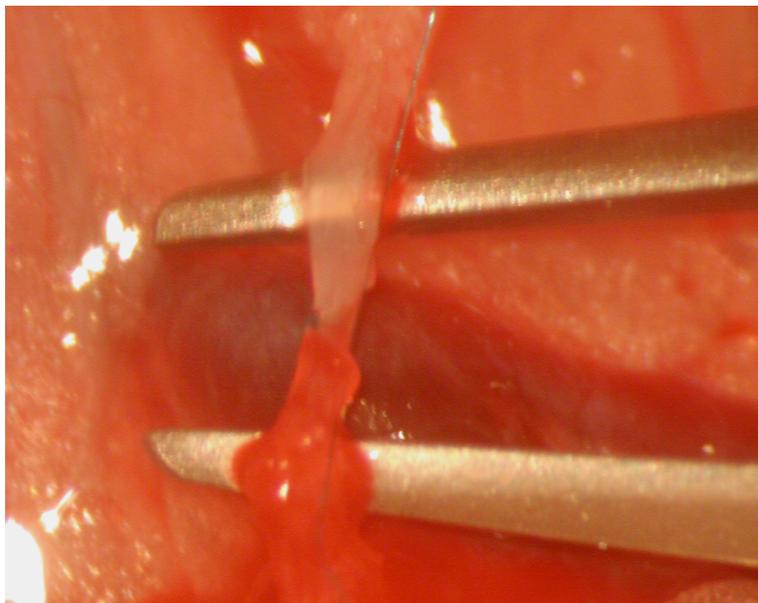


**Abbildung 9.** Anastomosen der Arteria (oben) und Vena renalis (unten) unmittelbar nach Reperfusion; rechter Bildrand: Spenderniere. Links erkennbar: Ligatur einer abgesetzten akzessorischen Arterie. (Vergr. 16-fach).

wurde abschließend im Abstand von 1-2 Pinzettenspitzen zur Vene mit dem freien Ende des anderen Eckknotens verknötet. Die Gefäßklemmen wurden anschließend gelöst. Bis die Blutung nach ca. einer Minute sistierte, wurden die Nähte zwischen zwei Wattetupfern sanft komprimiert. Bei erfolgreicher Reperfusion begann die Niere nach ca. 2 Minuten mit sichtbarer Harnproduktion.



**Abbildung 8.** Enden von Spender- (oben) und Empfängerureter (unten) zw. Branchen des Mikronadelhalters. Linker Eckknoten gesetzt, rechter Faden vorgelegt. (Vergr. 40-fach).

chen und der Faden nach innen verbracht.

Der Verschluss der Hinterwand erfolgte mit 3-4 Stichen in Richtung des ersten Eckknotens. Dort wurde das Gefäß nach außen durchstoßen und die Vorderwand im selben Verfahren verschlossen. Zur Vermeidung von Stenosen wurde die Anastomose vor dem Verknöten durch vorsichtigen Zug an beiden Eckknoten auf ihren Maximaldurchmesser geweitet.

Das freie Ende des Fadens wurde abschließend im Abstand von 1-2 Pinzettenspitzen zur Vene mit dem freien Ende des anderen Eckknotens verknötet. Die Gefäßklemmen wurden anschließend gelöst. Bis die Blutung nach ca. einer Minute sistierte, wurden die Nähte zwischen zwei Wattetupfern sanft komprimiert. Bei erfolgreicher Reperfusion begann die Niere nach ca. 2 Minuten mit sichtbarer Harnproduktion.

Ebenfalls mit 10-0 Faden erfolgte die End-zu-End-Anastomose des Ureters (4-5 Einzelnähte). Durch Beobachtung von Peristaltik und Harnfortleitung wurde die Durchlässigkeit der Anastomose intraoperativ sichergestellt.

Nach Fertigstellung aller Anastomosen wurde das Darmpaket rückverlagert. Der Situs wurde gespült und eventuelle Koagel entfernt. Zur Substitution des intraoperativen Volumenverlustes wurden 5 ml steriler, körperwarmer 0,9%iger NaCl-Lösung in die freie Bauchhöhle gegeben. Abschließend wurde die Bauchwunde mit resorbierbarem, geflochtenem Faden der Stärke 4-0 in zwei Schichten mit fortlaufender Naht verschlossen.

#### **3.6.5. Kontralaterale Nephrektomie des Empfängers**

Zur Funktionsbeurteilung des Transplantates wurden die Empfänger analog zum oben beschriebenen Verfahren kontralateral nephrektomiert. Den Empfehlungen des Schrifttums folgend geschah dies am dritten postoperativen Tag (95, 98, 99).

In situ wurden bei dieser Gelegenheit die Perfusion der Spenderniere anhand von Konsistenz und Farbe beurteilt, und die Anastomosen auf hämodynamisch relevante Stenosen kontrolliert. Ebenso wurden Dichtigkeit und Durchlässigkeit des Ureters eingeschätzt und die Harnwege auf eine eventuelle Stauung überprüft.

Anschließend wurden Arteria und Vena renalis der rechten Niere dargestellt und beide Gefäße mit 6/0 Seide aortennah ligiert und durchtrennt. Mit separater Ligatur wurde der Ureter im mittleren Drittel unterbunden und abgesetzt. Die Niere wurde schließlich aus ihrem Fettlager entnommen und die Bauchwunde verschlossen.

#### **3.6.6. CTLA4-Ig-Applikation und adoptiver Zelltransfer**

Den Empfängertieren der ersten Stufe wurde an Tag 2 post-OP eine Einzeldosis von 0,5mg CTLA4-Ig (gelöst in 0,5 ml einer 0,9%igen NaCl-Lsg.) intra-peritoneal injiziert.

Den bestrahlten (leukozytäm) Ratten der zweiten Stufe wurden einen Tag vor NTx Leukozyten der Erst-Empfänger transfiziert. Die hierfür hergestellte Leukozytensuspension (siehe unten) wurde intra-peritoneal injiziert.

Beide Behandlungen geschahen in kurzer Inhalationsnarkose.

#### **3.6.7. Probenentnahme bei Tötung des Empfängers**

Den Tieren wurden am Ende der Beobachtungszeiträume Transplantat, Milz, 5-6 niereennahe Lymphknoten und eine Blutprobe entnommen.

