

Seite 1

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

DISSERTATION

Altersabhängige Immunantwort
nach Nierentransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Vera Merk, geb. Galimulina

aus Omsk/Russland

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Pratschke
 2. PD. Dr. med. A. Pascher
 3. PD Dr. med. M. Scherer

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Historische Entwicklung der Nierentransplantation	5
1.1.1. Marginale Spenderorgane	8
1.2. Transplantationsimmunologie	11
1.2.1. Grundlagen der Immunantwort gegen das Transplantat	11
1.2.2. Grundlagen der Immunsuppression	15
1.3. Einfluss des Spenderalters	17
1.3.1. Altersspezifische morphologische und funktionelle Veränderungen in der Niere	17
1.3.2. Altersspezifische immunologische Veränderungen im Transplantat	18
1.4. Einfluss des Empfängeralters	19
1.4.1. Altersspezifische immunologische Veränderungen	19
1.5. Eurotransplant Senior Programm (ESP)	21
1.6. Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Studiendesign	24
2.1.1. Patientengut	25
2.2. Allgemeine technische Geräte und Verbrauchsmaterial	26
2.2.1. Allgemeine technische Geräte	26
2.2.2. Allgemeines Verbrauchsmaterial	26
2.3. Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut des Empfängers	27
2.3.1. Geräte und Material	27
2.3.2. Durchführung	27
2.4. Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus Milzgewebe des Spenders	28
2.4.1. Geräte und Material	28
2.4.2. Durchführung	28
2.5. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay)	29
2.5.1. Geräte und Material	29
2.5.2. Chemikalien und Reagenzien	29
2.5.3. Farbpuffer	30
2.5.4. Durchführung	30
2.6. Durchflusszytometrie mittels FACS (fluorescence-activated cell sorter)	32

2.6.1.	Geräte und Material	32
2.6.2.	Antikörper	32
2.6.3.	Chemikalien	32
2.6.4.	Durchführung	33
2.7.	Zytokinbestimmung im Überstand nach in vitro Stimulation des Vollbluts.....	35
2.8.	Statistische Analyse.....	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Klinische Daten	37
3.1.1.	Immunsuppressive Therapie	37
3.2.	T-Zelltypisierung.....	42
3.2.1.	Präoperativ	42
3.2.2.	Tag 7 postoperativ	44
3.2.3.	6 Monate postoperativ	50
3.3.	Frequenz alloreaktiver T- Zellen.....	56
3.3.1.	Präoperativ	56
3.3.2.	Tag 7 postoperativ	56
3.3.3.	6 Monate postoperativ	58
3.4.	Zytokinprofil	60
3.4.1.	Präoperativ	60
3.4.2.	Tag 7 nach der Transplantation.....	60
3.4.3.	6 Monate nach der Transplantation.....	62
4.	Diskussion	65
4.1.	Klinische Daten	67
3.5.	T-Zelltypisierung.....	68
3.6.	Frequenz alloreaktiver T-Zellen.....	74
3.7.	Zytokinbestimmung im Überstand nach ex vivo Stimulation des Vollbluts	76
3.8.	HLA-Diskrepanz	79
	Zusammenfassung	81
	Abkürzungsverzeichnis	83
	Curriculum vitae	Error! Bookmark not defined.
	Publikationsliste	85
	Eidstattliche Erklärung	87
	Danksagung	88
	Literatur	89

1. Einleitung

1.1. Historische Entwicklung der Nierentransplantation

Die Nierentransplantation hat sich seit Jahren als die Therapie der Wahl der terminalen Niereninsuffizienz etabliert. Seit der Durchführung der ersten erfolgreichen Nierentransplantation bei eineiigen Zwillingen in Boston im Jahr 1954 durch Joseph Murray hat die Transplantationsmedizin eine rasante Entwicklung durchgemacht. Dazu haben die Einführung effektiver Immunsuppressiva wie Azathioprin in den 60iger und Cyclosporin A in den 80iger Jahren, neuer chirurgischer Techniken sowie ein besseres Verständnis immunologischer Prozesse beigetragen. Seit der ersten allogenen Nierentransplantation in Berlin im Jahr 1963 sind in Deutschland über 62.000 Nieren transplantiert worden (Abb. 1). Zurzeit gibt es in Deutschland 40 Transplantationszentren, das Größte davon in Berlin (Abb. 2).

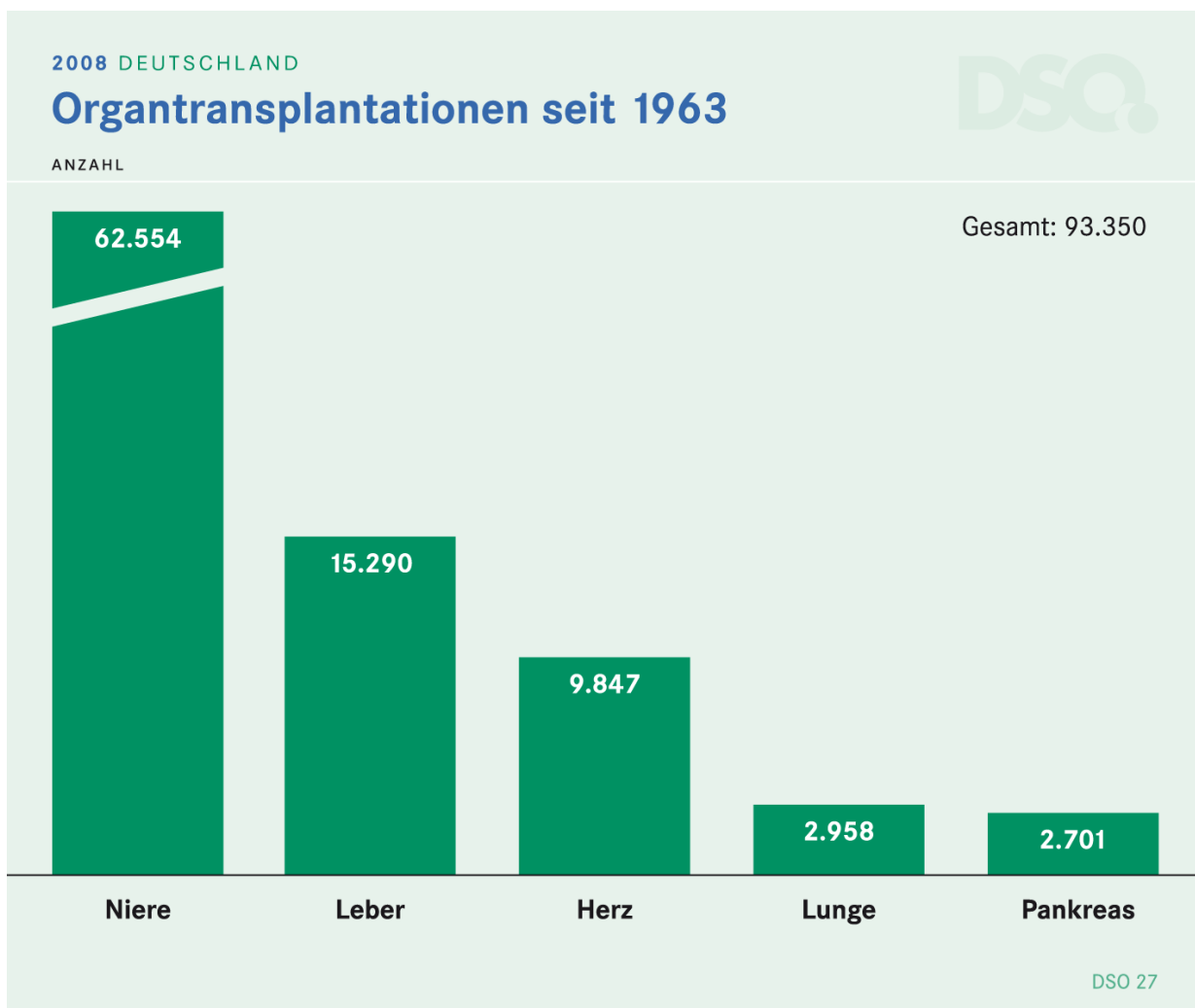


Abb. 1: Organtransplantationen in Deutschland seit 1963

Nierentransplantationen (ohne Lebendspende)

ANZAHL NACH TRANSPLANTATIONSZENTREN

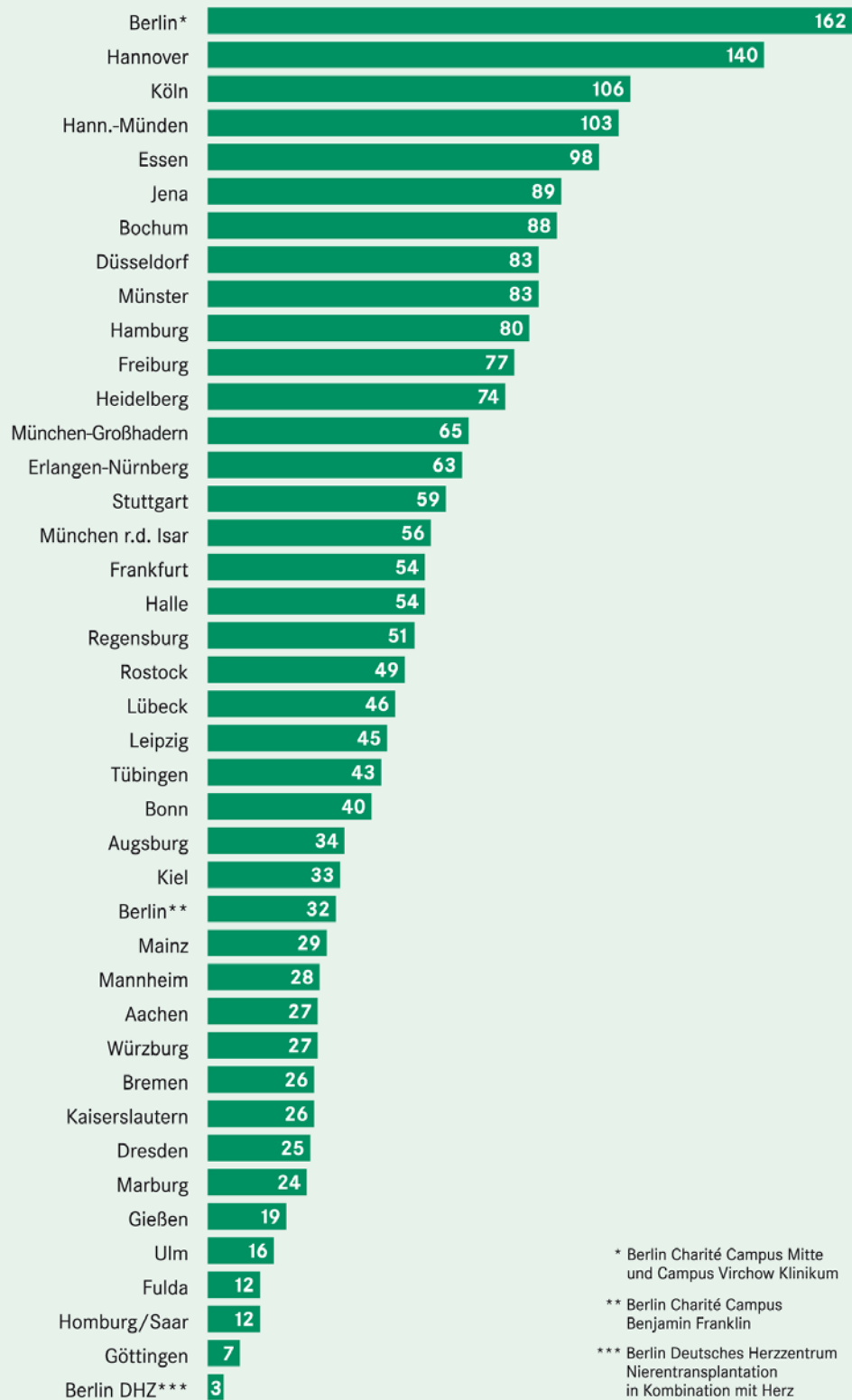


Abb. 2: Nierentransplantationen in Deutschland 2008

Die Indikation für die Nierentransplantation ist die terminale Niereninsuffizienz, die durch unterschiedliche Grunderkrankungen verursacht wird. Laut der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) war im Jahr 2008 die diabetische Nephropathie die häufigste Ursache für das terminale Nierenversagen, gefolgt von der Glomerulonephritis und dem chronischen nephritischen Syndrom (Abb. 3).

2008 DEUTSCHLAND		DSO
Indikationen für eine Nierentransplantation		
DIE ZEHN HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG)		
E10.2	Primär insulinabhängiger Diabetes mellitus mit Nierenkomplikation	356
N03.3	Chron. nephritisches Syndrom – Diffuse mesangioproliferative Glomerulonephr.	311
N03.9	Chronisches nephritisches Syndrom – nicht näher bezeichnet	263
Q61.2	Polyzystische Niere, autosomal-dominant	251
I12.0	Hypertensive Nierenkrankheit mit Niereninsuffizienz	241
N18	Chronische Niereninsuffizienz	147
N18.9	Chronische Niereninsuffizienz, nicht näher bezeichnet	128
N04.1	Nephrotisches Syndrom – Fokale und segmentale glomeruläre Läsion	124
E11.2	Nicht primär insulinabhängiger Diabetes mellitus – mit Nierenkomplikationen	122
N18.8	Sonstige chronische Niereninsuffizienz	101
		2.044
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 174 Hauptdiagnosen bei 3.599 Fällen		
Quelle: Eurotransplant		DSO 96

Abb. 3: Indikationen für eine Nierentransplantation

1.1.1. Marginale Spenderorgane

Die heutige Situation in der Transplantation ist durch die wachsende Diskrepanz zwischen der Zahl der Patienten auf der Warteliste und der Zahl der vorhandenen Organe gekennzeichnet (Abb. 4). So haben in Deutschland im Jahr 1996 8112 Patienten auf eine Niere gewartet, aber nur 2016 Organe, das entspricht ca. 25% des Bedarfs, wurden transplantiert. Im Jahr 2000 gab es entsprechend 9663 Patienten auf der Warteliste, 2219 (ca. 23%) erhielten ein Spenderorgan. Eine leichte Verbesserung der Situation in den letzten Jahren hängt vor allem mit der Verwendung marginaler Spenderorgane und dem wachsendem Anteil an Lebendspenden zusammen. Lag der Nierenlebendspendenanteil 1996 bei 6,4%, so liegt er heute bei über 20% (Abb. 5).

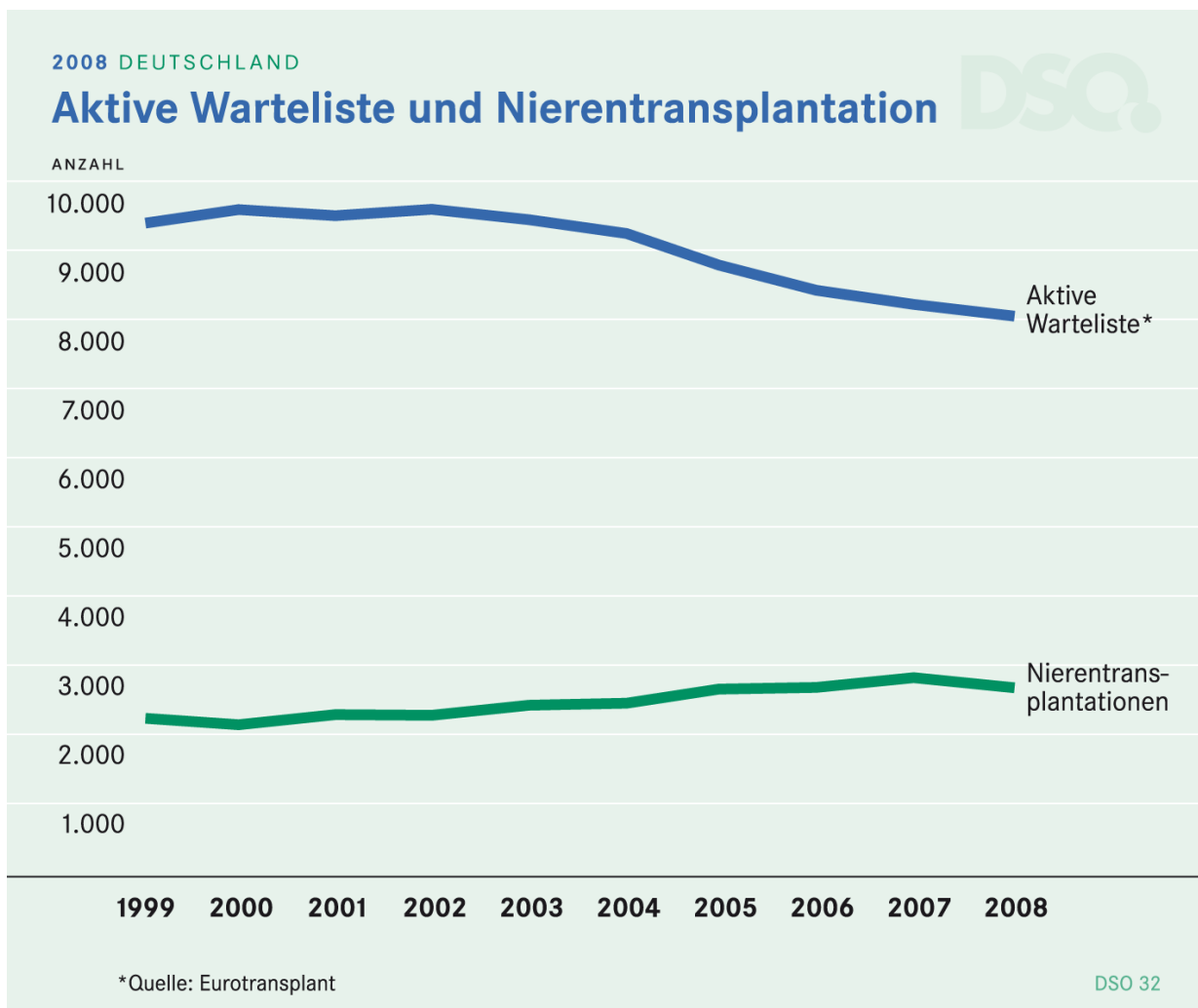


Abb. 4: Aktive Warteliste und Nierentransplantation

Anteil der Nierenlebendspenden* an der Nierentransplantation

ANZAHL, PROZENTUALER ANTEIL

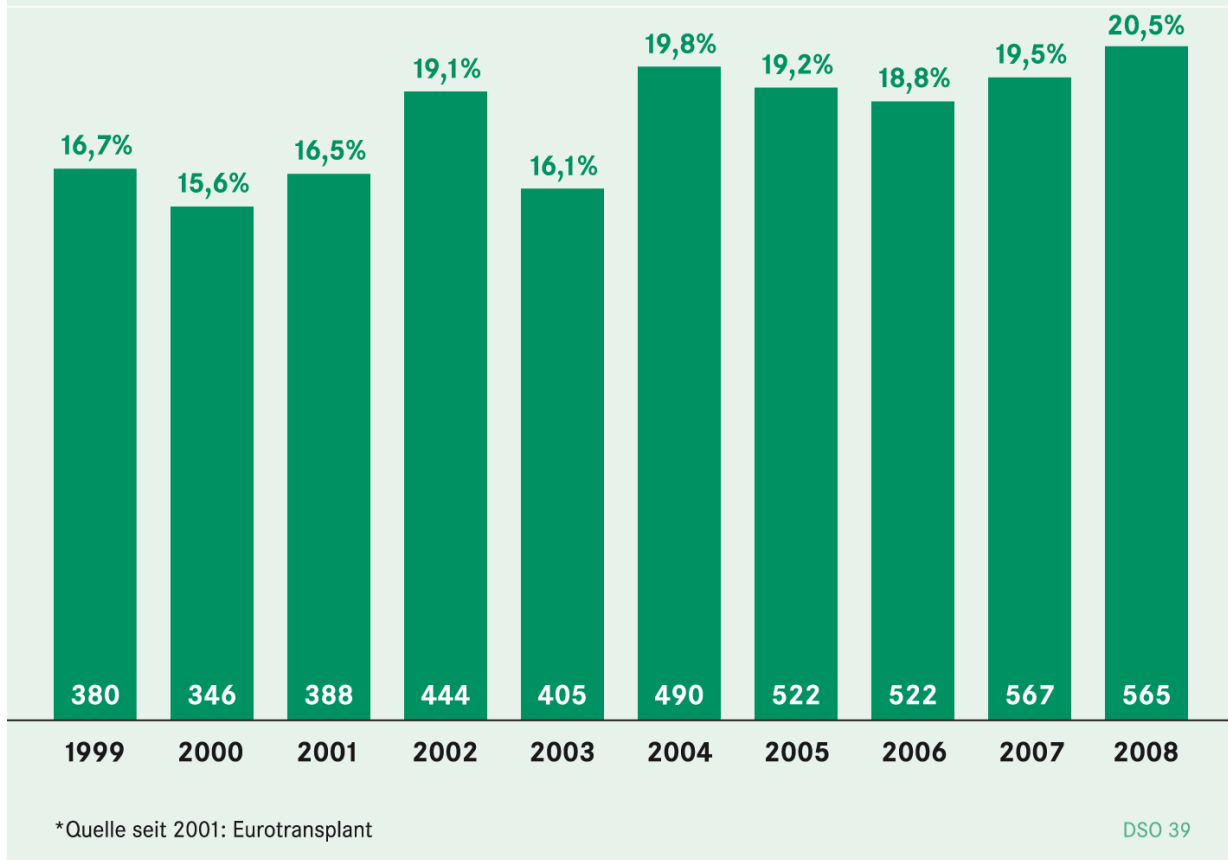


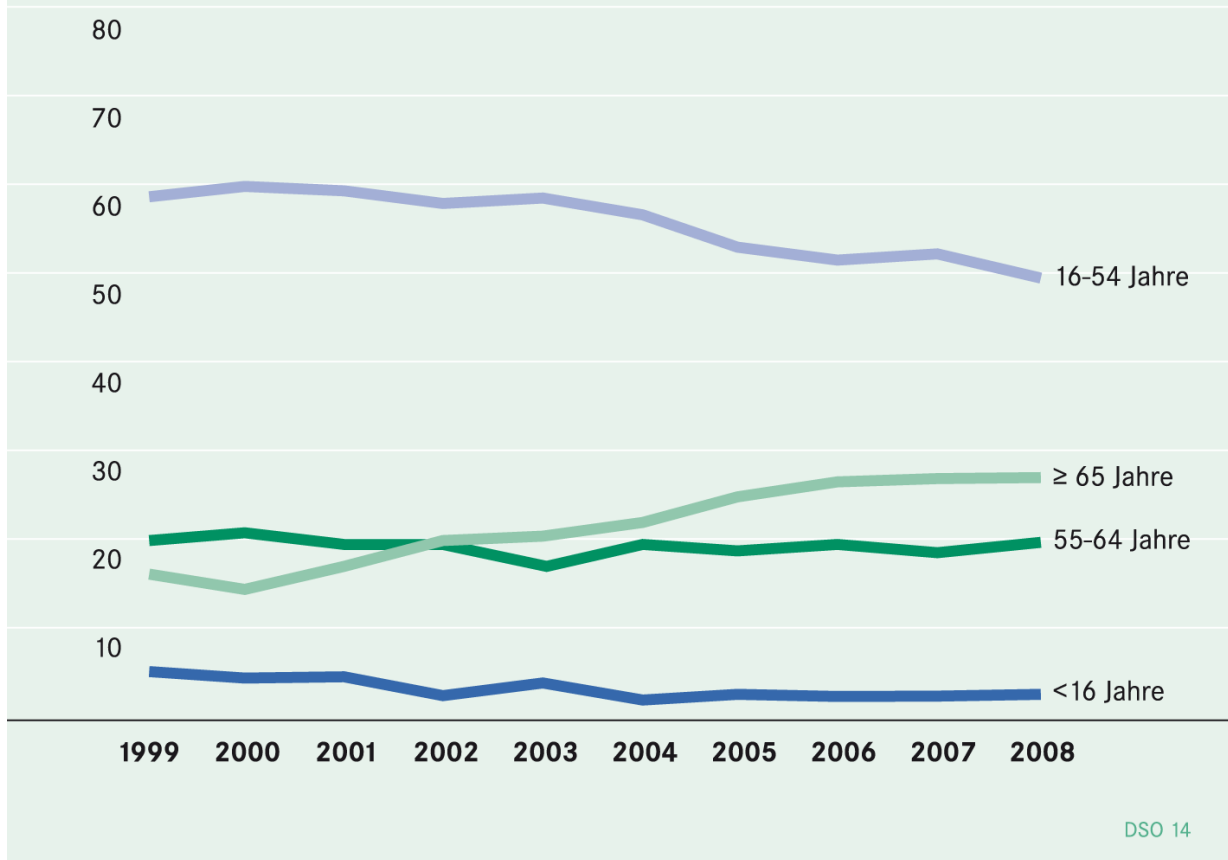
Abb. 5: Anteil der Nierenlebendspenden an der Nierentransplantation

Mit dem Begriff „marginale Spenderorgane“ werden Spenderorgane mit reduzierter Qualität bezeichnet, die nach Transplantation ein schlechteres Transplantatüberleben und eine reduzierte Transplantatfunktion im Vergleich zum „idealen“ Nierentransplantat (Spenderalter 10–39 Jahre, keine Risikofaktoren wie Hirntod oder arterielle Hypertension, Serumkreatinin <1,5mg/dl) aufweisen. Spender von Organen mit eingeschränkter Qualität werden auch als ECD (expanded criteria donors) bezeichnet und umfassen Spender zwischen 50 und 59 Jahren mit einer Hypertension in der Anamnese, cerebrovaskulärer Todesursache oder renaler Insuffizienz mit einem terminalen Serumkreatininspiegel unter 1,5 mg/dl, sowie alle Spender über 60 Jahre (1).

In den letzten 10 Jahren stieg der prozentuale Anteil der Spender über 65 Jahre in Deutschland um ca. 10% (Abb. 6).

Alter der Organspender

PROZENT



DSO 14

Abb. 6: Alter der Organspender

Eine ähnliche Entwicklung ist in den anderen europäischen Ländern zu beobachten (2). Laut Eurotransplant nimmt die Gruppe der über 65-jährigen Spender kontinuierlich zu und liegt aktuell bei 20,7% (Eurotransplant. Annual Report 2008 <http://www.eurotransplant.nl>).

1.2. Transplantationsimmunologie

1.2.1. Grundlagen der Immunantwort gegen das Transplantat

Die Immunantwort gegen Alloantigene kann sowohl vom humoralen als auch vom zellulären Typ sein. In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend zelluläre Immunreaktionen nach der Nierentransplantation untersucht.

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der zellulären Immunantwort. Es werden 2 Haupttypen von alloreaktiven T-Zellen unterschieden: *CD4+ Helfer T-Lymphozyten (Th)* und *CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)*.

Allotransplantate, die sich vom Empfänger bezüglich MHC-Klasse I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und MHC-Klasse II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) Antigenen unterscheiden, führen über die Erkennung von Alloantigenen zur Aktivierung von CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten. Bei der Alloantigenerkennung sind T-Lymphozyten auf professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ: dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen) sowie auf das Zusammenspiel sogenannter costimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen und APZ (z.B. CD28-CD80/86; CD40-CD40L) angewiesen.

Es wird zwischen direkter und indirekter Antigenpräsentation unterschieden. Bei der *direkten* Präsentation binden T-Zellen direkt an die fremden MHC Moleküle, die durch APZ des Spenderorgans, so genannte „passenger“ Leukozyten, präsentiert werden. Bei der *indirekten* Präsentation werden Fremdproteine von APZ des Empfängers aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen des Empfängers präsentiert (3).

Naive CD8+ Lymphozyten (CD8+ naive) werden durch fremde MHC Klasse I Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C), die auf allen Zellen des Transplantates vorhanden sind, zu zytotoxischen Lymphozyten (CTL) aktiviert. Aktivierte CTL sind in der Lage mit Hilfe von Perforin Zellen, die Fremdartigene aufweisen, zu lysieren.

Naive T-Helferlymphozyten (CD4+ Th naive; Th0) werden durch fremde MHC Klasse II Moleküle (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) aktiviert und sezernieren verschiedene Zytokine, die zur T-Zellproliferation und einer weiteren T-Zellaktivierung führen (4).

Es gibt zwei Haupttypen von aktivierten Helfer-Zellen: Th1- und Th2-Zellen. *Th1-Zellen* produzieren Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) und sind hauptsächlich an der zellulären Immunantwort beteiligt. *Th2-Zellen* begünstigen durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) eine

humorale Immunantwort und hemmen die Th1 Antwort. Daneben sind Treg (regulatorische T-Zellen) beschrieben, die für die Suppression des Immunantwort verantwortlich sind.

Zur Charakterisierung aktivierter T-Zellen und APZ kann die Expression verschiedener Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS [Fluorescence activated cell sorter]-Analyse) bestimmt werden (5):

CD25 α -Kette des IL-2-Rezeptors

HLA-DR MHC-Klasse II-Molekül auf APZ

CD62L L-Selektin (Adhäsionsmolekül auf Lymphozytenoberfläche)

CD62L (L-Selectin, „homing“ Rezeptor) ist ein Oberflächenantigen, welches auf naiven T-Helfer Zellen zu finden ist und insbesondere beim so genannten „rolling“, dem Bewegen der T-Zellen entlang des Endothels zu den sekundären lymphatischen Organen, wichtig ist. Im Zuge der Entwicklung naiver CD4⁺ Zellen zu Gedächtniszellen wird CD62L nach dem ersten Antigenkontakt bei ungefähr der Hälfte der Zellen von der Oberfläche abgespalten.

