

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

DISSERTATION

Vorbehandlung hirntoter Spenderratten mit anti-IL-6R monoklonalem  
Antikörper bei allogener Nierentransplantation schwächt die frühe  
inflammatorische Immunantwort ab

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mariya Petrova Stührk  
geb. Velikova

aus Varna

Datum der Promotion: 18.12.2020

Diese Arbeit ist meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinem Ehemann  
und meinen Kindern gewidmet.

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand während meines Humanmedizinstudiums als Doktorandin in der „Arbeitsgruppe Pratschke“ in der Transplantationschirurgie-Abteilung am Campus Virchow Klinikum Berlin. Ich habe mit der experimentellen Arbeit im Februar 2009 begonnen und im Sommer 2009 kam der Doktorand Fabian Beiglböck hinzu.

Wir haben zwei unterschiedliche Fragestellungen anhand desselben Versuchstiermodells bearbeitet. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden gewisse Basisparameter (Nierenfunktionsparameter nach 5 Monaten sowie die Histologie) durch uns beide gemeinsam erhoben. Diese Daten wurden bereits teilweise in der Dissertation von Fabian Beiglböck veröffentlicht. Aufgrund der gemeinschaftlichen Erhebung und ihrer Relevanz als Diskussionsgrundlage für beide Doktorarbeiten finden diese Basisparameter auch in meiner Dissertation Verwendung.

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
2.1. HISTORIE DER TRANSPLANTATIONSSCHIRURGIE .....	10
2.2. HYPERAKUTE, AKUTE UND CHRONISCHE ABSTOßUNG .....	13
2.3. HIRNTOD-ASSOZIIERTE ORGANSCHÄDEN .....	17
2.4. DIE ZENTRALE IMMUNOLOGISCHE ROLLE VON IL-6 .....	19
<b>3. STAND DER FORSCHUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>22</b>
3.1. STAND DER FORSCHUNG.....	22
3.2. ZIELE UND FRAGESTELLUNG .....	23
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
4.1. VERSUCHSAUFBAU.....	24
4.2. VERSUCHSGRUPPEN .....	25
4.3. VERSUCHSTIERE.....	26
4.3.1. ALLOGENES MODELL DER ORTHOTOPEN NIERENTRANSPLANTATION .....	26
4.3.2. TIERAUSWAHL, HALTUNG UND KENNZEICHNUNG .....	26
4.3.3. FISHER-344/LEWIS-MODELL DER CHRONISCHEN ABSTOßUNG.....	27
4.4. OPERATION UND PROBENENTNAHME.....	27
4.4.1. OPERATION DES LEBENDSPENDERS .....	27
4.4.2. OPERATION DES HIRNTODSPENDERS .....	28
4.4.3. OPERATION DES EMPFÄNGERS .....	29
4.4.4. POSTOPERATIVE VERSORGUNG .....	30
4.4.5. PROBENENTNAHME UND TÖTUNG DER TIERE .....	31
4.5. DATENERHEBUNG .....	31
4.5.1. BESTIMMUNG VON PROTEINURIE, KREATININSPiegel UND ELEKTROLYTEN IM URIN ..	31
4.5.2. BESTIMMUNG DES SERUMKREATININS UND DER KREATININ-CLEARANCE .....	32
4.5.3. HISTOMORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG .....	32
4.5.4. ELISA, HERSTELLUNG VON MILZZELLKULTURÜBERSTÄNDEN, PROTOKOLL .....	33
4.5.5. DURCHFLUSSZYTOMETRIE- MESSPRINZIP, ZELLISOLIERUNG, PROTOKOLL.....	35
4.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	37
4.7. MATERIALIEN.....	37