Die Vorbereitung des Situs bis zur Applikation der Perfusionslösung erfolgte analog zum oben beschriebenen Explantationsverfahren. Nach Punktion der Aorta wurde über die Kanüle ca. 2 ml Blut in eine Heparin-Monovette entnommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Anschließend wurde in situ mit 30 ml einer sterilen, 4°C kalten 0,9%igen Kochsalzlösung perfundiert.

Die Niere wurden entnommen, von Kapsel und Gefäßstümpfen befreit, und in einer Petrischale mit dem Skalpell längs geviertelt. Drei Viertel wurden in separaten Gefäßen schockgefroren; das vierte in 4%iger Formalinlösung fixiert. Darauf hin wurde die Milz entnommen und von ihrer Kapsel und fibrösen Fasern befreit. Abschließend wurden 5-6 nierennahe Lymphknoten unter dem Operationsmikroskop aufgesucht und entnommen. Milz und Lymphknoten wurden bis zur Weiterverarbeitung -binnen einer Stunde- in RPMI-Medium (eisgekühlt) gelagert.

#### **3.7. Auswertungsverfahren**

##### **3.7.1. Messung der Proteinurie und des Urin-Kreatininspiegels**

Von Erstempfängern (Gruppen I/1 und I/2) wurde an den postoperativen Tagen 14, 30, 60 und 90 im metabolischen Käfig 24h-Sammelurin gewonnen. Im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité wurden hieraus die Proteinurie (Benzethoniumchloridreaktion; Hitachi 911 Analyzer) und der Urin-Kreatininspiegel (modifizierte Jaffé-Reaktion) nach zertifiziertem Standard ermittelt (100).

##### **3.7.2. Bestimmung der Kreatinin-Clearance**

Zu den genannten Zeitpunkten (→ 3.6.1.) wurde den Ratten unter Inhalationsnarkose zur Blutentnahme die laterale Schwanzvene punktiert (101). Je 1 ml Blut wurden in Heparin- bzw. EDTA-Monovetten entnommen. Im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité wurden mittels modifizierter Jaffé-Reaktion nach Bartels et al. (Hitachi 917 Analyzer) die Serum-Kreatininspiegel bestimmt (102). Mit den ermittelten Werten wurde die Kreatinin-Clearance (C) als Maß der glomerulären Filtrationsrate nach folgender Formel errechnet:

$$C(\text{ml}/\text{min}) = \frac{\text{Urinkreatinin}(\text{mg}/\text{dl}) \times \text{Urinvolumen}(\text{ml})}{\text{Serumkreatinin}(\text{mg}/\text{dl}) \times \text{Urinsammelzeit}(\text{min})}$$

### 3.7.3. Leukozytenisolation für FACS, ELISA, Elispot und Zelltransfer

Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden die Versuchstiere getötet und Proben von Niere, Milz, Lymphknoten und Blut entnommen. Aus den Organproben der Erst-Empfänger (Stufe I) wurden Leukozyten für die FACS- Analyse isoliert. Aus den entnommenen Milzen wurde zusätzlich eine Leukozytensuspension für den adoptiven Zelltransfer gewonnen. Aus den Proben der Zweit-Empfänger (Gruppen II/1 und II/2) wurden Leukozyten für die Analyse mittels FACS, ELISA und Elispot isoliert.

Unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) wurden die soliden Organe mechanisch und durch Zugabe von Kollagenase in RPMI-Medium zerkleinert und gelöst. Diese Lösungen wurden durch das Zellsieb filtriert. Die Blutprobe wurde durch Lyse von Erythrozyten befreit. Alle Lösungen wurden dreimal gewaschen. Die Zelllösung der Niere wurde zur höheren Aufreinigung zusätzlich ficolliert (2400 U/min, 20°C, 30 min). Nach letztmaligem Waschen wurden die Überstände verworfen und die Leukozytenpellets in RPMI/FCS-Medium suspendiert. Eine Ausnahme bildete das Pellet für den Zelltransfer: Es wurde in PBS-Lösung suspendiert.

Für die Verwendung bei FACS und ELISPOT wurden die Zellkonzentration der Suspension auf  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt; für die Verwendung zum ELISA auf  $1,5 \times 10^7$ /ml. Bei der Suspension für den adoptiven Zelltransfer wurde eine Leukozytenkonzentration von  $1 \times 10^8$ /ml angestrebt. Zur Einstellung wurde eine Probe der jeweiligen Suspension in Trypanblau-Lsg. gefärbt und in der Neubauerkammer ausgezählt (10 µl Suspension in 990 µl Typanblau-Lsg). Mit dem Zählergebnis wurde die Ausgangskonzentration der Stammsuspension errechnet und mit RPMI/FCS-Medium auf die erwünschte Konzentration verdünnt.

### 3.7.4. Histomorphologische Färbung

Das formalinfixierte Nierenbiopsat wurde in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration entwässert und in Paraffin eingebettet. Auf einem Mikrotom wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und in gängigem Verfahren mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte anhand der etablierten Banff-Klassifikation durch Bewertung der Grade an tubulärer Atrophie, interstitieller Fibrose, zellulärer Infiltration sowie Glomerulo- und Arteriosklerose (103, 104). Dabei hatte der Untersucher keine Kenntnis von der Zugehörigkeit der Organe zu den Versuchsgruppen.

Die Schweregrade zellulärer Infiltration, tubulärer Atrophie, interstitieller Fibrose und der Atherosklerose wurde auf einer Skala von 0 bis 5 eingestuft (0=keine morphologischen Veränderungen; 5 =stärkste strukturelle Schäden). Je Schnitt wurden 20 Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet.

Der Grad an Glomerulosklerose wurde als Prozentwert nach folgender Formel bestimmt: Anzahl sklerotischer Glomeruli/Gesamtzahl der Glomeruli.

#### **3.7.5. Immunhistochemische Färbung**

Aus den cryokonservierten Nierenanteilen wurden immunhistochemische Präparate nach der von Cordell beschriebenen APAAP-Methode angefertigt (105).