Diejenigen T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, werden als *naive T-Zellen* (CD45RA⁺) bezeichnet. Nach Antigenkontakt differenzieren sie sich zu so genannten Effektorzellen, die meisten dieser Zellen sterben innerhalb weniger Wochen nach Erstkontakt mit dem Antigen. Ein kleiner Teil der Zellen, so genannte *Gedächtniszellen* (CD45RO⁺), überlebt dagegen längere Zeit und ermöglicht in der Folge eine schnelle Immunantwort bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen.

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen, CD16⁺CD56⁺) spielen eine bedeutende Rolle in der Tumor- und Infektionsabwehr, sind wahrscheinlich auch an der Immunantwort gegen das Transplantat beteiligt. So wurden NK-Zellinfiltrate in abgestoßenen Organtransplantaten gefunden (6). Im Gegensatz zu den zytotoxischen Lymphozyten haben NK-Zellen keinen T-Zellrezeptor (TCR), brauchen keine spezifische Aktivierung und bleiben nach einmaliger unspezifischer Aktivierung ihr ganzes weiteres Leben aktiv. Die lytische Wirkung der NK-Zellen ist ähnlich der von CTL und beruht auf der Produktion von Perforin, das zur Lyse von Zielzellen führt. NK-Zellen können körpereigene MHC Klasse I-Antigene erkennen, was eine Zerstörung von eigenen Zellen verhindert. Aktivierte NK-Zellen sind in der Lage proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α zu produzieren.

Humorale Immunreaktionen gegen das Transplantat sind in der Regel nur für 5-10 % der Abstoßungsreaktionen (hyperakute, akute vaskuläre und chronische Abstoßung) verantwortlich. Von T-Helferzellen produzierte Zytokine induzieren die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen, die in der Folge antigenspezifische Antikörper produzieren. Allerdings ist mittlerweile beschrieben, dass B-Zellen neben der Produktion von Antikörpern die T-Zell-

vermittelte Immunantwort über nicht-humorale Funktionen wie Aktivierung und Regulation der T-Zellantwort, professionelle Antigenpräsentation und Produktion von Zytokinen und Chemokinen beeinflussen können (7,8)

Eine zentrale Rolle bei der Immunantwort gegen Alloantigene spielt das Zytokin *Interleukin-2*. IL-2 wird von aktivierten Th1-Zellen und NK-Zellen produziert. Es führt über die Bindung an den IL-2-Rezeptor (IL-2R) auf T-Helferzellen zur Differenzierung und Proliferation aktivierter Helferzellen (Th1), alloreaktiver CTL und B-Zellen und erhöht die zytolytische Aktivität der NK-Zellen. Es wird diskutiert, dass sich CTL auch unabhängig von CD4⁺ T-Zellen differenzieren können. Die Alternative besteht in der direkten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch körperfremde Spender-APZ, die zur Produktion von Zytokinen führt. Diese steuern auf autokrinem Weg die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten zu CTL. Zusätzlich kann von Makrophagen produziertes IL-1 zur Differenzierung der CTL beitragen.

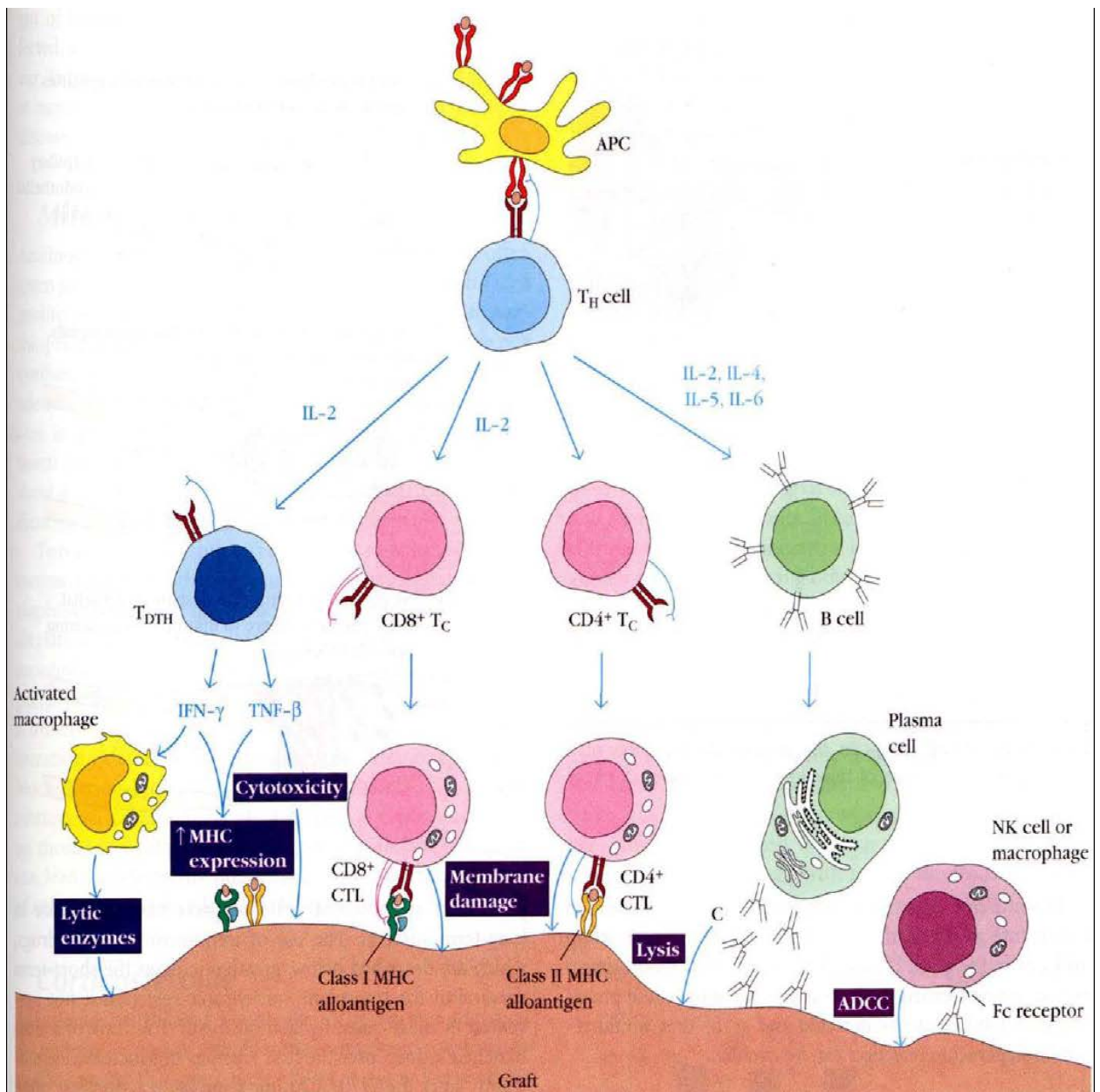
Interleukin-4 ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B und T-Zellen (Differenzierung von Th0 zu Th2) und zum Teil für zytotoxische T-Zellen. Es wird von aktivierten Th2-Zellen und Basophilen produziert und induziert die IgE-Synthese von B-Zellen. Des Weiteren hemmt es die Effekte von IL-2 auf B- und NK-Zellen und die Th1-Differenzierung und unterstützt dadurch die Toleranzinduktion.

Interleukin-5 wird wie IL-4 von aktivierten Th2-Zellen und Basophilen produziert und erhöht die Proliferation und Immunglobulinsekretion von B-Zellen. IL-5 stimuliert die Eosinophilen-Proliferation.

Interleukin-10, ein anti-inflammatorisches Zytokin, wird von Th2-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Treg), B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten produziert. Es hemmt die IFN- γ -Synthese durch Th1-Zellen, induziert die Proliferation und Differenzierung von CD8⁺-Zellen und Proliferation aktivierter B-Zellen. IL-10 spielt eine wichtige Rolle im Rahmen einer Toleranzinduktion, Inflammation und anti-Tumorimmunität.

Interferon- γ , ein pro-inflammatorisches Zytokin, wird von aktivierten Th1-Zellen und NK-Zellen produziert. Es induziert die Expression von MHC Klasse I und II Antigenen, erhöht die Aktivität von NK-Zellen, hemmt die Th2-Proliferation sowie die IL-4- induzierte B-Zellaktivierung.

Tumor nekrosis factor- α (TNF- α), ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, wird von einem breiten Zellspektrum produziert (Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen, Kupferzellen und B-Zellen). In der Regel induziert es eine inflammatorische Antwort, kann aber auch in kleinen Konzentrationen die Immunität durch Induktion von MHC Antigenen steigern. Darüber hinaus ist es an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt.



Aus Transplantation Biology. Tilney et al. 1996

1.2.2. Grundlagen der Immunsuppression

Die Immunsuppression ist das wichtigste Instrument für die Prävention und Steuerung der Transplantatabstoßung. Verschiedene immunsuppressive Behandlungsmethoden beruhen auf einer Hemmung der Lymphozytenproliferation oder Lymphozytendifferenzierung, Zytokinsignaltransduktion oder Nukleotidsynthese (6,9).

Moderne Immunsuppressiva können in 2 große Gruppen unterteilt werden (10).

Kleinmolekulare Medikamente wirken primär intrazellulär und werden vor allem in Kombination in der Basisimmunsuppression verwendet. Zu dieser Gruppe gehören Immunophilin bindende Pharmazeutika (Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus), Inhibitoren der Purin–Pyrimidin-Synthese (Mycophenolat Mofetil, Azathioprin) und Corticosteroide.

Proteinbasierte Medikamente wirken primär extrazellulär über Oberflächenmoleküle der Zielzellen und werden primär in der Induktions- und Rejektionstherapie eingesetzt. Zur dieser Gruppe gehören polyklonale Antikörper (Antithymozytenglobulin (ATG), Thymoglobulin), und monoklonale Antikörper (Daclizimab, Basiliximab, OKT 3, Alemtuzumab).

Corticosteroide (Prednisolon, Methylprednisolon) sind potente anti-inflammatorische Agenzien und haben mehrere Wirkungsmechanismen. So inhibieren Corticosteroide die T-Zellproliferation, T-Zellaktivierung und Transkription verschiedener Zytokingene (z.B. IL-1 und TNF- α) und fördern die Apoptose von Leukozyten und Lymphozyten.

Der Antimetabolit Azathioprin blockiert durch die Hemmung der Nukleotidsynthese die Proliferation und Differenzierung von allen Zellen, insbesondere die von sich schnell vermehrenden Zellen wie z.B. Lymphozyten nach Transplantation, ein anderer Antimetabolit Mycophenolat Mofetil (MMF) blockiert durch die Hemmung der Nukleotidsynthese Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten.

Calcineurininhibitoren (CNI: Cyclosporin A und Tacrolimus) beeinflussen unter anderem die intrathymale T-Zellentwicklung. Ihre pharmakologische Wirkung entfalten sie durch Bindung an eine Gruppe intrazellulärer Proteine, den sogenannten Cyclophilinen, einer Untergruppe der Immunophiline. Die so gebildeten Komplexe hemmen die Phosphataseaktivität von Calcineurin und unterbrechen auf diese Weise den calciumabhängigen Signaltransduktionsweg in der frühen T-Zellaktivierung. Dies führt zu einer verminderten Genexpression wichtiger Wachstumsfaktoren für T-Zellen, wie zum Beispiel von IL-2.

mTOR-Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus) hemmen die IL-2 Signaltransduktion und damit die Proliferation aktivierter T-Zellen, außerdem inhibiert Sirolimus die Antikörperbildung.

Monoklonale anti-T-Zell-Antikörper (anti-CD3 Antikörper, anti-IL-2-Rezeptor Antikörper, anti-CD52-Antikörper) sind gegen unterschiedliche Strukturen der T-Zellmembran gerichtet. Jeder monoklonale Antikörper reagiert spezifisch mit einem Oberflächenmarker.

Der anti-CD3 Antikörper (OKT 3) bindet an die ϵ -Kette des CD3 Moleküls, welches auf allen reifen T-Zellen exprimiert wird und für die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors verantwortlich ist. OKT 3 führt zu einer Modulation und Blockade des TCR/CD3 Komplexes und verhindert so die T-Zellantwort auf Alloantigene.

Anti-IL-2-Rezeptor Antikörper (anti-IL-2R-Ab: Basiliximab, Daclizumab) binden an die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25), der hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, und blockieren somit die T-Zellaktivierung über den IL-2/IL-2R Weg.

Der anti-CD52-Antikörper (CAMPATH), ein relativ neues Immunsuppressiva, bewirkt eine Depletion von Empfänger-Lymphozyten.

Polyklonale Antikörper (Thymoglobulin, Lymphoglobulin) enthalten Antikörper gegen verschiedene Oberflächenstrukturen humaner Lymphozyten und führen zur Elimination der Lymphozyten aus der Zirkulation.

Weitere, neuere Immunsuppressiva wie z.B. Leflunomid oder FTY720 werden zurzeit in klinischen Studien geprüft. Leflunomid verhindert die Lymphozytenproliferation durch Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase Aktivität. Dieses Enzym wird zur Herstellung von Pyrimidin-Nukleotid bei der Zellteilung von T-Lymphozyten gebraucht. Zusätzlich wird die Leukozytenmigration gehemmt. FTY720 verhindert die Einwanderung der Lymphozyten in das Transplantat durch Hemmung der T-Zell-Migration.

Bei hochimmunisierten Empfängern (Präsensibilisierung z.B. durch Ersttransplantation, Schwangerschaft) kann zur Eliminierung von vorbestehenden Antikörpern die Plasmapherese verwendet werden.

Da T-Lymphozyten als primäres Zielobjekt der immunsuppressiven Therapie dienen, wird das Oberflächenprofil der Lymphozytenpopulation durch Immunsuppressiva stark beeinflusst (11). Z.B. wurden persistierend niedrige CD4+ Lymphozytenzahlen bei gleichzeitiger Überrepräsentation der CD8+ Zellen 24 Monate und länger nach initialer depletierender Therapie beschrieben (10,11).

1.3. Einfluss des Spenderalters

Das Alter des Organspenders ist ein wichtiger Prognosefaktor für die Transplantatfunktion. Das Spenderalter wurde als einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Transplantatüberleben definiert. So zeigte sich ein signifikant schlechteres 5-Jahres Transplantatüberleben von Fullhouse Nieren (Übereinstimmung der HLA-Merkmale zwischen Spender und Empfänger) bei Organen von über 60-jährigen Spendern (39 % 5-Jahresüberleben) im Vergleich zu Organen 21-30-jähriger Spender (81 % 5-Jahresüberleben) (12). In einer klinischen Studie wurden bei gleicher Immunsuppression häufiger akute Abstoßungen bei Transplantatempfängern, die Organe von über 50-jährigen Spendern bekamen, beobachtet als bei Transplantatempfängern, die Organe jüngerer Spender bekamen (13).

Ebenso ist ein erhöhtes Spenderalter in vielen Studien als Risikofaktor für ein primäres Transplantatversagen (primäre Nichtfunktion) (14) und eine reduzierte Transplantatlangzeitfunktion (12,15) beschrieben worden.

Schlechtere Ergebnisse der Transplantation von alten Organspendern sind einerseits durch morphologische und biochemische Veränderungen im „alten“ Transplantat und andererseits durch immunologische Veränderungen in älteren Empfängern zu erklären.

1.3.1. Altersspezifische morphologische und funktionelle Veränderungen in der Niere

Der Alterungsvorgang in der Niere führt zu einer progressiven Abnahme der Nierenmasse, welche die Nierenrinde stärker als das Nierenmark betrifft. Makroskopisch findet sich die Abnahme der Anzahl funktionierender Glomeruli. Vor allem im Kortex finden sich Obliterationen der Vasa afferentia. In den größeren Nierenarterien lässt sich eine zunehmende Intimafibrosierung nachweisen. Die Glomeruli zeigen fokale Sklerosierungen und Hyalinisierungen. Tubuläre Veränderungen sind durch Volumenminderung proximaler Tubuli, Basalmembranaufsplitterungen und Divertikelbildungen in distalen Tubuli charakterisiert. Diese morphologischen Veränderungen führen über eine Reduktion des renalen Blutflusses sowie der glomerulären Filtrationsrate zu einer Abnahme der Nierenfunktion, die durch vorbestehende Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder arterielle Hypertonie zusätzlich eingeschränkt werden kann. Außerdem ist in Folge einer veränderter Tubulusfunktion die Konzentrierungs- und Verdünnungskapazität der alternden Niere eingeschränkt (16). Als Folge dieser multiplen Veränderungen haben Organe älterer Spender häufig geringere Kompensationsmöglichkeiten für immunologische und nichtimmunologische Schädigungen (17). Zusätzlicher Faktor ist die Verkürzung der Telomeren mit steigendem Alter und mit der

Anzahl der Zellteilungen. Unterschreitet die Länge der Telomeren einen kritischen Wert, ist die Zellteilung nicht mehr möglich. Zellen alter Personen haben kürzere Telomeren als die junger Personen und sind damit zu weniger Zellteilungen noch im Stande (18).

1.3.2. Alterspezifische immunologische Veränderungen im Transplantat

Eine erhöhte Inzidenz akuter Abstoßungen bei Empfängern älterer Transplantate kann möglicherweise durch die zum Zeitpunkt der Transplantation bereits vorhandene Gewebeinflammation in älteren Organen erklärt werden. Zusätzlich gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Lymphozyten älterer Individuen, die sich auch im Transplantat befinden, eine erhöhte HLA-Expression aufweisen (19). Außerdem konnte im Tierexperiment eine gesteigerte Allogenität alter Spender-APC's nachgewiesen werden, die Fremdantigene direkt an Empfängerlymphozyten präsentieren. Diese Faktoren führen zur einer erhöhten Alloantigenerkennung und damit zur einer gesteigerten allogenen Antwort (13).

1.4. Einfluss des Empfängeralters

Eines der Merkmale der heutigen Situation in der Transplantationsmedizin ist ein kontinuierlicher Altersanstieg der Empfängerpopulation. Während in den USA im Jahr 1988 nur 26% der Empfänger eines Nierentransplantats von verstorbenen Spendern älter als 50 Jahre waren, so waren es im Jahr 2000 bereits 45%, bei den Lebendspenden entsprechend 10% versus 35% (20). Zwischen 1998 und 2002 wurden in den USA mehr als 1000 Patienten im Alter von 70-75 Jahren transplantiert (21). In Europa sieht die Entwicklung ähnlich aus. Laut dem Eurotransplant Annual Report waren im Jahr 1998 6,5% Nierentransplantatempfänger älter als 65, im Jahr 2003 fast 19% und im Jahr 2007 21%.

1.4.1. Altersspezifische immunologische Veränderungen

Als altersspezifisch wurden folgende Veränderungen des Immunsystems beschrieben:

T-Zellen: leicht erniedrigte T-Lymphozytenzahl, insbesondere von Helfer-, regulatorischen und naiven T-Zellen, erniedrigte Anzahl CD28+ Zellen, eine gesteigerte Anzahl und eingeschränkte Funktion von T-Gedächtniszellen sowie NK-Zellen, eine gesteigerte Anzahl von zytotoxischen T-Zellen und CD95+ Zellen, eine erniedrigte IL-2-Rezeptor Expression, eine defekte T-Zell-Signalübertragung. (22,23).

B-Zellen: erniedrigte Anzahl im peripheren Blut, erniedrigte Produktion spezifischer Antikörper, erhöhte Autoantikörperproduktion (24).

NK-Zellen: erhöhte Anzahl, aber verminderte Antwort auf inflammatorische Zytokine

Monozyten/Makrophagen: verminderte Aktivität

APC: erhöhte bis verminderte Funktion (25)

Zytokinprofil: Verschiebung von Th1- zu Th2-Zytokinproduktion d.h. erniedrigte IL-2- und erhöhte IL-4- und IFN- γ -Sekretion, deutlich erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α in älteren Individuen (22).

Trotz zahlreicher Studien gab es zum Anfang des Jahrtausends keine eindeutige Meinung dazu, ob die Immunantwort nach der Transplantation mit zunehmendem Empfängeralter insgesamt ab- oder zunimmt. Seit Anfang der 90iger Jahre wurden viele Studien zum Thema Transplantation im Alter durchgeführt. Anfangs wurde angenommen, dass alte Empfänger weniger immunkompetent seien (26). Frühere Studien zeigten, dass ältere Empfänger weniger akute sowie chronische Transplantatabstoßungen und eine reduzierte Immunantwort aufweisen (27,28). Zusätzlich verlieren ältere Empfänger seltener ein Transplantat als Folge einer irreversiblen Abstoßung (29). Diese Altersgruppe zeigte zudem eine höhere Sterberate mit

funktionierendem Transplantat (30). Außerdem zeigten ältere Empfänger eines Transplantats von älteren Spendern (>50 Jahre) 3 Jahre nach der Transplantation bessere Funktionen im Vergleich zu jüngeren Empfängern, die ein Organ aus dem gleichen Spender-Pool erhielten (31). In jüngsten experimentellen Untersuchungen zeigten ältere Empfänger hingegen eine gesteigerte Immunantwort und ein schlechteres Transplantatüberleben. So konnte in einem Tierexperiment eine Korrelation zwischen zunehmendem Empfängeralter und der Häufigkeit, Ausprägung und der Progression chronischer Abstoßungsreaktionen beobachtet werden (32). Außerdem konnte in einem Rattenmodell eine Zunahme chronischer Abstoßungsreaktionen in älteren Empfängern auf der Grundlage einer veränderten Immunantwort (erhöhte Anzahl von Gedächtniszellen sowie alloreaktiven Zellen und ein verändertes Zytokinprofil) beobachtet werden (33-35). Gleichzeitig gibt es klinische Analysen, die eine erhöhte Rate chronischer Transplantatabstoßungen und ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben in älteren Empfängern zeigen (36). In der letzten Zeit berichteten verschiedene Autoren über eine höhere Rate akuter Abstoßungen bei älteren Transplantatempfängern (15,37,38). So berichtet eine deutsche Studie über eine Rate akuter Abstoßungsreaktionen von ca. 50 % bei älteren Empfängern einer Niere von älteren Spendern (39). Außerdem zeigen mehrere klinische Studien nach einer initialen Calcineurininhibitor-freien Immunsuppression bei älteren Empfängern eine hohe Konversionsrate zur Calcineurininhibitor-haltiger Immunsuppression. So wurden in einer klinischen Studie Nierentransplantatempfänger mit einem geringen immunologischen Risiko bei der Transplantation suboptimaler Organe mit einer ATG Induktionstherapie sowie einer MMF und Steroidtherapie behandelt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten funktionierten alle Organe, 30% der Patienten mussten jedoch auf Cyclosporin A umgestellt werden (40). In einer weiteren Studie wurden ältere Empfänger eines älteren Nierentransplantates nach einer ATG Induktionstherapie mit einer MMF Monotherapie behandelt. Während 1 Transplantat nach einer irreversiblen Abstoßung verloren ging, war eine große Zahl an Konversionen zu Calcineurin-Inhibitoren notwendig (41). Weitere experimentelle Untersuchungen ergaben, dass ältere Tiere eine erhöhte Mortalität und Morbidität sowie eine ausgeprägte Immunantwort und insbesondere eine höhere GVHD-Rate (graft-versus-host disease) nach einer Stammzelltransplantation im Vergleich zu jüngeren Tieren aufweisen (42).

1.5. Eurotransplant Senior Programm (ESP)

Insgesamt hat sich gezeigt, dass auch über 65-jährige Dialysepatienten von einer Nierentransplantation profitieren. Das äußert sich sowohl in der besseren Lebensqualität als auch in der verlängerten Lebenserwartung. So gewinnt ein 65-jähriger Patient ohne schwere Begleiterkrankungen 1,2 Jahre Lebenserwartung bei einer Transplantation im Vergleich zur Dialysebehandlung, wenn die Wartezeit 2 Jahre beträgt. Außerdem ist die Transplantation ökonomisch sinnvoll. Die Ergebnisse beziehen sich in gleichem Maße auf Transplantationen von Nieren verstorbener Spender wie Lebendspender (43). Die Mortalitäts- und Morbiditätsrate ist bei transplantierten Patienten sehr viel geringer als bei Dialysepatienten. Das relative Sterberisiko steigt im ersten Monat nach der Transplantation zwar steil an, ist aber dann viel niedriger als bei Dialysepatienten (44). Diese aktuelle Studie aus Schottland konnte zeigen, dass sich die Lebenserwartung nach Transplantation sogar verdoppelt.

Da Organe älterer Spender in jungen Empfängern nicht optimal funktionierten, in älteren Empfängern jedoch akzeptable Ergebnisse zeigten, schien es sinnvoll, alte Organe an alte Empfänger zu vermitteln.

Die Organknappheit und die veränderte Empfängerdemographie haben dazu geführt, dass im Januar 1999 das Eurotransplant-Senior-Programm (ESP) ins Leben gerufen wurde. Die Aufnahme in dieses Programm aus der Warteliste erfolgt freiwillig. In diesem Programm werden Nieren von über 64-jährigen Spendern in Empfänger über 64 Jahre transplantiert. Die Organvergabe erfolgt nach Blutgruppenkompatibilität und Wartezeit. Um die Organtransportzeit und somit die nicht-immunologische Schädigung der alten Spenderniere durch eine verlängerte kalte Ischämiezeit zu verkürzen, erfolgt die Zuordnung von Spender und Empfänger auf lokaler Ebene. Basierend auf der Annahme, dass ältere Empfänger eine weniger ausgeprägte Immunantwort aufweisen, wird zudem auf eine HLA-assoziierte Organzuordnung verzichtet.

Der Empfänger sollte zur Gewährleistung eines niedrigen immunogenen Profils weniger als 5 % Panel reaktive Antikörper (präformierte Antikörper gegen MHC-Moleküle) aufweisen. Die Ergebnisse der ersten Jahre zeigen eine Rate akuter Abstoßungen im ESP-Programm von 40 % gegenüber 33 % in der Kontrollgruppe sowie ein 1-Jahres Transplantatüberleben von 79 % in der ESP-Gruppe und 73 % in der Kontrollgruppe (45). Die höhere Zahl akuter Abstoßungen wird durch das schlechtere HLA-Matching bei der Allokation von Organen im ESP erklärt (38).

Da im ESP sowohl Empfänger als auch Spender älter als 64 Jahre sind, ist es schwierig ausschließlich anhand klinischer Daten zu differenzieren, ob die Veränderungen in der

Immunantwort durch altersbedingte Veränderungen im Empfängerorganismus oder im Transplantat bedingt sind.

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunantwort des Empfängers nach Transplantation in Abhängigkeit des Alters untersucht.

Die eigenen Untersuchungen wurden im Rahmen der klinischen Studie „Altersabhängige Immunantwort nach Nierentransplantation“ ausgeführt.

Nach Vorlage des Ethikvotums der Charité wurden in der Studie Untersuchungen bezüglich einer altersadaptierten Immunantwort nach Nierentransplantation durchgeführt, auf deren Basis eine altersadaptierte Immunsuppression bzw. Organallokation entwickelt werden könnte.

1.6.Zielsetzung

Inhalt der Studie war der Nachweis altersspezifischer Unterschiede in der Immunantwort von Patienten nach Nierentransplantation mit dem Ziel Konzepte für eine altersadaptierte Immunsuppression entwickeln zu können. Hierbei sollten veränderte Immunreaktionen als Folge einer altersbedingt veränderten Immunantwort des Empfängers, vor allem hinsichtlich der zellulären Immunantwort, durch

1. T-Zelltypisierungen (durchflusszytometrische Bestimmung) mittels spezifischer Antikörper gegen relevante Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56, CD45RO, CD45RA, CD25, HLA-DR, CD62L)
2. Zytokinprofilbestimmungen (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10) in den Überständen nach in vitro Stimulation des Vollbluts und
3. Bestimmung der Alloreaktivität des Empfängers mittels ELISPOT (Frequenz alloreaktiver T-Zellen)

untersucht werden.

Es wurde eine verstärkte Immunantwort in der initialen Phase nach der Transplantation durch eine verstärkte Gedächtnis-T-Zellantwort und langfristig eine reduzierte Immunantwort bei einer reduzierten Anzahl nativer T-Zellen bei älteren Empfängern erwartet.

Zusätzlich wurden ein verändertes Zytokinprofil und eine erhöhte Alloreaktivität in der Frühphase nach der Transplantation bei älteren Probanden angenommen.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Bei der Studie handelte es sich um eine monozentrische, offene, prospektive Studie.

Alle Patienten wurden an folgenden 3 Zeitpunkten untersucht:

1. Tag 0 (vor der Transplantation)
2. Tag 7 nach der Transplantation
3. 6 Monate nach der Transplantation

Von den Patienten wurde im Rahmen planmäßiger Blutentnahmen zusätzlich eine Blutprobe (10 ml Heparin-Blut) an Tag 0 und an Tag 7 und bei der Nachsorgeuntersuchung 6 Monate nach der Transplantation entnommen und folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Lymphozytentypisierung (Durchflusszytometrie):

Vor der Lymphozytentypisierung wurde ein Automaten Blutbild am Hämatologieautomaten XE-2100 (Sysmex, Japan) bestimmt. Die ermittelten Werte für Leukozyten, Lymphozyten dienten als Grundlage für die Bestimmung der Absolutwerte der Subpopulationen. Am Durchflusszytometer wurden die Lymphozyten im Vorwärts- (FSC) gegen Seitwärtsscatter (SSC) eingegrenzt (gated) und die verschiedenen Subpopulationen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern bestimmt.

