reperfusionsschadens und eine abgeschwächte akute Abstoßungsreaktion des Allografts erreicht werden konnte.

Der Effekt der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung auf die Zytokin- und Chemokinexpression sowie auf immunkompetente Entzündungszellen war 7 Tage p. t. deutlich ausgeprägter als 18 Stunden p. t. Die Expression aller in dieser Arbeit untersuchten Zytokine (IL-6, TNF α , INF γ , IL-4, IL-10) und Chemokine (CCL-19/-21) war unter Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe 7d p. t. reduziert. Derselbe Trend wurde in der Immunhistochemie für alle untersuchten Immuzellsubtypen, mit Ausnahme von CD4+ T-Zellen, beobachtet. Interessanterweise wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten eine erhöhte Anzahl CD4+ T-Zellen (7d p. t., $p < 0.05$) in der vorbehandelten Gruppe nachgewiesen.

Für die hier beobachtete zeitliche Abhängigkeit des Effekts der Spendervorbehandlung wird der im Folgenden beschriebene Mechanismus angenommen:

Es ist bekannt, dass es nach Eintreten des Hirntodes zu einer massiven generalisierten systemischen IL-6-Ausschüttung kommt. So detektierten verschiedene Arbeitsgruppen nach Hirntodinduktion eine signifikant größere IL-6 Expression im Gewebe (Dünndarm und Leber) und IL-6 Konzentration im Serum im Vergleich zu Lebendspendern. [90, 92] Weiss et al. beobachteten in einer klinischen Lebertransplantationsstudie bereits vor Organentnahme eine bis zu 100-fach erhöhte IL-6 Konzentration im Serum hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern. [64]

In der vorliegenden Arbeit detektierten wir in PCR-Analysen bereits 18h p. t. eine etwa 10-fach gesteigerte IL-6 Expressionsrate in der Gruppe unbehandelter Hirntodspender gegenüber der Gruppe unbehandelter Lebendspender sowie eine größere IL-6 Serum-Proteinkonzentration (ELISA) in der selben Gruppe.

In einem Nierentransplantationsmodell der Ratte zeigten Damman et al. sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen, dass es bereits 4h nach Hirntodinduktion nicht nur zu einer gesteigerten C3-Expression in epithelialen Tubuluszellen kommt, sondern auch die IL-6 Konzentration im Serum signifikant ansteigt. [94] Ähnliche Ergebnisse beobachteten Koudstaal et al. in einem Dünndarmtransplantationsmodell der Ratte: Sie detektierten in Leber und Dünndarm nach 1 Stunde eine leicht erhöhte sowie eine signifikant gesteigerte IL-6 Expression 4 Stunden nach Hirntodinduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (scheinoperierte Ratten ohne Hirntodinduktion ohne Tx). Ebenso waren die IL-6 Serumkonzentrationen 1 Stunde und 4 Stunden nach Hirntod im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich angestiegen. [92]

In mehreren klinischen Studien und Untersuchungen konnte zudem im Serum von Patienten, welche ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten, eine stark erhöhte IL-6 Konzentration gemessen werden, sodass ein mittelbarer Zusammenhang zwischen dem raschen IL-6 Anstieg und dem Untergang von neuronalem Hirngewebe angenommen wird. [95, 96]

Diese Kausalität wurde in einer Arbeit von Boama et al. (siehe auch unter 1.5.2) anhand einer potenziellen Enzymkaskade beschrieben: So erfolgt nach einer neuronalen Hirnverletzung ebenso wie nach Eintritt des Hirntods in den Mikrogliazellen eine gesteigerte Transkription von NF-kappaBeta und eine vermehrte IL-6 Synthese. Konsekutiv kommt es zu einer massiven IL-6 Sezernierung, sodass sich nach Überwinden der Blut-Hirnschranke bereits 1 Stunde nach Hirntod eine signifikant erhöhte IL-6 Konzentration im Serum nachweisen lässt. [43, 93] Diese wird im Empfänger durch den I/R-Schaden während und nach der Transplantation noch weiter potenziert. [64, 93]

Wie erstmalig durch Pratschke et al. beschrieben, führt der Hirntod im humanen Organspender zu einer signifikanten Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IFN γ und TNF α , wodurch die immunologische Aktivierung und somit die Immunogenität der Spenderorgane bereits vor der eigentlichen Transplantation entscheidend induziert und gesteigert wird. Neben dieser unspezifischen Aktivierung folgt daraus, wie in 1.4.4.2 bereits beschrieben, ein verstärkter I/R-Schaden sowie eine verstärkte Empfänger-Immunantwort gegen das Transplantat, an deren Ende im Vergleich zum Lebendspender eine stärkere Schädigung und späterer Organverlust zu beobachten ist. [62-66, 73-75] Durch den Hirntod selbst und die folgende IL-6 Sezernierung

kommt es bereits vor der Transplantation im Spender nicht nur zu einer gesteigerten Zytokin- und Chemokinexpression, sondern ebenfalls zu einer raschen Aktivierung von Entzündungszellen.

Kusaka et al. verglichen in einem Nierentransplantationsmodell in der Ratte die Zytokinexpression, die Leukozyteninfiltration sowie die histomorphologischen Veränderungen in Nierentransplantaten hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern. Sie beobachteten bei den Hirntodspendern eine verstärkte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, des Chemokins IP-10 sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM, P-/E-Selektine). Bereits 1 Stunde nach Hirntodinduktion zeigte sich in diesem Modell im Spender eine erhöhte Synthese von P- und E-Selektinen, die im Zuge des so genannten „Rollings“ durch Endothelaktivierung die Adhäsion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten vermitteln. [67, 135]

Die hier genannten Aspekte verdeutlichen wie stark und vor allem wie schnell sich die pathophysiologischen Folgen nach Eintritt des Hirntodes auf den Spender und das Spenderorgan einstellen und damit die Organqualität entscheidend beeinflussen.

Setzt man den Versuchsaufbau dieser Arbeit mit den raschen pathophysiologischen Veränderungen nach Eintritt des Hirntodes und der pharmakokinetischen Eigenschaften monoklonaler Antikörper in Verbindung, so lässt sich der vermeintlich nicht so stark ausgeprägte Benefit einer anti-IL-6R mAb Vorbehandlung hirntoter Spender zum frühen Untersuchungszeitpunkt 18 Stunden p. t. gegenüber dem späteren Untersuchungszeitpunkt 7 Tage p. t. erklären:

In der vorliegenden Arbeit wurde den Spenderratten erst 1 Stunde nach Hirntodinduktion bzw. 5 Stunden vor Transplantation der anti-IL-6R monoklonale Antikörper injiziert. Somit konnte IL-6 bereits über den Zeitraum von 1 Stunde nach seiner massiven Freisetzung in die Peripherie, über die Bindung an spezifische Rezeptoren seine pathogenen Eigenschaften im Spender entwickeln und über seine Autoregulation (Abb. 3) die Expression und Produktion von weiterem IL-6 fördern. Hierdurch ist zu erklären, dass sich der neutralisierende Effekt der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung 18 Stunden p.t noch nicht so kontrastreich darstellt, da innerhalb jener Stunde bereits die Bildung pro-inflammatorischer Gene ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-4) sowie die Differenzierung von Entzündungszellen induziert wurde.

Diese Annahme wird zusätzlich durch die pharmakokinetischen Eigenschaften monoklonaler Antikörper im Allgemeinen sowie die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften von Tocilizumab im Speziellen untermauert:

Monoklonale Antikörper, welche bedingt durch ihre Hydrophilie nur parenteral injiziert werden können, zeichnen sich neben kleiner Verteilungsvolumina durch eine langsame Eliminationshalbwertszeit und v. a. durch eine langsame Gewebeverteilung aus. [136]

Zhang et al. untersuchten in einer klinischen Studie an gesunden Probanden die pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften von Tocilizumab. Bei diesem handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, welcher den Interleukin-6 Rezeptor inhibiert. Der Wirkungsmechanismus von Tocilizumab entspricht dem des in dieser Arbeit verwendeten anti-Maus/Ratte anti-IL-6R monoklonalen Antikörpers. In der klinischen Studie wurden die Probanden in 4 verschiedene Gruppen aufgeteilt, wobei je 2 Gruppen einmalig Tocilizumab in unterschiedlicher Dosis intravenös bzw. subkutan injiziert wurde. Nach der Tocilizumab-Injektion erfolgten u. a. Blutentnahmen zur Konzentrationsbestimmung von Tocilizumab, Neutrophilen Granulozyten, IL-6 und C-reaktivem Protein (CRP) zu mehreren Zeitpunkten am ersten Tag sowie einmal täglich an den folgenden Tagen (Tag 2,3,4,5,7,9,11-25). Hierbei sei anzumerken, dass IL-6 direkt die CRP-Synthese in Hepatozyten der Leber stimuliert und daher CRP als Indikator für die IL-6 Rezeptor Inhibierung durch Tocilizumab dienen kann. [137, 138] Zhang et. al beobachteten in allen Gruppen relativ zur detektierten Tocilizumab-Konzentration einen suffizienten Abfall der CRP-Konzentration im Serum: So zeigte sich in der Gruppe der Probanden, welchen einmalig 162 mg Tocilizumab intravasal injiziert wurde, eine max. Tocilizumab-Konzentration im Serum nach 1 Stunde; die kleinste CRP-Konzentration wurde aber erst nach 11 Tagen gemessen. Ebenso war die Anzahl Neutrophiler Granulozyten zwischen Tag 2 und 9 am geringsten. [139]

Diese Beobachtungen sind mit unseren Ergebnissen vereinbar: Zeigte sich nach 18 Stunden, wie beschrieben, noch kein klarer Benefit, so konnte hingegen 7 Tage nach p. t. ein deutlicher Nutzen der Vorbehandlung hirntoter Spender gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass bis zu diesem Zeitpunkt die entzündungsfördernden IL-6-Kaskaden unter der Spendervorbehandlung erfolgreich gehemmt bzw. unterbrochen werden konnten und der anti-IL-6R monoklonale Antikörper bis zu jenem Zeitpunkt seine effiziente Wirkung entfalten konnte.