Mit dem Cryotom wurden je Präparat 8-10 Gefrierschnitte von 4 µm Dicke gemacht. Die Schnitte wurden nach zehnmütiger Fixierung in Aceton 24 Stunden luftgetrocknet und bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Der Färbung ging eine Präinkubation mit Normal-Kaninchenserum (Kaninchen Anti-Maus) zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung voraus. Anschließend wurde mit folgenden monoklonalen Primärantikörpern (Maus Anti-Ratte) inkubiert: CD4 (Klon W3/25), CD8 (Klon OX-8), CD25 (Klon OX-39), ED1, OX62 (Klon OX-62) und RT1Bu (Klon OX3). Es folgte die Inkubation mit Brückenantikörpern (Kaninchen Anti-Maus-IgG) und die Aufbringung des APAAP-Komplexes. Schließlich wurden die Immunkomplexe mit Neu-Fuchsin-Substrat (Naphtol-AS-Biphosphat als Substrat und Neu-Fuchsin als Bindungsagens) visualisiert und H&E-gegengefärbt. Der Schnitt wurde abschließend auf einem Objektträger in Glyceringelatine gedeckelt.

#### **3.7.6. Durchflusszytometrische Untersuchung (FACS)**

Nach zuvor beschriebenem Verfahren wurden aus den entnommenen Organen Leukozytensuspensionen gewonnen. Die enthaltenen Zellen wurden im FACS hinsichtlich ihrer Expression folgender Oberflächenantigene analysiert: CD3 (Klon IF4), CD4 (Klon W3/25), CD25 (Klon OX-39), CD86 (Klon 24F), OX62 (Klon OX-62), RT1A<sup>ab</sup> (Klon C3) und MHC II (Ia Antigen; Klon RT1B).

Das von Hulett und Bonner beschriebene Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Erkennung unterschiedlicher Zellfluoreszenzen nach Fluorchromfärbung (106, 107):

Die Bindung der Fluochrome geschieht mittels fluorchrom-gekoppelter monoklonaler Fc-Antikörperfragmente gegen die gesuchten Oberflächenantigene. Fluochrome absorbieren laseremittierte Photonen bestimmter Wellenlänge. In Folge der energetischen Anregung erhöht sich kurzzeitig das Energieniveau ihrer Hüllenelektronen. Bei der Rückkehr der Elektronen auf ihre energieärmeren Ausgangsbahnen emittieren sie Licht molekulspezifischer Wellenlänge, das vom FACS-Gerät registriert wird. Im vorliegenden Fall dienen ein Argon- ( $\lambda=488$  nm) und ein Helium-Neon-Laser ( $\lambda=635$  nm) als Photonenquelle. Als Fluochrome wurden verwendet: Fluoreszeinisothiocyanat (FITC;  $\lambda=530$  nm (grün)), Phycoerythrin (PE;  $\lambda=578$  nm (gelb)), Allophycocyanin (APC;  $\lambda=650$  nm (rot)), Peridinin Chlorophyllprotein (PerCP;  $\lambda=482$  nm (rot)).

#### **3.7.6.1. Färbung von CD3, CD4, CD25**

Leukozyten aus der Milz-, Nieren-, Lymphknoten und Blutsuspension wurden im FACS auf die Expression von CD3, CD4 und CD25 untersucht.

Die Zellkonzentration der Suspension wurde nach Trypanblau-Färbung in der Neubauerkammer bestimmt und mit RPMI/FCS-Medium auf  $5 \times 10^6$ /ml verdünnt. Für jeden Färbeansatz wurden 400  $\mu$ l Suspension verwendet. Zur direkten Färbung der Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD25 wurde mit folgenden Fluochrom-Ab inkubiert (je 0,5  $\mu$ l; 30 min, 4°C) und anschließend zweimal mit PBS-Lsg. gewaschen: CD3-FITC, CD4-APC und CD25-PE. Durch Zugabe von Paraformaldehyd-Lsg (1 ml, 15 min, 4°C) wurden die Leukozyten fixiert und ihre Membranen stabilisiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen entfernt und die Pellets der gefärbten Zellen nach dem letzten Waschgang in FACS-Pufferlösung (2 ml) suspendiert.

#### **3.7.6.2. Färbung von MHC II, CD86, OX62 und RT1A<sup>ab</sup>**

Leukozyten aus Milz-, Nieren-, Lymphknoten- und Blutsuspension wurden für die Messung von MHC II, CD86, OX62 und RT1A<sup>ab</sup> im FACS aufbereitet.

Die Zellkonzentration der Suspension wurde nach Trypanblau-Färbung in der Neubauerkammer bestimmt und mit RPMI/FCS-Medium auf  $5 \times 10^6$ /ml verdünnt. Pro Färbung wurden 400  $\mu$ l Suspension angesetzt und mit FACS-Puffer gewaschen (2 ml; 1200 U/min; 4°C). Zur direkten Färbung von CD86, OX62 und MHC-II wurden die Ansätze mit

folgenden fluorchrom-konjugierten Anti-Ratte-Antikörpern inkubiert (je 0,5 µl; 30 min, 4°C): CD86-FITC, OX62-PE und MHC-II-PerCP. Als erster Schritt der indirekten Färbung von RT1A<sup>ab</sup> wurden alle Ansätze gleichzeitig mit RT1A<sup>ab</sup>-Biotin inkubiert (je 0,5 µl; 30 min, 4°C). Nach Inkubation wurde mit FACS-Pufferlösung gewaschen. Zum Abschluss der indirekten Färbung von RT1A<sup>ab</sup> wurde ein Streptavidin-APC-Komplex (0,5 µl) hinzugegeben, der bei nochmaliger Inkubation aller Proben an Biotin bindet (30 min, 4°C). Durch Zugabe einprozentiger Paraformaldehyd-Lsg (1 ml; 4°C) für 15 Minuten wurden die Leukozyten anschließend fixiert. Alle überschüssigen Antikörper wurden durch Waschen der Ansätze entfernt und das Pellet der gefärbten Zellen nach dem letzten Waschgang in FACS-Pufferlösung suspendiert.