CD45+/CD3+	T-Lymphozyten
CD45+/CD4+/CD3+	Helfer T-Lymphozyten (Th)
CD45+/CD8+/CD3+	Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)
CD45+/CD19+/CD3+	B-Zellen
CD45+/CD16+/CD56+	NK-Zellen
CD45+/CD4+/CD45RO+	Gedächtniszellen
CD45+/CD4+/CD45RA+	Naive T-Zellen
CD45+/CD4+/CD25+	Aktivierte T-Helfer
CD45+/CD8+/HLA-DR+	Aktivierte CTL
CD45+/CD4+/CD62L+	Naive T-Helfer

2. Zytokinprofilbestimmung (im Überstand nach unspezifischer Stimulation von Vollblut: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10)
3. Alloreaktiver IFN- γ -Sekretions-ELISPOT (Frequenz alloreaktiver T-Zellen)

2.1.1. Patientengut

Die Durchführung der vorliegenden Studie wurde von der Ethikkommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum befürwortet (Votum Nr. 149/2004). Die in Hinblick auf Ein- und Ausschlusskriterien geeigneten Patienten wurden nach ausführlicher Erläuterung des Zieles und der Methoden der Studie nach Ihrer Bereitschaft zur Teilnahme befragt. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme, die jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen werden konnte, wurde eingeholt.

Einschlusskriterien:

Eingeschlossen wurden männliche und weibliche Patienten, die das 18. Lebensjahr vollendet hatten und deren schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie vorlag. Es wurden 100 Patienten einer chirurgischen und einer nephrologischen Intensivstation der Charité, Campus Virchow-Klinikum untersucht. Bei allen Patienten bestand bei Aufnahme eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. 78 Patienten erhielten allogene Nierentransplantate von postmortalen Spendern, 22 Patienten eine allogene Lebendspende. 74 Empfänger waren zum Transplantationszeitpunkt jünger als 65 Jahre, 26 Empfänger älter als 65 Jahre.

Ausschlusskriterien:

Das Vorliegen folgender Kriterien bei der Aufnahme des Patienten galt als Ausschlusskriterium:

1. Alter < 18 Jahre
2. Schwangere oder stillende Patientinnen
3. HLA-identische Lebendspende

Abbruchkriterien

Die Studie konnte im Falle des Transplantatversagens, des Transplantatverlustes, bei Tod des Patienten sowie durch den Widerruf der Einwilligung des Patienten abgebrochen werden.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung:

Gruppe 1 ESP (n=26)	Patienten, die eine postmortale Spende (n=24) oder eine Lebendspende (n=2) von einem Spender >65 Jahre erhielten und zum Transplantationszeitpunkt älter als 65 Jahre waren.
Gruppe 2 Normalkollektiv (n=74)	Patienten, die eine postmortale Spende (n=54) oder eine Lebendspende (n=20) von einem Spender <65 Jahre erhielten und zum Transplantationszeitpunkt jünger als 65 Jahre waren.

2.2. Allgemeine technische Geräte und Verbrauchsmaterial

2.2.1. Allgemeine technische Geräte

Tabelle 2: Allgemeine technische Geräte

Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
Glaswaren	Duran, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Schüttler	Heidolph REAX 2000
Sterilwerkbanken	Heraeus, Hanau
Ultratiefkühltruhe -152 °C	Sanyo, Deutschland
Vortex MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Waage AE 200	Mettler
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Labofuge M	Heraeus, Hanau
Zentrifuge RT 6000 D	Sorvall

2.2.2. Allgemeines Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Allgemeines Verbrauchsmaterial

Einwegpipetten (10 ml, 20 ml)	Bibby Sterilin Ltd, Stone, UK
Einweg - Pasteurpipetten (3,0 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht
Feinpipetten Research (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Finnpipette (5-40 µl, 40-200 µl)	Labsystems
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Oxnard, USA
Polystyrolröhrchen (10 ml),	Greiner GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald

2.3. Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut des Empfängers

2.3.1. Geräte und Material

Tabelle 4: Geräte und Material, Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut des Empfängers

Einfrierbox	Nalgene
Einfrierröhrchen	Greiner bio - one, Frickenhausen
Glas-Petrischalen	Falcon, Oxnard, USA
Ultratiefkühltruhe -152 °C	Sanyo, Deutschland
Zellsiebe, 40 und 100 µm Porendurchmesser	Becton Dickinson, San Jose, USA

2.3.2. Durchführung

Alle folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt.

Heparinblut wurde 1:1 mit AIM-V Medium verdünnt. Die Isolierung von Lymphozyten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit LymphoprepTM Dichtegradient (Dichte 1.077 g/ml, AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway). Dabei wurden 3 ml Lymphoprep mit 5 ml Zellsuspension pro Röhrchen überschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur und 800 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert, in ein neues Röhrchen überführt, mit Medium auf 15 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 g mit Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die gerenteten Lymphozyten im Medium mit 5% Fungizone resuspendiert und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels eines Hämatologieautomaten (Automat XE-2100, Firma Sysmex, Japan).

2.4. Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus Milzgewebe des Spenders

2.4.1. Geräte und Material

Tabelle 5: Geräte und Material, Präparation peripherer mononukleärer Zellen aus Milzgewebe des Spenders

Einfrierbox	Nalgene
Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glas-Petrischalen	Falcon, Oxnard, USA
Ultratiefkühltruhe -152 °C	Sanyo, Deutschland
Zellsiebe, 40 und 100 µm Porendurchmesser	Becton Dickinson, San Jose, USA

2.4.2. Durchführung

Alle folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt.

Die Milz wurde zerkleinert und dabei frei gewordene Zellen durch ein Zellsieb in ein 50 ml Falconröhrchen mit AIM-V Medium (Serum free Lymphocyte Medium, with L-glutamine, Streptomycinsulfate 50 µg/ml, Gentamicinsulfate 10 µg/ml, Gibco) mit 0,5% Fungizone überführt. Für die Herstellung der Zellsuspension aus 1g Milzgewebe waren 25 ml Medium notwendig. Die Isolierung von Lymphozyten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit Lymphoprep™ Dichtegradient (Dichte 1.077 g/ml, AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway). Dabei wurden 3 ml Lymphoprep mit 5 ml Zellsuspension pro Röhrchen überschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur und 800 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert, in ein neues Röhrchen überführt, mit Medium auf 15 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 g mit Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die geernteten Stimulatorzellen im Medium mit 5% Fungizone resuspendiert. Die Stimulatorzellen wurden eingefroren (1ml Zellsuspension+ 500µl Freez A (40% AIM-V+60% FCS)+500µl Freez B (20% DMSO+ 80% FCS) tropfenweise) und bei -150 °C 1 Woche gelagert. Nach einer Woche wurden die Stimulatorzellen im warmen Kulturmedium aufgetaut, zentrifugiert, die Zellzahl wurde bestimmt und eingestellt.

2.5. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay)

2.5.1. Geräte und Material

Tabelle 6: Geräte und Material, ELISPOT

BIOREADER 3000 C	BIO-SYS, Karben
Inkubationsschränke	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Okular 10 fach, Objektive 20 fach, 40 fach, 63 fache Vergrößerung mit Ölimmersion	Zeiss, Axioscop
MultiScreen™-IP Filtrationsplatten	Millipore, Molsheim, Frankreich
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.5.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien, ELISPOT

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol	Sigma, Steinheim
Aqua destillata	Delta Select, Dreieich
AIM-V	Gibco
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Dimethylformamid	Sigma, Steinheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Selbst hergestellt
Ethanol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PBS ohne Calcium	PAA Laboratories GmbH, Austria
PHA (Polyhydroxyalkanoat)	Biochrom KG, Berlin
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	Sigma, Steinheim

2.5.3. Farbpuffer

Tabelle 8: Farbpuffer, ELISPOT

AEC-Lösung	100 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol+ 10 ml Dimethylformamid
0,2 M Natrium-Acetat-Lösung	27,2 g Natrium –Azetat in 1 Liter Aqua dest.
0,1 M Acetat -Puffer	148 ml 0,2.M Essigsäure+2,3 ml Eisessig+200ml Agua dest+833 ml 0,2 M Natrium-Acetat –Lösung, mit Agua dest bis 1l auffüllen

2.5.4. Durchführung

Alle folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt. Die Frequenz alloreaktiver T-Zellen wurde mittels eines anti-Human-IFN-GAMMA ELISPOT Assays bestimmt. Dabei wurden PVDF-beschichtete 96-well Microfilter Platten mit 100 µl Anti-Human-IFN-GAMMA-Bindungsantikörper (0,4% in PBS, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) pro well 12 Stunden inkubiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindung mit 200µl Blocking Solution (1% Bovines Serum Albumin (BSA, Sigma, Steinheim) in Dulbecco's PBS (PAA Laboratories GmbH, Austria) pro well für 2 Stunden, wurden entweder in AIM-V-Medium gelöstes PHA (2%, Biochrom KG, Berlin) (Positivkontrolle; unspezifische Stimulation) oder $2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen (Milzzellen des Spenders) in 100 µl AIM-V-Medium bzw. $2,5 \times 10^5$ Responderzellen (PBMCs des Empfängers) in 100 µl AIM-V-Medium (Negativkontrolle) in die Mikrotiterplatten verteilt. Für die spezifische Stimulation wurden $2,5 \times 10^5$ Responderzellen in 100µl Medium zu $2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen in 100 µl Medium hinzugefügt. Um die statistische Analyse zu optimieren wurde die spezifische Stimulation dreifach eingesetzt (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Spezifische Stimulation, ELISPOT

Bedeutung	Zusammensetzung
Negativkontrolle Empfänger	$2,5 \times 10^5$ Responderzellen in 100 µl AIM-V-Medium
Negativkontrolle Spender	$2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen in 100 µl AIM-V-Medium
Spezifische Stimulation 1	$2,5 \times 10^5$ Responderzellen+ $2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen
Spezifische Stimulation 2	$2,5 \times 10^5$ Responderzellen+ $2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen
Spezifische Stimulation 3	$2,5 \times 10^5$ Responderzellen+ $2,5 \times 10^5$ Stimulatorzellen
Positivkontrolle Empfänger	2 µl PHA (2mg/ml)+ $2,5 \times 10^5$ Responderzellen in 100 µl AIM-V-Medium

Die Mikrotiterplatten wurden über 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Platten mit 200 µl PBS und 200 µl 0,05% Tween 20 (Serva, Heidelberg) in PBS pro well wurde der biotinylierte anti-Human-IFN-GAMMA Detektionsantikörper (100 µl pro well, 0,2% in PBS/1% BSA/0,05% Tween 20, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) hinzugefügt und über 2 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ belassen. Es folgten eine 45-minütige Inkubation mit 100µl Streptavidin-Peroxidase Konjugat (0,05% in PBS/BSA/Tween, Dako Cytomation, Denmark) pro well und die Färbung mit frisch hergestelltem Färbepuffer (80 µl AEC-Lösung+2,4 ml 0,1 M Azetat-Puffer+1,2ml Wasserstoffperoxid (30%)). Die trockenen ELISPOT-Platten wurden mit dem BIOREADER 3000C/BIOCOUNTER System gemessen und ausgewertet. Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden donorreaktiven Zellen (=Spots) wurde durch Subtraktion beider Negativkontrollen (Empfänger und Spender) von dem Mittelwert der mit Spenderlymphozyten spezifisch stimulierten Proben (Empfängerlymphozyten) bestimmt. Die aktuelle Frequenz alloreaktiver T-Zellen wurde als prozentueller Anteil aller gemessenen alloreaktiver Lymphozyten (=Spots) durchflusszytometrisch ermittelt.

2.6. Durchflusszytometrie mittels FACS (fluorescence-activated cell sorter)

2.6.1. Geräte und Material

Tabelle 10: Geräte und Material, FACS

Durchflusszytometer FACScan Becton Dincison, Heidelberg

2.6.2. Antikörper

Tabelle 11: Antikörper, FACS

Spezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Quelle
CD4, human	Sk3	PERCP	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD45, human	2D1	PERCP	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD3, human	SK7	FITC	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD4, human	Sk3	FITC	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD8, human	SK1	FITC	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD45RA, human	L48	FITC	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD3, human	SK7	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD4, human	SK3	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD8, human	SK1	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD16, human	B73.1	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD19, human	4G7	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD25, human	2A3	PE	Maus IgG ₁	BD, Heidelberg
CD56, human	NCAM16.2	PE	Maus IgG _{2b}	BD, Heidelberg
CD62L, human	SK11	PE	Maus IgG _{2b}	BD, Heidelberg
HLA DR, human	L243	PE	Maus IgG _{2b}	BD, Heidelberg
CD45 RO, human	UCHL-1	PE	Maus IgG _{2b}	BD, Heidelberg
CD14, human	MφP9	PE	Maus IgG _{2b}	BD, Heidelberg
Isotypkontrolle	γ ₁ /γ ₂	FITC/PE	Anti-Maus IgG _{1/2a}	BD, Heidelberg

2.6.3. Chemikalien

Tabelle 12: Chemikalien, FACS

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Merck, Darmstadt

Aqua destillata	Delta Select, Dreieich
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt

2.6.4. Durchführung

Vor der Lymphozytentypisierung wurde ein Automaten Blutbild am Hämatologieautomaten XE-2100 (Sysmex, Japan) bestimmt. Die ermittelten Werte für Leukozyten, Lymphozyten dienten als Grundlage für die Bestimmung der Absolutwerte der Subpopulationen.

Die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut wurde mittels FACScan (Durchflusszytometrie) untersucht. Dabei wurde EDTA-Blut (50 µl pro Röhrchen) mit FITC und PE markierten Antikörpern, die gegen verschiedene Oberflächen-Antigene gerichtet sind (25 µl Antikörpermischung pro Röhrchen), 10 Minuten bei Zimmertemperatur im Dunklen inkubiert; danach wurden die Erythrozyten mit 3 ml Lysingpuffer (8,29 g Ammoniumchlorid (NH₄Cl), 1,02 g Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO₃), 29,2 g EDTA pro 1L Aqua dest.) pro Röhrchen lysiert und die Zellen mit 3 ml Phosphatpufferlösung (0,2 g Natriumazid (NaN₃), 0,037 g EDTA pro 1L PBS) pro Röhrchen gewaschen (1800 U/min, 5 min, mit Bremse). Anschließend wurde die Expression der Antigene auf den Lymphozyten im Durchflusszytometer mit der Software Cell-Quest (Becton Dickinson) gemessen und ausgewertet.

Folgende monoklonale Maus-anti-Human Antikörperkombinationen wurden verwendet (BD Biosciences Clontech, Deutschland, Heidelberg)

Tabelle 13: Antikörpermischungen, FACS

Nr.	FITC	Menge (µl) Verdünnung	PE	Menge (µl) Verdünnung	PerCP	Menge (µl) Verdünnung	PBS Acid, µl
1	CD3	100, 1µg/µl	CD14	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
2	Isotyp kontrolle IgG1	100, 1µg/µl	Anti-Maus IgG2a	100, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	800
3	CD3	100, 1µg/µl	CD19	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
4	CD3	150, 1µg/µl	CD16 CD56	75, 1µg/µl 75, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	600
5	CD3	100, 1µg/µl	CD4	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
6	CD3	100, 1µg/µl	CD8	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
7	CD4	100, 1µg/µl	CD25	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750

8	CD8	100, 1µg/µl	HLA-DR	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
9	CD4	100, 1µg/µl	CD62L	50, 1µg/µl	CD45	100, 1µg/µl	750
10	CD45RA	100, 1µg/µl	CD45RO	100, 1µg/µl	CD4	100, 1µg/µl	700

Die Zellen werden mit Licht der Anregungswellenlänge 488 nm am Durchflusszytometer (FACScan) mit dem Programm CellQuest BD, (USA) gemessen. Mit Fluoreszenz 1 (515–545 nm) wurden FITC- markierte und mit Fluoreszenz 2 (550 bis 600 nm) PE markierte Oberflächenstrukturen gemessen. Mit Hilfe der Isotypkontrolle wurde die Grenze für eine positive Expression der jeweiligen Oberflächenmarker festgelegt, 95% der Zellen waren negativ. Die Lymphozyten wurden Scattergramm Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht eingegrenzt (gated).

Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurde überprüft, ob die CD3+ Lymphozytenpopulation der Summe von CD4+ und CD8+ Lymphozyten entspricht, ob die Summe von CD3+ Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen der Gesamtlymphozytenzahl (100 %) entspricht und ob Messungen von Subpopulationen in den verschiedenen Ansätzen (Antikörpermischungen) vergleichbare Ergebnisse erbringen.

2.7. Zytokinbestimmung im Überstand nach in vitro Stimulation des Vollbluts

Die Zytokinkonzentrationen wurden mittels CBA (Cytometric Bead Array) Assay im Überstand nach in vitro Stimulation des Vollbluts bestimmt. Hierfür wurde heparinisiertes Vollblut 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit entsprechenden Stimulanzen inkubiert. Für die Stimulation von IL-10- und TNF- α wurden 50 μ l Heparinblut mit 500 μ l LPS (100ng/ml, Sigma, Steinheim) inkubiert, für eine IL-2-, IL-4- und IFN γ -Stimulation wurden 200 μ l Heparinblut mit 100 μ l Con A (100 μ g/ml Concanavalin A, Pharmacia Biotech) in AIM-V inkubiert. Durch Zentrifugation (1000 g, 10 min bei RT, mit Bremse) wurde im Anschluss der Überstand mit den darin enthaltenen sezernierten Zytokinen gewonnen, und bei -80 °C bis zur Messung der Zytokinkonzentrationen gelagert.

Die Messung wurde mittels Cytometric Bead Array Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Biosciences, Heidelberg) nach der vom Hersteller angegebenen Methode (BD) im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg) mit Cell-Quest Software durchgeführt. Die Auswertung wurde ebenso mittels Cell-Quest Software durchgeführt.

2.8. Statistische Analyse

Die statistische Analyse des Patienten- und Transplantatüberlebens wurde mittels Kaplan-Meier-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Für den Vergleich der Werte zwischen den Altersgruppen wurde je nach Verteilungstyp der erhaltenen Beobachtungswerte der t-Test (parametrische Werte) oder Mann-Whitney-Test (nicht parametrische Werte) verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ akzeptiert. Beim Vergleich der klinischen Parameter kam der exakte Test nach Fisher zur Anwendung. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS durchgeführt. Alle Ergebnisse sind im Folgenden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Demographische und klinische Daten, die beide Patientengruppen vor der Transplantation charakterisieren, sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Demographische und klinische Daten

	alt (>65 Jahre, ESP)	jung (<65 Jahre, Normalkollektiv)	p
	Gruppe 1	Gruppe 2	
Anzahl der Patienten	26	74	
Geschlecht des Empfängers (m/w)	15/11 (57,7%/42,3%)	45/29 (60,8%/39,2%)	n.s.
Empfängeralter	67,94±2,5	45,64±11,26	<0,0001
Spenderalter	69,27±8,46	49,72±10,15	<0,0001
HLA-mismatch	3,96±1,84	2,64±1,43	0,0003
PRA >25% (n)	0 (0,0%)	4 (5,4%)	n.s.
Kalte Ischämiezeit (Stunden)	8,64±3,22	9,67±5,49	n.s.
Mehrfachtransplantationen	4 (15,4%)	13 (17,6%)	n.s.
Postmortale Spende	24 (92,3%)	54 (73,0%)	n.s.
Lebendspende	2 (7,7%)	20 (27,0%)	n.s.

n.s.–nicht signifikant

Entsprechend der Gruppenbildung und der Fragestellung war sowohl das Empfänger- als auch das Spenderalter in der Gruppe „alt“ signifikant höher (67,94±2,5 und 69,27±8,46 Jahre) als in der Gruppe „jung“ (vs. 45,64±11,26 und 49,72±10,15; beide p<0,0001).

Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Geschlechts des Empfängers, der kalten Ischämiezeit, der Anzahl der Mehrfachtransplantationen und der Inzidenz präformierter Antikörper gegen HLA (Human Leukocyte Antigen) zwischen den beiden Gruppen.

Das HLA-Mismatch (A, B, DR) lag im ESP deutlich höher (3,96±1,84 vs. 2,64±1,43; p=0,0003). Patienten in der Gruppe <65 Jahre erhielten häufiger ein Organ von Lebendspendern als Patienten des ESP (27,0% vs. 7,7%; n.s.).

3.1.1. Immunsuppressive Therapie

Die initiale Immunsuppression war in beiden Gruppen zum größten Teil vergleichbar:

Die meisten Patienten erhielten eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden, Calcineurininhibitoren (CNI), Mycophenolatemofetil (MMF) und anti-IL-2-Rezeptor Antikörpern (anti-IL-2R Ab) zur Induktion (Tabelle 15).

29 Patienten der Gruppe 1 (ESP) und 20 Patienten der Gruppe 2 (Normalkollektiv) erhielten eine immunsuppressive Therapie mit anti-IL-2-Rezeptor-Antikörpern (Basiliximab n=33, Daclizumab n=16), Calcineurininhibitoren (Tacrolimus n=32, Cyclosporin A n=17), MMF und Steroiden (Methylprednisolon).

7 Patienten in der jüngeren Gruppe und 3 Patienten in der älteren Gruppe bekamen Basiliximab zur Induktion, sowie Tacrolimus und Methylprednisolon.

8 Transplantatempfänger <65 Jahre und 1 Transplantatempfänger >65 Jahre wurden mit Calcineurininhibitoren (Tacrolimus n=7, Cyclosporin A n=2), MMF und Methylprednisolon therapiert.

2 Patienten der Gruppe 1 und 2 Patienten der Gruppe 2 erhielten Daclizumab, MMF, Methylprednisolon und Sirolimus (Rapamune).

9 Transplantatempfänger der älteren Gruppe bekamen Tacrolimus, Leflunomid (FK 778) und Methylprednisolon. Nach 3 Monaten wurde die FK 778-Therapie durch eine MMF-Therapie ersetzt.

7 der jüngeren Patienten wurden mit einer Kombination aus anti-CD52 Antikörper (CAMPATH), Tacrolimus und Methylprednisolon therapiert.

3 jüngere Transplantatempfänger erhielten FTY, Cyclosporin A und Methylprednisolon.

7 Patienten der Gruppe 2 waren durch vorangegangene Transplantationen presensibilisiert mit nachgewiesenen HLA-Antikörpern und erhielten daher als Induktionstherapie OKT-3, den anti-TNF Antikörper Infliximab sowie eine Plasmapherese.

1 junge Patientin bekam Basiliximab, Azathioprin, MMF und Methylprednisolon.

Tabelle 15: Immunsuppressive Protokolle

Protokoll	alt	jung
Steroid+CNI+MMF+anti-IL-2R Ab	20	29
Steroid+CNI+anti-IL-2R Ab	3	7
Steroid+CNI+MMF	1	8
Steroid+Sirolimus+MMF+anti-IL-2R Ab	2	2
Steroid+CNI+FK778	0	9
Steroid+CNI+CAMPATH	0	7
Steroid+CNI+FTY720	0	3

Diagnose akuter Rejektion

Die Diagnose einer akuten Rejektion basierte auf klinischen (Oligo-, Anurie) und Laborparametern (Kreatinin). Sie wurde durch histologische Evaluation von Transplantatbiopsien bestätigt. Der Grad der akuten Abstoßung wurde anhand histopathologischer Klassifikation (Banff) für Nierentransplantatrejektionen diagnostiziert. Borderline Rejektionen wurden ebenfalls als Rejektionen bewertet (46).

Rejektionstherapie

Bei klinischem Rejektionsverdacht wurde eine Biopsie durchgeführt. Bioptisch gesicherte Rejektionen (Banff Klassifikation) wurden folgendermaßen therapiert: als Standardtherapie wurde eine Urbason® Stoßtherapie mit 250-500 mg Methylprednisolon an 3 bis 5 aufeinander folgenden Tagen abhängig vom Rejektionsgrad durchgeführt. Bei steroidresistenter Rejektion folgte eine 5-tägige Behandlung mit OKT3 (5 mg pro Tag).

Die klinischen Daten, die beide Patientengruppen nach der Transplantation charakterisieren, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 16: Klinische Daten

	alt (n=26)	jung (n=74)	p
Patientenüberleben (6 Monate), %	100 (26/26)	98,7 (73/74)	n.s.
Transplantatüberleben (6 Monate), %	88,5	93,2	n.s.
Serum Kreatinin 6 Monate post Tx, mg/dl	1,59±0,50	1,62±0,56	n.s.
Rejektionsrate (6 Monate), %	50,0 (13/26)	44,6 (33/74)	n.s.
Primäre Nichtfunktion, %	7,7 (2/26)	1,4 (1/74)	n.s.
Verzögerte Transplantatfunktion, %	26,9 (7/26)	28,4 (21/74)	n.s.

Das Patientenüberleben nach 6 Monaten bei Empfängern des ESP betrug 100 % vs. 98,7% bei Patienten <65 Jahre (n.s.; Abb. 1). Ursache für den Tod des einen Patienten <65 Jahre war eine Sepsis. Das Transplantatüberleben lag bei 88,5% (23/26) in der ESP-Gruppe vs. 93,2 % (69/74) im Normalkollektiv (n.s., Abb. 7). Ursachen für den Transplantatverlust in der ESP-Gruppe waren hyperakute Abstoßung (n=2) und therapieresistente akute Rejektion (n=1), in der Gruppe

jüngerer Transplantatempfänger waren es Thrombose (n=2), vaskuläre Abstoßung (n=1) und therapieresistente akute Rejektion (n=2).

Bei Transplantaten älterer Empfänger trat in 2 Fällen eine primäre Nichtfunktion auf gegenüber einem Fall in der Gruppe jüngerer Patienten (7,7 % vs. 1,4 %; n.s.). In allen Fällen war die Abstoßung humoral bedingt.

Bezüglich der Rejektionsrate (50,0 % vs. 44,6 %, n.s.), der Häufigkeit einer verzögerten Transplantatfunktion (26,9 % vs. 28,4 %, n.s.) und der Transplantatfunktion nach 6 Monaten (Serumkreatinin $1,59 \pm 0,50$ mg/dl vs. $1,62 \pm 0,56$ mg/dl, n.s.) gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Insgesamt waren die Abstoßungsraten in beiden Gruppen auffällig hoch. Eine mögliche Ursache dafür ist der relativ hohe Anteil von Empfängern mit Mehrfachtransplantationen in beiden Gruppen (15,4 % in der Gruppe älterer und 17,6 % in der Gruppe jüngerer Empfänger).

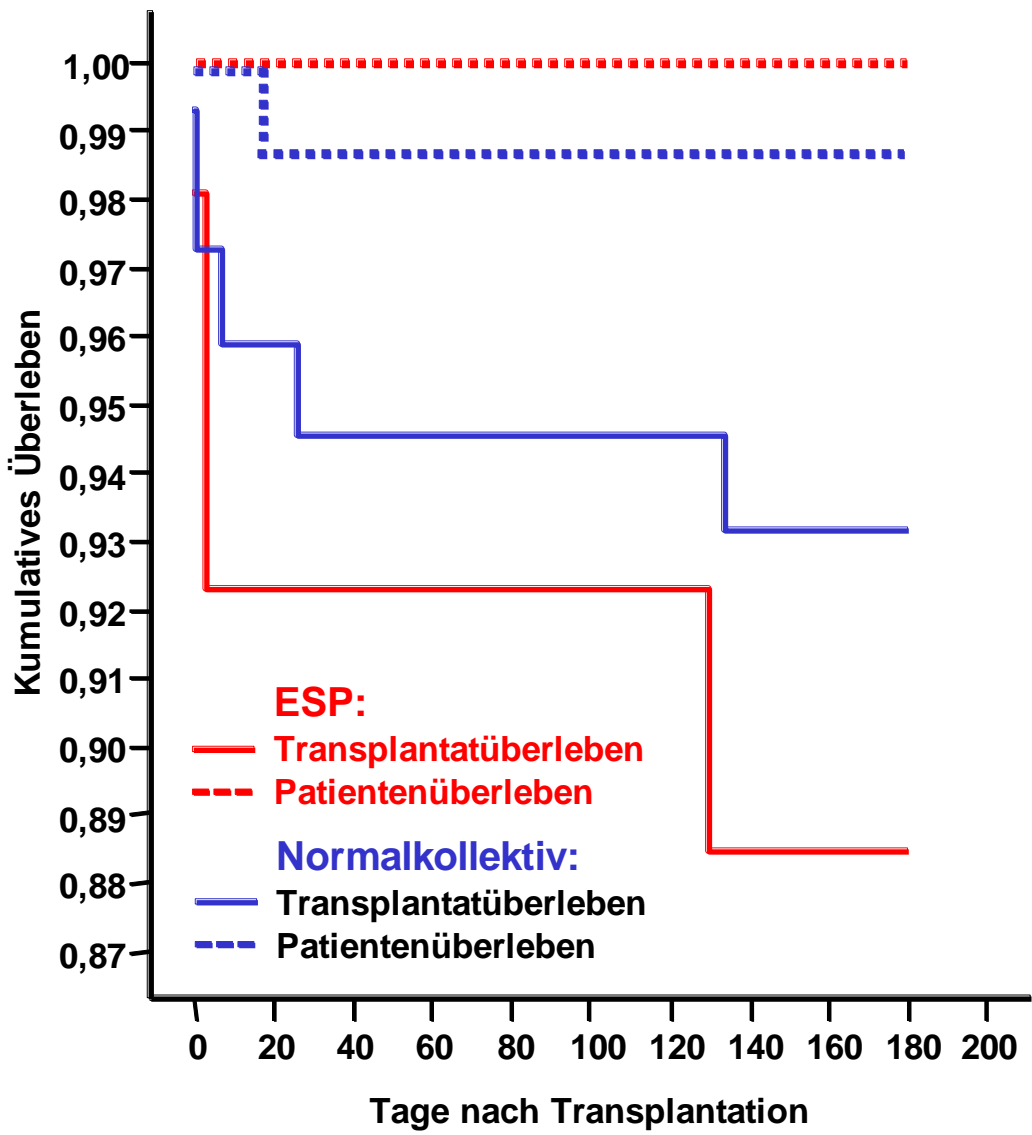


Abb. 7: Transplantat- und Patientenüberleben nach Kaplan-Meier

3.2. T-Zelltypisierung

3.2.1. Präoperativ

Vor der Transplantation zeigten Empfänger >65 Jahre eine signifikant geringere relative Anzahl von B Zellen (CD19+: $8,3 \pm 0,9$ % vs. $10,9 \pm 0,7$ %, $p=0,0423$), T-Helfer -Zellen (CD4+: $39,0 \pm 2,1$ % vs. $44,7 \pm 1,4$ %, $p=0,0365$) und naiven Helfer-Zellen (CD4+CD45RA+: $19,9 \pm 2,3$ % vs. $29,4 \pm 1,5$ %, $p<0,0011$), jedoch eine erhöhte Anzahl von Gedächtnis-Helfer-Zellen (CD4+CD45RO+: $68,7 \pm 3,4$ % vs. $57,5 \pm 1,8$ %, $p=0,0024$), aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CD8+HLA DR+: $25,4 \pm 3,6$ % vs. $16,2 \pm 1,0$ %, $p=0,0191$) und NK-Zellen (CD16+CD56+: $20,8 \pm 1,7$ % vs. $17,7 \pm 1,4$ %, $p=0,05$; Abb. 8 und 9).