6.2 Akute Abstoßung

Es ist bekannt, dass die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger die Frequenz und Intensität akuter Abstoßungsreaktionen nach Transplantation beeinflusst. [72, 132, 140] Ebenso ist klinisch eine enge Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens akuter Rejektionen und dem Risiko einer chronischen Abstoßung dokumentiert. [72, 141, 142] Dennoch zeigen Untersuchungen, dass Transplantate hirntoter Spender trotz größtmöglicher HLA-Kompatibilität eine signifikant schlechtere Kurzzeit- und Langzeitfunktion gegenüber Organen nichtverwandter Lebendspender aufweisen. Dies belegt den Einfluss alloantigen-unabhängiger Faktoren (wie u. a. Hirntod und I/R-Schaden) auf die Organqualität. [70, 72]

Nach allogener oder auch xenogener Transplantation folgt neben der humoralen Immunantwort eine vor allem zellvermittelte immunologische Reaktion auf das Fremdgewebe. Diese wird entscheidend durch körperfremde und körpereigene MHC-Moleküle der Klasse I und II bestimmt. Dendritische Zellen sind die potentesten APZs, da sie nicht nur durch die Präsentation spezifischer Alloantigene an anderen Zellen die humorale Immunantwort initiieren, sondern auch als einzige Zellen des Immunsystems naive T-Zellen direkt aktivieren und somit die adaptive Immunantwort auslösen können. [143] Sie beeinflussen sowohl über die “direct allorecognition“ als auch über die “indirect allorecognition“ entscheidend den Prozess der Transplantatabstoßung. (siehe auch 1.3.1 u. 1.3.2) Die Migration aktivierter DCs in den nächsten drainierenden Lymphknoten wird dabei durch eine gesteigerte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 gelenkt. [144] Gleichzeitig führt die Aktivierung zu einer reduzierten Phagozytoseleistung sowie einer vermehrten Expression von MHC-Klasse II-Molekülen und kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von APZs. [145] Durch die Dichteerhöhung und gesteigerte Expression von MHC-II-Molekülen der APZs wird nicht nur die zelluläre Immunantwort, sondern auch die Immunogenität des Transplantates potenziert.

Die nachgewiesene Korrelation zwischen histologisch gesicherter Allograft-Rejektion und einer erhöhten MHC-Dichte legt den Schluss nahe, dass eine Steigerung der Transplantatimmunogenität zu einer erhöhten Abstoßungsrate führt. [72, 146, 147]

Die initiale Phase der Allograft Rejektion ist v. a. durch eine ausgedehnte zelluläre Infiltration von APZs und aktivierten T-Zellen charakterisiert. In unsere Arbeit konnten wir diese zelluläre Infiltration durch die Vorbehandlung hirntoter Spender signifikant reduzieren. Es zeigte sich

histomorphologisch nicht nur eine signifikant geringere Anzahl infiltrierender Zellen, sondern auch eine signifikant verringerte Destruktion der Glomeruli.

Im Rahmen der Transmigration wandern v. a. im Blut zirkulierende mononukleäre Zellen über das aktivierte Endothel in das Transplantat ein und differenzieren sich dort zu APZs und u. a. zu DCs. APZs der MHC-Klasse II des Empfängers können im Rahmen der „indirect allorecognition“ native CD4⁺ T-Zellen aktivieren. [148] Hierauf folgt eine gesteigerte Expression und Sezernierung verschiedener Zyto- und Chemokine, wie die hier untersuchten Zytokine TNF α , IFN γ , IL-6, IL-4, IL-10 und Chemokine CCL-19 und -21, wodurch die Destruktion des Transplantates unterhalten wird. Über eine intrazellulär gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors NF κ B sezernieren wiederum v. a. Neutrophile Granulozyten IL-6 und seinen löslichen IL-6 Rezeptor (sl-IL-6R). [149] Konsekutiv wird dadurch die ohnehin schon durch den I/R-Schaden getriggerte sowie durch den Hirntod induzierte erhöhte IL-6 Konzentration weiter gesteigert und die Infiltration von Monozyten und anderen Entzündungszellen in das Allograft gefördert.

Die Ausdifferenzierung naiver im Blut zirkulierender Monozyten hin zu gewebeinfiltrierenden Monozyten/Makrophagen wird dabei entscheidend durch IL-6 im Zusammenspiel mit dem Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) und IL-4 beeinflusst: In-vitro-Untersuchungen zeigten eine Akkumulation von Makrophagen nach IL-6 Gabe. Weitere in-vitro-Analysen ergaben, dass eine Neutralisierung von IL-6 mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-6 und/oder gegen seinen Rezeptor (IL-6R) eine signifikante Reduktion der Bildung und Ausreifung infiltrierender Makrophagen zur Folge hat. [150, 151]

Diese Ergebnisse konnten wir durch unsere Untersuchungen untermauern: So zeigte sich durch Blockierung des IL-6R in vorbehandelten hirntoten Spendern immunhistologisch eine geringere Anzahl infiltrierender ED1⁺ Monozyten/Makrophagen im Transplantat gegenüber nicht vorbehandelten Hirntodspendern. Der direkte Benefit der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung hirntoter Spender konnte durch zusätzliche FACS-Analysen (nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) belegt werden: Diese Untersuchungen des Transplantatgewebes zeigten nach 7 Tagen eine signifikante Reduktion ED1⁺ Monozyten/Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Interessanterweise beobachteten wir in den eigenen Untersuchungen nach Spendervorbehandlung eine Reduktion bzw. eine signifikante Hemmung der IL-4 Genexpression 18 Stunden bzw. 7 Tage nach Hirntodinduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-4 induziert u. a. die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen, fördert die Differenzierung von naiven T-Zellen

in T_{H2} -Zellen und hemmt die Bildung von T_{H1} -Zellen und Makrophagen. Neben diesen bekannten Wirkmechanismen wird inzwischen auch die Beteiligung von IL-4 in alternativen Signalwegen und pro-inflammatorischen Prozessen diskutiert: [152] Denn neben der klassischen Makrophagenaktivierung mittels $IFN\gamma$ über NK- und NK-T-Zellen zeigten in vitro Untersuchungen, dass eine alternative Makrophagenaktivierung maßgeblich durch IL-4 und IL-13 getriggert wird. [150, 152, 153] Eine andere Arbeitsgruppe um Famulski et al. beobachteten in einem NTx-Modell der Maus zwar einen geringeren Einfluss von IL-4 bzw. IL-13 auf die Aktivierung alternativ aktivierte Makrophagen (AMA), konnten aber deren pathologische Wirkung/Eigenschaften auf das Allograft nachweisen bzw. aufzeigen: So demonstrierten sie in ihrem Modell, dass hohe Spiegel spezifischer Gen-Transkripte (Arg1, Mrc1, Mmp12, Ear1) alternativ aktivierter Makrophagen mit einer verstärkten Allograftinfiltration sowie mit einer parenchymalen Schädigung und einer verstärkten Tubulitis assoziiert waren. [154]

Es kann demnach vermutet werden, dass durch die anti-IL-6R Vorbehandlung und konsekutive deutliche Reduzierung der IL-6 und IL-4 Expression, die Ausreifung infiltrierender Makrophagen erfolgreich gehemmt werden konnte.

Ferner zeigte sich in unseren Genexpressionsanalysen unter der Spendervorbehandlung auch eine signifikante Reduktion des Chemokins CCL-21 sowie eine verminderte Expression von CCL-19. Kotsch et al. beobachteten in Nullbiopsien transplantierte Nieren eine signifikant gesteigerte Induktion der Chemokine CCL-19 und CCL-21 in Transplantaten verstorbener Spender im Vergleich zu denen von Lebendspendern. [78] Beide Chemokine teilen sich den Chemokinrezeptor 7 (CCR7), welcher auf APZ und naiven T-Zellen exprimiert wird und die chemotaktische Zellinfiltration in das Allograft fördert. [79]

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Vorbehandlung eine Suppression der CCL-19- und CCL-21- Chemokinexpression erreicht werden, die eine weitere Reduzierung der Infiltration naiver T-Zellen und APZs in das Transplantat zur Folge hatte.