### 3.7.6.3. Messung im FACS-Gerät

Vor Probenmessung wurde die Fluoreszenzabgrenzung im FACS mit Postiv-Kontrollen der Fluorochrome (FITC, PE, APC, PerCP) kalibriert. Anschließend wurden jeweils 2.000.000 Zellen der Zellsuspensionen und zeitgleich angesetzter Negativkontrollen (Maus Anti-Ratte-IgG) im FACS gemessen. Ein Macintosh-PC erfasste die gemessenen Durchmesser ( $\cong$ FSC) und Granularitäten ( $\cong$ SSC) der Zellen und gab sie im Boxplot wieder. Die Häufigkeit der jeweiligen Fluoreszenz wurde in einem Histogramm wiedergegeben.

### 3.7.7. ELISA von IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , und IFN- $\gamma$

Mit etablierten ELISA-Verfahren (*Enzyme linked immunosorbent essay*) wurde das relative Expressionsniveau der Zytokine IL-4, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . bestimmt.

Zur Messung wurden die Leukozyten der Milzsuspension verwendet. Um das relative Expressionsniveau auf Nachweisniveau zu erhöhen, wurden die Leukozyten mit Mitogenen unspezifisch stimuliert. Dazu wurden jeweils 0,5 ml der Suspension im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>; 37°C) inkubiert:

für IL-4	mit 2 µl PMA / Ionomycin	für 24 h
für IFN- $\gamma$	mit 5 µl ConA	für 5 h
für IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$	mit 10 µl LPS	für 5 h.

Mit den Zellkulturüberständen der stimulierten Leukozyten wurde ein kommerzieller ELISA-Test (OptEIA™, Becton Dickinson) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die abschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung (Lambert-Beersches Gesetz) im automatisierten ELISA-Photometer mit zugehöriger Software.

### 3.7.8. ELISPOT-Assay von IFN- $\gamma$

Das ELISPOT-Assay ist ein etablierter, hoch spezifischer und sensibler Test zur IFN- $\gamma$ -Detektion (108, 109). Die leukozytäre IFN- $\gamma$ -Expression ist Ausdruck antigenspezifischer T-Zell-Aktivierung. Die nach spenderspezifischer Stimulation sezernierten IFN- $\gamma$ -Moleküle werden im ELISPOT von zuvor aufgebrauchten Antikörpern in unmittelbarer Umgebung zur produzierenden Zelle eingefangen und immunchemisch als Punkt (Spot) sichtbar gemacht. Eine Spot Forming Unit (SFU) repräsentiert somit eine IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zelle.

Für den ELISPOT wurde die Leukozytensuspension der Milz verwendet. Zur Stimulation der IFN- $\gamma$ -Bildung durch T-Zellen des Empfängers musste spenderspezifisches Antigen (Proteine der Spenderratten vom DA-Stamm) zugesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde analog zum oben beschriebenen Verfahren eine Suspension aus Milzleukozyten einer DA-Ratte gewonnen (Stimulatorsuspension) und folgende Ansätze für den ELISPOT hergestellt:

- Negativ-Kontrolle: 100  $\mu$ l Suspension + 100  $\mu$ l RPMI/FCS-Lsg.
- Positiv-Kontrolle: 100  $\mu$ l Suspension + 100  $\mu$ l PMA/Ionomycin-Lsg.
- Spezifische Stimulation: 100  $\mu$ l Suspension + 100  $\mu$ l Stimulatorsuspension

Nach dem gängigen, von Valujskikh und Heeger beschriebenen Prinzip, wird der ELISPOT mit dem Protokoll in untenstehender Tabelle durchgeführt (110). Pro Well werden dabei 100  $\mu$ l Reagenz vorgelegt.

Protokoll des INF- $\gamma$ -ELISPOT-Essay		
Schritt	Reagenz	Inkubation
1 Aktivierung	Ethanol (70%)	10 min, Raumtemperatur
2 3x waschen	PBS	
3 Capture-AK auftragen	100 $\mu$ l AK in 10 ml PBS	12 h 4°C
4 Waschen	PBS	
5 Blocken	Skimmed dry milk-Lsg.	2 h, Raumtemperatur

6	Waschen	PBS	
7	Ansätze auftragen (siehe oben)		24 h, 37°C
8	Ausklopfen		
9	AK auswaschen	PBS/Tween-Lsg.	10 min, 4°C
10	3x waschen		
11	Detection-AK auftr.	100 µl AK in 10 ml PBS/BSA-Lsg.	1,5 h, 37°C, dann:
12	3x waschen	PBS	1,5 h Raumtemp.
13	Vor-Färbung	Strept.-Alk.-Phosphatase	45 min, 37°C
14	3x waschen	PBS	
15	Färbung	BCIP/NTB	4 min, Raumtemp
16	3x waschen	Aqua dest.	
17	Trocknen		

**Tabelle 1.** Protokoll des IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay

Die Spot-Messung der trockenen Platten erfolgte mit computergestütztem ELISPOT-Analyser (BIO-SYS, Karben, Deutschland). Er erfasste die Spots digital und errechnete die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender spenderreaktiver T-Zellen (IFN- $\gamma$ -Spots) nach folgendem Prinzip:  $\text{IFN-}\gamma\text{-Spots} = (\text{Anzahl Spots in Wells mit Suspension UND Stimulator-suspension}) - [(\text{Anzahl Spots in Wells mit Suspension}) + (\text{Anzahl Spots in Wells mit Stimulatorsuspension})]$ .

### 3.7.9. Statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden mit gängigen Verfahren der deskriptiven Statistik elektronisch ausgewertet und dargestellt. Alle Daten wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  mittlerer Standardfehler ausgedrückt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $< 0,05$  angesehen. In Abhängigkeit von der Datenskalisierung kamen unterschiedliche analytische Test zur Anwendung: Kumulative Überlebensraten und die mittlere Überlebenszeit wurden nach Kaplan-Meier dargestellt und mit dem Log-Rank-Test auf Signifikanz überprüft (111, 112). Dabei wurde die Statistiksoftware SPSS Version 14 verwendet.

Die Signifikanzprüfung der Daten von Proteinurie, Kreatininspiegel, Clearance, Immunhistochemie, Histomorphologie, FACS, ELISPOT und ELISA erfolgte mittels Students T-Test bzw. Mann-Whitney U-Test (nicht parametrische Werte) und Berechnung eines zweiseitigen p-Wertes (113). Für diese Verfahren wurde die Software GraphPad InStat Version 3.0 verwendet.