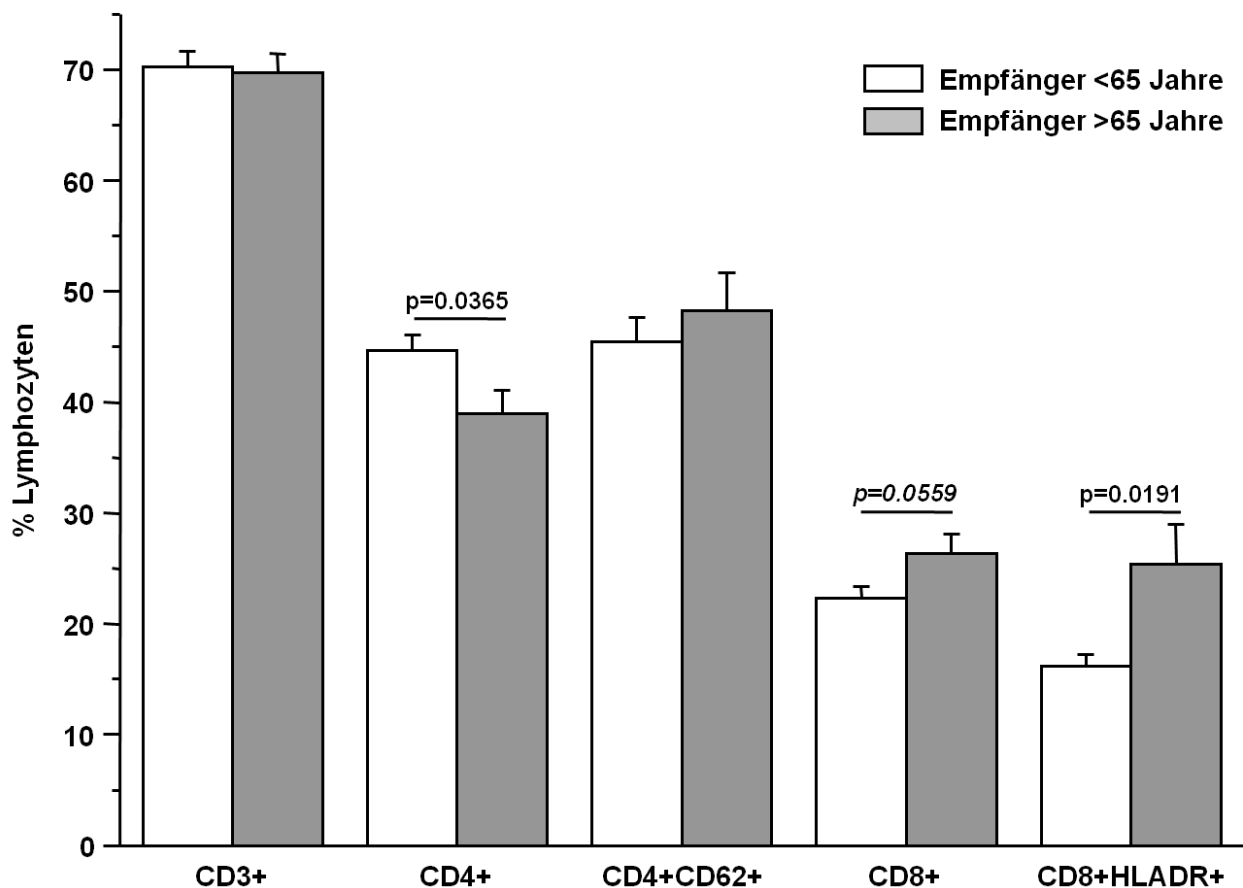


Abb. 8: T-Zelltypisierung Tag 0, Teil 1

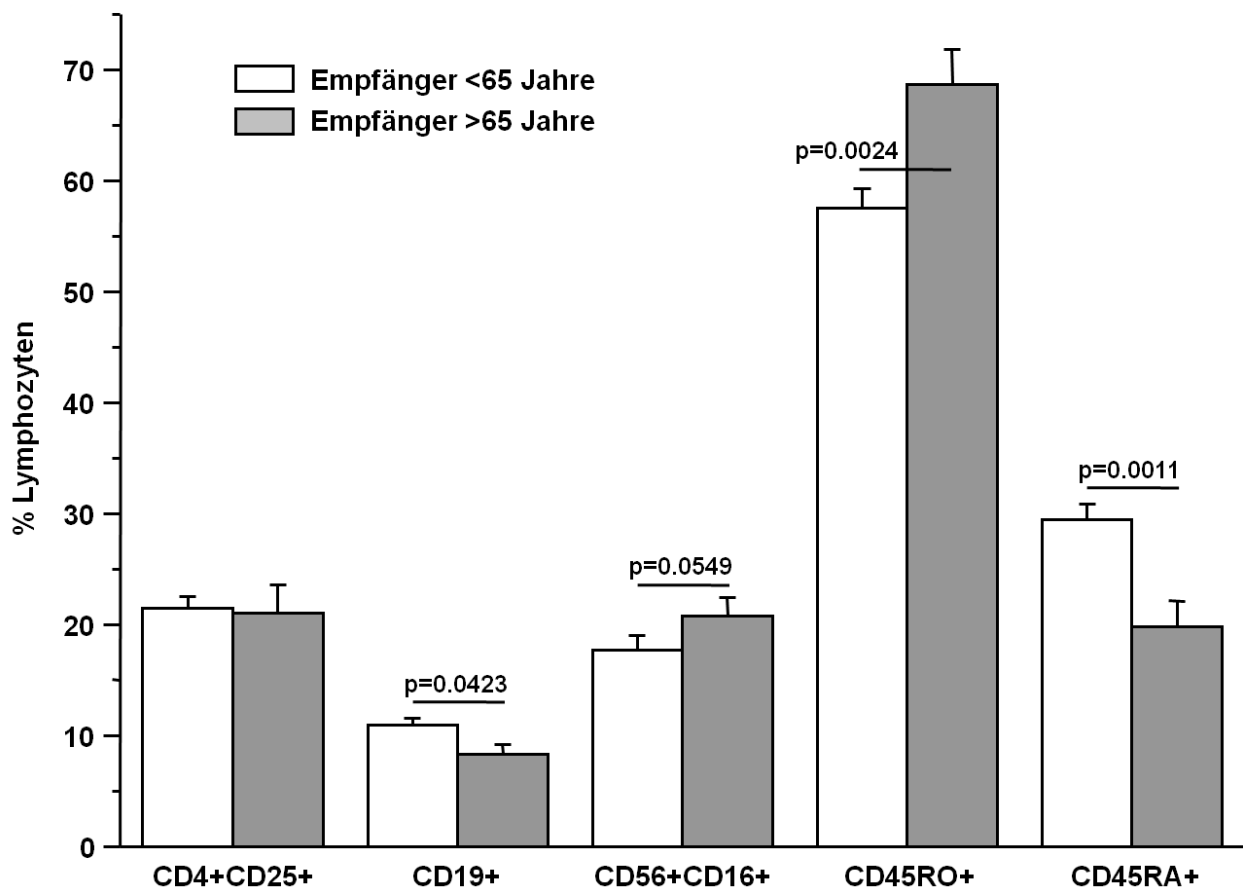


Abb. 9: T-Zelltypisierung Tag 0, Teil 2

3.2.2. Tag 7 postoperativ

I. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Wurden am 7. postoperativen Tag alle Patienten in die Auswertung eingeschlossen, zeigten ältere Transplantatempfänger im Vergleich zu jungen eine signifikant erhöhte Anzahl von Gedächtnis Helfer-Zellen (CD4+CD45RO+: $63,2 \pm 3,5$ vs. $52,3 \pm 2,0$ %, $p=0,0072$) und aktivierten zytotoxischen Zellen (CD8+HLA DR+: $21,2 \pm 2,5$ vs. $13,6 \pm 1,3$ %, $p=0,0042$), während die Anzahl naiver Helfer-Zellen (CD4+CD45RA+: $21,9 \pm 2,3$ vs. $34,2 \pm 1,8$ %; $p=0,0004$) signifikant reduziert war. Die Anzahl aktivierter T-Zellen sank mit steigendem Empfängeralter (CD4+CD25+: $0,1 \pm 0,1$ vs. $12,1 \pm 2,2$ %; $p=0,0044$), was durch die häufigere Anwendung einer anti-IL-2R Induktionstherapie bei älteren Empfängern zu erklären ist (Abb. 10 und 11).

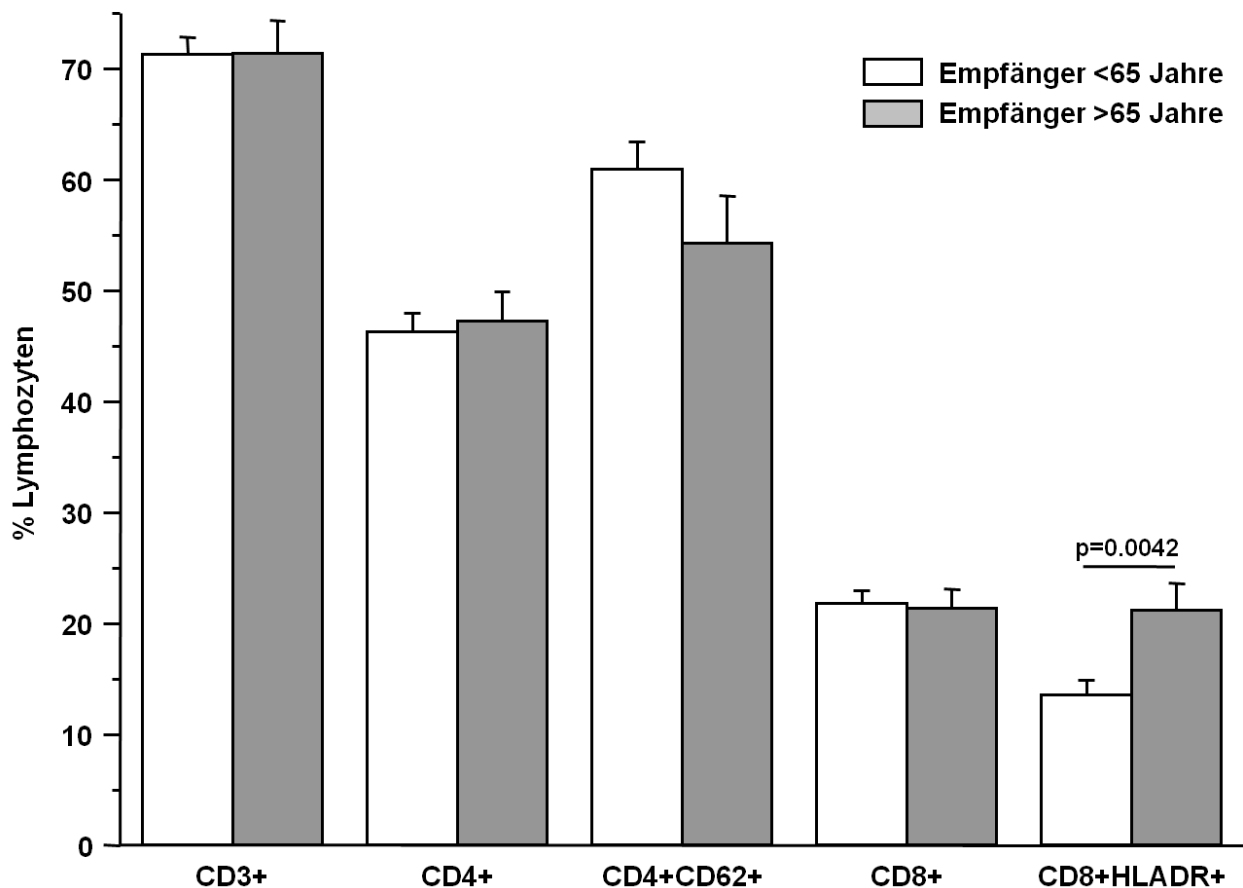


Abb. 10: T-Zelltypisierung Tag 7, alle Patienten, Teil 1

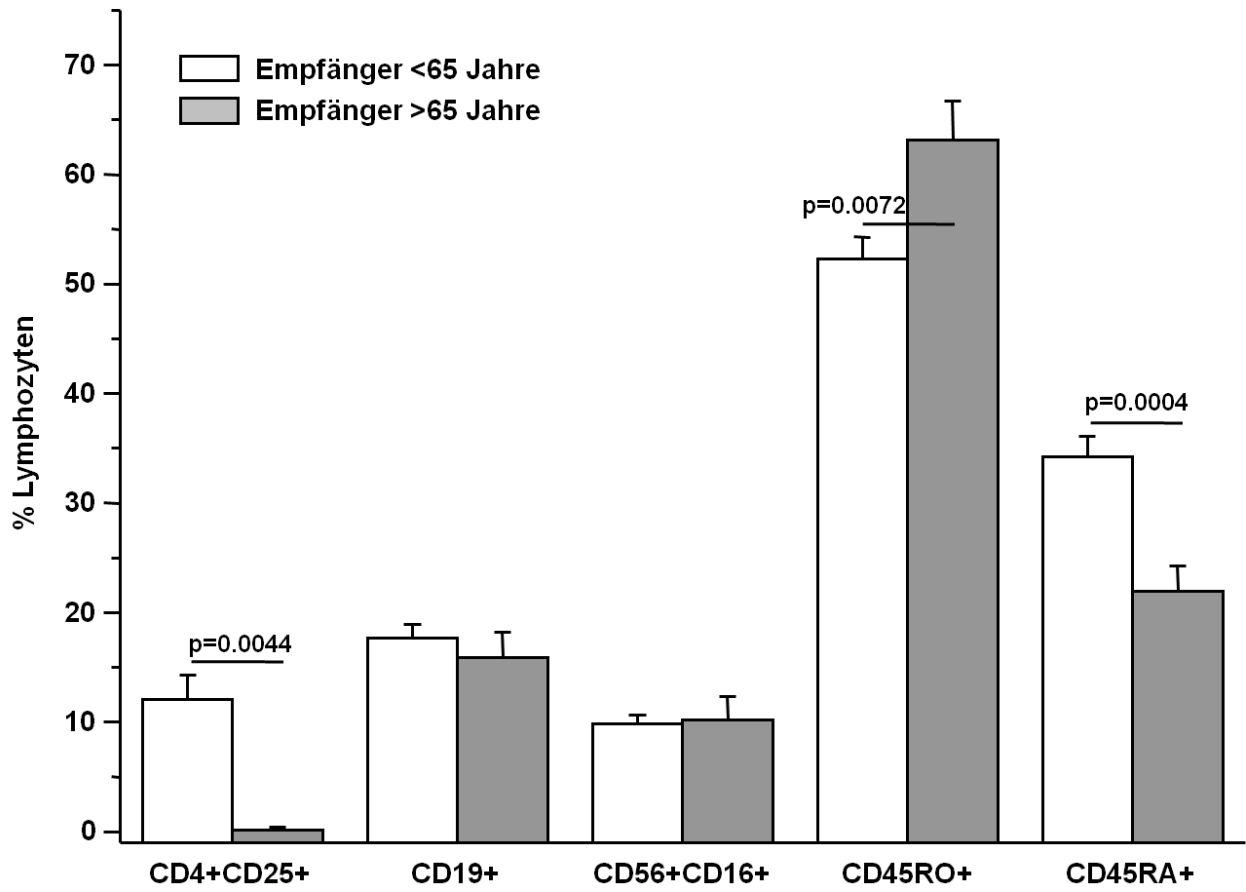


Abb. 11: T-Zelltypisierung Tag 7, alle Patienten, Teil 2

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Wenn nur Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression gegenübergestellt wurden (gesamt: n=68, ESP: n=24, Normalkollektiv: n=44), wiesen alte Transplantatempfänger eine signifikant erhöhte Anzahl von Gedächtnis-Helferzellen (CD4+CD45RO+: 63,2±3,6 vs. 52,3±2,5 %, p=0,0133) und aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CD8+HLA DR+: 21,2±2,4 vs. 12,3±1,3 %, p=0,0008) auf, während die Anzahl naiver Helfer-Zellen (CD4+CD45RA+: 21,9±2,3 vs. 34,4±2,2 %; p=0,0004) signifikant vermindert war (Abb. 12 und 13). Die Anzahl aktivierter T-Helferzellen (CD4+ CD25+) war bei vergleichbarer Immunsuppression nahezu identisch.

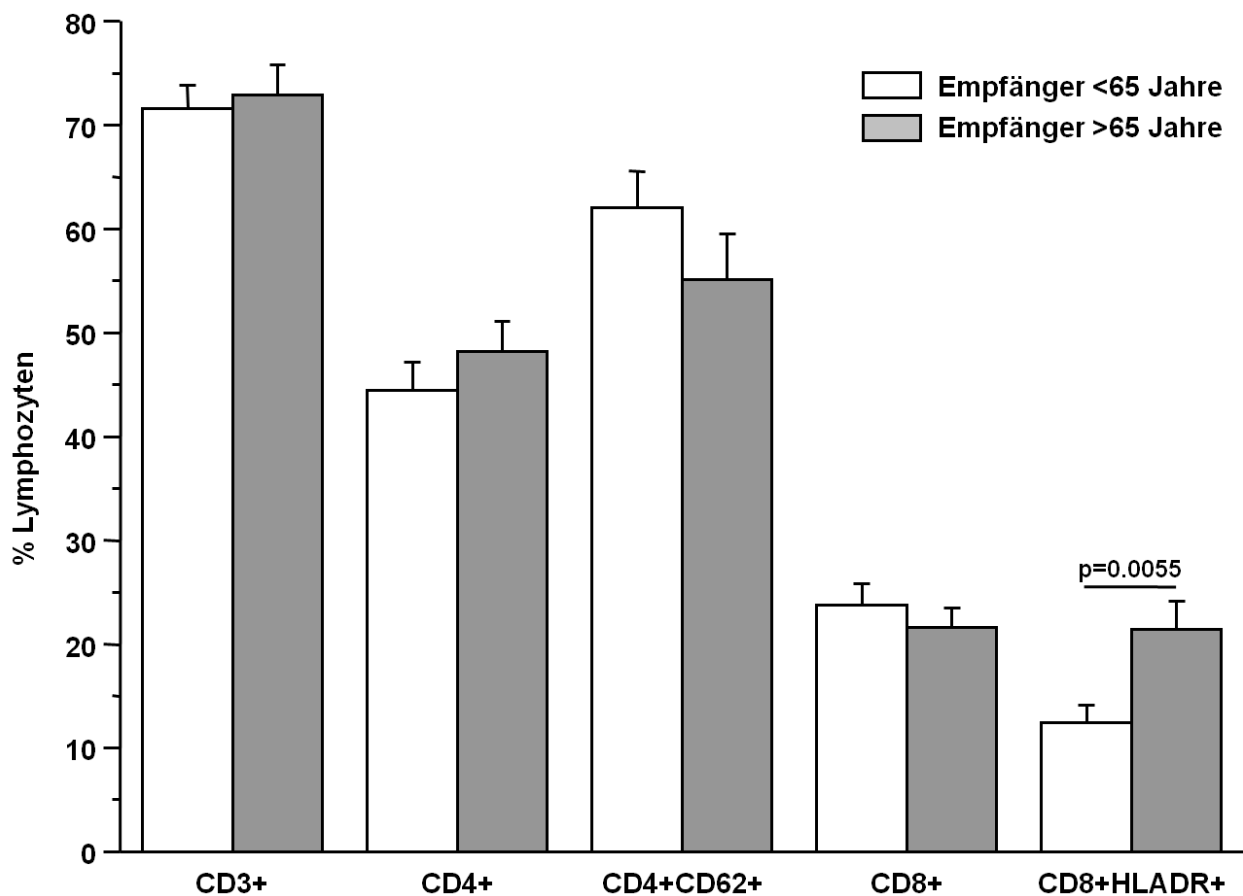


Abb. 12: T-Zelltypisierung Tag 7, vergleichbare Immunsuppression, Teil 1

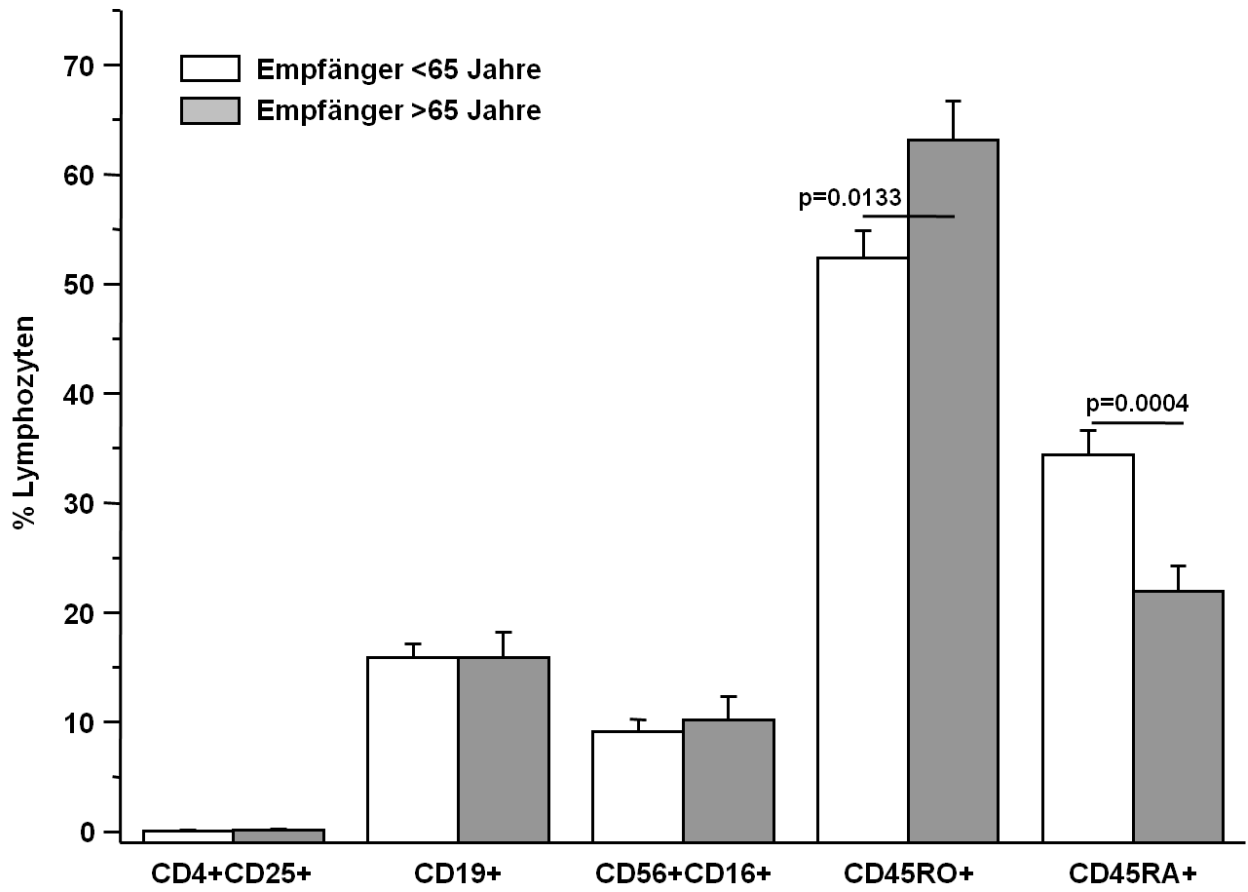


Abb. 13: T-Zelltypisierung Tag 7, vergleichbare Immunsuppression, Teil 2

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

Zugunsten einer verkürzten kalten Ischämiezeit wird bei der Allokation von Transplantaten im ESP nur die Blutgruppenkompatibilität berücksichtigt und auf ein optimales HLA-Match verzichtet. Da die Immunantwort nach der Transplantation allerdings auch durch das HLA-Match beeinflusst werden kann, wurde für ein vergleichbares HLA-Match die Immunantwort in beiden Gruppen nur bei Patienten mit 3 und mehr Mismatches (HLA-A, -B, -DR) und vergleichbarer Immunsuppression (ESP: n=23 und junge Transplantatempfänger: n=40) analysiert.

Am Tag 7 nach der Transplantation war bei älteren Patienten mit 3 und mehr Mismatches im Vergleich zu jüngeren Patienten mit vergleichbarem Mismatch die Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen und Gedächtnis-Helferzellen signifikant erhöht (CD8+HLA DR+: 21,4±2,8 vs. 12,5±1,6 %; p=0,0055, CD4+CD45RO: 63,2±3,3 vs. 51,0±3,2 %; p=0,0117), während die Anzahl naiver Helfer-Zellen signifikant vermindert war (CD4+CD45RA: 22,2±2,4 vs. 34,3±2,8 %; p=0,0023; Abb. 14 und 15).