<b>5. ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
5.1. LANGZEIT-TRANSPLANTATFUNKTION: PROTEINURIE UND KREATININ-CLEARANCE .....	43
5.2. HISTOLOGIE .....	44
5.3. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN (FACS); NIERE.....	46
5.3.1. INFILTRATION VON ANTIGEN-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN (APZ).....	46
5.3.2. INFILTRATION VON CD161A+ NATÜRLICHE KILLERZELLEN (NK) UND NATÜRLICHE KILLER-T- ZELLEN (NKT).....	56
5.3.3. INFILTRATION VON CD3+ T-ZELLEN .....	59
5.3.4. INFILTRATION VON CD62L+ T-ZELLEN .....	61
5.4. FACS-MILZ .....	64
5.4.1. INFILTRATION VON APZ.....	64
5.4.2. INFILTRATION VON CD161A+ NK UND NKT .....	67
5.4.3. INFILTRATION VON CD3+ T-ZELLEN .....	69
5.4.4. INFILTRATION VON CD62L+ T-ZELLEN .....	70
5.5. FACS BLUT .....	71
5.5.1. INFILTRATION VON APZ.....	71
5.5.2. INFILTRATION VON CD161A+ NK- UND NKT-ZELLEN .....	72
5.5.3. INFILTRATION VON CD3+ T-ZELLEN .....	72
5.5.4. INFILTRATION VON CD62L+ T-ZELLEN .....	72
5.6. ELISA .....	73
5.6.1. IFN- $\gamma$ .....	73
5.6.2. IL-2 .....	73
5.6.3. IL-6 IM SERUM.....	73
5.6.4. IL-10 .....	73
5.6.5. TNF-A .....	74
5.6.6. IL-6 MILZ .....	74
<b>6. DISKUSSION</b> .....	<b>76</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>86</b>
<b>8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>98</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b> .....	<b>100</b>

<b>10. PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>100</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>100</b>

## 1. Zusammenfassung / Abstract

Aufgrund des stetig zunehmendem Organbedarfs und einer gleichzeitig rückläufigen Anzahl von Organspenden, wurden in den letzten Jahren die Spenderkriterien erweitert (Extended criteria donor, ECD) und die Nierentransplantation sogenannter „marginaler“ Organe zugelassen. ECD bedeutet hirntote Nierenspender, die entweder  $\geq 60$  Jahre oder zwischen 50 und 60 Jahre alt mit zusätzlich zwei der folgenden Eigenschaften sind: Hypertonie, ein Serumkreatininwert  $> 1.5$  mg/dl oder Versterben aufgrund eines zerebrovaskulären Ereignisses.

Neben Faktoren wie dem Spenderalter, einer verlängerten kalten Ischämiezeit oder dem Ischämie-/Reperfusionsschaden ist der Hirntod (HT) ein wesentlicher Alloantigen-unabhängiger Risikofaktor. Organe hirntoter Spender zeigen in der Regel eine erhöhte Immunogenität und können im Empfänger zu einer verstärkten Immunantwort führen.

In zahlreichen Studien wurde die entscheidende Rolle von IL-6 bei der Immunregulation sowie als Prädiktor für akute Abstoßungsepisoden gezeigt. Während des Hirntodes kommt es im Spender zu einer massiven IL-6 Ausschüttung, welche das Transplantat bereits vor Entnahme schädigt und dessen Immunogenität erhöht.

Zur Reduktion der Transplantatimmunogenität und des transplantations-assoziierten I/R-Schadens wurden in unserem experimentellen Ansatz hirntote Spenderratten (F-344) mit einer einmaligen Applikation eines anti-IL-6R monoklonalen Antikörpers (CD126 mAb) vorbehandelt und im Anschluss der Effekt auf die Transplantatqualität sowie die frühe (18h, 7d) und späte (nach 5Mo) Immunantwort des Empfängers untersucht. Hierfür wurden etablierte standardisierte Modelle der Hirntodinduktion und der Nierentransplantation in der Ratte (F-344->Lewis Ratten) verwendet. Als Kontrolle diente die Transplantation von Nieren unbehandelter hirntoter Spender sowie von Nieren unbehandelter und vorbehandelter Lebendspender. An den drei gewählten Zeitpunkten (18h, 7d, 5Mo) wurden durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS: APZ, T-Zellen, NK- und NKT-Zellen in Niere, Milz und Blut), Analysen zur Zytokinsekretion (ELISA: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6; Milzzellkulturüberstände und Serum) sowie histologische Untersuchungen durchgeführt. Für die Bestimmung der Transplantat-Langzeitfunktion (5Mo) wurden zusätzlich die Kreatinin-Clearance sowie die Proteinurie durch serielle Messungen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einem monoklonalen anti-IL-6R Antikörper eine signifikante Reduktion transplantatinfiltrierender Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation (7d p.t.) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe hirntoter Spender bewirkt. Ebenso ergaben die ELISA-Analysen an Tag 7 tendenziell geringere Serumproteinkonzentrationen der Zytokine IL-6 sowie signifikant reduzierte Konzentrationen von IFN- $\gamma$  in der Gruppe vorbehandelter Hirntodspender im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Eine einmalige Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit dem anti-IL-6R mAb verringert die Ausprägung der frühen Immunantwort, während Empfänger eines Transplantats von Lebendspendern nicht von einer Vorbehandlung zu profitieren scheinen. Ein Benefit der Spendervorbehandlung für die Langzeitfunktion des Nierentransplantats konnte in unserem Modell nicht nachgewiesen werden.