### 3.8. Material

Alle verwendeten Materialien sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

<b>Geräte und Instrumente</b>	
<b>OP-Instrumente</b>	
Operationsmikroskop (Model M690)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Präparierschere (Modell No. 14519-14)	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikropinzetten (Model No. 11252-40)	“
Mikroschere (Model No. 15020-15)	“
Mikrogefäßklemmen (Model No. 18320-11)	“
Mikronadelhalter (Model 80-2003)	Codman, Norderstedt, Deutschland „
Narkosezylinder / -maske	Eigenbau
<b>Laborgeräte</b>	
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrotom (HM 400)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tischmikroskop (EX41)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Cryotom (HM 500 OM)	Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
Durchflusszytometer (FACSCalibur® II)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Macintosh PC	Apple Corporation, Cupertino, CA, USA
FACS®-Software (CellQuest® Pro ver. 5.2.1)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ELISA-Photometer (Fluostar Galaxy®)	BMG, Offenburg, Deutschland
ELISA-Software(Fluostar Galaxy® Ver. 4.21-0)	BMG, Offenburg, Deutschland
ELISPOT-Analyser	BIO-SYS, Karben, Deutschland
pH-Meter (CG840)	Schott, Mainz, Deutschland
pH-Sonde (52000102)	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Feinwaage (AC121A)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Statistiksoftware SPSS®, Ver. 14	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Statistiksoftware GraphPad InStat®, Ver. 3.0	Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA

**Tabelle 2.** Aufstellung der verwendeten Geräte und Instrumente

<b>Verbrauchsmaterial</b>	
Faden USP 10-0 (Prolene®) / 4-0 (Vicryl®)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Seide, 6/0 „E“	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Venenverweilkanüle (REF 393204)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Kunststoffröhrchen, 14 ml (Falcon®-Tube)	“
Spritzen und Kanülen, versch. Größe	“
Kompressen 10x10 cm	Lohmann Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Li-Heparin-Monovette, 5,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cryogefäß, 1,8ml (Nalgene® Cryogenic Vial)	Nalgene Nunc, Rochester, NY, USA
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Blut-/Urinmonovetten, 5,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cryoschnitt-Medium	Killik, Mailand, Italien
DAKO-Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
ELISPOT-Platte, 96 Wells, 45 µm Poren (Multiscreen-IP®; Nr. MAIPS4510)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
ELISA-Platten, Module je 16 Wells (F16 Maxisorp Loose®; Nr. 469914)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellsieb, 40 µm (Falcon® Cell Strainer)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Pharmaka</b>	
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
0,9%ige NaCl-Lösung, steril	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Pentazocin (Fortral®)	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland

Heparin (Liquemin®)	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
UW-Lösung (ViaSpan®)	DuPont, Bad Homburg, Deutschland
<b>Allgemeine Reagenzien und Lösungen</b>	
Ethanol, 100 Vol%, denaturiert	Herbeta, Berlin, Deutschland
Aceton, pro analysi	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Fomaldehyd-Lösung, 4%, gepuffert	Herbeta, Berlin, Deutschland
Paraffin (Kendall Paraplast Plus®)	Tyco, Mansfield, MA, USA
Flüssiger Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Linde, Wiesbaden, Deutschland
<i>Das RPMI-Medium enthält:</i> RPMI-Lösung (RPMI 1640), 500 ml Natriumpyruvat (MEM 100MM), 5 ml Non essential amino acids, 15 ml L-Glutamin, 5 ml Pen-Strep, 5 ml β-Mercaptoethanol (0,25m), 1 ml	PAA, Pasching, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA “ “ Biochrome, Cambridge, Großbritannien Biosciences, La Jolla, CA, USA
<i>Die RPMI/FCS-Lösung enthält:</i> RPMI-Medium wie oben beschrieben, 100 ml FCS, 10ml (Nr. (10106-169))	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Die PBS-Lösung enthält</i> Aqua dest., 1000 ml D-PBS (10x), 10 ml (Nr. 14200-067)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>Reagenzien und Lösungen H&amp;E-Färbung</b>	
Hämatoxylin-Lösung (Nr. HHS32-1L)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin-Lösung	“
Kaisers Glyceringelatine (Nr. 1.09242.0100)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Der Waschpuffer enthält:</i> Trizma® Base (Nr. T-1503), 0,9 g Trizma® Hydrochlorid (Nr. 3253), 6,85 g Natriumchlorid, 8,78 g Aqua dest., 1 l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland “ Merck, Darmstadt, Deutschland Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
<i>Die BSA-Verdünnungslösung enthält:</i> Waschpuffer (siehe oben), 10 ml Bovines Serumalbumin, 96%ig, 0,1 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschlan
<i>Das Neufuchsin-Substrat enthält:</i> Waschpuffer (siehe oben), 105 ml Propandiol-Lösung, 0,2 M, 37,5 ml Levamisole, 0,06 g Naphthol-AS-Biphosphat, 0,075 g N,N-Dimethylformamid, 900 µl Natriumnitrid, 0,03 g Neufuchsin-Lösung, 300 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland “ “ “ “
<i>Antikörper und Farbreagenzien:</i> ED1 Mouse Anti-Rat (Nr. MCA341R) CD4 Mouse Anti-Rat CD8 Mouse Anti-Rat IgG (Nr. MCA48G) OX3 Mouse Anti-Rat CD25 Mouse Anti-Rat (Nr. MCA273) OX 62 Mouse Anti-Rat (Nr. 555010) Rabbit Anti-Mouse Ig (Nr. Z-0259) APAAP, Mouse, Monoclonal (Nr. D-0651)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland “ “ “ “ BD Biosciences, San Jose, CA, USA Dako, Glostrup, Denmark ”
<b>Reagenzien und Lösungen FACS</b>	
<i>Das Stimulationsmedium enthält:</i> RPMI/FCS-Lösung (siehe oben), 1 ml Ionomycin, 2,5 µl Ansatzlösung, 125 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Die Ansatzlösung enthält:</i> RPMI/FCS-Lsg. (siehe oben), 1 ml PMA, 1 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Die Monensin-Lösung enthält:</i>	