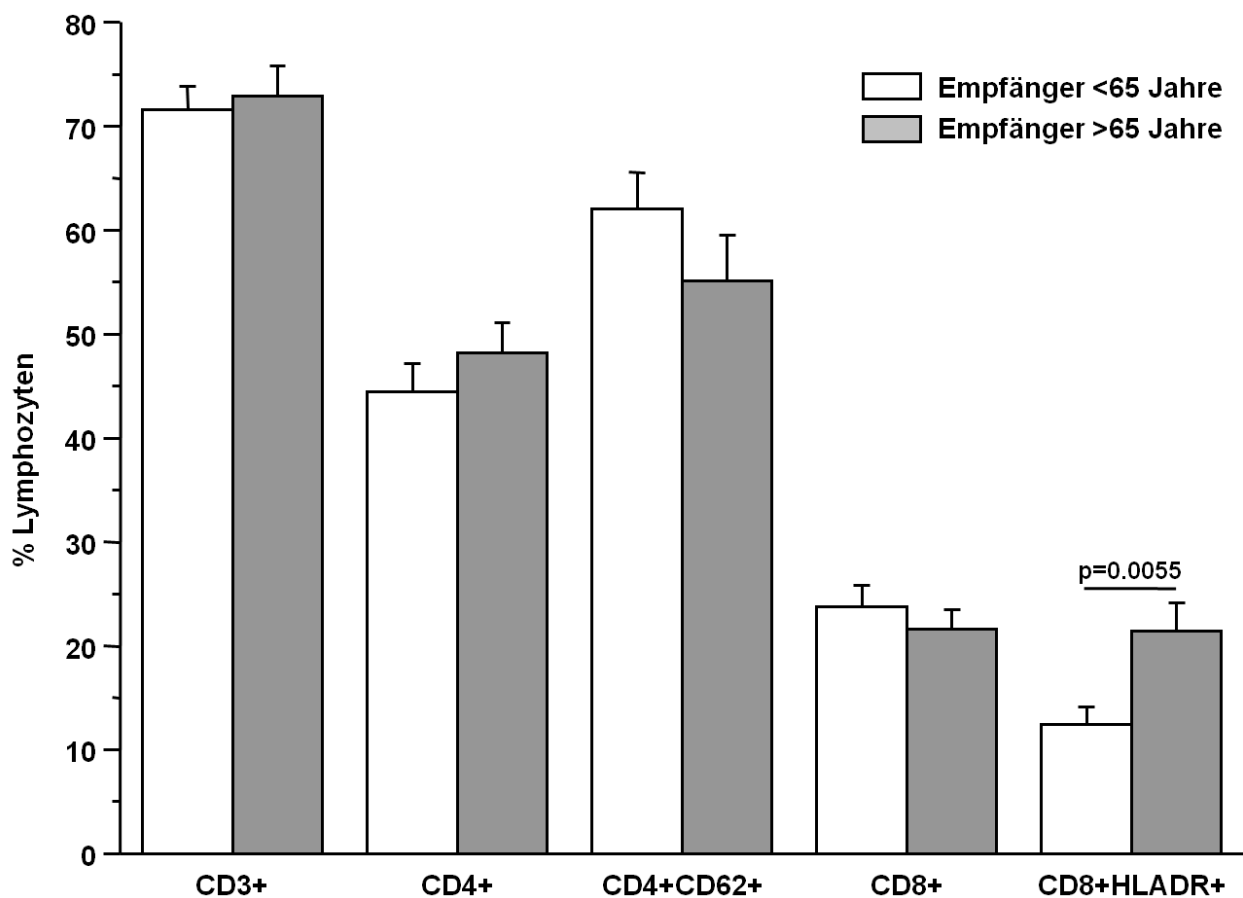


Abb. 14: T-Zelltypisierung Tag 7, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression, Teil 1

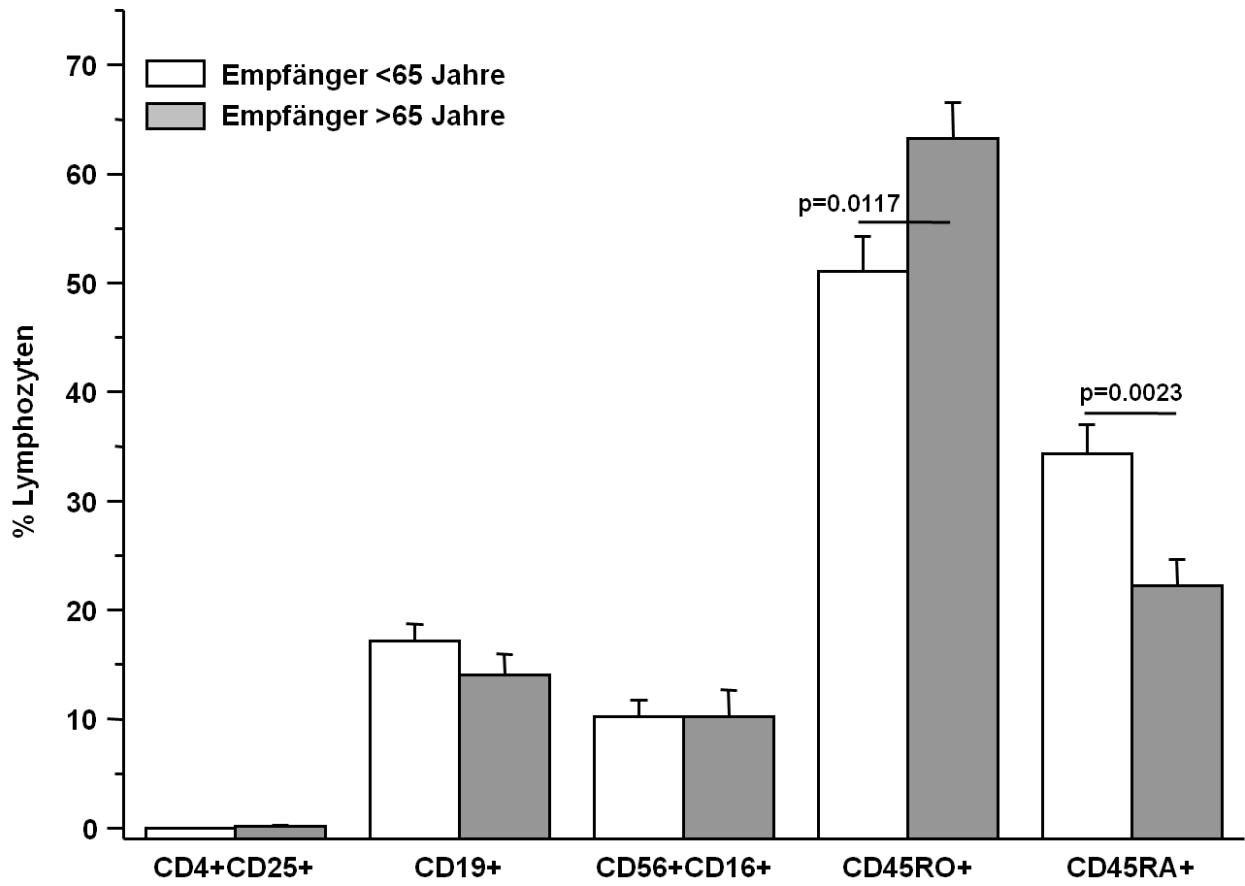


Abb. 15: T-Zelltypisierung Tag 7, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression, Teil 2

3.2.3. 6 Monate postoperativ

I. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Wurden die Daten von allen 100 Patienten verglichen, zeigten 6 Monate nach der Transplantation Patienten >65 Jahre eine höhere Anzahl von Gedächtnis-Helferzellen (CD4+CD45RO+: 67,3±3,3 vs. 59,5±2,1 %, p=0,0541) und eine signifikant reduzierte Anzahl von naiven Helferzellen (CD4+CD45RA+: 20,1±2,3 vs. 28,8±1,6 %; p=0,0059), während die Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen (CD8+HLA DR+) vergleichbar mit denen der jüngeren Transplantatempfänger war (Abb. 16 und 17).

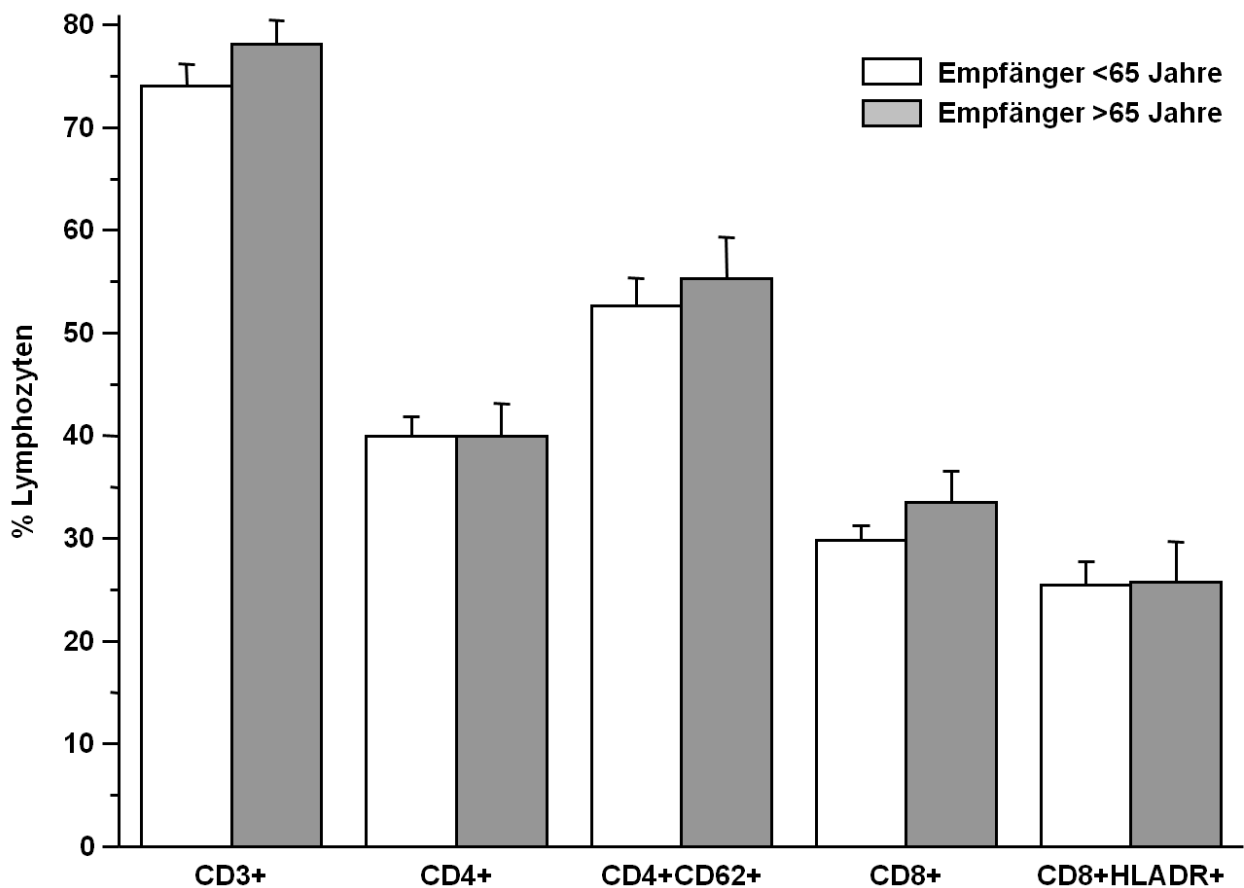


Abb. 16: T-Zelltypisierung 6 Monate, alle Patienten, Teil 1

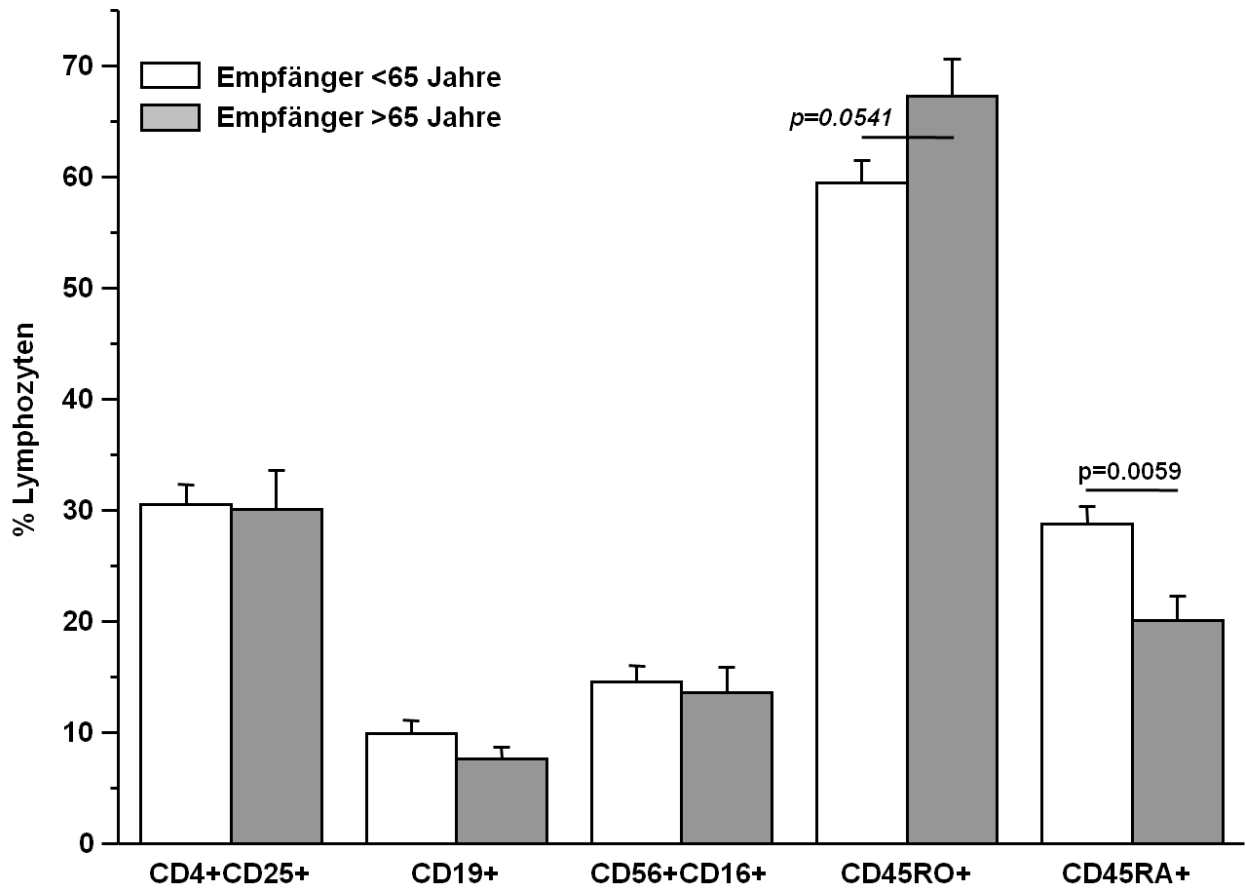


Abb. 17: T-Zelltypisierung 6 Monate, alle Patienten, Teil 2

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Wurden nur Patienten mit gleicher Immunsuppression verglichen, zeigten Patienten >65 Jahre 6 Monate nach der Transplantation eine signifikant höhere Anzahl von Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO+: 67,3±3,3 vs. 57,1±2,4 %, p=0,0156) und signifikant reduzierte Frequenzen naiver T-Zellen (CD45RA+: 20,1±2,3 vs. 30,5±1,9 %; p=0,0010), während die Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen (CD8+HLA DR+) vergleichbar mit denen der jüngeren Transplantatempfänger war (Abb. 18 und 19).

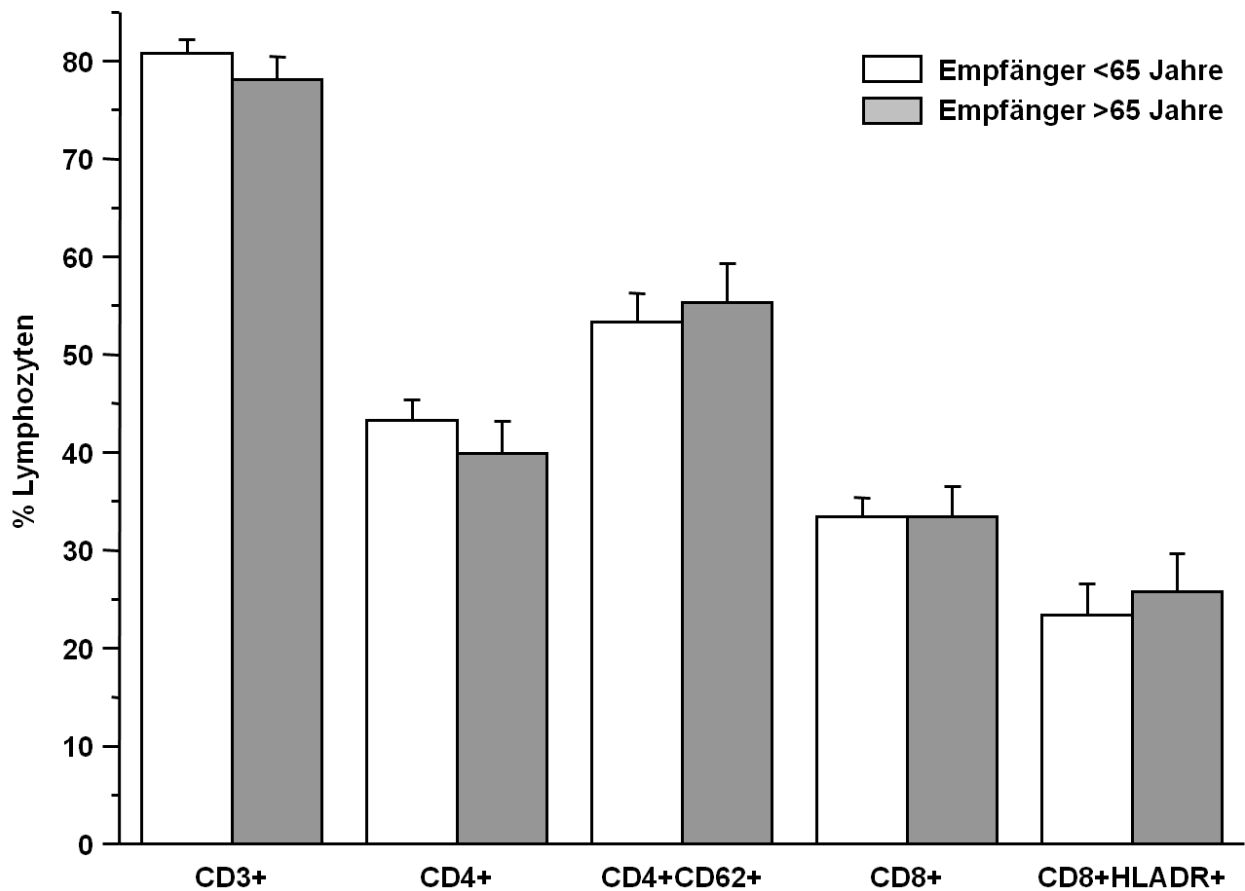


Abb. 18: T-Zelltypisierung 6 Monate, vergleichbare Immunsuppression, Teil 1

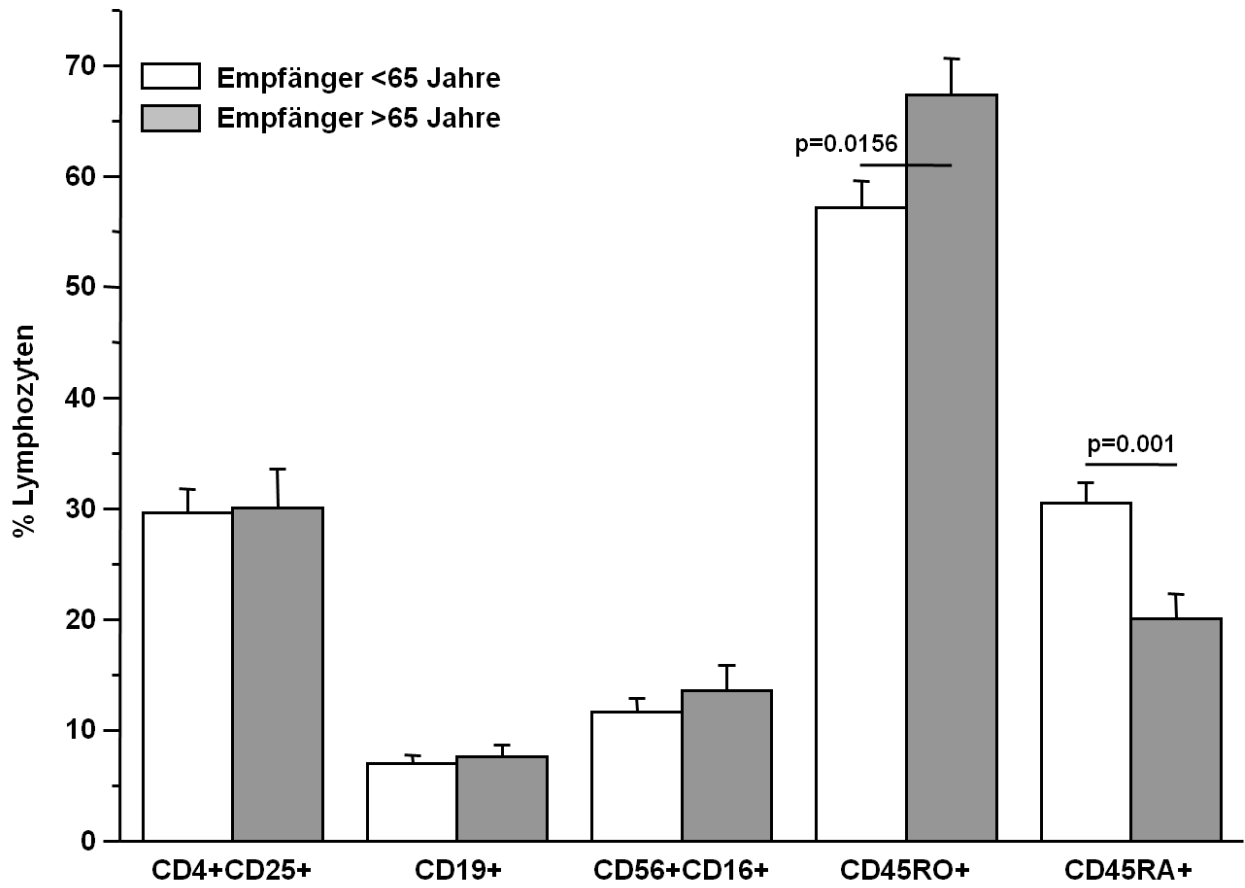


Abb. 19: T-Zelltypisierung 6 Monate, vergleichbare Immunsuppression, Teil 2

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

6 Monate nach der Transplantation waren folgende Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen mit vergleichbarem Mismatch zu beobachten. Bei älteren Nierentransplantatempfängern war der Anteil von Gedächtnis-Helferzellen signifikant höher (CD4+CD45RO: $67,4 \pm 3,3$ vs. $56,5 \pm 3,3$ %; $p=0,0305$) als bei jüngeren Patienten, während der Anteil naiver Helferzellen signifikant vermindert war (CD4+CD45RA: $20,8 \pm 2,3$ vs. $30,4 \pm 2,5$ %; $p=0,0095$; Abb. 20 und 21).

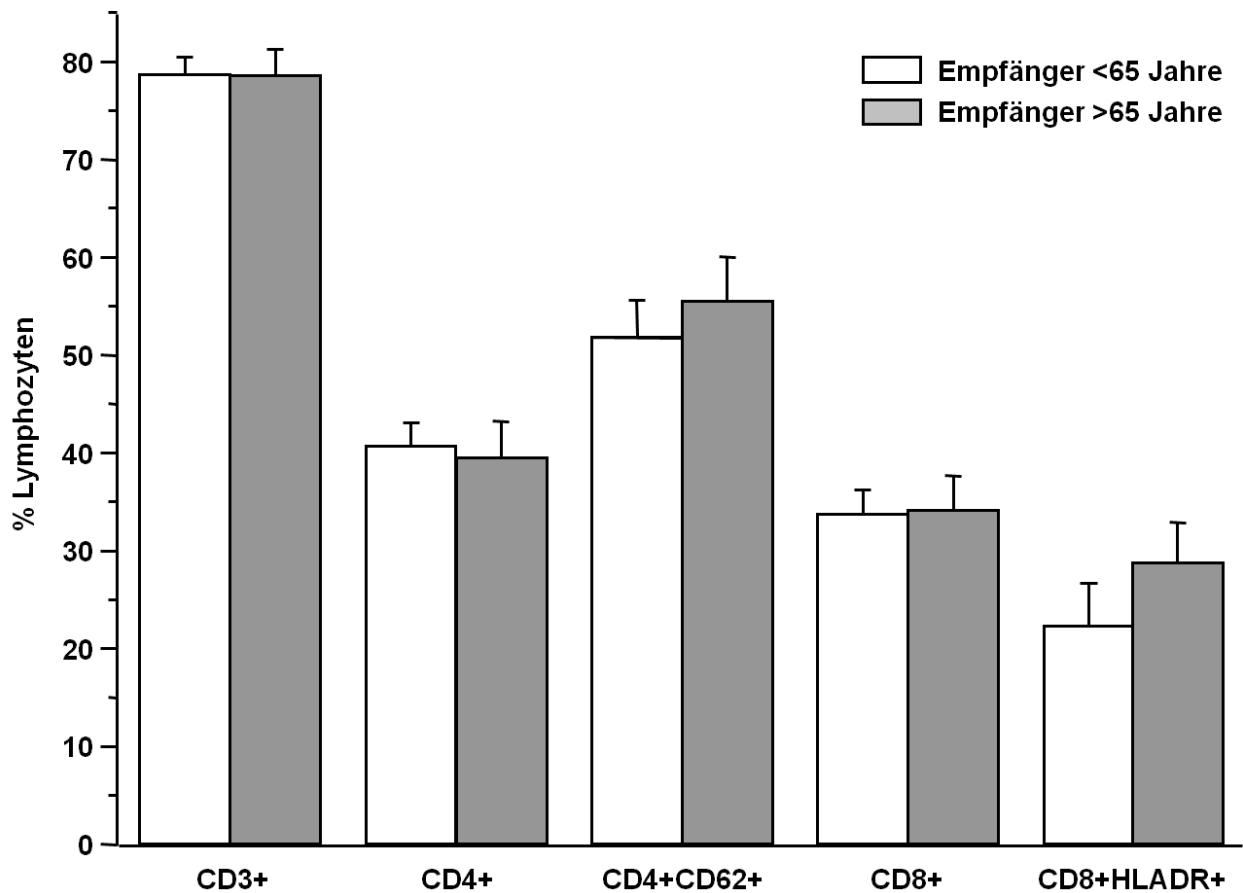


Abb. 20: T-Zelltypisierung 6 Monate, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression, Teil 1

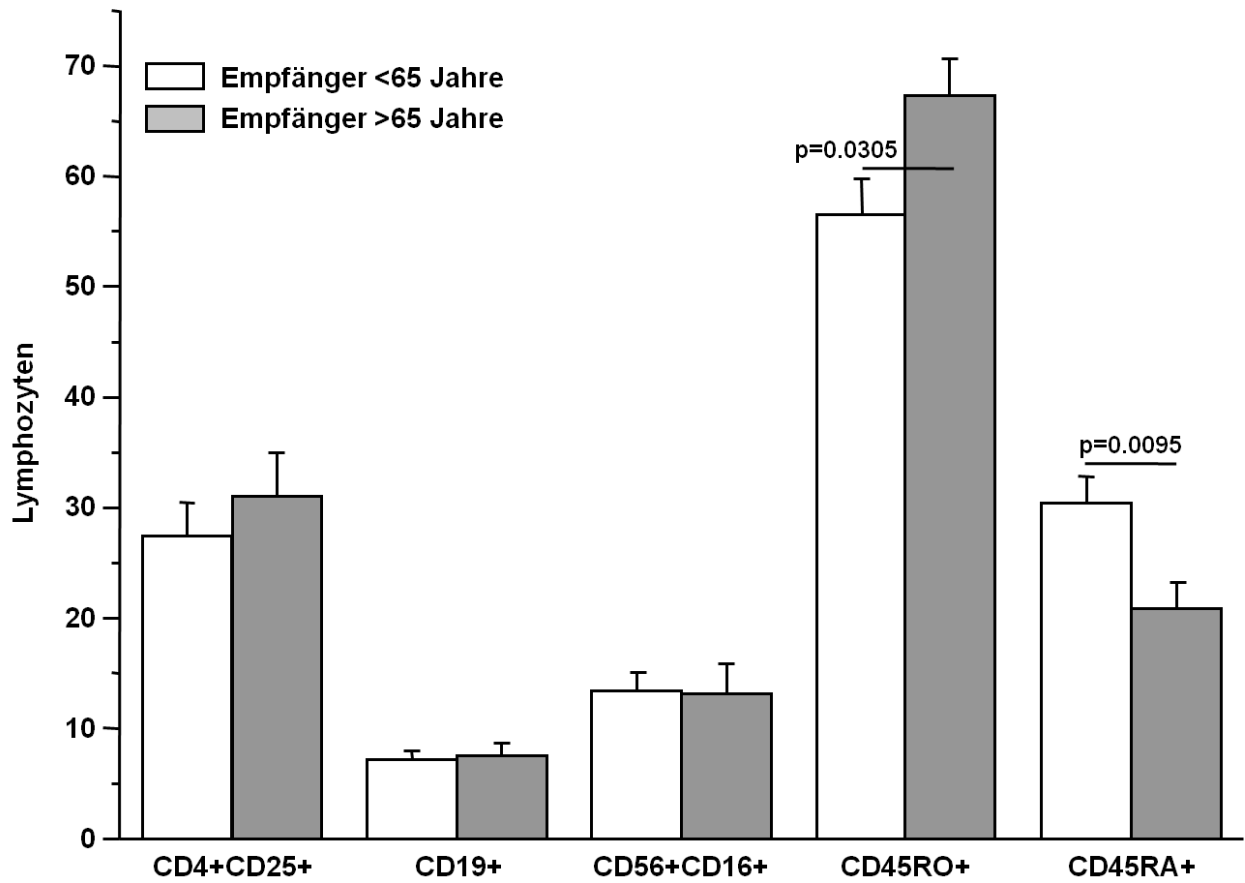


Abb. 21: T-Zelltypisierung 6 Monate, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression, Teil 2

3.3. Frequenz alloreaktiver T- Zellen

3.3.1. Präoperativ

Vor der Transplantation zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Alloreaktivität zwischen den Gruppen (Abb. 22: die linke Grafik zeigt die absolute Anzahl von IFN- γ -produzierenden Zellen (spots) pro well, rechts ist die Anzahl von IFN- γ -produzierenden Zellen umgerechnet auf 10^6 CD3+Zellen dargestellt).

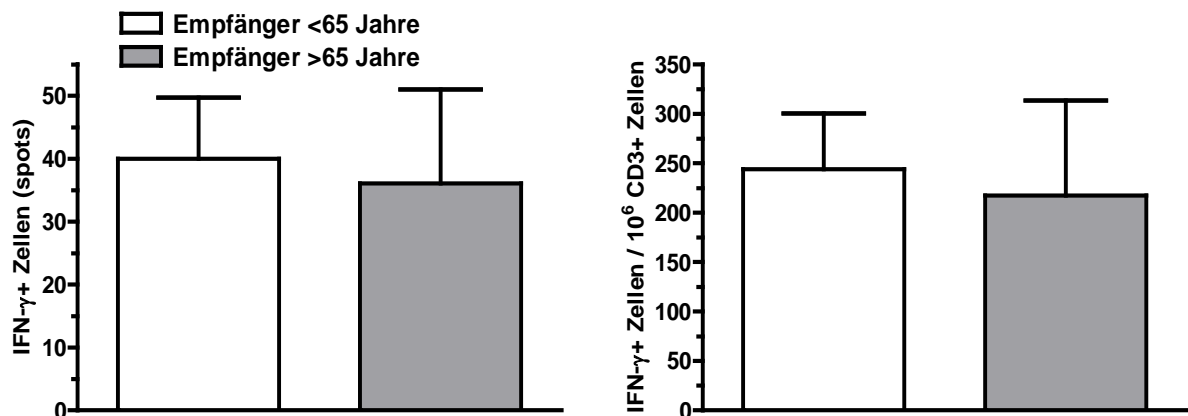


Abb. 22: T-Zell-Alloreaktivität, Tag 0

3.3.2. Tag 7 postoperativ

II. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Wurden alle Patienten unabhängig von der initialen Immunsuppression verglichen, zeigten sich auch an Tag 7 nach der Transplantation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der T-Zell Alloreaktivität zwischen den beiden Gruppen (Abb. 23).