Auch in den zusätzlichen FACS-Analysen von Transplantatgewebeproben konnte gezeigt werden, dass durch eine anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung die Anzahl transplantatinfiltrierender APZs deutlich reduziert werden kann: So zeigte sich unter Spendervorbehandlung neben der bereits erwähnten signifikanten Minderung von ED1+ Monozyten/Makrophagen (7 Tage p.t.) auch eine signifikant reduzierte Anzahl Dendritischer Zellen (OX62+) nach 7 Tagen respektive 18 Stunden p.t.. Ebenso wurden in FACS-Doppelfärbungen eine geringere Anzahl MHCII+ DCs (OX62+MHCII+) und MHCII+ B-Zellen

(CD45RA+MHCII+) in der Gruppe vorbehandelter Hirntodspender gegenüber den Kontrollgruppen nach 7 Tagen detektiert.

Diese Korrelation zwischen der Abnahme der Monozyten/Makrophagen- und der DC-Population ist bekannt. So initiieren aktivierte Monozyten/Makrophagen über die Sezernierung von $\text{TNF}\alpha$, die Stimulation und Mobilisierung von DCs. Diese wiederum wandern in die nächsten lymphatischen Organe und induzieren dort die T-Zell-Antwort. Auch wenn in den eigenen PCR-Analysen kein relevanter Unterschied bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ Genexpression zwischen den Vergleichsgruppen zu erkennen war, konnte eine tendenziell reduzierte $\text{TNF}\alpha$ Proteinkonzentration im ELISA (nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) nach Spendervorbehandlung im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Dies mag sowohl auf die kleinere Population aktivierter Makrophagen, als auch auf die direkte Blockierung des IL-6R, der konsekutiven Hemmung von NF- κ B und der daraus resultierenden Inhibierung der $\text{TNF}\alpha$ Synthese zurückzuführen sein. (Abb. 3)

Im Rahmen der Allograft-Rejektion spielen neben den bereits erwähnten Makrophagen und DCs verschiedene T-Zell-Populationen eine tragende Rolle. Nach Induktion durch eine APZ der MHC-Klasse I oder II differenziert sich eine naive-T-Zelle in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in verschiedene Effektor-T-Zellen. Innerhalb der adaptiven Immunantwort imponieren T-Helferzellen (TH) v. a. regulatorisch, während zytotoxische T-Zellen (Tzyt) und NK-T-Zellen (NKT) aufgrund ihrer Apoptose induzierenden Eigenschaften mittelbar schädigend auf das Allograft wirken. T-Helferzellen lassen sich in Subtypen einteilen, welche ihrerseits durch ein typisches Zytokinexpressionsmuster charakterisiert sind. Allen THs ist das CD4+ Glykoprotein gemein, welches ubiquitär je nach Subtyp alleine oder mit kostimulatorischen Molekülen MHC-II-tragende APZs erkennt.

Nach der Aktivierung durch eine APZ polarisiert sich eine naive CD4+ T-Zelle (nT) unter IL-12 und $\text{IFN}\gamma$ zu einer $\text{IFN}\gamma$ sezernierenden $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zelle sowie unter IL-4 zu einer IL-4 sezernierenden $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zelle. Eine Polarisierung in Richtung der erst kürzlich beschriebenen T_{reg} - bzw. $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen wird dabei entscheidend durch IL-6 beeinflusst. [155] Beide Subtypen benötigen für ihre Differenzierung TGF β , allerdings wird in Anwesenheit von IL-6 die Differenzierung zu einer IL-17 sezernierenden $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zelle getriggert, während in Abwesenheit von IL-6 die Differenzierung zu einer IL-10 sezernierende T_{reg} gefördert wird. [104, 155, 156] In einigen Studien wurde jedoch beschrieben, dass eine erhöhte IL-6 Konzentration die Differenzierung von naiven T-Zellen sowohl zu $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen als auch zu $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen induzieren kann. [104, 157]

T_{H17}-Zellen sezernieren vermehrt Interleukin-17, wodurch zum einen die IL-6 Synthese über die NF-κB-Aktivierung weiter verstärkt wird und zum anderen die Transplantatdestruktion durch Induktion neutrophiler Granulozyten und Fibroblasten getriggert wird. [104, 155-157]

So zeigte sich in einem allogenen Lungentransplantationsmodell der Maus im Vergleich zum isogenen Modell eine stärkere IL-6 Expression, welche mit einer größeren Population von T_{H17}-Zellen sowie einer stark ausgeprägten Bronchiolitis obliterans als Folge einer akuten Abstoßungsepisode assoziiert war. [158]

Der IL-6 Effekt auf die T_{H1}-Antwort wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert; einige Quellen geben eine supprimierende, [159] andere wiederum eine stimulierende Wirkung auf die T_{H1}-Zell Population an. [160, 161] Unbestritten ist jedoch, wie sowohl klinische Studien als auch experimentelle Untersuchungen belegen, dass eine erhöhte IL-6 Expression nicht nur die Differenzierung von CD4+ T-Helferzellen, sondern auch von CD8+ T_{zyt}-Zellen induziert [134, 162, 163] sowie mit einer vergrößerten Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungen assoziiert ist. [133, 134]

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir unter der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung hirntoter Spender eine geringere Infiltration von CD8+ T-Zellen gegenüber der unbehandelten Gruppe. Dies ist besonders bemerkenswert, da in unseren immunhistologischen Untersuchungen CD8+ T-Zellen die größte Population transplantatinfiltrierender Zellen darstellte. Der Benefit der Spendervorbehandlung wird besonders deutlich, wenn man den Anstieg der CD8+ T-Zellinfiltration über die Zeit (18h → 7d p. t.) zwischen vorbehandelten Hirntodspendern und Lebendspendern bzw. beiden Kontrollgruppen miteinander vergleicht: So zeigt die Kontrollgruppe der Lebendspender gegenüber der Kontrollgruppe der Hirntodspender, wie zu erwarten, einen kleineren Anstieg der Allograftinfiltration zwischen 18 Stunden und 7 Tagen. In den vorbehandelten Gruppen war jedoch ein geringerer Anstieg der Allograftinfiltration CD8+ T-Zellen in der Gruppe der Hirntodspender im Vergleich zu vorbehandelten Lebendspendern zwischen 18 Stunden und 7 Tagen zu beobachten.

Diese Ergebnisse werden durch zusätzliche FACS-Analysen unserer Arbeitsgruppe bestätigt: So detektierten wir 7 Tage p. t. eine signifikant geringere Anzahl CD8+ CD161+ NKTs im Allograft unter Vorbehandlung hirntoter Spender im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine kleinere Anzahl von NKTs und zytotoxischen CD8+ T-Zellen, welche durch direkte Lyse Endothel- und Parenchymzellen schädigen können, korreliert mit dem beobachteten geringeren histologischen Schädigungsgrad des Allografts in der Gruppe vorbehandelter Hirntodspender gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Arbeitsgruppe um Booth et al. publizierten vergleichbare Ergebnisse in einem allogenen Transplantationsmodell der Maus zur Untersuchung der CD4⁺/CD8⁺ vermittelten akuten Abstoßung nach Herztransplantation unter IL-6 Neutralisierung mittels eines anti-IL-6R mAbs. Sie demonstrierten, dass Mäuse, welche mit anti-IL-6R mAb behandelt wurden, nicht nur eine signifikant kleinere Allograftinfiltration durch sog. GIC (Graft Infiltrating Cells) aufwiesen, sondern auch eine signifikant längere Überlebenszeit zeigten. In weiteren Untersuchungen detektierten sie zudem unter anti-IL-6R mAb Behandlung signifikant geringere IFN γ -Konzentrationen in Milzzellkulturüberständen sowie einen signifikanten Anstieg Eosinophiler Granulozyten im prozentualen Verhältnis zu anderen GICs. Dies führten sie auf die Hemmung der T_{H1}-Antwort, einer konsekutiv geringeren IFN γ -Synthese und resultierenden Verschiebung der T-Zell-Antwort zu Gunsten einer T_{H2}-Antwort zurück. [133]

Auch in unserer Arbeit erreichten wir unter der anti-IL-6R mAb Behandlung hirntoter Nierenspender nach 7 Tagen eine deutliche Suppression der IFN γ -Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Auch im zeitlichen Verlauf war unter der Spendervorbehandlung der Anstieg der IFN γ -Expression zwischen 18h und 7 Tagen nur etwa halb so groß im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Ergebnisse konnten auf Proteinebene im ELISA bestätigt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe); auch hier war eine signifikant geringere IFN γ -Konzentration in der Empfängermilz unter der Vorbehandlung hirntoter Spender gegenüber der Kontrollgruppe 7 Tage p. t. zu verzeichnen. IFN γ wird von Makrophagen, DCs, NKs, NKTs und vor allem von CD4⁺ T_{H1}-Zellen sezerniert. [164, 165]

Daher kann postuliert werden, dass die durch eine Vorbehandlung erzielte Reduktion von Allograft-infiltrierenden Zellen, wie Makrophagen, APZs und NKTs, u. a. auch eine verringerte Expression und Sezernierung von IFN γ bewirkt. Da IFN γ ebenso für die Ausdifferenzierung von Makrophagen wichtig ist, lässt sich die verringerte IFN γ -Expression im Rahmen der Spendervorbehandlung auch mit der bereits diskutierten geringeren Allograftinfiltration von ED1⁺ Monozyten/Makrophagen unter Spendervorbehandlung vereinbaren.