RPMI/FCS-Lösung (siehe oben), 1 ml Monensin, 1 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Der FACS-Puffer enthielt:</i> Bovines Serumalbumin (96%) in PBS, 1% Natrium-Acid, 0,1%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland “
<i>Die 1%ige-Paraformaldehydlösung enthielt:</i> PBS-Lösung (siehe oben), 900 ml Paraformaldehyd, 5 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Die Saponinlösung enthielt:</i> PBS-Lösung (siehe oben), 500 ml Saponin purum, 2 g (Nr. 16109)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
<i>Antikörper:</i> CD3 FITC Anti-Rat (Nr. 22014D) CD25 PE Anti-Rat (Nr. 22095B) MHCII PerCP Anti-Rat (Nr. 557016) RT1A <sup>a,b</sup> Biotin Anti-Rat (Nr. 559994) Streptavidin-PerCP (Nr. 554064) CD86 FITC Anti-Rat (Nr. 555018) CD4 APC Anti-Rat (Nr. 02-04-1628) OX62 PE Anti-Rat (Nr. MCA 1029PE)	BD Biosciences, San Jose, USA “ “ “ “ Biocarta, San Diego, CA, USA Serotec, Düsseldorf, Deutschland
<i>Antikörper Isotyp-Kontrollen:</i> FITC Rat IgG <sub>2b</sub> (Nr. 553988) FITC Mouse IgG <sub>1</sub> (Nr. 554679) PE Mouse IgG <sub>1</sub> (Nr. 554680) APC Mouse IgG <sub>1</sub> (Nr. 550874) PerCP Mouse IgG <sub>1</sub> (Nr. 559425)	alle BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Reagenzien und Lösungen ELISA</b>	
LPS-Lösung (Nr. L4391)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PMA-Lösung	“
PMA/Ionomycin-Lösung	“
ConA-Lösung (Nr. 17-0450-01)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
<i>Antikörper:</i> IFN-γ Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-2696E) IFN-γ Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-26962E) IL-4 Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-26311E) IL-4 Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-26312E) IL-6 Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-2705E) IL-6 Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-27052E) TNF-α Anti-Rat Capture AB (Nr. 51-26971E) TNF-α Anti-Rat Detection AB (Nr. 51-26972E) Avidin-HRP Enzyme (Nr. 51-264375)	alle BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Reagenzien und Lösungen ELISPOT</b>	
<i>PBS/BSA-Lösung enthielt:</i> PBS-Lösung (siehe oben), 20 ml ELISPOT BSA, 0,2 g Skimmed dry milk BCIP/NTB Streptavidin Alkalische Phosphatase	Diaclone, Stamford, CT, USA “ “
<i>Antikörper:</i> IFN-γ Rat ELISPOT Capture AB (Nr. DB1)	Diaclone, Stamford, CT, USA

Tabelle 3. Aufstellung verwendeter Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ein-/Ausschlusskriterien und Kontrolltiere**

Die postoperative Beobachtungszeit betrug für die Tiere der Stufe I (Gruppen I/1 und I/2) 100 Tage; für die Empfänger der Stufe II (Gruppen II/1 und II/2) 20 Tage.

In dieser Zeit wurden die Tiere täglich untersucht. Bei Anzeichen von Krankheit oder Leiden wurden sie schmerzfrei getötet; zuvor wurden Organproben entnommen. Sofern der Kadaverzustand es zuließ, wurden die Tiere obduziert. Beim Vorliegen von Anzeichen für andere Todesursachen als eine Transplantatdysfunktion wurden solche Tiere von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Verstarb ein Tier binnen 5 Tagen nach OP wurde es als technischer Fehler vollständig ausgeschlossen.

Die Kontrolltiere beider Stufen verstarben zwischen dem 6. und 8. Tag nach NTx und wiesen keine Anzeichen operativer Fehler auf. Ihr Tod wurde als Folge der Transplantatabstoßung gewertet.

### **4.2. Überleben**

#### **4.2.1. Überleben der Tiere von Stufe I**

Die kumulative Überlebensrate der Gruppe I/1 (kalte Ischämie ~20 min) war signifikant schlechter, als die der Gruppe II/2 (kalte Ischämie 6 h): 16,7% vs. 63,6% ( $p=0,0375$ ). Die mittlere Überlebenszeit ( $\pm$ Standardfehler) in Gruppe I/1 betrug 35,2 ( $\pm 8,2$ ) Tage, die in Gruppe I/2 66,5 ( $\pm 13,4$ ) Tage. Abbildung 10 (nächste Seite) zeigt die grafische Darstellung des kumulativen Überlebens nach Kaplan-Meier.

Sämtliche vorzeitig verstorbenen Tiere der Gruppe I/1 (Ischämie ~20 min) verstarben am oder nach dem 6. postoperativen Tag und wiesen in der Obduktion keine Zeichen für andere Todesursachen als eine Transplantatabstoßung auf.

Nachfolgender Abbildung 10 ist ein grafischer Vergleich der Überlebensraten zu entnehmen. Tabelle 4 gibt die Überlebenszeiten der Individuen mit den zugehörigen statistischen Werten wieder.