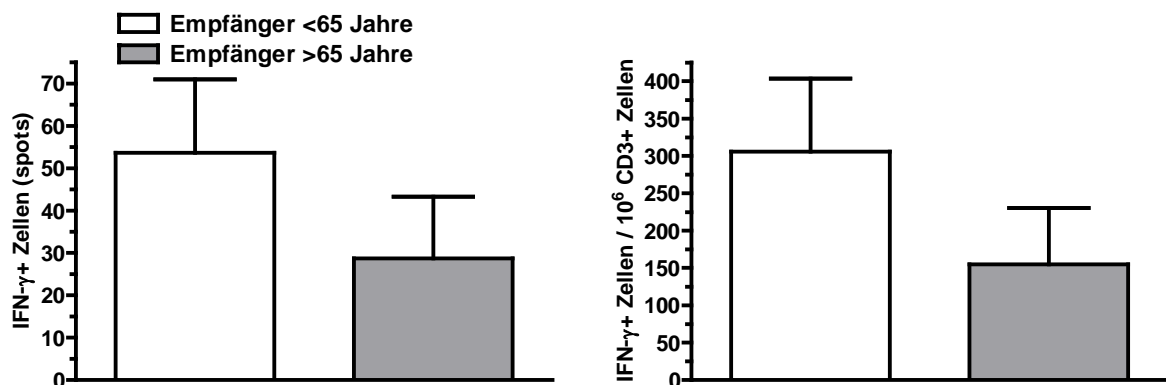


Abb. 23: T-Zell-Alloreaktivität Tag 7, alle Patienten

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Wurden nur Patienten mit ähnlicher initialer Immunsuppression verglichen, so zeigte sich an Tag 7 in älteren Empfängern tendenziell eine stärker ausgeprägte T-Zell-Alloreaktivität im Vergleich zu jüngeren Empfängern, d.h. die Frequenz IFN- γ -produzierender donorreaktiver Zellen war in Patienten über 65 Jahre deutlich höher, das Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Tag 7, IFN- γ + Zellen/ 10^6 CD3+ T-Zellen: 155 ± 76 vs. 77 ± 26 ; Abb. 24).

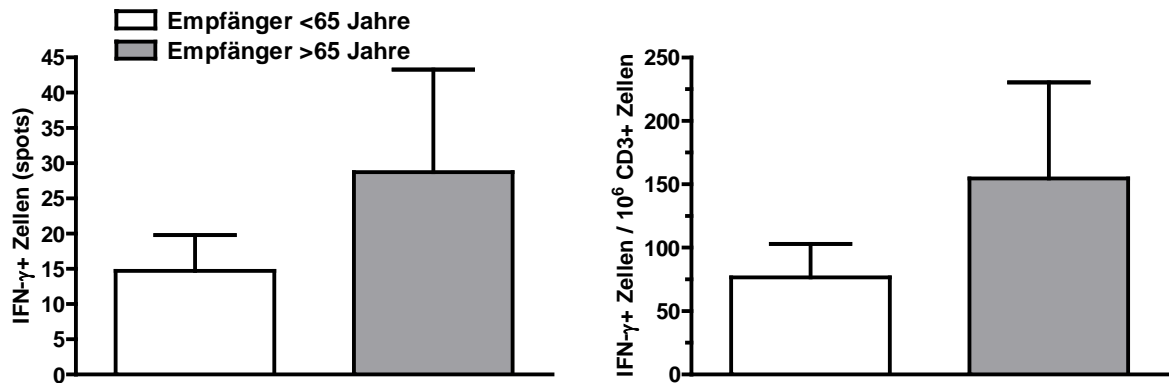


Abb. 24: T-Zell-Alloreaktivität Tag 7, vergleichbare Immunsuppression

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

Auch bei einem vergleichbarem HLA-Mismatch war die Alloreaktivität in älteren Empfängern stärker ausgeprägt, jedoch zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tag 7, IFN- γ + Zellen/ 10^6 CD3+ T-Zellen: 171 ± 83 vs. 74 ± 44 ; Abb. 25).

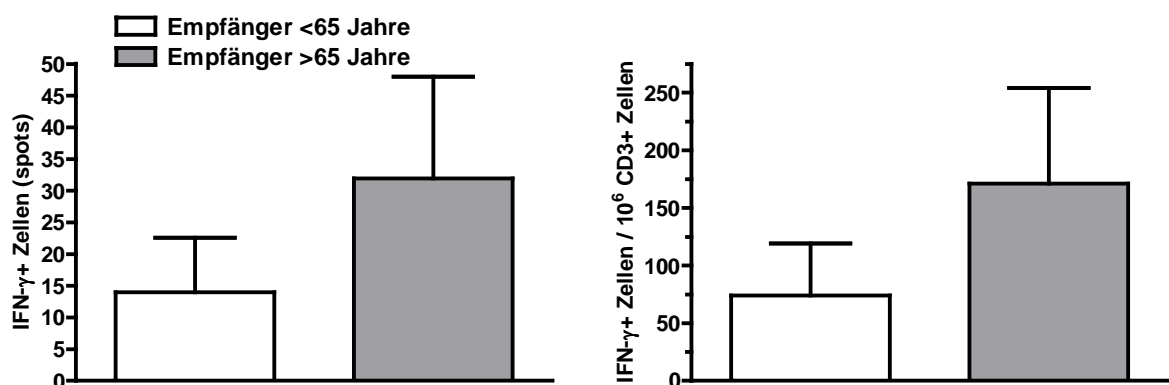


Abb. 25: T-Zell-Alloreaktivität Tag 7, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression

3.3.3. 6 Monate postoperativ

I. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Sechs Monate nach Transplantation waren beim Vergleich aller Patienten unabhängig von der initialen Immunsuppression keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl alloreaktiver Zellen zu erkennen (Abb. 26).

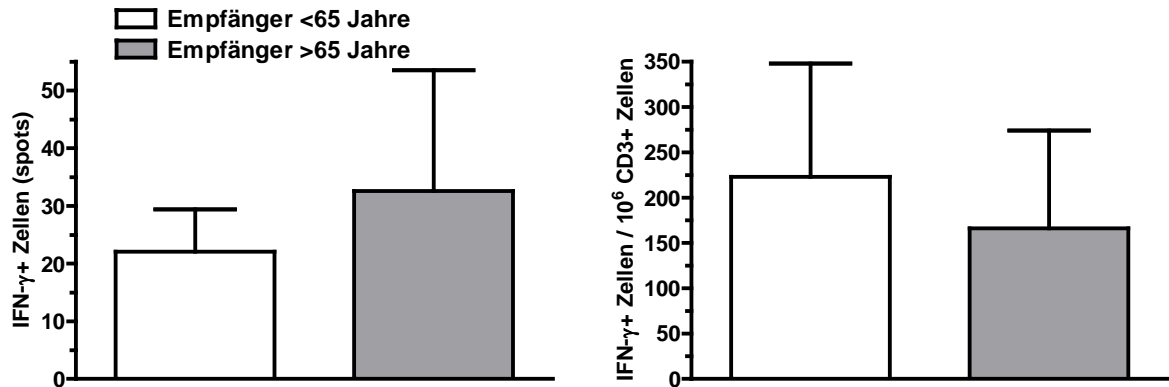


Abb. 26: T-Zell-Alloreaktivität 6 Monate, alle Patienten

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Ebenso wie eine Woche nach Transplantation war auch nach 6 Monaten in älteren Empfängern tendenziell eine stärker ausgeprägte T Zell-Alloreaktivität im Vergleich zu jüngeren Patienten zu erkennen, jedoch blieb auch hier das Ergebnis ohne statistische Signifikanz (6 Monate, IFN- γ + Zellen/ 10^6 CD3+ T-Zellen: 166 ± 108 vs. 88 ± 28 ; Abb.27).

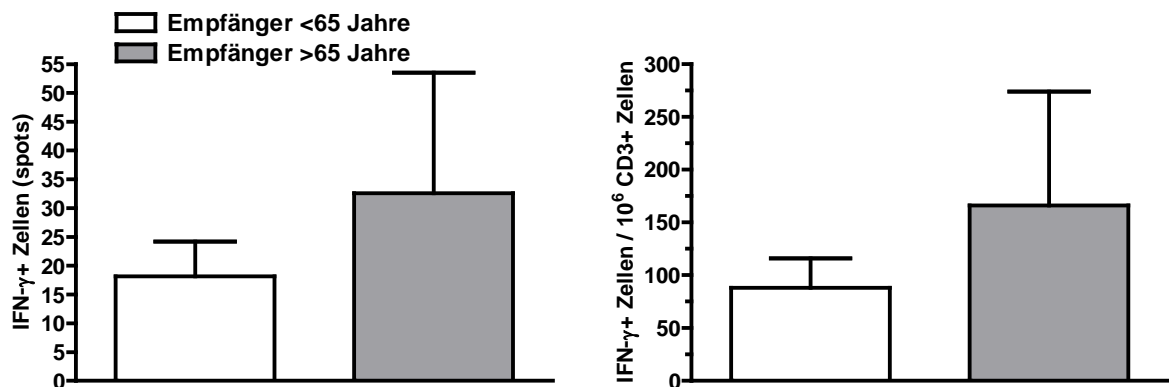


Abb. 27: T-Zell-Alloreaktivität 6 Monate, vergleichbare Immunsuppression

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

Bei vergleichbarer Immunsuppression sowie vergleichbarem HLA-Mismatch war 6 Monate nach Transplantation die Anzahl alloreaktiver Zellen annähernd gleich in beiden Gruppen (Abb. 28).

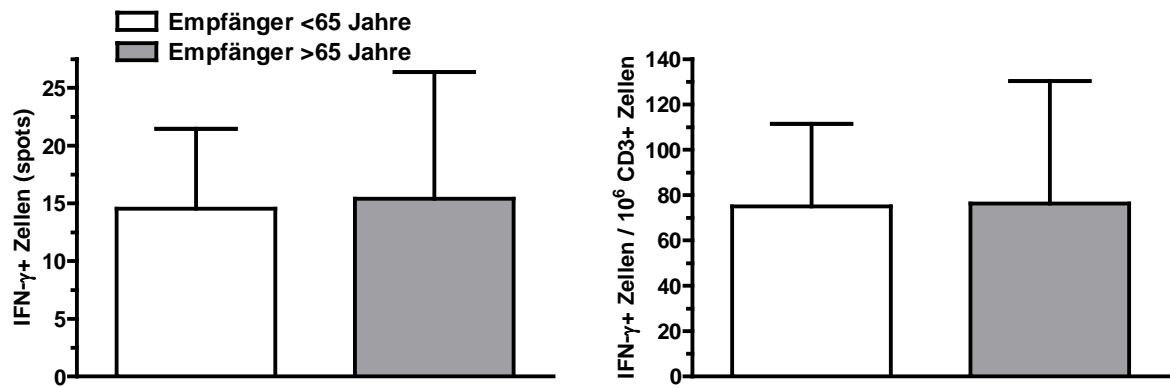


Abb. 28: T-Zell-Alloreaktivität 6 Monate, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression

3.4. Zytokinprofil

3.4.1. Präoperativ

Vor der Transplantation waren bei Einschluss aller Patienten keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion (nach in vitro Stimulation von Empfängervollblut) zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Abb. 29).

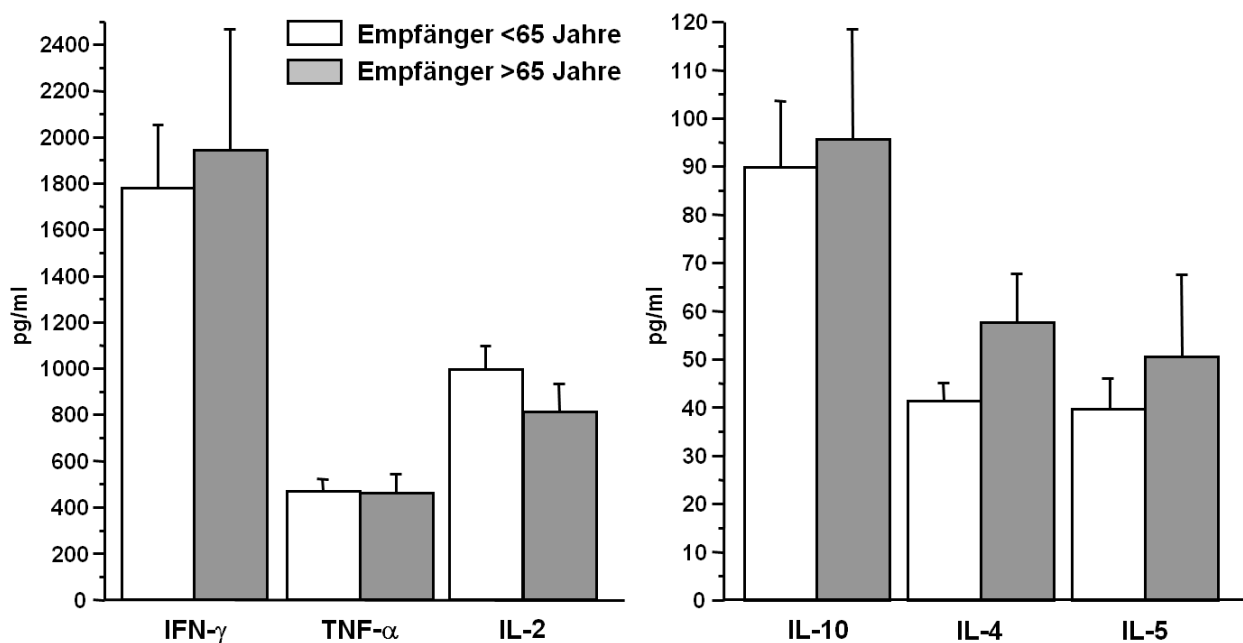


Abb. 29: Zytokine Tag 0

3.4.2. Tag 7 nach der Transplantation

I. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Ließ man den Einfluss der Immunsuppression unbeachtet, waren auch an Tag 7 nach der Transplantation keine Unterschiede in der Zytokinkonzentration zwischen den beiden Gruppen zu beobachten (Abb. 30).

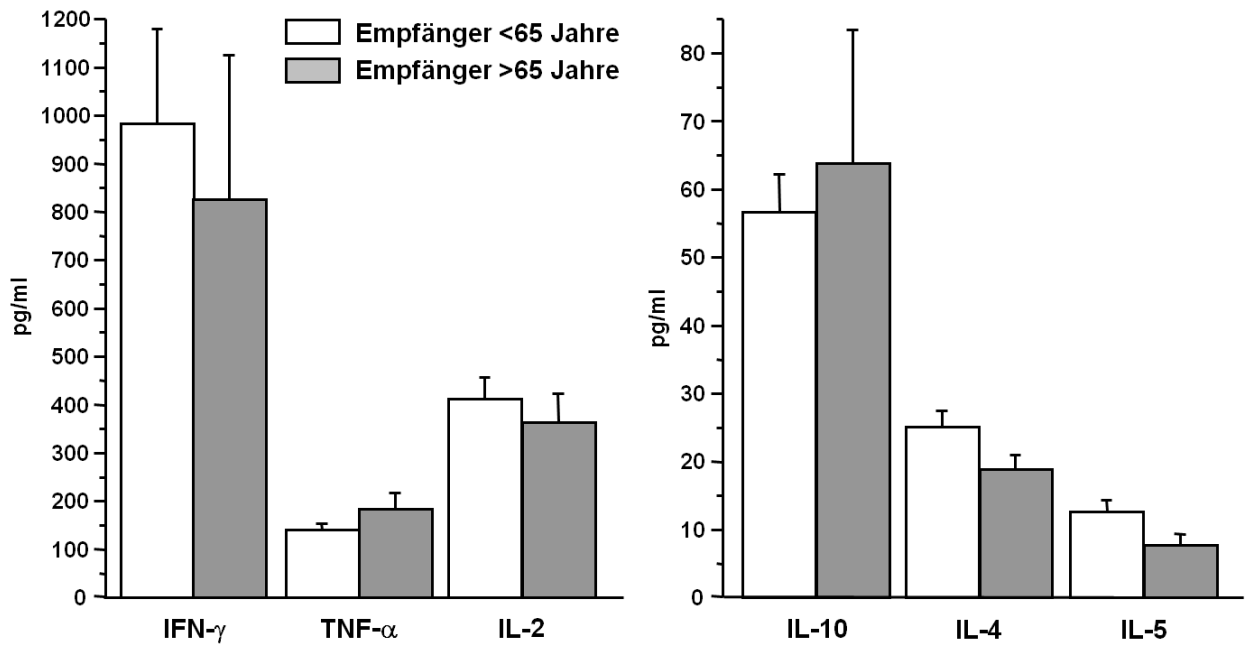


Abb. 30: Zytokine Tag 7, alle Patienten

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Am Tag 7 nach der Transplantation war die TNF- α Konzentration im Blut von Patienten >65 Jahre im Vergleich zu Patienten <65 Jahre mit vergleichbarer initialer Immunsuppression signifikant erhöht (ESP: 184 ± 33 vs. Normalkollektiv: 117 ± 15 pg/ml; $p=0,0324$, Abb. 31).

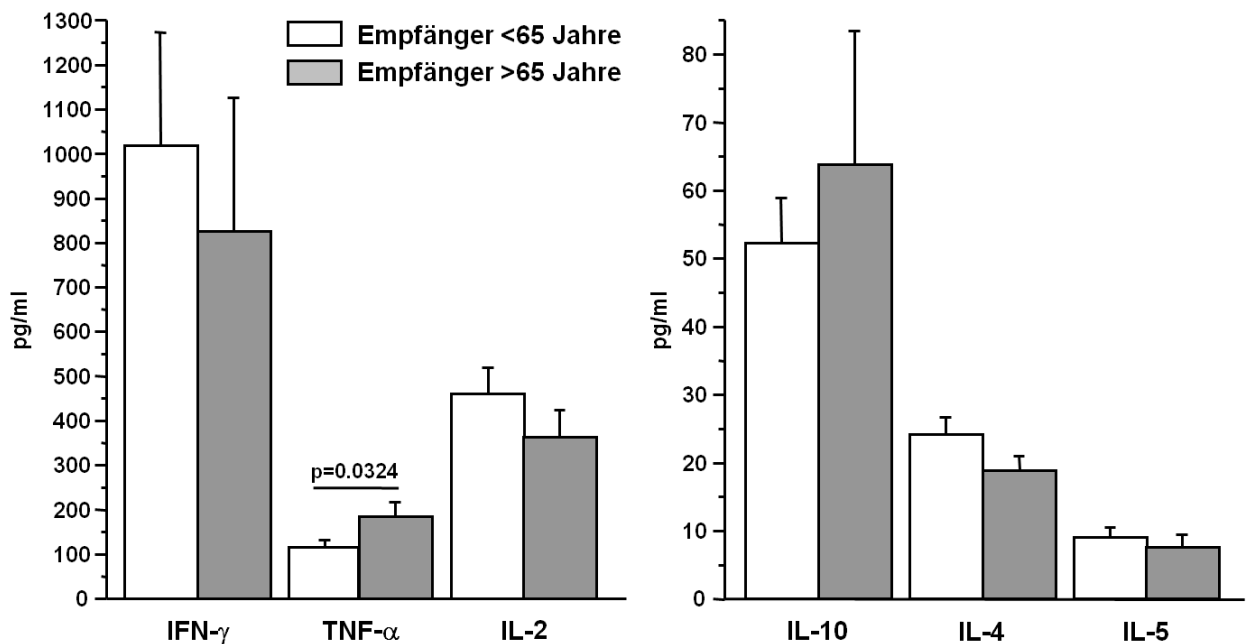


Abb. 31: Zytokine Tag 7, vergleichbare Immunsuppression

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

Die TNF- α - Konzentration war nach in vitro-Stimulation im älteren Patientenkollektiv im Vergleich zum jüngeren Patientenkollektiv mit vergleichbarem HLA-Mismatch signifikant erhöht (196 ± 37 vs. 102 ± 18 pg/ml; $p=0,0176$; Abb. 32).

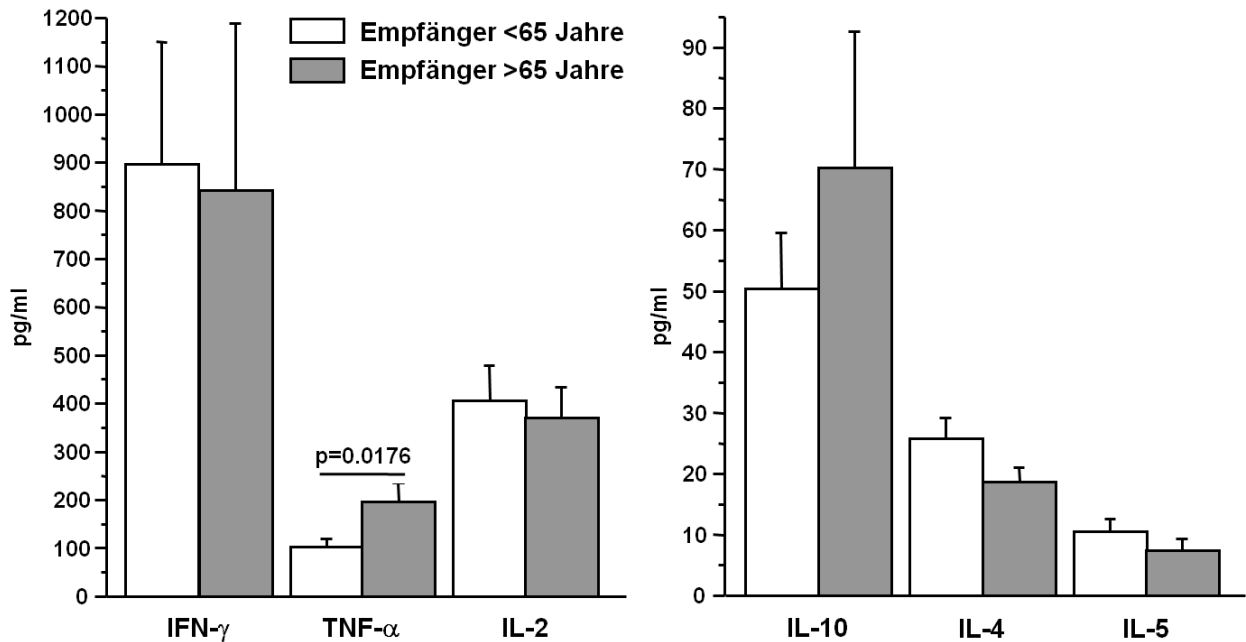


Abb. 32: Zytokine Tag 7, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression

3.4.3. 6 Monate nach der Transplantation

I. Unabhängig von der initialen Immunsuppression

Sechs Monate nach der Transplantation zeigten ältere Empfänger signifikant höhere IFN- γ -Konzentrationen im Vergleich zu jüngeren Empfängern (1338 ± 184 vs. 882 ± 173 pg/ml; $p=0,004$). Gleichzeitig waren die IL-10 Konzentrationen in älteren Empfängern deutlich, wenn auch nicht signifikant, gegenüber jüngeren Patienten erniedrigt (73 ± 14 vs. 158 ± 38 pg/ml, n.s.; Abb. 33).

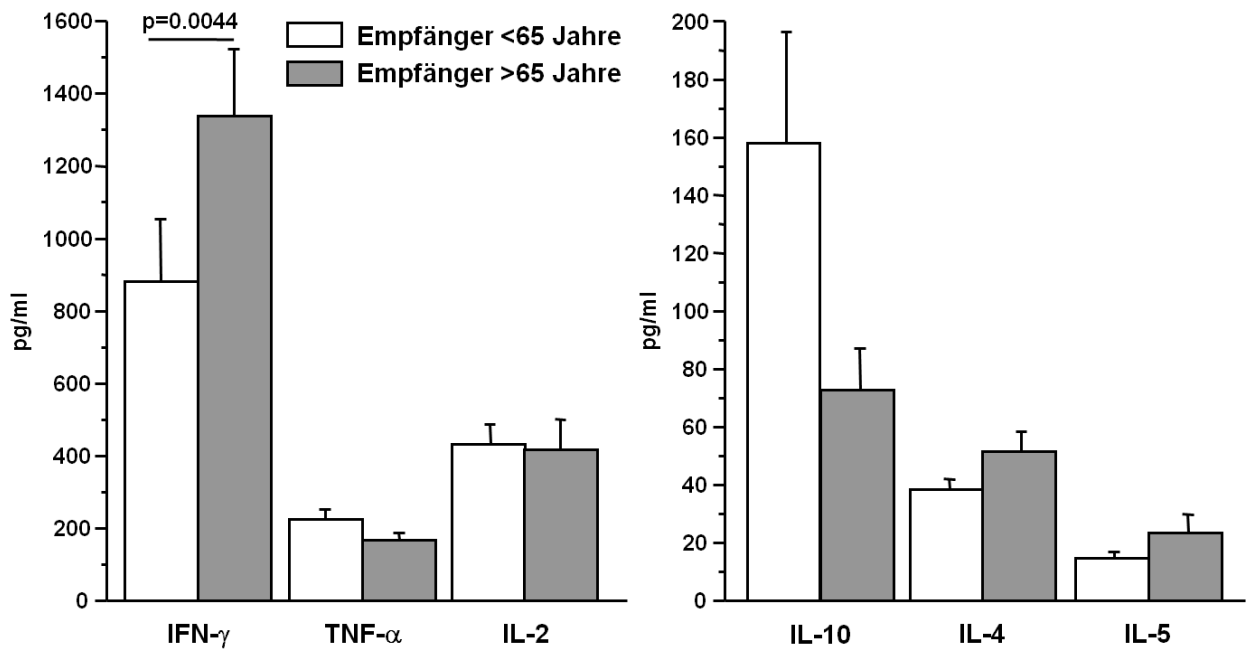


Abb. 33: Zytokine 6 Monate, alle Patienten

II. Abhängig von der initialen Immunsuppression

Im Gegensatz zu Tag 7 waren 6 Monate nach Transplantation sowohl die TNF- α als auch die IL-10 Konzentrationen in der Gruppe älterer Empfänger signifikant niedriger (TNF- α : 167 ± 21 vs. 269 ± 40 pg/ml, $p=0,0419$; IL-10: 73 ± 14 vs. 137 ± 23 pg/ml, $p=0,0300$; Abb. 34) als in jüngeren Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression.

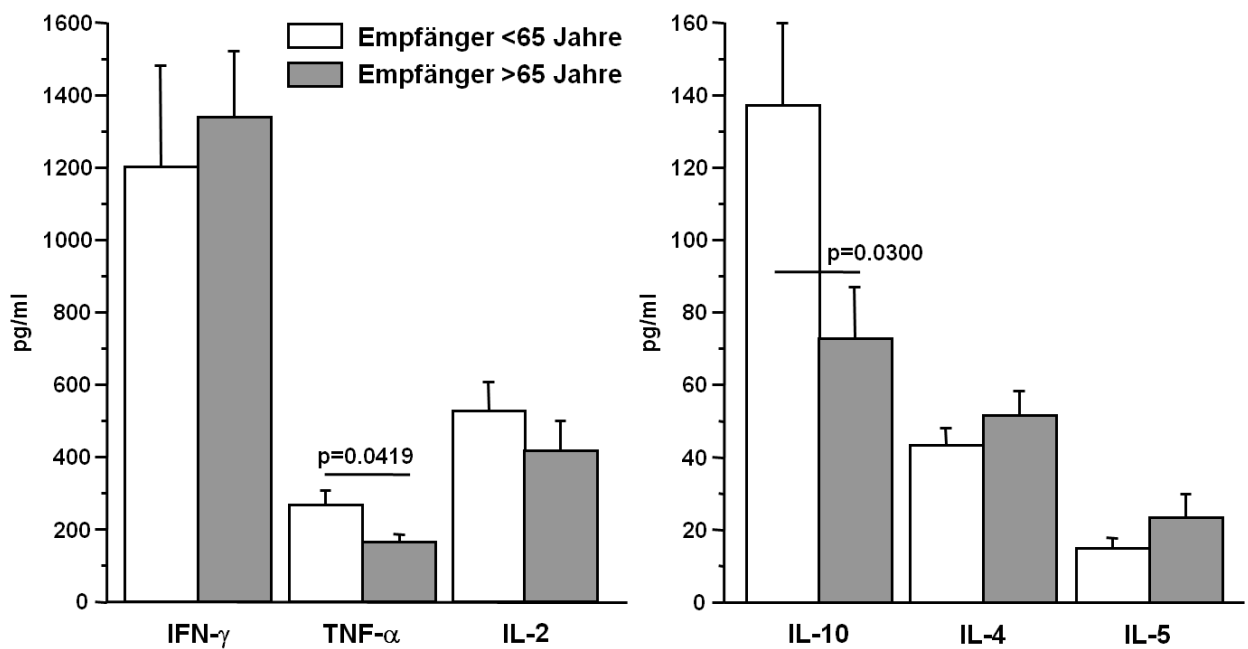


Abb. 34: Zytokine 6 Monate, vergleichbare Immunsuppression

III. Bei vergleichbarem HLA-Mismatch und vergleichbarer Immunsuppression

Im Falle eines vergleichbaren HLA-Mismatches waren 6 Monate nach der Transplantation die IL-10 Konzentrationen im älteren Patientenkollektiv deutlich, aber nicht signifikant niedriger als im jüngeren Patientenkollektiv (IL-10: 78 ± 18 vs. 156 ± 36 pg/ml; $p=0,0670$), während die IL-4 Konzentrationen leicht erhöht waren (IL-4: 53 ± 7 vs. 34 ± 6 pg/ml; $p=0,0732$; Abb. 35).