Interessanterweise beobachteten wir 18 Stunden p. t. eine vergleichbare Anzahl CD4⁺ T-Helferzellen in Transplantaten vorbehandelter und unbehandelter Hirntodspender. 7 Tagen p. t. zeigte sich dagegen eine signifikant größere Infiltration von CD4⁺ T-Helferzellen in das Allograft vorbehandelter Hirntodspender. Dies könnte ebenfalls mit einer geringeren IFN γ -Expression, welche wir unter der Spendervorbehandlung detektierten, in Zusammenhang stehen:

So zeigten Untersuchungen, dass naive CD4⁺ T-Zellen nicht nur unter IL-12, sondern auch in Anwesenheit von IFN γ zu CD4⁺ T_{H1}-Zellen differenzieren. [166] CD4⁺ T_{H1}-Zellen, welche über einen positiven Loop v. a. IFN γ sezernieren, sind wiederum fähig, die Ausdifferenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ T_{H2}-Zellen zu hemmen. [165, 167] Es kann vermutet werden, dass durch die anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung neben der Suppression von Makrophagen, DCs, NKs, NKTs auch die T_{H1}-Antwort supprimiert wurde und hierdurch eine T_{H2}-und/oder eine CD4⁺ T_{reg} vermittelte Antwort ausgelöst wurde.

Um die Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen für die akute oder chronische Abstoßung im Kontext einer Spendervorbehandlung zu analysieren, müsste zum Beispiel in zukünftigen durchflusszytometrischen Analysen, eine Differenzierung zwischen CD4⁺ T_{H1}/T_{H2}-Zellen bzw. T_{H17}⁺/CD4⁺ T_{regs} erfolgen. Hierbei wäre interessant zu klären, inwieweit CD4⁺ T_{regs} unter einer Spendervorbehandlung vermehrt in das Allograft einwandern, da dieser T-Zell-Subtyp, durch seine Modulation von T_{zyt}-Zellen sowie durch Hemmung einer Allograftrejektion, mit einem längeren Transplantatüberleben assoziiert ist.[168]

6.3 I/R-Schaden

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) ist ein Spender-unabhängiger Risikofaktor, der die Organqualität und damit die Transplantatfunktion stark beeinträchtigt und die negativen Auswirkungen des Hirntods potenziert. [64, 72] Wie erwähnt (siehe 1.4.4.1), wird im Zuge des Hirntodes und der durch den „katecholaminen Sturm“ vermittelten Vasokonstriktion eine generalisierte Organischämie induziert. [64, 75, 93] Die ischämische Schädigung des Transplantats setzt sich demnach wie folgt zusammen: Aus der warmen Ischämie, d. h. der verbleibenden Zeit im Spender nach Eintritt des Hirntodes, der Operationszeit und der anschließenden Reperfusion im Empfänger sowie der kalten Ischämie, d.h. der Zeit der Konservierungs- und Transportphase des Transplantates. Insgesamt wird das Transplantat durch die Summe der ischämischen Schädigungen und der nachfolgenden Reperfusion nach der Transplantation geschädigt. Pathophysiologisch kommt es infolge der Ischämie und der Reperfusion zu einer starken Expression pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine, wie IL-6, TNF α , IFN γ , IL-10, IP-10, sowie einer gesteigerten Transplantatinfiltation an Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen. [43, 64, 72, 93, 130]

Die Arbeitsgruppe von Daemen et al. untersuchte die renale Ischämie in einem Mausmodell. Diese wurde durch temporäres Abklemmen (45 min) der renalen Gefäße induziert. Bereits nach 1 Stunde detektierten sie eine gesteigerte Expression spezifischer Chemokine, wie C-X-C motif ligand 1 (KC) und Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2). Der maximale Peak von MIP-2, welches insbesondere bei inflammatorischen Prozessen durch Makrophagen gebildet wird, wurde sowohl immunhistologisch als auch auf Genexpressionsniveau 6 Stunden nach Ischämieinduktion beobachtet. [61] Eine andere Arbeitsgruppe um Kaminska et al. untersuchte im Rahmen einer klinischen Studie mittels Nierenbiopsien nach Lebendspende das Expressionsniveau verschiedener Zytokine (u. a. IL-6, IFN γ , TGF β , IL-10) vor NTx, nach kalter Ischämie und 30 Minuten nach Reperfusion. Hierbei detektierten sie in den Nierentubuli nach Reperfusion eine signifikant gesteigerte Genexpression von IL-6, IL-10 und IL-2 im Vergleich zu Biopsien nach kalter Ischämie bzw. vor Reperfusion. [93] De Vries et al. demonstrierten in einer anderen klinischen Studie ähnliche Ergebnisse: Im Rahmen von Nierentransplantationen von Lebendspendern wiesen sie durch atriovenöse Konzentrationsmessungen 30 Minuten nach Reperfusion eine massive Freisetzung von IL-6 und IL-8 im Vergleich zu Messungen, welche vor der Nephrektomie durchgeführt wurden, nach. Diese Beobachtung konnten sie durch den Nachweis einer gesteigerten IL-6 Expression bestätigen. [169]

Insbesondere die Korrelation zwischen massivem IL-6-Anstieg und I/R-Schaden unterstreicht den Vorteil einer anti-IL-6R mAb Vorbehandlung. Tatsächlich zeigen unsere Ergebnisse in den durchgeführten Genexpressions- und Proteinanalysen bereits nach 18h eine leichte sowie nach 7d eine deutliche Reduzierung der IL-6 Genexpression (rt PCR) und IL-6 Proteinkonzentration (ELISA) gegenüber der nicht vorbehandelten Kontrollgruppe

Diese Beobachtung alleine als eindruckliche Hemmung des I/R-Schadens zu interpretieren, ist in Anbetracht der komplexen Pathophysiologie nach Eintritt des Hirntodes im Zusammenspiel mit dem I/R-Schaden zu vermessen. Stattdessen sollte in der vorliegenden Arbeit von einer Reduzierung der pathophysiologischen Folgen des I/R-Schadens durch die einmalige Spendervorbehandlung ausgegangen werden, dank derer eine Abschwächung des I/R-Schadens und folglich eine Minimierung der Transplantatschädigung erreicht werden konnte. Um den Benefit einer Spendervorbehandlung ausschließlich im Hinblick auf eine Minimierung des I/R-Schadens differenzierter betrachten zu können, wären in zukünftigen Untersuchungen engmaschigere Untersuchungen vor Transplantation sowie v.a. vor und nach Reperfusion in Betracht zu ziehen. Hier wäre dann unter Berücksichtigung der multiplen pathophysiologischen

Folgen der IL-6 Synthese und Ausschüttung über eine zusätzliche Empfänger-Behandlung mittels anti-IL-6R mAb zu diskutieren.

6.4 chron. Abstoßung

Die chronische Transplantatabstoßung CAN (Chronic Allograft Nephropathy) ist die häufigste Ursache für einen vorzeitigen Funktionsverlust einer transplantierten Niere. [170] Während akute Abstoßungen mit der Entwicklung neuer Immunsuppressiva immer besser zu therapieren sind, zeigt die chronische Abstoßung noch unbefriedigende Ergebnisse und ist die Hauptursache für die Notwendigkeit einer erneuten Dialysepflicht nierentransplantierten Patienten. [171]

Gomez et al. beobachteten in einer Studie zur Untersuchung der Langzeitfunktion des Allograft nach Nierentransplantation, dass von insgesamt 487 transplantierten Patienten 263 (59 %) nach 15 Jahren ihr Transplantat verloren hatten; bei 47.2% war eine CAN ursächlich. Ferner wurde bei 29 (66 %) von 44 Patienten, welche nach mehr als 15 Jahren noch keinen Transplantatverlust erlitten hatten, eine CAN diagnostiziert. [172] Andere Untersuchungen diagnostizierten in etwa 40-60 % aller Biopsien, welche routinemäßig 24 Monate nach Nierentransplantation durchgeführt wurden, eine CAN. [170, 173]

Allgemein lässt sich die Pathophysiologie der chronischen Transplantatabstoßung in 3 Phasen unterteilen: in die initiale Transplantatdestruktion, welche teils durch Antikörper, teils durch eine unspezifische Schädigung charakterisiert ist, gefolgt von der zellvermittelten Entzündungsreaktion des Transplantatgewebes sowie der für die Endphase typischen Fibrose und Sklerose des Nierenallografts, bedingt durch überschießende Reparaturmechanismen.