### **Abstract**

Due to the steadily increasing need of organs and simultaneously declining numbers of donor organs, criteria for organ donation have been extended (extended criteria donors „ECD“) allowing the kidney transplantation of so called ‘marginal’ organs. ECD donors are brain-dead and either  $\geq 60$  or between 50 and 60 years old and fulfilling one of the following characteristics: hypertension, serum creatinine concentration  $> 1.5$  mg/dl or death due to cerebrovascular event.

Besides donor age, prolonged cold ischemia and ischemia/reperfusion damage, brain death is a substantial alloantigen independent risk factor. Organs of brain-dead donors usually show an increased immunogenicity and may provoke an intensified host immune response.

In numerous studies the key role of IL-6 in immune regulation and as a predictor for acute transplant rejection has been shown. Brain dead induces a massive IL-6 release which increases donor organ immunogenicity and damages the organ itself prior to explantation.

In our experimental setting F 344 donor rats were once treated with a single dose of the anti-IL6R monoclonal antibody (CD126 mAb) 1 hour after brain death induction and 5



hours prior to explantation to reduce transplant immunogenicity and transplantation related I/R damage. Effects regarding transplant quality as well as early (18h, 7d) and late (5Mo) host immune response were studied. Therefore a standardised model of brain death induction and kidney transplantation in rats (F-344 -> Lewis model) was used. Transplantation of kidneys of untreated brain-dead donors and pretreated living-donor rats served as controls. Besides histological diagnostics, FACS analysis were performed to determine and characterize relevant cell populations (APC, T-cells, NK-cells, NKT-cells in kidney, spleen and blood). Cytokines were evaluated in supernatants of spleen cell cultures and serum by ELISA (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6). Long-term organ function was examined by sequential determination of serum creatinine clearance and proteinuria.

We could show that a single treatment of the brain-dead donor with the monoclonal antibody anti-IL6R significantly reduces the amount of graft infiltrating cells 7d after transplantation compared to the untreated brain-dead control group. Cytokine analysis at postoperative day 7 revealed reduced serum concentrations of IL-6 as well as of IFN- $\gamma$  in the pretreated brain-dead group compared to untreated controls.

A single pretreatment of the brain-dead donor with the anti-IL-6R mAb reduces the early immune response whereas recipients of pretreated living donors do not seem to profit. Donor pretreatment with anti-IL6R mAb could not improve long-term function of the renal graft.

## 2. Einleitung

### 2.1. Historie der Transplantationschirurgie

Die Transplantationschirurgie nimmt ihren Beginn am Ende des 19. Jahrhunderts. Reverdin war einer der ersten Pioniere der Transplantationsmedizin, welchem 1869 die erfolgreiche autologe Transplantation ‚freier‘ Haut gelang. Diese Methode wurde bei starken Verbrennungen eingesetzt und wird in manchen Fällen sogar heutzutage noch durchgeführt. [1] [2] Zu dieser Zeit forschte auch der Berner Chirurg Theodor Kocher über die Funktion der Schilddrüse und führte 1883 die erste Transplantation von Schilddrüsengewebe bei einem Patienten unter die Haut durch, der bis dato unter einer hypothyreoten Stoffwechsellage nach radikaler Thyreoidektomie litt. Für seine außerordentliche Arbeit erhielt er 1909 den Nobelpreis in Physiologie / Medizin.[1] [3]