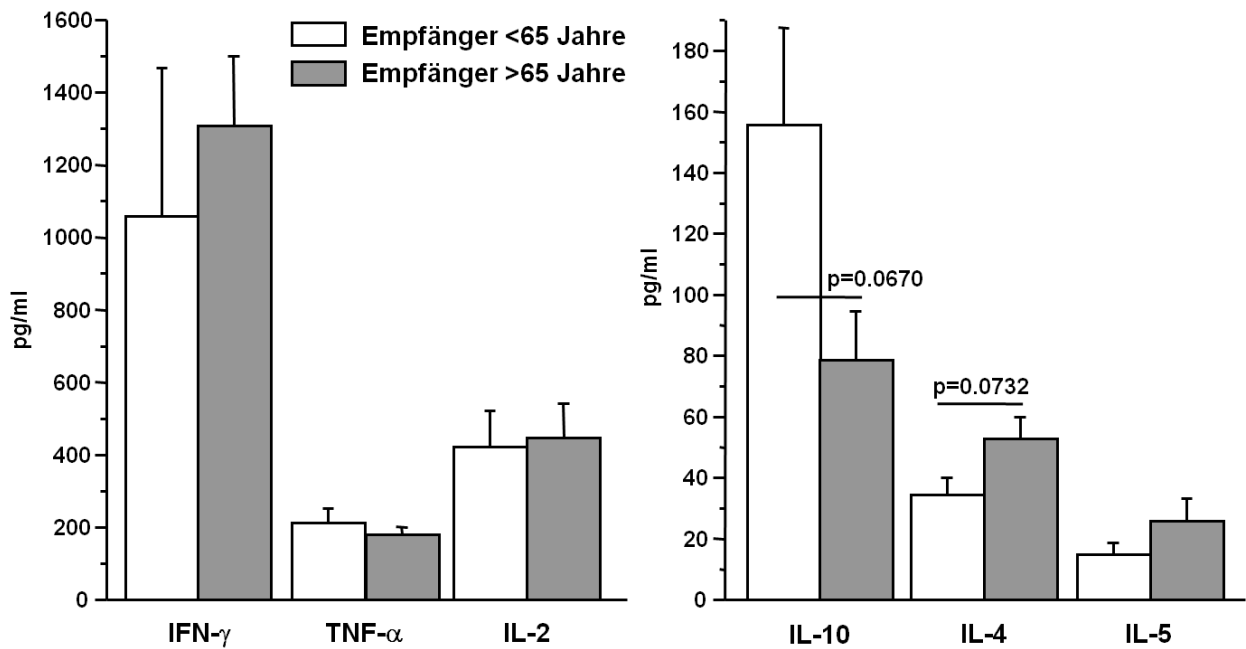


Abb. 35: Zytokine 6 Monate, vergleichbares HLA-Mismatch, vergleichbare Immunsuppression

4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war der Nachweis altersspezifischer Unterschiede in der Immunantwort bei Patienten nach Nierentransplantation. In den früheren Publikationen findet man diesbezüglich kontroverse Daten. So wurde die Immunantwort nach der Transplantation bei älteren Patienten sowohl als stärker als auch als schwächer im Vergleich zu jüngeren Transplantatempfängern beschrieben (47).

Seit Anfang der 90er Jahre wurden zahlreiche Studien zum Thema Transplantation im Alter durchgeführt. Anfangs wurde angenommen, dass alte Empfänger weniger immunkompetent seien (26). Während frühere Studien eine niedrigere Rate an akuten und chronischen Transplantatabstoßungen sowie eine reduzierte Immunantwort in älteren Empfängern zeigten (27),(28) wurde in jüngsten experimentellen Untersuchungen hingegen eine gesteigerte Immunantwort und ein schlechteres Transplantatüberleben (32) sowie eine veränderte Immunantwort (erhöhte Anzahl von Gedächtniszellen sowie alloreaktiven Zellen und ein verändertes Zytokinprofil) (33-35) in älteren Empfängern beschrieben. Gleichzeitig gibt es klinische Analysen, die über eine erhöhte Rate akuter und chronischer Transplantatabstoßungen sowie ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben in älteren Empfängern berichten (15,36-39).

Schlechtere Ergebnisse nach Transplantation im Alter können einerseits durch immunologische Veränderungen sowohl im alten Empfängerorganismus als auch im alten Transplantatspender und andererseits durch morphologische Veränderungen in Transplantaten älterer Spender erklärt werden.

Dafür, dass ältere Empfänger eine verstärkte Immunantwort aufweisen, sprechen die Ergebnisse zahlreicher klinischer und experimenteller Arbeiten. So zeigen mehrere klinische Studien nach einer initialen Calcineurininhibitor-freien Immunsuppression bei älteren Empfängern eine hohe Konversionsrate zur Calcineurininhibitoren. (40),(41).

Das Alter des Organspenders ist ein wichtiger Prognosefaktor für die Transplantatfunktion. Hohes Spenderalter wurde als einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Transplantatüberleben definiert.

Erhöhtes Spenderalter ist in vielen Studien als Risikofaktor für primäres Transplantatversagen (14) und reduzierte Transplantatlangzeitfunktion (12,15) beschrieben. Beide Kriterien werden durch immunologische aber auch nicht immunologische Veränderungen im Transplantat beeinflusst. Es ist bekannt, dass die Nierenfunktion mit steigendem Alter abnimmt. So ist z.B. die Kreatinin-Clearance eines 80-jährigen um 40 % gegenüber der eines 20-jährigen erniedrigt

(16). Klinisch zeigt sich ein signifikant schlechteres 5-Jahres Transplantatüberleben von full-house Nieren von über 60-jährigen Spendern (39%) im Vergleich 21-30-jährigen Spendern (81%) (12). In einer anderen klinischen Studie wurden bei gleicher Immunsuppression häufiger akute Abstoßungen bei Empfängern, die Organe von über 50-jährigen Spendern bekamen, beobachtet als bei Empfängern von Organen jüngerer Spender (13).

Es wird angenommen, dass Organe älterer Spender immunogener sind als Organe jüngerer Spender (13). So wurde z.B. beschrieben, dass Lymphozyten in Transplantaten älterer Individuen eine erhöhte HLA-Expression im Vergleich zu jüngeren Individuen aufweisen (19). Es wird angenommen das eine erhöhte Alloantigenerkennung bei Empfängern älterer Transplantate durch die zum Zeitpunkt der Transplantation bereits vorhandene Gewebeinflammation in älteren Organen hervorgerufen wird (13).

Da im ESP-Programm sowohl Empfänger als auch Spender älter als 65 sind, ist es schwierig ausschließlich anhand klinischer Daten zu differenzieren, ob die Veränderungen in der Immunantwort durch altersbedingte Veränderungen des Empfängerorganismus oder des Transplantates bedingt sind.

Zur Untersuchung altersabhängiger Veränderungen im Empfängerorganismus wurde in dieser Studie eine Analyse der T-Zellantwort im Empfänger durchgeführt.

4.1. Klinische Daten

In der vorliegenden Arbeit zeigten ältere Empfänger nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten keine Unterschiede bezüglich des Patienten- und Transplantatüberlebens, der Transplantatfunktion (Serumkreatinin nach 6 Monaten), der Rejektionsrate und der Häufigkeit einer verzögerten Transplantatfunktion im Vergleich zu jüngeren Transplantatempfängern. Die Transplantate älterer Transplantatempfänger wiesen im Trend, aber nicht signifikant häufiger, eine primäre Nichtfunktion auf.

Die vorliegende Ergebnisse bezüglich des Patienten- und Transplantatüberlebens, der Rate akuter Abstoßungen, des Transplantatüberlebens und der Transplantatfunktion nach 6 Monaten entsprechen im wesentlichen den bereits publizierten Daten von Smits et al., die keine Unterschiede in den oben genannten Parametern zwischen der ESP Gruppe und der Kontrollgruppe 1 Jahr nach der Transplantation fanden (45). Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Patientenüberleben nach 6 Monaten: 100 % im ESP vs. 98,7 % bei Patienten <65 Jahre), wird in dieser Studie über ein Patientenüberleben von 86 % in der älteren versus 90 % in der jüngeren Gruppe berichtet. Das Transplantatüberleben nach 1 Jahr, ausgewertet für Transplantatverlust durch Patiententod mit funktionierendem Transplantat, betrug 86 % im ESP und 79 % in der Kontrollgruppe, während das Transplantatüberleben der eigenen Studie bei 88,5 % im ESP versus 93,2 % bei Patienten <65 Jahren lag. Des Weiteren beobachteten die Autoren eine Abstoßungsrate von ca. 40 % in älteren gegenüber 33 % in jüngeren Transplantatempfängern vergleichbar mit den Rejektionsraten der eigenen Studie (50,0 % vs. 44,6 %). Die Häufigkeit einer verzögerten Transplantatfunktion lag hier bei 33 % im ESP und 37 % im Normalkollektiv gegenüber 26,9 % im ESP und 28,4 % im Normalkollektiv in der aktuellen klinischen Studie.

Rejektionsraten von 50 % und mehr in älteren Transplantatempfängern wurden auch von anderen Autoren beschrieben (37),(39).

Es ist hervorzuheben, dass im Vergleich zu anderen Studien der Beobachtungszeitraum vorliegender Studie lediglich 6 Monate betrug und die Rate akuter Abstoßungsreaktionen in Transplantatempfängern unter 65 Jahren mit 44,6 % relativ hoch war. Die hohe Abstoßungsrate in der Gruppe der jüngeren Transplantatempfänger kann möglicherweise durch den relativ hohen Anteil an Patienten mit Mehrfachtransplantationen (15,4 % im ESP und 17,6 % im Normalkollektiv) und durch die höhere Anzahl von Empfängern mit erhöhtem immunologischen Risiko in der jüngeren Patientengruppe (PRA>25 % bei 4 jüngeren Empfängern vs. 0 bei Patienten der älteren Gruppe) erklärt werden.

3.5.T-Zelltypisierung

Die zur Lymphozytentypisierung benutzte FACS-Methode erfasst durch die Kombination von charakteristischer Immunfluoreszenz und Lichtstreuung reproduzierbar über 98% aller Lymphozyten. Die Charakterisierung der Immunantwort durch die Messung der Lymphozytenpopulationen weist die bekannten Einschränkungen auf, Zellen mit modulierten Oberflächenantigenen werden nicht erfasst. Das periphere Blut bietet nur einen sehr eingeschränkten Blick auf die tatsächliche Zusammenstellung der Lymphozytensubpopulationen - nur 2-3% aller Lymphozyten befinden sich im Blut. Unterschiedliche Lymphozytensubgruppen weisen außerdem unterschiedliche Rezirkulations- und Migrationsmuster auf. Eine naive T-Zelle z.B. zirkuliert mindestens 2 Mal innerhalb von 24 Stunden aus peripherem Blut ins lymphatische Gewebe und zurück. Die mittlere Aufenthaltsdauer eines Lymphozyten im peripheren Blut beträgt ca. 30 Minuten (11).

Die Methode hat allerdings den Vorteil, dass eine große Anzahl der Lymphozytenmarker gleichzeitig erfasst werden kann. Dadurch, dass die Untersuchung immer von derselben Person durchgeführt wurde, konnten eventuelle Untersucher-abhängige Unterschiede minimiert werden.

Ein weiteres Problem ist, dass das Oberflächenprofil der Lymphozytensubpopulationen durch Immunsuppressiva stark und zum Teil langfristig beeinflusst wird, da z.B. T-Lymphozyten als primäres Zielobjekt der immunsuppressiven Therapie dienen. So werden die Oberflächenmoleküle durch Antikörper moduliert, blockiert oder aktiviert (11).

Medikamente in der Basisimmunsuppression werden in der Regel als Kombinationstherapie eingesetzt, was die Identifikation der Wirkung einzelner Medikamente auf die Oberflächenprofile der Lymphozyten erschwert. Zusätzlich führen sie zu keinen ausgeprägten Veränderungen der Lymphozytenoberflächenmarker. Allerdings sind einige phänotypische Veränderungen der Immunzellen beschrieben, die auf bestimmte Immunsuppressiva zurückgeführt werden können.

Glukokortikoide induzieren eine dosisabhängige kurzzeitige Lymphozytopenie. Azathioprin hat neben einem leukopenischen Effekt einen Effekt auf NK-Zellen (48). So sind die Anzahl und die Funktion der NK-Zellen in Nierentransplantatempfängern, die eine Immunsuppressionstherapie mit Azathioprin erhalten haben, signifikant vermindert. Dabei existiert eine Korrelation zwischen der Azathioprin Dosis und der Anzahl und Funktion von NK-Zellen.

MMF inhibiert die Expression von T-Zelloberflächenmarkern wie z.B. von IL-2- und TNF- α -Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und co-stimulatorischen Molekülen (49-51) sowie die

Expression von B-Zell-Aktivierungsmarkern (52). Zusätzlich ist die Induktion der Apoptose von aktivierten peripheren T-Zellen beschrieben worden (53).

Medikamente, die zur Induktions- oder Abstoßungstherapie verwendet werden (poly- oder monoklonale Antikörper) führen dagegen zur typischen Veränderungen des Oberflächenprofils.

Es wird zwischen depletierenden und nicht-depletierenden monoklonalen Antikörpern unterschieden. Depletierende monoklonale Antikörper (anti-CD52) lösen die Zerstörung der Lymphozyten *in vivo* aus, während nicht-depletierende monoklonale Antikörper (anti-CD3, anti-CD25) die Funktion der jeweiligen Zielproteine blockieren ohne die Zellen zu zerstören (6).

Die Modulation spezifischer Oberflächenmoleküle führt zu den phänotypischen Veränderungen. Spezifische Fluoreszenzantikörper, die für die Markierung von Oberflächenmolekülen im FACS benutzt werden, können dadurch nicht binden. Infolgedessen können z.B. im Falle einer mono- oder polyklonalen Antikörpertherapie ca. 30-40% der zirkulierenden Lymphozyten im FACS nicht nachgewiesen werden.

Die monoklonalen Antikörper Basiliximab und Daclizumab binden an die α -Kette des IL-2-Rezeptors aktivierter T-Zellen, wodurch die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation dosisabhängig blockiert werden. Lymphozyten von Patienten, die mit Basiliximab oder Daclizumab behandelt wurden, exprimieren noch 10 bis 12 Wochen nach der Induktionstherapie kein CD25 (54).

Transplantatempfänger, die eine OKT-3 Behandlung erhielten, weisen eine starke, aber reversible Reduktion CD3 positiver Zellen aufgrund einer Herrunterregulation des TCR/CD3 Komplexes auf (55,56). Zusätzlich wurde eine T-Zell-Aktivierung, die ihrerseits eine T-Zell-Apoptose induziert, als Wirkungsmechanismus für OKT3 beschrieben. Damit führt der T-Zell-Antikörper OKT3 in Dosierungen, die bei steroidresistenter Rejektion genutzt werden, sowohl zu einer biologischen T-Zell-Depletion über die Induktion der Apoptose, als auch zu einer funktionellen T-Zell-Depletion aus dem Blut über die Modifizierung des OKT3-T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Die entstehende T-Lymphopenie ist allerdings reversibel und wird innerhalb einiger Wochen wieder ausgeglichen.

Eine Komplement-abhängige Zelllyse ist der Hauptmechanismus bei der Depletion durch den monoklonalen anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab (Campath®). Die Gabe von anti-CD52 führt zu einem schnellen Abfall der Anzahl zirkulierender T- und B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Eosinophilen (57). Insbesondere wird die Anzahl CD4- und CD8-positiver Zellen vermindert (58). Zusätzlich wurde eine gesteigerte Expression des Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 beschrieben (59). Die Veränderungen in der Lymphozytenzahl sind zum Teil langfristig und erreichen das präoperative Niveau erst nach über 2 Jahren (60).

Polyklonale Antikörper haben sowohl einen depletierenden, als auch nicht-depletierenden Effekt, da sie aus einem Gemisch unterschiedlicher Antikörper bestehen und somit eine Modulation unterschiedlicher Oberflächenmarker induzieren. So werden bei Verwendung von Thymoglobulin Moleküle, die die T-Zell Aktivierung (TCR/CD3 Komplex, CD2, CD4, CD8, CD5, CD6) sowie die Leukozyt-Endothelium-Interaktion (CD11a/CD18, CD54) kontrollieren, herunterreguliert. Dieser Effekt tritt nach ca. 2 Stunden ein und bleibt über 4 Wochen erhalten. Die Komplement-abhängige Zellyse ist auch der Hauptmechanismus bei der Zelldepletion nach Therapie mit polyklonalen Antikörpern. So induziert eine ATG-Therapie eine dosisabhängige Lymphozytopenie im peripheren Blut und eine dosis-abhängige T-Zelldepletion in der Milz und in den Lymphknoten. Eine Induktionstherapie mit ATG führt zur langfristigen (bis zu 3 Jahren) Depletion von T-, B- und NK-Zellen (61). Außerdem wurden persistierend niedrige CD4+ Lymphozytenzahlen bei gleichzeitiger Überrepräsentation von CD8+ Zellen 24 Monate und länger nach initial depletierender Therapie beschrieben (10).

Insgesamt ist die T-Zell Apoptose im peripheren lymphatischen Gewebe einer der Hauptmechanismen der depletierenden Immunsuppression (62).

Einer der Befunde beim immunologischen Monitoring nach T-Zelldepletion ist die Inversion des CD4+/CD8+ Ratio zugunsten CD8+ T-Zellen. Diese Inversion reflektiert Unterschiede in der T-Zellregeneration. Während die Rekonstruktion von CD4+ Zellen thymusabhängig ist, können CD8+ Zellen extrathymal wiederhergestellt werden (63). Dies erklärt die Altersabhängigkeit der Regeneration CD4+ T-Zellen und die daraus folgende Veränderung der CD4+/CD8+ Ratio. Zusätzlich teilen sich CD8 positive T-Zellen schneller als CD4 positive T-Zellen (6 versus 9-20 Stunden pro Teilung) (64).

Da das Oberflächenprofil der Lymphozytenpopulation durch Immunsuppressiva stark beeinflusst wird, werden im Folgenden nur die Ergebnisse des Vergleichs zwischen den Patientengruppen mit ähnlicher Immunsuppression nach der Transplantation diskutiert.

Zusammenfassend fanden wir einen modifizierten T-Zellstatus bei älteren Transplantatempfängern vor der Transplantation und in der frühen Phase nach Transplantation.

So weisen ältere Patienten vor der Transplantation eine signifikant erhöhte Anzahl von NK-Zellen, Gedächtnis-Helferzellen und aktivierten zytotoxischen T-Zellen, eine signifikant niedrigere Anzahl von B-Zellen, Gesamt-T-Helferzellen, naiven T-Helferzellen sowie eine veränderte CD4/CD8 Ratio zugunsten CD8+ Zellen auf. Diese Ergebnisse entsprechen größtenteils den bereits bekannten physiologischen Veränderungen des T-Zellstatus im Alter. Die Veränderungen in den Lymphozytensubpopulationen wie die Reduktion naiver T-Helferzellen (CD4+CD45RA+), B-Zellen (CD19+) und Gesamt-T-Helferzellen (CD3+CD4+)

sowie die gesteigerte Anzahl von Gedächtnis-Helferzellen (CD4+CD45RO+), NK- (CD16+CD56+) und zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+) in älteren Individuen wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben (22). So berichten Pawelec und seine Mitarbeiter über eine leicht erniedrigte Anzahl T-Helferzellen und eine signifikant erniedrigte Anzahl naiver T-Zellen sowie eine gesteigerte Anzahl von T-Gedächtniszellen und NK-Zellen in älteren Individuen (12;13)(23). Allerdings wurden in dieser Arbeit T-Lymphozytenpopulationen von 20-30jährigen Probanden mit denen von 80jährigen verglichen. Laut Gruebeck-Loebenstein et al. werden im Alter naive T-Zellen durch T-Gedächtniszellen ersetzt, die eine eingeschränkte Funktion bei der Infektionsabwehr zeigen (65).

In einer anderen Arbeit beschreibt die gleiche Autorin eine Erhöhung der Anzahl HLA-DR+ T-Lymphozyten sowie eine verminderte Immuntoleranz im Alter (66).

Die Anzahl der B-Zellen im peripheren Blut im Alter wurde sowohl als erniedrigt als auch nicht erniedrigt beschrieben. Die Funktion der B-Zellen bei älteren Individuen scheint dagegen eindeutig eingeschränkt zu sein. So wurde z. B. eine erniedrigte Produktion spezifischer Antikörper in älteren Individuen beschrieben (67),(68,69) .

Sieben Tage nach der Transplantation fanden wir eine signifikant höhere Anzahl von Gedächtnis-Helferzellen und aktivierten zytotoxischen Zellen sowie eine signifikant verminderte Anzahl naiver Helferzellen in älteren Transplantatempfängern.

Auch zu diesem Untersuchungszeitpunkt war die Anzahl von NK-Zellen in beiden Gruppen im Vergleich zum Normbereich erhöht. Zusätzlich wiesen ältere Nierentransplantatempfänger eine gesteigerte Anzahl aktivierter zytotoxischer Zellen im Vergleich zum Normalkollektiv auf.

Die Veränderungen in den Lymphozytensubpopulationen wie die Reduktion der naiven T-Helferzellen (CD4+CD45RA+) und die gesteigerte Anzahl der Gedächtnis-Helferzellen (CD4+CD45RO+) in älteren Individuen nach der Transplantation entsprechen den physiologischen Veränderungen des Immunsystems im Alter und sind auch für den Zeitpunkt nach Transplantation bereits beschrieben (33). Interessant ist allerdings unsere Beobachtung, dass ältere Transplantatempfänger eine erhöhte Anzahl aktivierter zytotoxischer Zellen (CD8+HLA DR+) sowohl vor als auch eine Woche nach Transplantation aufweisen.

Über eine erhöhte Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen wurde bei gesunden Erwachsenen im Vergleich zu gesunden Kindern berichtet (70). In einer älteren Studie wurde eine signifikant höhere Anzahl aktivierter T-Zellen (CD3+HLA DR+) mit steigendem Alter festgestellt (71).

Im Tierexperiment wurde eine gesteigerte Anzahl zytotoxischer Zellen im peripheren Blut zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation in Empfängern von Transplantaten älterer Spender beschrieben (35,72). In letzterer Arbeit wurden in einem allogenen Modell Nieren von jungen (3

Monate) bzw. alten (18 Monate) F-344 Ratten in bilateral nephrektomierte junge Lewis-Empfängerratten transplantiert.

Da die Erkennung und Lyse körperfremder Zellen durch zytotoxische Lymphozyten den wichtigsten Mechanismus der akuten zellulären Abstoßungsreaktion darstellt, ist davon auszugehen, dass Empfänger mit einer erhöhten Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten und insbesondere aktivierter zytotoxischer Lymphozyten, eher zu einer akuten Rejektion neigen als Empfänger mit einer geringeren Anzahl zytotoxischer T-Zellen. Auf der anderen Seite kann eine erhöhte Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen auch ein Zeichen für eine chronische Immunstimulation im Alter sein (6). Unsere Ergebnisse könnten zudem in einer auch von anderen Autoren beschriebenen erhöhten HLA-Expression auf Lymphozyten älterer Individuen begründet sein (19). Ebenso ist bekannt, dass APZ älterer Individuen eine erhöhte Aktivität besitzen und somit zu einer gesteigerter Alloantigenerkennung führen (73).

Wider Erwarten war die Anzahl CD4⁺ T-Zellen, die das Adhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) exprimieren, zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation in älteren Empfängern nicht signifikant unterschiedlich zu jüngeren Empfängern, obwohl eine deutliche Tendenz zu einer reduzierten Anzahl CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen zu erkennen war. In der Literatur ist eine Verminderung der CD62L-Expression auf naiven Helferzellen in älteren Individuen beschrieben, was möglicherweise auf eine veränderte (verminderte) Migration in die sekundären lymphatischen Organe im Alter hindeutet (6). Präaktivierte T-Zellen, die sogenannten „zentralen Gedächtniszellen“ (TCM) mit eingeschränkter Effektorfunktion exprimieren CD62L und migrieren vorzugsweise in sekundäres lymphatisches Gewebe. Bereits polarisierte (Typ 1 oder 2) Effektor-Gedächtniszellen (TEM) mit unmittelbaren Effektorfunktionen im nicht-lymphatischen, entzündeten Gewebe, exprimieren dagegen nicht zwingend CD62L (74).

6 Monate nach der Transplantation waren die Unterschiede in den Lymphozytensubpopulationen zwischen beiden Patientengruppen auf naive und Gedächtnishelferzellen begrenzt. Das entspricht Ergebnissen aus experimentellen Untersuchungen in Ratten, auch hier wurden keine anderen Unterschiede in der T- und B-Zellantwort zu einem späten Zeitpunkt nach Transplantation beschrieben (35,72).

Insgesamt war eine Verschiebung in der Anzahl von Gedächtnis- (CD4⁺CD45RO⁺) und naiven T-Helfer Zellen (CD4⁺CD45RA⁺) zu Gunsten der T-Gedächtniszellen bei älteren Patienten wie erwartet an allen 3 Untersuchungszeitpunkten zu beobachten. Diese Veränderungen sind die Folge der Thymusinvolution im Alter (75). Dabei werden epitheliales Gewebe, das in der Lage ist Thymozyten zu produzieren, und zelluläre Anteile im Thymus durch Fett ersetzt (76). Dadurch ist die Produktion von naiven T-Zellen im Thymus in Individuen ab ca. 40 Jahren stark

reduziert. Bei einem 70-jährigen Individuum ist der epitheliale Anteil im Thymus weniger als 10% (67).

Das Ausmaß der Regeneration der T-Zellen ist abhängig vom Thymusalter. So gibt es eine inverse Relation zwischen dem Alter und der Fähigkeit zur Wiederherstellung des naiven T-Zellpools. Das betrifft insbesondere die naive CD4+ Zellpopulation, während für naive CD8+ Zellen eine thymusunabhängige Rekonstitution beschrieben wurde (77).

3.6.Frequenz alloreaktiver T-Zellen

Die hier verwendete ELISPOT-Methode zur Bestimmung alloreaktiver T-Zellen zeigte in unseren Untersuchungen deutliche Schwächen. So wiesen die im Dreifacheinsatz gemessenen Werte nach spezifischer Stimulation intra- und interindividuell eine hohe Variabilität auf, dementsprechend war der Standardfehler relativ groß, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden konnten.

Außerdem fiel eine erhöhte spontane Produktion von IFN- γ durch unstimulierte Spenderzellen (Negativkontrolle) auf. Dadurch kam es teilweise zu negativen Werten spenderspezifischer T-Zellfrequenzen nach Abzug beider (Empfänger- und Spender Negativkontrollen) Negativwerte. Es war daher auch schwierig zu identifizieren, ob die im ELISPOT-Assay gemessene Zytokinsekretion in den Proben mit spezifischer Stimulation ausschließlich von Empfängerzellen stammte.

Der Einsatz bestimmter Immunsuppressiva (OKT3) machte außerdem die Durchführung eines ELISPOT-Assays bei einigen Patienten unmöglich, da bei diesen Patienten keine T-Zellen in den FACS-Analysen nachgewiesen werden konnten. Der T-Zell-Antikörper OKT3 führt in Dosierungen einer Antirejektionstherapie sowohl zu einer biologischen T-Zell-Depletion über die Induktion von Apoptose, als auch zu einer funktionellen T-Zell-Depletion aus dem Blut über die Modifizierung des OKT3-T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Diese T-Lymphopenie ist allerdings reversibel und wird innerhalb einiger Wochen wieder ausgeglichen.

Die oben genannten Probleme des verwendeten ELISPOT-Assays führten zu einer eingeschränkten Relevanz einzelner Werte. Da jedoch alle Blut- und Gewebeproben gleich behandelt und alle Platten gleich ausgewertet wurden, sind Ergebnisse dieser Studie als aussagekräftig zu behandeln.

Ältere Nierentransplantatempfänger wiesen zu allen 3 Untersuchungszeitpunkten eine erhöhte Frequenz alloreaktiver T-Zellen auf, was zum einen auf eine ausgeprägtere T Zell Alloreaktivität bei älteren Patienten, zum anderen auf eine erhöhte Immunogenität von Transplantaten älterer Spender hindeuten kann .

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im Tierexperiment beschrieben. So zeigten Pascher et al in einem „high responder“ Nierentransplantationsmodell der Ratte (Dark Agouti Spender/Lewis Empfänger), dass ältere (Alter 18 Monate) Empfänger die doppelte Anzahl donor-spezifischer IFN- γ -produzierender alloreaktiver T-Zellen im ELISPOT im Vergleich zu jüngeren (Alter 3 Monate) Empfängern aufweisen (33).

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurden die Nieren von jungen (3 Monate) und alten (18 Monate) F-344 Ratten (chronisches Modell) in bilateral nephrektomierte jungen Lewis-Empfänger transplantiert. Dabei zeigten Empfänger älterer Nierentransplantate eine erhöhte T-Zellalloreaktivität 1 und 3 Monate nach der Transplantation (72).

Heeger et al. fanden einen Zusammenhang zwischen der Frequenz donor-spezifischer IFN- γ -produzierender alloreaktiver T-Zellen im ELISPOT vor der Transplantation und der Inzidenz akuter Abstoßungen danach (78). Dieser Zusammenhang wurde durch Arbeiten anderer Autoren bestätigt (79-81). Die gleichzeitige Erhöhung der Anzahl von T-Gedächtniszellen und der alloreaktiver T-Zellen spiegelt eine größere Immunerfahrung älterer Individuen wieder und bestätigt die Hypothese, dass die Frequenz alloreaktiver T-Zellen ein direkter Marker für das immunologische Gedächtnis ist (78).

3.7. Zytokinbestimmung im Überstand nach ex vivo Stimulation des Vollbluts

Bei der Durchführung der Zytokinbestimmung im Vollblut ergaben sich ebenso einige Probleme. Da das Vollblut heterogene Zellpopulationen beinhaltet, ist zum einen die Herkunft der Zytokine nicht eruierbar, zum anderen wurde der optimale Zeitpunkt der Zytokinausschüttung für einige der gemessenen Zytokine überschritten.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse betreffend der Zytokinkonzentrationen im Überstand nach in vitro Stimulation des Empfängerbluts gefunden:

An Tag 7 nach der Transplantation war die TNF- α Konzentration im Überstand bei Patienten >65 Jahre erhöht, 6 Monate nach der Transplantation waren jedoch die TNF- α wie auch die IL-10 Konzentrationen in der Gruppe älterer Transplantatempfänger signifikant niedriger.