Histomorphologisch zeigt sich aufgrund von Fibrose und Sklerose eine Tubulusatrophie und Glomerulopathie (Glomerulosklerose) sowie durch die krankhafte Bindegewebsproliferation eine Verdickung der Intima und konsekutive Abnahme des Gefäßlumens, wodurch letztlich die Nierenperfusion und Urindrainierung zum Erliegen kommt. [72, 174, 175]

Ein wichtiger Risikofaktor für die chronische Abstoßungsreaktion scheinen vorangegangene akute Abstoßungsreaktionen zu sein. So zeigen klinische Daten, dass eine Korrelation zwischen der Anzahl akuter Abstoßungsreaktionen und dem Risiko, eine chronische Transplantatdysfunktion zu erleiden, besteht und diese unabhängig von einer erfolgreichen Therapie akuter Abstoßungsereignisse ist. [72, 176]

Wie bereits in der vorliegenden Arbeit demonstriert, konnten wir unter der Vorbehandlung hirntoter Nierenspender im Rahmen akuter Abstoßungsereignisse einen eindeutigen Benefit belegen. Unsere Ergebnisse demonstrieren auch im Hinblick auf die Langzeitfunktion des Transplantats einen Nutzen der anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung, allerdings nicht in dem Maße wie bei den Ergebnissen im Rahmen der akuten Abstoßung: Histomorphologisch zeigten sich hinsichtlich der Zellinfiltration, der Arteriosklerose und Tubulimorphologie des Nierenallografts signifikant schlechtere Werte in der vorbehandelten Spendergruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Auch klinisch beobachteten wir im Rahmen der metabolischen Untersuchungen in der Gruppe der Ratten, welche ein Transplantat vorbehandelter Hirntodspender erhalten hatten, eine signifikant schlechtere Proteinurie gegenüber den Kontrolltieren, während die Creatinin-Clearance vergleichbar war.

Allein betrachtet, lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass eine Spendervorbehandlung langfristig die Transplantatfunktion nicht zu verbessern scheint. Allerdings konnten wir unter der Spendervorbehandlung eine deutliche Reduzierung nahezu aller untersuchten Zyto- und Chemokine erreichen: Interessanterweise zeigte sich die IL-6 Expression auch langfristig noch signifikant reduziert. Ebenso beobachteten wir sowohl eine tendenziell reduzierte TNF α -Expression im Nierentransplantat als auch eine tendenziell verringerte TNF α -Proteinkonzentration in Milzzellkulturüberständen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) vorbehandelter Hirntodspender.

Ferner zeigte sich immunhistochemisch eine tendenzielle Verbesserung nach Spendervorbehandlung: So detektierten wir im Allograft der vorbehandelten Hirntodspender eine geringere Infiltration von CD8⁺ T-Zellen sowie eine signifikant reduzierte Infiltration von ED1⁺ Monozyten/Makrophagen und APZs. Dagegen beobachteten wir, wie schon in der frühen Phase nach Transplantation, im Allograft der vorbehandelten Hirntodspender eine größere Population von CD4⁺ T-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe.

Ähnliche Ergebnisse detektierten wir auch in FACS-Untersuchungen nach 5 Monaten. Bei der Interpretation der Langzeitergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Gesamtanzahl infiltrierender Zellen nach 5 Monaten signifikant geringer war als 7 Tage nach Transplantation.

In Anbetracht der gewonnenen Langzeitparameter kann man davon ausgehen, dass sich die einmalige Vorbehandlung mit dem anti-IL-6R monoklonalen Antikörper nicht negativ auf die Langzeitfunktion des Allografts auswirkt und die Entwicklung einer chronischen

Transplantatabstoßung nicht begünstigt. Um aber auch den langfristigen Nutzen einer anti-IL-6R mAb Vorbehandlung im Sinne einer Minimierung chronischer Schäden eindeutig belegen zu können, müsste in zukünftigen Untersuchungen der potentielle Vorteil einer kombinierten Spender- und Empfängerbehandlung überprüft werden.

Die gewonnenen Ergebnisse aus den Gruppen der Lebendspender legen den Schluss nahe, dass sowohl in der frühen als auch späten Phase nach Transplantation Lebendspender nicht von einer Spendervorbehandlung profitieren können. Aufgrund der geringen Versuchstierzahl in den Gruppen der Lebendspender können diese Ergebnisse statistisch jedoch nur als Trend bewertet werden und müssten mit einer erweiterten Versuchstierzahl verifiziert werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nierentransplantation ist die Therapie der Wahl des terminalen Nierenversagens. Bedingt durch die große Nachfrage nach Spendernieren bei gleichzeitig zeitweisen Rückgang der Spenderbereitschaft in der Bevölkerung im Eurotransplantraum, wurden die Spenderkriterien für eine Akzeptanz sog. „marginaler Organe“ in den letzten 2 Jahrzehnten erweitert. Diese Organe zeigen im Vergleich zu optimalen Spenderorganen eine größere Anfälligkeit gegenüber transplantationsassoziierten Schädigungsmechanismen, verursacht zum Beispiel durch den Hirntod, und damit eine geringere Transplantatüberlebensdauer. Als Konsequenz werden immer neue Strategien zur Verbesserung der Organqualität marginaler Organe entwickelt. Aufgrund des Hirntodes und der konsekutiven generalisierten massiven IL-6 Produktion und Sezernierung, werden die Organe bereits im Spender (vor)geschädigt und immunologische aktiviert, wodurch die Transplantatfunktion im Empfänger erheblich beeinträchtigt wird. In dieser Arbeit untersuchten wir die Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor Antikörper zur Verminderung der inflammatorischen Immunantwort sowie des assoziierten Ischämie/Reperfusionsschadens nach Nierentransplantation in einem Rattenmodell. Hierzu wurden Nieren hirntoter (BD) und lebender (LD) F-344-Spenderratten in Lewis-Empfängerratten transplantiert. Der Hirntod wurde im Spender 6 Stunden (h) vor der Organentnahme und Transplantation (Tx) induziert. Sowohl BD als auch LD Spenderratten wurden 1 Stunde nach Hirntodinduktion mit anti-IL-6R/CD126 mAb behandelt. Die Empfänger von Transplantaten unbehandelter Spender dienten als Kontrollen (con). Zur Untersuchung des Benefits einer Spendervorbehandlung in der frühen (18h und 7d) bzw. späten Phase (5mths) der Transplantation wurde die Genexpression von Entzündungsmarkern (IL-6, IL-10, IL-4, TNF α , IFN γ , IP-10, CCL19/-20) in Transplantatbiopsien mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR bestimmt, histologische und immunhistologische Färbungen (ED1+, MHCII+, CD4+, CD8+) des Allografts durchgeführt sowie T-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen (APZ), NK und NKT-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und verschiedene pro-inflammatorischer Proteine (IL-6, TNF α , IFN γ) mittels ELISA detektiert. Zusätzlich wurde die Langzeittransplantatfunktion durch Messung der Urin-Proteinkonzentration (Proteinurie, Uprot) und der Kreatinin-Clearance (CreaCl) bewertet.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass durch eine Vorbehandlung hirntoter Spender mit einem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen den IL-6-Rezeptor (IL-6R) die Schädigung von Nierentransplantaten minimiert werden kann. So war die durch den Hirntod induzierte sowie

durch den I/R-Schaden getriggerte Genexpression der pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α , INF γ , IL-4, IL-10 und der Chemokine CCL-19 und -21 durch die Vorbehandlung merklich reduziert. Ebenso zeigte sich unter der anti-IL-6R mAb Vorbehandlung eine geringere Infiltration spezifischer Entzündungszellen (ED1+, CD8+, APZs, DCs, NK-T-Zellen) in das Allograft sowie signifikant geringere histomorphologische Schädigungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in zusätzlichen FACS-Analysen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) von Transplantatgewebeprobe(n) konnte gezeigt werden, dass durch eine anti-IL-6R mAb Spendervorbehandlung die Anzahl transplantatinfiltrierender Zellen deutlich reduziert wird. Ferner zeigten sich auch geringere Proteinkonzentrationen (IL-6, TNF α , INF γ ; ELISA) in der Gruppe vorbehandelter Hirntodspender im Vergleich zur Kontrolle.