Nachdem 1902 Alexis Carrel und Charles Guthrie die erste Arbeit über eine vielversprechende Operationstechnik der Gefäßanastomosen publizierten, erschien im Jahre 1905 ihr Artikel über die autogene Nierentransplantation bei einem Hund in die Halsregion mit Gefäßanastomosen zu Vena jugularis externa und Arteria carotis sowie die Verbindung des Ureters zum Ösophagus. A. Carrel führte ebenso die erste Herztransplantation beim Hund in die Halsregion mit dem Ziel durch, die Funktionsfähigkeit der Gefäßnähte zu zeigen. [4] Dadurch wurde zusätzlich bewiesen, dass die Mangelernährung eines transplantierten Organs nicht im Vordergrund stand. Jedoch war es noch unklar, warum die allogen bzw. xenogen verpflanzten Transplantate nach wenigen Stunden bis Tage abgestoßen wurden. Zur Klärung dieser Frage trugen mehrere chirurgische Wissenschaftler wie P. Rous und J.B. Murphy bei, die als Erste zeigten, dass eine Implantation von Sarkom-Zellen nur in Hühnerembryonen möglich war und aufgrund der überschüssigen Reaktion der Lymphozyten auf das fremde Gewebe nicht in älteren Tieren mit schon ausgebildetem Immunsystem. [5] [6] Nachdem Karl Landsteiner neue Erkenntnisse über das ABO-Blutgruppensystem lieferte, folgte ein weiterer Versuch einer Nierentransplantation - diesmal von einem Kadaverspender mit der Blutgruppe (BG) B Rh pos. zum Empfänger mit BG 0 Rh pos. durch den ukrainischen Arzt Voronoy. Leider produzierte die transplantierte Niere zu keinem Zeitpunkt Urin. Die Ursache dafür war wahrscheinlich die immer noch hohe Quecksilberkonzentration im Transplantat, verursacht durch den Suizid des Spenders. [6]

1944 kam der britische Zoologe Sir P. B. Medawar zusammen mit seinem chirurgischen Mentor T. Gibson zu der Erkenntnis, dass die Abstoßung eines Transplantats ein immunologisches Ereignis war. Durch autogene und allogene Hauttransplantationen wurde festgestellt, dass die ‚fremden‘ Transplantate im Vergleich zu den körpereigenen immer mit einer massiven Reaktion des Immunsystems im Sinne einer schweren Entzündung und Destruktion des Transplantats assoziiert waren. Experimentell wurde gezeigt, dass Hauttransplantate zwischen zweieiigen Zwillingen toleriert wurden, sodass der Begriff der immunologischen Toleranz entstand. [7] Währenddessen untersuchten G. Snell und P. Gorer die Reaktion des Immunsystems bei Transplantation eines Organes zwischen zwei Individuen einer Art. Hierbei konnten sie den auf allen Körperzellen exprimierten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) nachweisen. Im Jahre 1958 beobachtete J. Dausset, dass Patienten nach mehreren Bluttransfusionen Antikörper gegen den Spender bildeten und es zu einer Blutagglutination kam. Durch weiterführende Forschung auf diesem Gebiet entdeckte man das humane Leukozytenantigen (HLA). [7] [8]

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde zwischen eineiigen Zwillingen bei Glomerulonephritis im Endstadium durch J. E. Murray am 23.12.1954 am Peter Bent Brigham Hospital in Boston durchgeführt. Die transplantierte Niere funktionierte 9 Jahre bis der Empfänger erneut eine Glomerulonephritis entwickelte und daran verstarb. Es entstand die Idee einer effizienteren Behandlung nach erfolgter Transplantation durch Immunsuppression. Als erstes wurde die Ganzkörperbestrahlung getestet. Dies führte jedoch zu Knochenmarkaplasien, sodass die Patienten relativ schnell aufgrund von Infektionen verstarben. Als nächstes wurde 6-Mercaptopurin, ein Zytostatikum, welches für die Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt wird, zur Hemmung der Antikörperbildung verwendet. [9] In den 60er Jahren erreichten R. Calne und J.E. Murray enorme Fortschritte in der allogenen Transplantation mittels Azathioprin- und niedrig dosierter Kortikosteroidtherapie. Die Organfunktionsrate wurde auf 40-50% pro Jahr gesteigert. Danach folgten viele Transplantationen von allogenen sowie xenogenen Spendern von Leber, Herz, Knochenmark etc. Erst mit der klinischen Einführung von Calcineurininhibitoren (CNI) wie Cyclosporin A im Jahr 1980 verbesserte sich die Aussicht der Organempfänger deutlich. Wenig später wurde die immunsuppressive Therapie durch Tacrolimus, einen weiteren CNI ergänzt. [10] [11] CNIs verhindern die Aktivierung von T-Zellen und die Freisetzung von T-Zell-Zytokinen und somit die T-Zell-vermittelte Immunreaktion auf das Fremdorgan. Alternativ zu den