### Kumulatives Überleben nach Kaplan-Meier (Stufe I)

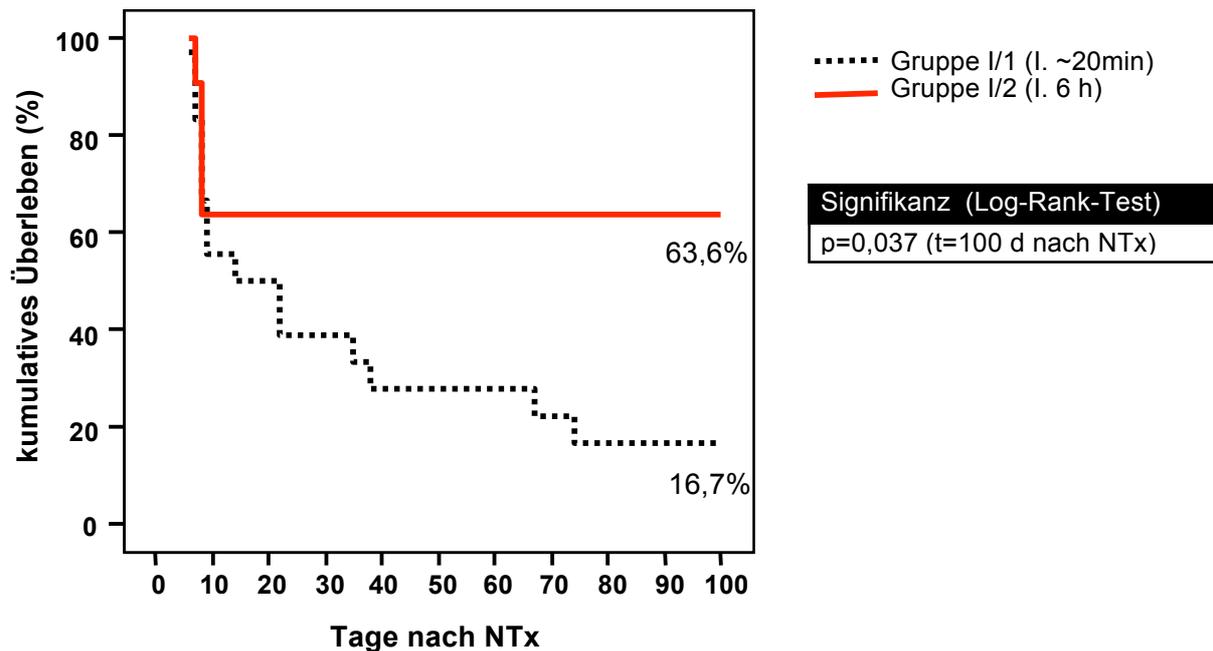


Abbildung 10. Überlebenskurven der Gruppen I/1 und I/2. Rechts: Signifikanz nach Log-Rank-Test.

Gruppe	Überleben der Versuchstiere in Stufe I		Vorzeitig verstorbene Tiere			
	Mittlere Überlebenszeit (Tage±Standardfehler)	Kum. Überlebensrate nach 100 Tagen (nach Kaplan-Meier)	Tier	OP	Tod	Tage
I/1	35,2 ± 8,2	16,67%	1	12.12.04	17.02.05	67
			3	13.12.04	21.12.04	8
			7	22.12.04	30.12.04	8
			11	08.01.05	17.01.05	9
			12	09.01.05	17.01.05	8
			15	19.02.05	29.03.05	38
			16	19.02.05	05.03.05	14
			17	03.03.05	16.05.05	74
			18	06.03.05	13.03.05	7
			22	07.03.05	11.04.05	35
			25	27.07.05	02.08.05	6
			26	27.07.05	03.08.05	7
			27	29.07.05	20.08.05	22
			28	29.07.05	20.08.05	22
			29	31.07.05	09.08.05	9
			Insg. vorzeitig verstorben: 15			
I/2	66,5 ± 13,4	63,64%	2	12.12.04	20.12.04	8
			13	09.01.05	17.01.05	8
			14	10.01.05	17.01.05	7
			19	06.03.05	14.03.05	8
			Insg. vorzeitig verstorben: 4			

Tabelle 4. Mittleres Überleben nach Kaplan-Meier und Liste vorzeitig verstorbener Tiere der Gruppen der Stufe I (Gruppe I/1: Ischämie ~20 min, Gruppe I/2: Ischämie 6 h). Für vorzeitig verstorbene Tieren sind die Daten von OP u. Todesfeststellung mit der resultierenden Anzahl an Überlebenstagen ausgewiesen.

#### 4.2.2. Überleben der Tiere von Stufe II

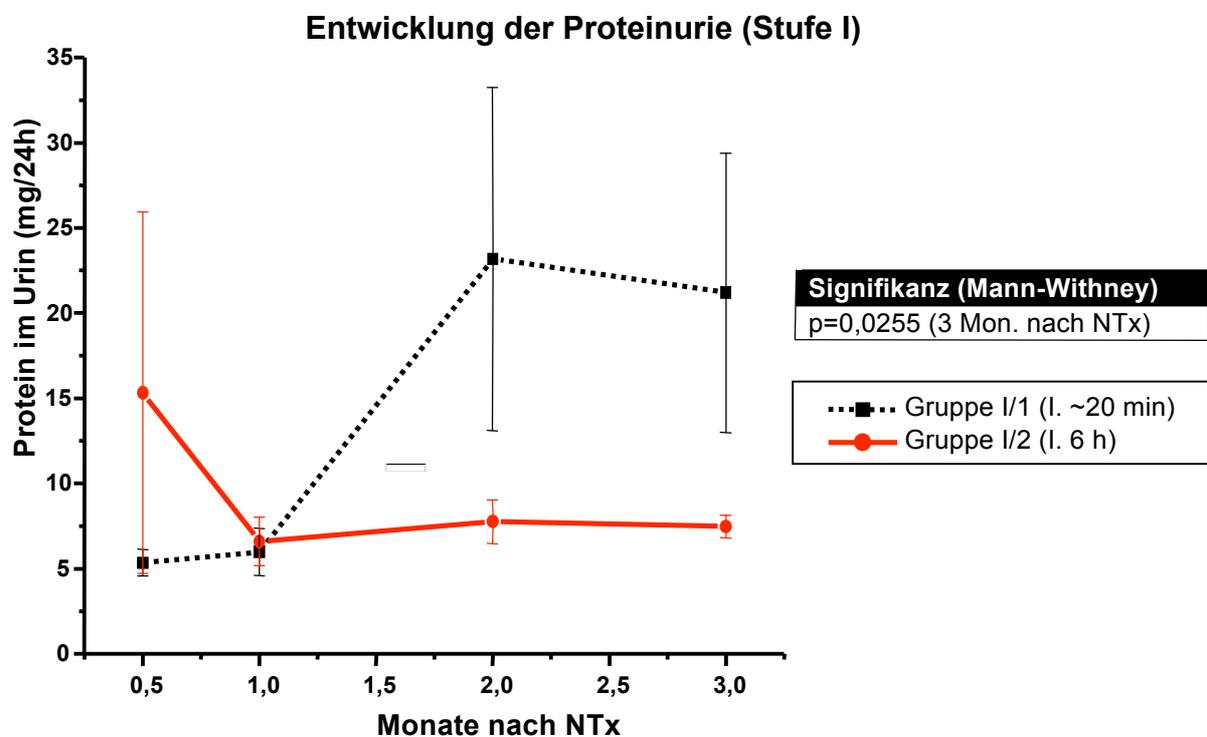
Sämtliche Tiere der Gruppen II/1 (n=3) und II/2 (n=7) überlebten die Beobachtungszeit von 20 Tagen. Da sämtliche Kontrolltiere dieser Stufe zwischen dem 6. und 8. postoperativen Tag verstarben wurde das Überleben der Versuchstiere als Folge des adoptiven Leukozytentransfers gewertet.