Im Vergleich zur frühen Phase scheint eine einmalige Spendervorbehandlung eine Ausbildung einer Chronischen Allograft Nephropathie nicht ausreichend unterdrücken zu können. Zwar zeigte sich unter Spendervorbehandlung eine geringere Genexpression verschiedener Zyto- und Chemokine (IL-6, INF γ , TNF α , IL-10, IP-10, und CCL19/-21) und immunhistologisch eine geringere Allograftinfiltration von MHCII+, ED1+, und CD8+ Zellen, jedoch konnte keine suffiziente Reduktion weiterer immunkompetenter Zellen (NKT-, NK-, CD4+ Zellen, APZs) in durchflusszytometrischen Untersuchungen nachgewiesen werden.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse wird durch die Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem monoklonalen anti-IL-6R Antikörper die inflammatorische Immunantwort in der frühen Phase nach Transplantation im Empfänger deutlich reduziert. Ferner ist davon auszugehen, dass durch Vorbehandlung die pathophysiologischen Einflüsse des Ischämie-/Reperfusionsschadens erheblich gemindert werden konnten. Empfänger von Lebendspenden scheinen dagegen nicht von einer Spendervorbehandlung profitieren zu können. Ebenso scheint die einmalige Therapie des Spenders nicht ausreichend für die Verbesserung der Transplantat-Langzeitfunktion zu sein.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schlich, T., *The origins of organ transplantation*. Lancet, 2011. **378**(9800): p. 1372-3.
2. Ullmann, E., *Experimentelle Nierentransplantation*. Wiener Klinische Wochenschrift, 1902(15): p. 281-2.
3. Morris, P.J., *Transplantation--a medical miracle of the 20th century*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2678-80.
4. Gibson, T. and P.B. Medawar, *The fate of skin homografts in man*. J Anat, 1943. **77**(Pt 4): p. 299-310 4.
5. Charron, D.J., *Obituary: Jean Dausset (1916-2009)*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 338.
6. Elion, G.B., et al., *Relationship between Metabolic Fates and Antitumor Activities of Thiopurines*. Cancer Res, 1963. **23**: p. 1207-17.
7. Murray, J.E., J.P. Merrill, and J.H. Harrison, *Renal homotransplantation in identical twins*. 1955. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(1): p. 201-4.
8. Murray, J.E., et al., *Current Evaluation of Human Kidney Transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 1964. **120**: p. 545-57.
9. DSO, *Kein Weg zurück – Informationen zum Hirntod*. 2012.
10. Borel, J.F., *Immunosuppressive properties of cyclosporin A (CY-A)*. Transplantation proceedings, 1980. **12**(2): p. 233.
11. Brandenburg, P., *Einfluss verlängerter Ischämie auf Nierentransplantatfunktion und antigen-abhängige Immunantwort nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig*.
12. Nankivell, B.J., et al., *The natural history of chronic allograft nephropathy*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2326-33.
13. Ekberg, H., et al., *Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2562-75.
14. Schnitzler, M.A., et al., *Use of 12-Month Renal Function and Baseline Clinical Factors to Predict Long-Term Graft Survival: Application to BENEFIT and BENEFIT-EXT Trials*. Transplantation, 2012. **93**(2): p. 172-181.
15. Vanrenterghem, Y., et al., *Belatacept-based regimens are associated with improved cardiovascular and metabolic risk factors compared with cyclosporine in kidney transplant recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT studies)*. Transplantation, 2011. **91**(9): p. 976-83.
16. Zickgraf, T., *Das Transplantationsgesetz tritt in Kraft*. in: *Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen. Transplantationsgesetz. Der Gesetzestext mit Stellungnahmen von Experten und Betroffenen*. Deutsche Stiftung Organtransplantation, Neu-Isenburg, 1998.
17. Rommel, W. and H.H. Schmidt, *[Organ transplantation in Germany - Legal framework and organizational management]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2010. **45**(5): p. 348-54.
18. <http://www.dso.de>,
19. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1725-30.
20. <http://www.dso.de/>, *Jahresbericht 2010*.
21. eurotransplant.org/, *Annual Report 2012*. 2012.
22. Warrens, A.N., G. Lombardi, and R.I. Lechler, *Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens*. Transpl Immunol, 1994. **2**(2): p. 103-7.
23. Kenneth M. Murphy, P.T., Mark Walport, *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Auflage: 7. Aufl. (17. September 2009): p. 804-812.

24. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, *Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells*. J Exp Med, 1982. **155**(1): p. 31-41.
25. Hartmann, J., *Einfluss einer verlängerten Kaltischämie auf Infektiöse Transplantattoleranz*
26. Orosz, C.G. and A.M. VanBuskirk, *Immune mechanisms of acute rejection*. Transplant Proc, 1998. **30**(3): p. 859-61.
27. Furness, P.N., *Histopathology of chronic renal allograft dysfunction*. Transplantation, 2001. **71**(11 Suppl): p. SS31-6.
28. Ponticelli, C., *The mechanisms of acute transplant rejection revisited*. J Nephrol, 2012. **25**(2): p. 150-8.
29. Itano, A.A. and M.K. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node*. Nat Immunol, 2003. **4**(8): p. 733-9.
30. Penfield, J.G., et al., *Syngeneic renal transplantation increases the number of renal dendritic cells in the rat*. Transpl Immunol, 1999. **7**(4): p. 197-200.
31. Kaminska, D., et al., *Intragraft mRNA expression of cytokines and growth factors in human kidney allograft biopsies by in situ RT-PCR analysis*. Transplant Proc, 2005. **37**(2): p. 767-9.
32. R. Pichlmayr, E.N., Dietrich Löhlein (Herausgeber), *Pichlmayrs Chirurgische Therapie: Allgemein-, Viszeral- Und Transplantationschirurgie* Springer Berlin Heidelberg; Auflage: 3., völlig neu bearb. Aufl. (15. August 2005). 722-723.
33. Tilney, N.L., et al., *Chronic rejection--an undefined conundrum*. Transplantation, 1991. **52**(3): p. 389-98.
34. Keßler, H., *Einfluss einer einmaligen Spendervorbehandlung mit Cobalt-III-Protoporphyrin IX auf die Immunogenität des Transplantats im Rahmen der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation im Rattenmodell*.
35. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes*. Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 30, A-1861-64, 24. Juli 1998
36. *A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death*. JAMA, 1968. **205**(6): p. 337-40.
37. Weiss, S., *Einfluss des Hirntodes auf die Zytokinexpression in humanen Spenderorganen und die initiale Transplantatfunktion nach Lebertransplantation*
38. <http://www.dso.de/>, *Jahresbericht 2012*.
39. Smith, M., *Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(9 Suppl): p. S217-22.
40. Mertes PM, T.N., Strom TB, Paul LC, eds. , *Physiology of brain death*. . Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects.: p. 275-289.
41. Perez Lopez, S., et al., *Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(8): p. 815-20.
42. Martikainen, T.J., et al., *Vasopressor agents after experimental brain death: effects of dopamine and vasopressin on vitality of the small gut*. Transplant Proc, 2010. **42**(7): p. 2449-56.
43. Bouma, H.R., R.J. Ploeg, and T.A. Schuur, *Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury*. Am J Transplant, 2009. **9**(5): p. 989-97.
44. Powner, D.J., et al., *Hormonal changes in brain dead patients*. Crit Care Med, 1990. **18**(7): p. 702-8.
45. Arita, K., et al., *The function of the hypothalamo-pituitary axis in brain dead patients*. Acta Neurochir (Wien), 1993. **123**(1-2): p. 64-75.

46. Gramm, H.J., et al., *Acute endocrine failure after brain death?* Transplantation, 1992. **54**(5): p. 851-7.
47. Chen, E.P., et al., *Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death.* Crit Care Med, 1996. **24**(8): p. 1352-9.
48. Wicomb, W.N., et al., *The effects of brain death and 24 hours' storage by hypothermic perfusion on donor heart function in the pig.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1986. **91**(6): p. 896-909.
49. Novitzky, D., et al., *Improved cardiac function following hormonal therapy in brain dead pigs: relevance to organ donation.* Cryobiology, 1987. **24**(1): p. 1-10.
50. Novitzky, D., et al., *Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy.* Transplantation, 1988. **45**(1): p. 32-6.
51. Cooper, D.K., et al., *A review of studies relating to thyroid hormone therapy in brain-dead organ donors.* Front Biosci, 2009. **14**: p. 3750-70.
52. Novitzky, D., *Detrimental effects of brain death on the potential organ donor.* Transplant Proc, 1997. **29**(8): p. 3770-2.
53. Padanilam, B.J., *Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis.* Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(4): p. F608-27.
54. Weinberg, J.M., *The cell biology of ischemic renal injury.* Kidney Int, 1991. **39**(3): p. 476-500.
55. Mangino, M.J., et al., *Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury.* Transplantation, 2008. **85**(3): p. 427-36.
56. Kevin, L.G., et al., *Ischemic preconditioning alters real-time measure of O2 radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H566-74.
57. Homer-Vanniasinkam, S., J.N. Crinnion, and M.J. Gough, *Post-ischaemic organ dysfunction: a review.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. **14**(3): p. 195-203.
58. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
59. Okusa, M.D., *The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure.* Nephron, 2002. **90**(2): p. 133-8.
60. Perico, N., et al., *Delayed graft function in kidney transplantation.* Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1814-27.
61. Daemen, M.A., et al., *Apoptosis and chemokine induction after renal ischemia-reperfusion.* Transplantation, 2001. **71**(7): p. 1007-11.
62. Nijboer, W.N., et al., *Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys.* Transplantation, 2004. **78**(7): p. 978-986.
63. Murugan, R., et al., *Increased plasma interleukin-6 in donors is associated with lower recipient hospital-free survival after cadaveric organ transplantation.* Crit Care Med, 2008. **36**(6): p. 1810-6.
64. Weiss, S., et al., *Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation.* Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1584-93.
65. Pratschke, J., P. Neuhaus, and S.G. Tullius, *What can be learned from brain-death models?* Transpl Int, 2005. **18**(1): p. 15-21.
66. Pratschke, J., et al., *Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation.* Transplantation, 1999. **67**(3): p. 343-8.
67. Kusaka, M., et al., *Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death.* Transplantation, 2000. **69**(3): p. 405-10.
68. Molitoris, B.A. and J. Marrs, *The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure.* Am J Med, 1999. **106**(5): p. 583-92.