Wider Erwarten fanden sich vor der Transplantation keine Unterschiede im Zytokinprofil zwischen jüngeren und älteren Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. In der Literatur wurde allerdings über einen Shift von von einer Th1 zu einer Th2 Zytokinproduktion, über eine erniedrigte IL-2-, erhöhte IL-4- und IFN- γ -Sekretion sowie über deutlich erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α in älteren Individuen berichtet (22),(76,82), (83). Außerdem wurde eine veränderte Zytokinproduktion (erhöhte IL-2-, IL-4-, IFN- γ und TNF- α -Produktion) nach in vitro-Stimulation von Lymphozyten und Monozyten älterer Ratten vor der Transplantation im Tierexperiment beschrieben (33).

Ebenso wurde von anderen Autoren sowohl über eine erhöhte Plasmakonzentration von TNF- α als auch über eine erhöhte TNF- α -Produktion nach mitogener Stimulation in der älteren Population berichtet (84). In einer anderen Studie wurden PBMC von Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung, die auf eine Lebertransplantation warteten, mit LPS stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die PBMC der Patienten, die nach Lebertransplantation eine akute Rejektion entwickelten, eine höhere TNF- α -Synthese aufwiesen als PBMC von Patienten ohne akute Rejektion (85).

Das Fehlen dieser Unterschiede in vorliegendem Patientengut kann möglicherweise durch generell erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine und persistierender Inflammation sowohl bei älteren als auch bei jüngeren dialysepflichtigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erklärt werden (86,87)

Kurz nach der Transplantation fanden sich signifikant höhere Konzentrationen von TNF- α nach in vitro Stimulation im Blut älteren Transplantatempfängern. Erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α gelten als gesicherter Risikofaktor für die

Entwicklung einer akuten Rejektion in Transplantaten mit einem Mismatch in den MHC Klasse II Antigenen (HLA-DR) (88).

Erhöhte Konzentrationen von TNF- α im Serum wurden auch während einer Abstoßung von Nierentransplantaten nachgewiesen (89).

Außerdem ist bekannt, dass TNF- α die T-Zellproliferation und Differenzierung von Th0 Zellen in Th1 Zellen nach alloantigenem Stimulus erhöht und damit eine entscheidende Rolle in der Akzeleration der alloreaktiven T-Zellantwort spielt (90).

In der bereits erwähnten tierexperimentellen Arbeit konnte ebenso ein verändertes Zytokinprofil nach mitogener Stimulation des peripheren Bluts in Empfängern älterer Nierentransplantate nach Transplantation gezeigt werden. Allerdings war hier die Produktion von IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-10 einen Monat nach der Transplantation erhöht (72). 6 Monate nach der Transplantation zeigten Empfänger älterer und jüngerer Organe keine Unterschiede mehr in der IL-2- und IL-10-Produktion, während zu diesem Zeitpunkt die IFN- γ - und IL-4-Produktion in Empfängern von Nierentransplantaten junger Spender erhöht war.

In der vorliegenden Arbeit waren die TNF- α und IL-10 Konzentrationen im Überstand nach ex vivo Stimulation 6 Monate nach der Transplantation signifikant niedriger in der Gruppe älterer Transplantatempfänger. Dies kann möglicherweise auf eine Überimmunsuppression bei älteren Patienten 6 Monate nach der Transplantation hinweisen, da auch in anderen Studien deutlich erniedrigte TNF- α -Werte nach LPS-Stimulation im Stadium der Immunparalyse nachgewiesen wurden (91,92).

Interessanterweise wurde aber auch eine Induktion IL-10 produzierender T-Zellen durch Immunosuppressiva (Cortikosteroide) beschrieben (93).

Andererseits gibt es Hinweise für eine Rolle von IL-10 bei Sepsis und Immunparalyse durch die Induktion der Endotoxin-Toleranz (94). Dabei korrelieren erhöhte IL-10 Konzentrationen mit einer schlechten Prognose bei Sepsis (95-98) und umgekehrt niedrigere IL-10 Konzentrationen mit einer verbesserten Überlebensrate von Sepsispatienten (99).

Zusätzlich besitzt IL-10, welches in unserer Studie bei älteren Empfängern 6 Monate nach der Transplantation deutlich erniedrigt war, aber auch zahlreiche anti-inflammatorische Eigenschaften. So inhibiert IL-10 die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-1 und IL-8 und TNF- α (100).

IL-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung regulatorischer T-Zellen (101). So induziert IL-10 die Differenzierung naiver T-Helferzellen zu Zellen des regulatorischen Typs 1 (102). Diese Zellen sind in der Lage die T-Zellantwort auf Alloantigene zu inhibieren, entweder durch die Suppression alloreaktiver T-Helferzellen (direkt via Zell-Zellkontakt oder via

Sekretion von IL-10 und TGF- β) oder durch die Vermittlung tolerogener Signale an APZ (103,104).

Die Bedeutung von IL-10 für die Verlängerung der Transplantatakzeptanz ist eindeutig. So führte eine virale Interleukin-10 Gentherapie nach der Herztransplantation zur Toleranzinduktion in Mäusen (105). Außerdem konnte eine Suppression der allogenen Antwort nach Hepatozytentransplantation durch einen viralen IL-10 Gentransfer nachgewiesen werden (106). Die Kombination aus einer Rapamycin- und Interleukin-10-Therapie induziert eine antigenspezifische Transplantattoleranz durch die Induktion regulatorischer T-Zellen vom Typ 1 nach Inselzelltransplantation (107).

3.8.HLA-Diskrepanz

Die verstärkte Immunantwort nach der Transplantation bei älteren Transplantatempfängern könnte auch durch das schlechtere HLA-Matching im ESP-Programm erklärt werden.

Die HLA-Kompatibilität hat einen ebenso wichtigen Einfluss auf das Transplantatüberleben wie die Immunsuppression. Am Anfang der 90er Jahre, vor Einführung neuer Immunsuppressiva wie MMF und ATG, war das HLA-Mismatch (besonders ein HLA-DR-Mismatch), einer der bedeutendsten Risikofaktoren für den Transplantatverlust (108-111). Seit Mitte der 90er Jahre mit der Verbesserung der immunsuppressiven Therapie verliert das HLA-Matching allerdings an Bedeutung für das Transplantatüberleben und die Transplantatfunktion, besonders bei älteren Transplantatempfängern (109).

Um die HLA-Diskrepanz als mögliche Ursache für die modifizierte Immunantwort in der ESP-Gruppe auszuschließen, wurde die Immunantwort in beiden Gruppen nur bei Patienten mit 3 und mehr Mismatches analysiert. Hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie beim Vergleich beider Patientengruppen in Abhängigkeit von der initialen Immunsuppression, aber unabhängig von der Mismatchanzahl.

So war am Tag 7 nach der Transplantation bei älteren Patienten mit 3 und mehr Mismatches die Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Zellen und Gedächtnis-Helfer-Zellen signifikant erhöht im Vergleich zu jüngeren Patienten mit gleicher Anzahl Mismatches, während die Anzahl naiver Helfer-Zellen signifikant vermindert war. Die TNF- α Konzentration war nach in vitro-Stimulation im älteren Patientenkollektiv ebenso signifikant erhöht.

6 Monate nach der Transplantation waren ähnliche Unterschiede wie beim Vergleich der Patientengruppen mit unterschiedlichem HLA-Mismatch zu beobachten. So war bei älteren Nierentransplantatempfängern der Anteil aktivierter zytotoxischer T-Zellen und Gedächtnis-Helfer-Zellen signifikant höher als bei jüngeren Patienten mit gleicher Anzahl Mismatches, während der Anteil naiver Helfer-Zellen signifikant vermindert war.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine HLA-Diskrepanz eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur Immunsuppression spielt und kaum Auswirkungen auf die Immunantwort nach der Transplantation hat.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eine initial verstärkte Immunantwort älterer Transplantatempfänger bei Verwendung älterer Transplantate und unterstützen damit das Konzept einer altersadaptierten Immunosuppression in der frühen Phase nach Transplantation. Die altersbedingte Veränderung der Immunantwort ist unter anderem mit der erhöhten Anzahl von Gedächtnis- und zytotoxischen T Zellen assoziiert. Deshalb sollte die altersabhängige Immunantwort für Empfänger und Spender als Faktor, der das Transplantatüberleben beeinflusst, beachtet und in altersadaptierten immunsuppressiven Protokollen der frühen Phase nach der Transplantation berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

Hintergrund In der Klinik führte die zunehmende Anzahl älterer Spender und Empfänger zur Einführung einer altersadaptierten Allokation von Nierentransplantaten (European Senior Program, ESP) unter der Annahme einer reduzierten Immunantwort in der älteren Empfängerpopulation. Eigene experimentelle Studien zeigten allerdings eine verstärkte Immunantwort in älteren Empfängern bzw. nach Transplantation von Organen älterer Spender. In der vorliegenden Studie wurde die altersmodifizierte Immunantwort nach klinischer Nierentransplantation untersucht.

Methoden Im Zeitraum 01/2004 bis 01/2005 wurden 100 Nierentransplantatempfänger untersucht. Empfänger des ESP >65 Jahre (68 ± 3 ; $n=26$) eines Nierentransplantats von Spendern >65 (70 ± 8), wurden mit Patienten des ETKAS (European Transplantation Kidney Allocation System) <65 Jahre (46 ± 11 ; $n=74$) verglichen (Spenderalter: 49 ± 11 ; $p < 0,0001$). Die altersabhängige Immunantwort wurde an Tag 0, 7 sowie nach 6 Monaten mittels Durchflusszytometrie (Typisierung relevanter Oberflächenmarker), Cytometric Bead Array (Zytokinprofilbestimmung im Plasma) und ELISPOT (Bestimmung der T-Zell-Alloreaktivität durch Nachweis von intrazellulärem IFN- γ nach donorspezifischer Stimulation von Empfängerlymphozyten) untersucht.

Ergebnisse Das Patienten-/Transplantatüberleben betrug 100/89 % im ESP versus 98/93 % im Normalkollektiv (mittlere Beobachtungszeit 214 ± 33 vs. 207 ± 33 Tage). Die kalte Ischämiezeit war in der ESP-Gruppe nicht signifikant verkürzt (9 ± 3 vs. 10 ± 5 Std.), das HLA-Mismatch war im Vergleich zum Normalkollektiv signifikant höher (4.0 ± 1.8 vs. 2.6 ± 1.4 Mismatches/Transplantat; $p < 0,001$). Die Immunsuppression war in beiden Gruppen vergleichbar. 7 Tage nach Transplantation war die T-Zell-Alloreaktivität deutlich, aber nicht signifikant und die TNF- α Plasmakonzentration in ESP-Patienten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Ältere Patienten zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl von T-Gedächtniszellen bei gleichzeitig reduzierter Anzahl nativer T-Zellen ($p < 0,01$). Zusätzlich war die Frequenz aktivierter zytotoxischer T-Zellen signifikant erhöht (CD8+HLADR+: 21 ± 3 vs. 13 ± 1 , $p < 0,005$). Nach 6 Monaten waren die Zytokinplasmakonzentrationen sowie die Frequenz CD8+HLADR+ T-Zellen in beiden Gruppen vergleichbar. Die Anzahl von T-Gedächtniszellen blieb auch nach 6 Monaten in der ESP-Gruppe erhöht, während die Anzahl nativer T-Zellen weiterhin signifikant reduziert war ($p < 0,01$).

Zusammenfassung Diese klinischen Daten bestätigen die Hypothese einer initial ausgeprägten Immunantwort in älteren Empfängern von Nierentransplantaten älterer Spender und unterstützen das Konzept einer potenten Immunsuppression in der frühen Phase nach der Transplantation im ESP.

Abkürzungsverzeichnis

Anti-IL-2R Ab	anti-Interleukin 2 Rezeptor Antibody
ATG	Antithymozytenglobulin
APC (APZ)	Antigen presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)
CNI	Calcineurininhibitor
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (zytotoxische T-Lymphozyten)
CD	cluster of differentiation
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ESP	Eurotransplant Senior Programm
ECD	expanded criteria donors
HLA	human leukocyte antigen
ELISPOT	Enzyme - Linked Immunosorbent Spot Assay
FACS	fluorescence – activated cell sorter
IFN- γ	Interferon Gamma
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
NK	Natural Killer
n.s.	nicht signifikant
Th	T-Helper
TNF- α	Tumor Nekrosis Faktor Alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
Tx	Transplantation
TZR	T-Zell Rezeptor
Vs.	Versus
z.B.	zum Beispiel

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

Publikationsliste

Abstrakts:

1. Tullius SG, **Merk V**, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Martins PNA, Strobelt V, May G, Reinke P, Schindler R, Schönemann C, Lun A, Frei U, Neuhaus P. Altersabhängige Immunantwort nach Nierentransplantation. *Transplantationsmedizin* 2004; (suppl.): 40.
2. Pratschke J, **Merk V**, Reutzel-Selke A, Pascher A, Lun A, May G, Bold G, Reinke P, Schindler R, Frei U, Neuhaus P, Tullius SG. Older recipients of renal allografts demonstrate a strong immune response in the early period after transplantation. *Am. J. Transplant.* 2005; (suppl.).
3. Pratschke J, **Merk V**, Pascher A, Lun A, May G, Frei U, Neuhaus P, Tullius SG. Ältere Nierentransplantempfänger zeigen eine ausgeprägte Immunantwort in der frühen Phase nach der Organtransplantation. *Langenbecks Archives of Surgery* 2005; (suppl.), *Chirurgisches Forum für experimentelle und klinische Forschung* 2005.
4. **Merk V**, Pratschke J, Reutzel-Selke A, Pascher A, Lun A, Schönemann C, Ulrich F, Reinke P, Neuhaus P, Tullius SG. Age-dependent immune response after kidney transplantation from cadaver donors. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2005. Vol. 43; (suppl.).
5. Pratschke J, **Merk V**, Reutzel-Selke A, Pascher A, Lun A, May G, Reinke P, Schindler R, Frei U, Neuhaus P, Tullius SG. Older recipients of renal allografts demonstrate a strong immune response in the early period after transplantation. *Transplant International* 2005, Vol. 18; (suppl. 1):104.
6. **Merk V**, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Ulrich F, Pascher A, Reinke P, Guckelberger O, Schönemann C, Lun A, Frei U, Neuhaus P, Tullius S, Pratschke J Altersabhängige Immunantwort nach Nierentransplantation. *Transplantationsmedizin* 2006; (suppl.): 150
7. Pratschke J, **Merk V**, Reutzel-Selke A, Pascher A, Lun A, Schönemann C, Frei U, Neuhaus P, Tullius SG Potent early immune response after kidney transplantation in patients of the European senior transplant program (esp). *Transplantation.* 2006 Jul 15;82(1 Suppl 2):919-20.
8. Kotsch K, **Merk V**, Kunert K, Reutzel-Selke A, Pascher A, Volk H.-D., Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Identifikation of molekular candidate marker in zero kidney biopsies is indicative for graft quality. *Transplantationsmedizin* 2008; (suppl. II): 52

Paper:

Pratschke J, **Merk V**, Reutzel-Selke A, Pascher A, Denecke C, Lun A, Said A, Schönemann C, Ulrich F, Reinke P, Frei U, Neuhaus P, Tullius SG. Potent early immune response after kidney transplantation in patients of the European senior transplant program. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):992-1000

Eidstattliche Erklärung

Ich, Vera Merk, geb. Galimulina, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, und das die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus (Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin) für die Möglichkeit meine Promotion auf dem Gebiet der experimentellen Chirurgie anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. S.G. Tullius (Associate Professor of Surgery, Chief Division of Transplantation, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School) für die Überlassung des Dissertationsthemas, exzellente Anleitung und Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. J. Pratschke für seine hervorragende Betreuung und praktische Unterstützung.

Herrn PD Dr. A. Lun danke ich für die persönliche, fachliche und methodische Unterstützung auf tagtäglicher Basis und für die zahlreichen fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen.

Frau A. Jurisch, Frau C. Dumont, Frau P. Ellenson, Frau M. Oberreit und Herrn B. Kochinski danke ich für die methodische Anleitung und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn A. Said danke ich für seine engagierte Hilfe bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Frau Dr. A. Reutzel-Selke danke ich ganz herzlich für die wissenschaftliche und menschliche Unterstützung meiner Arbeit.

Bei den Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, CVK Frau H. Zobel, Frau S. Fischer, Frau A. Wilke, Herrn A. Abel, Frau I. Uhl sowie bei Frau Dr. C. Schönemann, Leiterin des HLA-Labors (Institut für Transfusionsmedizin, CVK) möchte ich mich für die organisatorische Unterstützung bedanken.

Frau T. Schink danke ich für die Hilfe bei der Durchführung statistischer Analysen.

Ich danke meinem Mann für die Betreuung unserer Tochter während meiner Arbeit und für seine hilfreiche Unterstützung bei jeglichen computergenerierten Problemen.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Kollegen der AG Pratschke für die gute Atmosphäre in der Gruppe und die Hilfsbereitschaft untereinander bedanken.

Literatur

Reference List

1. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation* 2002;74: 1281-1286.
2. Tarantino A, Montagnino G, Cesana B et al. Renal transplantation from older donors. *Transplant Proc* 2001;33: 3769-3770.
3. Abdul K.Abbas AHL. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 2003. Editorial Saunders. Ref Type: Generic
4. Tilney NLSTBPLC. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Ref Type: Generic
5. Lun A, Cho MY, Muller C et al. Diagnostic value of peripheral blood T-cell activation and soluble IL-2 receptor for acute rejection in liver transplantation. *Clin Chim Acta* 2002;320: 69-78.
6. Paul WE. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins. Ref Type: Generic
7. Balin SJ, Platt JL, Cascalho M. Noncognate function of B cells in transplantation. *Transpl Int* 2009;22: 593-598.

8. Balin SJ, Platt JL, Cascalho M. New insights into the functions of B cells. *Pediatr Transplant* 2008;12: 510-515.
9. Handbuch Transplantation. 2004. Medizinische Medien Informations GmbH.
Ref Type: Generic
10. Muller TF, Grebe SO, Reckzeh B, Borutta A, Radsak K, Lange H. Short- and long-term effects of polyclonal antibodies. *Transplant Proc* 1999;31: 12S-15S.
11. Mueller TF. Phenotypic changes with immunosuppression in human recipients. *Front Biosci* 2003;8: d1254-d1274.
12. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin Transplant* 1997;11: 366-372.
13. de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 1538-1546.
14. Verran DJ, deLeon C, Chui AK, Chapman JR. Factors in older cadaveric organ donors impacting on renal allograft outcome. *Clin Transplant* 2001;15: 1-5.
15. Lufft V, Kliem V, Tusch G, Dannenberg B, Brunkhorst R. Renal transplantation in older adults: is graft survival affected by age? A case control study. *Transplantation* 2000;69: 790-794.

16. Jehle A, Krapf R. [Kidney function and kidney diseases in the elderly]. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130: 398-408.
17. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 167-181.
18. Kaszubowska L. Telomere shortening and ageing of the immune system. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 9: 169-186.
19. Sidman CL, Luther EA, Marshall JD, Nguyen KA, Roopenian DC, Worthen SM. Increased expression of major histocompatibility complex antigens on lymphocytes from aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84: 7624-7628.
20. Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl* 2001; 1-18.
21. Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry 2003. *Clin Transpl* 2003; 1-12.
22. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 2005;205: 257-268.
23. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K et al. Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 2002;127: 107-114.

24. Maue AC, Eaton SM, Lanthier PA, Sweet KB, Blumerman SL, Haynes L. Proinflammatory adjuvants enhance the cognate helper activity of aged CD4 T cells. *J Immunol* 2009;182: 6129-6135.
25. Martins PN, Pratschke J, Pascher A et al. Age and immune response in organ transplantation. *Transplantation* 2005;79: 127-132.
26. Bradley BA. Rejection and recipient age. *Transpl Immunol* 2002;10: 125-132.
27. Cecka JM, Terasaki PI. Optimal use for older donor kidneys: older recipients. *Transplant Proc* 1995;27: 801-802.
28. Waiser J, Schreiber M, Budde K et al. Age-matching in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15: 696-700.
29. Tesi RJ, Elkhammas EA, Davies EA, Henry ML, Ferguson RM. Renal transplantation in older people. *Lancet* 1994;343: 461-464.
30. Mallick NP, Dyer P, Johnson RW. Transplantation in the elderly. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11 Suppl 9: 95-97.
31. Kasiske BL, Snyder J. Matching older kidneys with older patients does not improve allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 1067-1072.
32. Liu S, Lutz J, Antus B et al. Recipient age and weight affect chronic renal allograft rejection in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 1742-1749.

33. Pascher A, Reutzel-Selke A, Jurisch A et al. Alterations of the immune response with increasing recipient age are associated with reduced long-term organ graft function of rat kidney allografts. *Transplantation* 2003;76: 1560-1568.
34. Pascher A, Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. Modifications of immune regulations with increasing donor & recipient age. *Ann Transplant* 2004;9: 72-73.
35. Reutzel-Selke A, Filatenkov A, Jurisch A et al. Grafts from elderly donors elicit a stronger immune response in the early period posttransplantation: a study in a rat model. *Transplant Proc* 2005;37: 382-383.
36. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM et al. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 2000;70: 306-310.
37. Fritsche L, Horstrup J, Budde K et al. Old-for-old kidney allocation allows successful expansion of the donor and recipient pool. *Am J Transplant* 2003;3: 1434-1439.
38. Voiculescu A, Schlieper G, Hetzel GR et al. Kidney transplantation in the elderly: age-matching as compared to HLA-matching: a single center experience. *Transplantation* 2002;73: 1356-1359.
39. Giessing M, Conrad S, Schonberger B et al. [Kidney donors and kidney transplantation in the elderly]. *Urologe A* 2004;43: 947-954.

40. Grinyo JM, Gil-Vernet S, Seron D et al. Primary immunosuppression with mycophenolate mofetil and antithymocyte globulin for kidney transplant recipients of a suboptimal graft. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 2601-2604.
41. Theodorakis J, Schneeberger H, Illner WD, Stangl M, Zanker B, Land W. Nephrotoxicity-free, mycophenolate mofetil-based induction/maintenance immunosuppression in elderly recipients of renal allografts from elderly cadaveric donors. *Transplant Proc* 2000;32: 9S-11S.
42. Ordemann R, Hutchinson R, Friedman J et al. Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002;109: 1249-1256.
43. Jassal SV, Krahn MD, Naglie G et al. Kidney transplantation in the elderly: a decision analysis. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 187-196.
44. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 1859-1865.
45. Smits JM, Persijn GG, van Houwelingen HC, Claas FH, Frei U. Evaluation of the Eurotransplant Senior Program. The results of the first year. *Am J Transplant* 2002;2: 664-670.
46. Gaber LW. Borderline changes in the Banff schema: rejection or no rejection? *Transplant Proc* 2004;36: 755-757.

47. Bradley BA. Does the risk of acute rejection really decrease with increasing recipient age? *Transpl Int* 2000;13 Suppl 1: S42-S44.
48. Alamartine E, Sabido O, Berthoux FC. The influence of prophylactic immunosuppressive regimens on natural killer and lymphokine-activated killer cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 1990;50: 969-973.
49. Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T. Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transpl Immunol* 1996;4: 64-67.
50. Kamar N, Glander P, Nolting J et al. Effect of mycophenolate mofetil monotherapy on T-cell functions and inosine monophosphate dehydrogenase activity in patients undergoing a kidney transplantation. *Transplant Proc* 2006;38: 2292-2294.
51. Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol* 2000;165: 2374-2381.
52. Weigel G, Griesmacher A, Karimi A, Zuckermann AO, Grimm M, Mueller MM. Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002;21: 1074-1079.
53. Izeradjene K, Revillard JP. Apoptosis of superantigen-activated T cells induced by mycophenolate mofetil treatment. *Transplantation* 2001;71: 118-125.

54. Praditpornsilpa K, Avihingsanon Y, Kupatawintu P et al. Monitoring of T-cell subsets in patients treated with anti-CD 25 antibody. *Transplant Proc* 2004;36: 487S-491S.
55. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* 1996;15: 435-442.
56. Galante NZ, Camara NO, Kallas EG, Salomao R, Pacheco-Silva A. Modulation of peripheral blood T-lymphocytes in kidney transplant recipients treated with low dose OKT3 therapy. *Immunol Lett* 2004;91: 75-77.
57. Hale G. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. *Cytotherapy* 2001;3: 137-143.
58. Shah A, Lowenstein H, Chant A, Khan A. CD52 ligation induces CD4 and CD8 down modulation in vivo and in vitro. *Transpl Int* 2006;19: 749-758.
59. Lowenstein H, Shah A, Chant A, Khan A. Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transpl Int* 2006;19: 927-936.
60. Watson CJ, Bradley JA, Friend PJ et al. Alemtuzumab (CAMPATH 1H) induction therapy in cadaveric kidney transplantation--efficacy and safety at five years. *Am J Transplant* 2005;5: 1347-1353.
61. Esposito L, Kamar N, Tkaczuk J, Abbal M, Durand D, Rostaing L. Long-term evolution of lymphocytes subsets after induction therapy based on continuous versus discontinuous

- administration of anti-thymocyte globulins in renal-transplant patients. *Transplant Proc* 2005;37: 785-787.
62. Preville X, Flacher M, LeMauff B et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 2001;71: 460-468.
63. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997;89: 3700-3707.
64. Whitmire JK, Ahmed R. The economy of T-cell memory: CD4+ recession in times of CD8+ stability? *Nat Med* 2001;7: 892-893.
65. Grubeck-Loebenstien B. Changes in the aging immune system. *Biologicals* 1997;25: 205-208.
66. Wick G, Grubeck-Loebenstien B. Immunity and aging. *Dev Comp Immunol* 1997;21: 455-460.
67. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007;211: 144-156.
68. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 2004;76: 291-299.

69. Weksler ME. Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine* 2000;18: 1624-1628.
70. Soares TF, Rocha GA, Rocha AM et al. Phenotypic study of peripheral blood lymphocytes and humoral immune response in *Helicobacter pylori* infection according to age. *Scand J Immunol* 2005;62: 63-70.
71. Born J, Uthgenannt D, Dodt C et al. Cytokine production and lymphocyte subpopulations in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech Ageing Dev* 1995;84: 113-126.
72. Reutzel-Selke A J. Donor age intensifies the early immune response after transplantation. *Kidney Int* 2007.
73. Castle SC, Uyemura K, Crawford W, Wong W, Makinodan T. Antigen presenting cell function is enhanced in healthy elderly. *Mech Ageing Dev* 1999;107: 137-145.
74. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22: 745-763.
75. Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol* 2000;20: 250-256.
76. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007;120: 435-446.

77. Heitger A, Neu N, Kern H et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90: 850-857.
78. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 1999;163: 2267-2275.
79. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2003;3: 878-884.
80. Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A et al. Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant* 2002;2: 857-866.
81. Nickel P, Presber F, Bold G et al. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 2004;78: 1640-1646.
82. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004;39: 687-699.

83. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* 2000;51: 245-270.
84. Bruunsgaard H. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. *Eur Cytokine Netw* 2002;13: 389-391.
85. Bathgate AJ, Lee P, Hayes PC, Simpson KJ. Pretransplantation tumor necrosis factor-alpha production predicts acute rejection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000;6: 721-727.
86. Rysz J. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cellular & molecular immunology* 6 A.D.;3: 151-154.
87. Wong CSCMLCLPLC. Elevation of pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and cardiac troponin T in chronic renal failure patients on dialysis. *Immunol Invest* 2007;36: 47-57.
88. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM et al. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation* 2001;72: 660-665.
89. Dorge SE, Roux-Lombard P, Dayer JM, Koch KM, Frei U, Lonnemann G. Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1994;58: 1000-1008.

90. Hill GR, Teshima T, Rebel VI et al. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 2000;164: 656-663.
91. Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Chirurg* 2000;71: 159-165.
92. Hoflich C, Volk HD. [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg* 2002;73: 1100-1104.
93. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195: 603-616.
94. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005;77: 3-15.
95. Heper Y, Akalin EH, Mistik R et al. Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25: 481-491.
96. Monneret G, Finck ME, Venet F et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004;95: 193-198.

97. Allen ML, Hoschtitzky JA, Peters MJ et al. Interleukin-10 and its role in clinical immunoparalysis following pediatric cardiac surgery. *Crit Care Med* 2006;34: 2658-2665.
98. Wunder C, Eichelbronner O, Roewer N. Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res* 2004;53: 158-163.
99. Stanilova SA, Karakolev ZT, Dimov GS et al. High interleukin 12 and low interleukin 10 production after in vitro stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med* 2005;31: 401-407.
100. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 2004;113: 281-292.
101. Hara M, Kingsley CI, Niimi M et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001;166: 3789-3796.
102. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal MR, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166: 5530-5539.
103. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004;114: 1398-1403.

104. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2007;17: 120-129.
105. Salgar SK, Yang D, Ruiz P, Miller J, Tzakis AG. Viral interleukin-10 gene therapy to induce tolerance to solid organ transplants in mice. *Transplant Proc* 2004;36: 397-398.
106. Fujisawa K, Saito S, Okada Y et al. Suppression of allogeneic response by viral IL-10 gene transfer. *Cell Transplant* 2003;12: 379-387.
107. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 2006;55: 40-49.
108. Leivestad T, Reisaeter AV, Brekke IB, Vartdal F, Thorsby E. The role of HLA matching in renal transplantation: experience from one center. *Rev Immunogenet* 1999;1: 343-350.
109. Martins L, Fonseca I, Sousa S et al. The influence of HLA mismatches and immunosuppression on kidney graft survival: an analysis of more than 1300 patients. *Transplant Proc* 2007;39: 2489-2493.
110. Panigrahi A, Agarwal SK, Kanga U et al. Influence of HLA compatibility on renal graft survival using live unrelated & cadaver donors in India. *Indian J Med Res* 2002;115: 158-164.

111. Terasaki PI. The HLA-matching effect in different cohorts of kidney transplant recipients. *Clin Transpl* 2000; 497-514.