#### 4.3. Proteinurie

Die Proteinurie ist ein zuverlässiger Parameter der Nierenfunktionsbeurteilung bei männlichen Ratten (114). Sie korreliert eng mit morphologischen Veränderungen im Rahmen einer Transplantatabstoßung.

Die Tiere der Gruppe I/2 (Ischämie 6 h) wiesen gegenüber der Gruppe kurzer Ischämie eine signifikant geringere Proteinurie auf ( $p=0,025$ ; 3 Monate nach NTx). Lediglich zum Zeitpunkt der ersten Messung (2 Wochen post NTx) verhielt es sich gegenteilig. Die einzelnen Werte sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Als Indikator schlechter Transplantatfunktion lässt sich die erhöhte Proteinurie mit der vermehrten Sterblichkeit in Gruppe I/1 (Ischämie ~20 min) gut in Deckung bringen.



**Abbildung 11.** Kurven der Proteinurie der Versuchstiere in Stufe I. Rechts: Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; nicht angegebene p-Werte  $> 0,05$ .

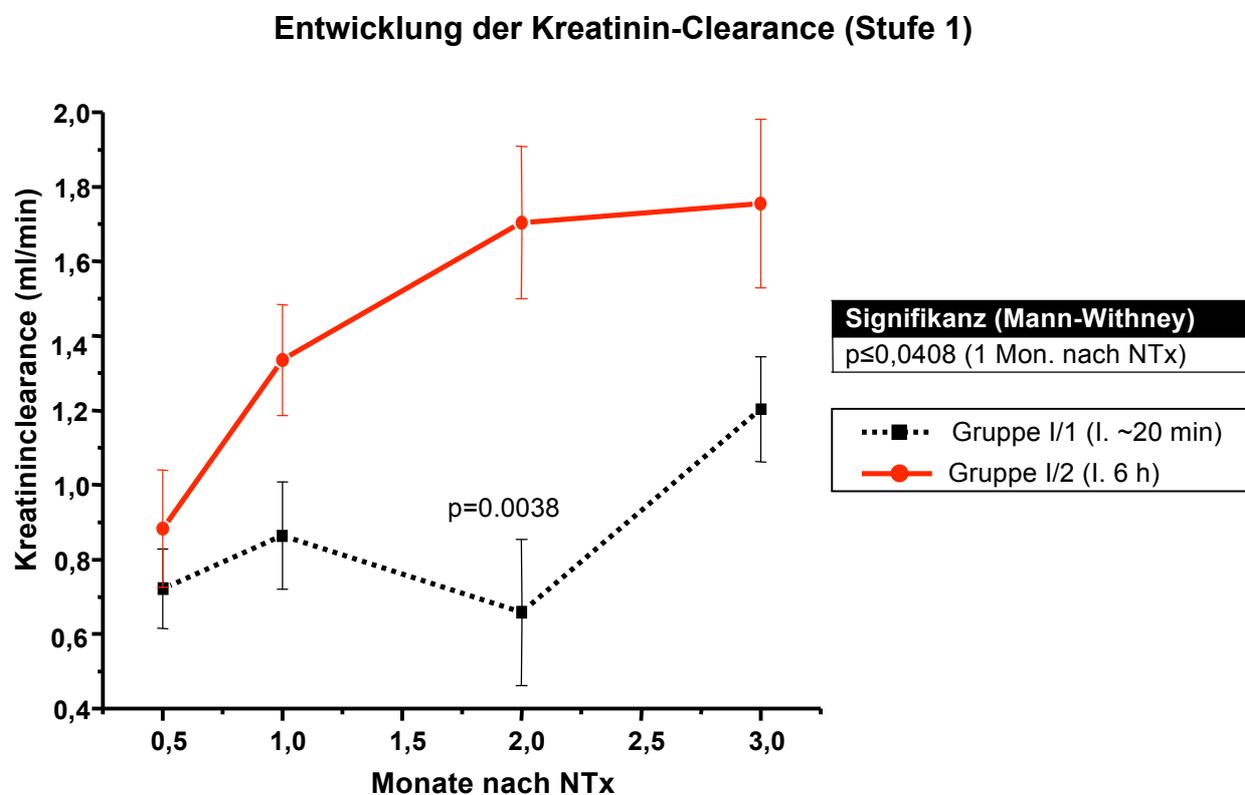
Proteinurie (in mg/24h)								
	Gruppe I/1 (~20 min Ischämie)				Gruppe I/2 (6 h Ischämie)			
Zeit nach NTx (Monate)	0,5	1	2	3	0,5	1	2	3
Mittelwert	5,35	5,98	23,18	21,20	15,33	6,60	7,76	7,47
Standardabweichung	2,48	4,15	24,67	14,20	28,07	3,75	3,39	1,75
Standardfehler	0,78	1,38	10,07	8,20	10,61	1,42	1,28	0,66

**Tabelle 5.** Proteinurie der Versuchstiere in Stufe I. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern für die Proteinuriewerte der Gruppen von Stufe I; angegeben für die Messzeitpunkte 0, 5, 1, 2 und 3 Monate nach NTx.

#### 4.4. Kreatinin-Clearance

Analog zur höheren Proteinurie fand sich bei Tieren der Gruppe I/1 (kurze Ischämie) ab einem Monat nach NTx eine schlechtere Kreatinin-Clearance ( $p \leq 0,048$ ). Ab einem Monat post NTx war dieser Unterschied statistisch signifikant.

Abbildung 12 gibt die Verlaufsentwicklung der Kreatinin-Clearance wieder; einzelne Messwerte sind Tabelle 5 (nächste Seite) zu entnehmen.



**Abbildung 12.** Kurven der Kreatinin-Clearance der Versuchstiere in Stufe I. Rechts: Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; nicht angegebene p-Werte  $> 0,05$