69. Pratschke, J., et al., *Acute rejection of rat renal allografts is accelerated by donor brain death*. *Transplant Proc*, 1999. **31**(1-2): p. 874-5.
70. Terasaki, P.I., et al., *High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(6): p. 333-6.
71. Pratschke, J., et al., *A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats*. *Transplantation*, 2000. **69**(3): p. 427-30.
72. Pratschke, J., *Der Zusammenhang zwischen Organqualität und Spenderspezifischen Risikofaktoren* 20.08.202.
73. Kotsch, K., et al., *Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial*. *Ann Surg*, 2008. **248**(6): p. 1042-50.
74. Ulrich, F., K. Kotsch, and J. Pratschke, *Methylprednisolone Therapy in Decreased Donors Reduces Inflammation in the Donor Liver and Improves Outcome After Liver Transplantation-Restrictions May Apply*. *Ann Surg*, 2009.
75. Ranasinghe, A.M. and R.S. Bonser, *Endocrine changes in brain death and transplantation*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011. **25**(5): p. 799-812.
76. Kusaka, M., et al., *Global expression profiles in 1-hour biopsy specimens of human kidney transplantation from donors after cardiac death*. *Cell Transplant*, 2009. **18**(5): p. 647-56.
77. Iznerowicz, A., et al., *Duration of brain death and cold ischemia time, but not warm ischemia time, increases expression of genes associated with apoptosis in transplanted kidneys from deceased donors*. *Transplant Proc*, 2011. **43**(8): p. 2887-90.
78. Kotsch, K., et al., *Novel markers in zero-hour kidney biopsies indicate graft quality and clinical outcome*. *Transplantation*, 2010. **90**(9): p. 958-65.
79. Nandagopal, S., D. Wu, and F. Lin, *Combinatorial guidance by CCR7 ligands for T lymphocytes migration in co-existing chemokine fields*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e18183.
80. Flanagan, K., et al., *The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells*. *Cell Immunol*, 2004. **231**(1-2): p. 75-84.
81. Marsland, B.J., et al., *CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells*. *Immunity*, 2005. **22**(4): p. 493-505.
82. Johnson, L.A. and D.G. Jackson, *Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration*. *Int Immunol*, 2010. **22**(10): p. 839-49.
83. Ziegler, E., et al., *CCL19-IgG prevents allograft rejection by impairment of immune cell trafficking*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(9): p. 2521-32.
84. Westendorp, W.H., H.G. Leuvenink, and R.J. Ploeg, *Brain death induced renal injury*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011. **16**(2): p. 151-6.
85. Ma, X., et al., *Expressions of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, and Tie2 and their roles in rat renal allografts with chronic allograft nephropathy*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(8): p. 2795-9.
86. Fukatsu, A., et al., *Expression of interleukin 6 and major histocompatibility complex molecules in tubular epithelial cells of diseased human kidneys*. *Lab Invest*, 1993. **69**(1): p. 58-67.
87. Kopf, M., M.F. Bachmann, and B.J. Marsland, *Averting inflammation by targeting the cytokine environment*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(9): p. 703-18.
88. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(2): p. 227-36.

89. Stenvinkel, P., et al., *IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly*. *Kidney Int*, 2005. **67**(4): p. 1216-33.
90. Nijboer, W.N., et al., *Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys*. *Transplantation*, 2004. **78**(7): p. 978-86.
91. Bos, E.M., et al., *Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement?* *Kidney Int*, 2007. **72**(7): p. 797-805.
92. Koudstaal, L.G., et al., *Brain death induces inflammation in the donor intestine*. *Transplantation*, 2008. **86**(1): p. 148-54.
93. Kaminska, D., et al., *Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis*. *Transplantation*, 2007. **84**(9): p. 1118-24.
94. Damman, J., et al., *Local renal complement C3 induction by donor brain death is associated with reduced renal allograft function after transplantation*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(7): p. 2345-54.
95. Minambres, E., et al., *Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury*. *Crit Care Med*, 2003. **31**(3): p. 933-8.
96. Winter, C.D., et al., *Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury*. *Brain*, 2004. **127**(Pt 2): p. 315-20.
97. Sayed, M., et al., *Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(22): p. 16569-73.
98. Schuur, T.A., et al., *Time-dependent changes in donor brain death related processes*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(12): p. 2903-11.
99. Denk, A., et al., *Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28451-8.
100. Shimizu, H., et al., *Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 561-8.
101. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
102. Stangl, M., et al., *Influence of brain death on cytokine release in organ donors and renal transplants*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(1-2): p. 1284-5.
103. Lopau, K., et al., *Hormonal changes in brain death and immune activation in the donor*. *Transpl Int*, 2000. **13 Suppl 1**: p. S282-5.
104. Basso, A.S., H. Cheroutre, and D. Mucida, *More stories on Th17 cells*. *Cell Res*, 2009. **19**(4): p. 399-411.
105. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 337-48.
106. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(1): p. 21-7.
107. Kalmovarin, N., et al., *Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation*. *Inflammation*, 1991. **15**(5): p. 369-79.
108. Farrar, C.A., et al., *Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure*. *FASEB J*, 2006. **20**(2): p. 217-26.
109. Serinsoz, E., et al., *Local complement C3 expression is upregulated in humoral and cellular rejection of renal allografts*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(6): p. 1490-4.
110. Pratt, J.R., S.A. Basheer, and S.H. Sacks, *Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection*. *Nat Med*, 2002. **8**(6): p. 582-7.

111. De Vries, B., et al., *Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation*. *Transplantation*, 2003. **75**(3): p. 375-82.
112. Lewis, A.G., et al., *Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **153**(1): p. 117-26.
113. Ito, H., et al., *Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease*. *J Gastroenterol*, 2002. **37 Suppl 14**: p. 56-61.
114. Ito, H., *Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody*. *J Gastroenterol*, 2005. **40 Suppl 16**: p. 32-4.
115. Fujimoto, M., S. Serada, and T. Naka, *[Role of IL-6 in the development and pathogenesis of CIA and EAE]*. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2008. **31**(2): p. 78-84.
116. Afzali, B., et al., *The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **148**(1): p. 32-46.
117. Gong, W., et al., *High weight differences between donor and recipient affect early kidney graft function--a role for enhanced IL-6 signaling*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(8): p. 1742-51.
118. Patel, N.S., et al., *Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **312**(3): p. 1170-8.
119. Pratschke, P.D.m.J., *Auswirkungen und Therapieversuche des Hirntodes in experimentellen und klinischen Modellen*. DFG Sachbeihilfe Pr 578/2-5.
120. White E, H., Mullen Y., *Chronic kidney allograft reactions in rats*. *Transplantation*, 1969. **8**: p. 602.
121. Francuski, M., *Tolerance induction in recipients of organs from brain dead donors*.
122. Lopez, V., et al., *Biopsies in renal transplant patients with proteinuria: histological findings*. *Transplant Proc*, 2011. **43**(6): p. 2191-3.
123. Amer, H., et al., *Proteinuria after kidney transplantation, relationship to allograft histology and survival*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(12): p. 2748-56.
124. Tilney, N.L., et al., *Chronic rejection*. *Transplant Proc*, 1998. **30**(4): p. 1590-4.
125. Horii, Y., et al., *Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis*. *Kidney Int Suppl*, 1993. **39**: p. S71-5.
126. Cordell, J.L., et al., *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. *J Histochem Cytochem*, 1984. **32**(2): p. 219-29.
127. <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8706>.
128. <https://http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>: p. 6-7.
129. http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/gene_expression/qPCR_real-time_PCR/technology_detail/real-time-pcr-detection-standard-pcr-primer-and-hydrolysis-probe.gif.
130. Tullius, S.G., H.D. Volk, and P. Neuhaus, *Transplantation of organs from marginal donors*. *Transplantation*, 2001. **72**(8): p. 1341-9.
131. Wilhelm, M.J., et al., *Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation*. *Circulation*, 2000. **102**(19): p. 2426-33.
132. Pratschke, J., et al., *Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(11): p. 2474-81.
133. Booth, A.J., et al., *IL-6 promotes cardiac graft rejection mediated by CD4+ cells*. *J Immunol*, 2011. **187**(11): p. 5764-71.

134. Liang, Y., et al., *Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation*. *Transplantation*, 2007. **84**(6): p. 771-7.
135. Kusaka, M., et al., *Genomewide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors*. *Transplantation*, 2007. **83**(1): p. 62-70.
136. Keizer, R.J., et al., *Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies*. *Clin Pharmacokinet*, 2010. **49**(8): p. 493-507.
137. Yap, S.H., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) inhibits interleukin (IL)-1 and/or IL-6 stimulated synthesis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in primary cultures of human hepatocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1091**(3): p. 405-8.
138. Swaak, A.J., et al., *Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases*. *Scand J Rheumatol*, 1988. **17**(6): p. 469-74.
139. Zhang, X., A. Georgy, and L. Rowell, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, following single-dose administration by subcutaneous and intravenous routes to healthy subjects*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013. **51**(6): p. 443-55.
140. Morris, P.J., et al., *Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA)*. *Lancet*, 1999. **354**(9185): p. 1147-52.
141. Almond, P.S., et al., *Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients*. *Transplantation*, 1993. **55**(4): p. 752-6; discussion 756-7.
142. Gulanikar, A.C., et al., *The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants*. *Transplantation*, 1992. **53**(2): p. 323-8.
143. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
144. Forster, R., A.C. Davalos-Misslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 362-71.
145. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. *Immunol Rev*, 2007. **219**: p. 143-56.
146. Shoskes, D.A. and P.F. Halloran, *Ischemic injury induces altered MHC gene expression in kidney by an interferon-gamma-dependent pathway*. *Transplant Proc*, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 599-601.
147. Shoskes, D.A., N.A. Parfrey, and P.F. Halloran, *Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse*. *Transplantation*, 1990. **49**(1): p. 201-7.
148. Ali, J.M., et al., *Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance*. *Transplantation*, 2013. **96**(8): p. 681-8.
149. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(6): p. 427-39.
150. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 510-4.
151. Jansen, J.H., et al., *Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells*. *The Journal of experimental medicine*, 1992. **175**(4): p. 1151-4.
152. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(4): p. 753-64.
153. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.

154. Famulski, K.S., et al., *Alternative macrophage activation-associated transcripts in T-cell-mediated rejection of mouse kidney allografts*. Am J Transplant, 2010. **10**(3): p. 490-7.
155. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.
156. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
157. Rincon, M., et al., *Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 461-9.
158. Nakagiri, T., et al., *Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation*. Transplant Proc, 2012. **44**(4): p. 1035-40.
159. Diehl, S., et al., *Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 805-15.
160. Yamamoto, M., et al., *IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2000. **164**(9): p. 4878-82.
161. Zhao, X., et al., *Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance*. Am J Transplant, 2012. **12**(1): p. 90-101.
162. Tormo, A.J., et al., *IL-6 activates STAT5 in T cells*. Cytokine, 2012. **60**(2): p. 575-82.
163. Nakagawa, T., et al., *IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo*. Int Immunol, 2010. **22**(2): p. 129-39.
164. Luetke-Eversloh, M., et al., *NK cells gain higher IFN-gamma competence during terminal differentiation*. Eur J Immunol, 2014. **44**(7): p. 2074-84.
165. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
166. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher, *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 567-73.
167. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
168. Sawitzki, B., et al., *IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(12): p. 1925-35.
169. de Vries, D.K., et al., *Early renal ischemia-reperfusion injury in humans is dominated by IL-6 release from the allograft*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2009. **9**(7): p. 1574-84.
170. Hariharan, S., et al., *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 605-12.
171. U.S. Renal Data System, U.A.D.R.A.o.C.K.D.a.E.-S.R.D.i.t.U.S., National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.
172. Gomez, E.G., et al., *Long-term allograft survival after kidney transplantation*. Transplant Proc, 2013. **45**(10): p. 3599-602.
173. Campistol, J.M. and J.M. Grinyo, *Exploring treatment options in renal transplantation: the problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity*. Transplantation, 2001. **71**(11 Suppl): p. SS42-51.
174. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, *Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 313-8.
175. Racusen, L.C. and H. Regele, *The pathology of chronic allograft dysfunction*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S27-32.
176. van Saase, J.L., et al., *The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection*. Transplantation, 1995. **59**(9): p. 1280-5.

9 ANHANG

9.1 Glossar

APP	Akute-Phase-Proteine	LD	Living Donor
APR	Akute-Phase-Reaktion	FBG	Fibrinogen beta
APZ	Antigenpräsentierende Zellen	mAb	Monoclonal antibody / monoklonaler Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase	MAP- Kinase	Mitogen-activated-protein-kinase
BD	Brain dead Donor?	mRNA	messenger-RNA
CAN	Chronische Allograft Nephropathie	MHC	Major Histocompatibility Complex
C3	Complement C3	NKT	NK-T-Zelle
CNI	Calcineurininhibitoren	NK	natürliche Killerzellen
CyA	Cyclosporin	NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells
DGF	Delayed Graft Function	NTx	Nierentransplantation
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
DC	Dendritic cells / Dendritische Zellen	p.t.	post transplantationem
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	ROI	Sauerstoffintermediate/-radikale
FBG	Fibrinogen beta	SHT	Schädelhirntrauma
FACS	Fluorescence activated cell sorting	TH	T-Helferzelle
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	TF	Transkriptionsfaktor
HLA	Human Leukozyten-Antigen	TNF α	Tumornekrose Factor α
H&E	Hämatoxylin & Eosin	TPG	Transplantationsgesetz
IFN γ	Interferon- γ	Tregs	regulatorische T-Zellen
IL-6R	IL-6-Rezeptor	Tzyt	zytotoxische T-Zellen
IFN γ	Interferon- γ	UW-Lsg.	University of Wisconsin-Lösung
ICAM	Intercellular adhesion molecule	VCAM	Vascular cell adhesion molecule
IP-10	Interferon gamma-induced protein		
<u>I/R-</u> <u>Schaden</u>	Ischämie-Reperfusionsschaden		

9.3 Publikationsverzeichnis

Reutzel-Selke A, **Beiglboeck F**, Velikova M, Marksteiner M, Polenz D, Neuhaus P, Kotsch K, Pratschke J. *Treatment of brain dead donors with anti-IL-6R monoclonal antibody attenuates the early and late inflammatory immune response.* Transplantationsmedizin 2010; Suppl.

Reutzel-Selke A, **Beiglboeck F**, Velikova M, Marksteiner M, Polenz D, Lippert S, Neuhaus P, Kotsch K, Pratschke J. *Treatment of brain dead donors with anti-IL-6R monoclonal antibody attenuates the early and late inflammatory immune response.* Transplantation 2010; 90 (suppl.): 39

Reutzel-Selke A., **Beiglboeck F.**, Velikova M., Marksteiner M., Polenz D., Neuhaus P., Kotsch K., Pratschke J. *Treatment of brain dead donors with anti-IL-6R mAb attenuates the inflammatory immune response.* 24th International Congress of The Transplantation Society · Abstract: A-453-0028-02166

9.3 Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater und Direktor der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Johann Pratschke für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meinen besonderen Dank spreche ich Frau Dr. Anja Reutzel-Selke aus, ohne deren unschätzbare Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei den Herren Dipl. Ing. Dietrich Polenz und Steffen Lippert, Frau Marion Marksteiner sowie meiner Kollegin Mariya Velikova für die Hilfe bei der Ausführung der Experimente und der mikrochirurgischen Operationen. Weiter möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Katja Kotsch und dem Institut für Medizinische Immunologie für die Bereitstellung der Sonden und für die Zusammenarbeit danken. Herrn PD Dr. Christian Grosse-Siestrup und den Mitarbeitern der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité danke ich für die Unterstützung bei der Versuchstierbetreuung. Bei Herrn Prof. Dr. R. Tauber und den Mitarbeitern des Zentrallabors der Charité Campus Virchow-Klinikum bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Einen großen Dank gilt auch meinem Kollegen und guten Freund Taner Köprülü, mit dem die häufig stundenlangen Laborarbeiten leichter zu ertragen und stets sehr lustig waren.

Ich danke ebenso meinem langjährigen Freund und Kollegen Dr. med. Johannes Grüneisen aus Berlin, der mir stets mit wertvollen Ratschlägen und Durchhalteparolen zur Seite stand.

Einen sehr großen Dank möchte ich auch meinen „Marburgern“ aussprechen, durch deren Mithilfe im Studium ich diese Arbeit fertigstellen konnte. Hierbei möchte ich Frau Nadine Matzulis, Herrn Dr. med. Roman Sankowski, Herrn Dr. med. Daniel Franz, Frau Dr. med. Tugba Ibis, Frau Tina Rakenius, Frau Dr. med. Nina Hegemann und Frau Dr. med. Caroline Goos sowie die Herren Denis S. Jost und Philipp Opfermann erwähnen.

Auch zu erwähnen sind meine „Berliner“, die mich über die ganze Zeit unterstützen und für die eine oder andere Ablenkung sorgten: Simon M. Fabich, Tiho und Stefanie Duvnjak, Jennifer

Pipietz, Oliver A. Riebartsch, Dr. Fabian Meissner, Ertan Ulrich, Moritz Neidel, Edwin Donor, Dr. med. Maximilian König, Laura Jacob, Ellen und Natalie Roh, Alexander Czekala sowie Frau Dr. dent. med. Nina Van Sprundel.

Einen großen Dank spreche ich ebenfalls meinem langjährigen sehr guten Freund Oliver Kopac (BP) aus.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen sehr guten Freunden und Kollegen Dr. med. Marius Ambrock (CCO), Dr. med. Moritz Crönlein (CCA) und Dr. med. Christoph Hüttemann (CCL), die mich jederzeit unterstützten, beratend zur Seite standen und mit denen das Studium ein wahrer Genuss war. Danke Jungs!

Zuletzt gebührt mein besonderer Dank meiner Mutter Rosemarie Beiglböck, meinen Schwestern Theresa und Katherina Beiglböck, meinen Nichten Medina und Zarah und meiner gesamten Familie, für die ich stellvertretend meine liebe Großmutter Hildegard Litzka-Schwarz nennen möchte. Ebenfalls möchte ich mich bei Gerrit Gramer und Cüneyt Kaya bedanken.

Meine Mutter hat mir all dies erst ermöglicht. Die ständigen Hochs und Tiefs während der Erstellung dieser Arbeit durchlebte sie mit mir und stand mir jederzeit beratend zur Seite. Vielen Dank für die große Unterstützung, Durchhalteparolen und auch für die finanzielle Unterstützung. Danke Mama, Theresa und Kathi!

Diese Arbeit ist meiner Mutter, meinen Schwestern, meiner Oma sowie meinem verstorbenen Vater Dr. med. Volker Beiglböck gewidmet.

11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Fabian Beiglböck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor Antikörper zur Verminderung der inflammatorischen Immunantwort sowie des assoziierten Ischämie/Reperfusionsschadens nach Nierentransplantation in einem Rattenmodell] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 07. Oktober 2015

Unterschrift:

Fabian Beiglböck