nephrotoxischen CNIs bot sich mit der Zulassung des mTOR-Inhibitors Sirolimus im Jahr 2001 die Möglichkeit, die Nephrotoxizität zu reduzieren und die dadurch entstehenden Langzeitveränderungen im Sinne einer chronischen Nephropathie zu minimieren. [12] In der Regel besteht eine Immunsuppression heutzutage aus einer Antikörper-Induktionstherapie (z.B. anti-Thymozyten Globulin/ ATG, anti-IL-2-Rezeptor Antikörper/ Daclizumab, Basiliximab etc.) und der anschließenden Erhaltungstherapie, einer Dreifachkombination aus Glukokortikoiden (Prednisolon), Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin, Tacrolimus,) und Mycophenolat Mofetil (CellCept oder Myfortic). [13] [14] Mit der Zeit wurde klar, dass der zunehmende Mangel an Spenderorganen nur durch die Verwendung sogenannter „marginaler“ Organe zum Teil behoben werden könnte. Aufgrund der stark verminderten Toleranz dieser Organe gegenüber einer verlängerten kalten Ischämiezeit und dem Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) wurde eine Vorbehandlung des Spenders mit Mycophenolat-Mofetil, Steroiden oder später auch mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, um die Abstoßungsreaktion zu minimieren. [15] [16] Seit den 80igern kam es hierdurch seltener zur akuten Abstoßung und auftretende akute Rejektionen konnten besser therapiert werden. Vielmehr standen jetzt die chronische Abstoßung sowie die Nebenwirkungen der Immunsuppression im Mittelpunkt der Forschung.

Die „Verträglichkeit“ (Histokompatibilität) eines transplantierten Gewebes/Organs ist abhängig von der Übereinstimmung spezifischer Oberflächenmoleküle von Spender und Empfänger, den sogenannten Histokompatibilitätsantigenen (MHC-Antigene, beim Menschen: Human Leucocyte Antigen/HLA) des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histoincompatibiliy Complex/MHC). Bei einer allogenen Transplantation solider Organe wie Niere, Herz oder Leber wird neben der Allokation eines Organs auf Grundlage der Blutgruppenübereinstimmung, eine sogenannte HLA-Typisierung vorgenommen, um eine möglichst hohe HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger zu erzielen (Matching). [17]

Basierend auf den Erkenntnissen von Jean Dausset hinsichtlich der Bedeutung des MHC-Komplexes für die Transplantation, bewies der holländische Arzt Jon J. van Rood 1966, dass ein optimales HLA-Matching zwischen Spender und Empfänger einen positiven Einfluss auf die Prognose des Transplantats hat. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit einer HLA-Übereinstimmung bei einer zufälligen Zuordnung des Spenderorgans, entstand die Idee mit Hilfe einer geordneten Allokation über eine zentrale Datenbank den optimalen Empfänger für ein Transplantat zu ermitteln. Zu

diesem Zweck wurde Eurotransplant von van Rood 1967 gegründet und ist heute für die Vermittlung von Organen auf medizinischer und ethischer Grundlage in 8 europäischen Ländern verantwortlich. [18] Seitdem wurden circa 125 000 Spenderorgane von Lebend- bzw. hirntoten Spendern in Deutschland transplantiert. 2015 gab es ca. 7530 Patienten auf der offiziellen aktiven Warteliste für eine Nierentransplantation auf Eurotransplant in Deutschland. Nur 877 hirntote Spender standen zur Verfügung, obwohl primär insgesamt 2245 Gespräche bzgl. einer Organtransplantation geführt wurden. Nur in 60-74% wurden die Transplantationen durchgeführt. Im Vergleich zu 2010 sinkt die Organtransplantationsbereitschaft bis zu 50% in den verschiedenen Bundesländern und bis 31% bei den postmortal gespendeten Organen. [19] [20]

## **2.2. Hyperakute, akute und chronische Abstoßung**

Die hyperakute Abstoßung ist aufgrund des Crossmatch-Tests zwischen Spender und Empfänger vor der Organtransplantation extrem selten geworden. Sie wird durch präformierte zytotoxische Antikörper gegen HLA, meist IgG, innerhalb von Minuten bis Stunden hervorgerufen. [21] [22] Diese Antikörper sind vor allem gegen MHC-Antigene der Klasse I des Transplantats gerichtet. Ursache hierfür ist eine Sensibilisierung des Immunsystems durch eine vorangegangene fehlgeschlagene Transplantation, Bluttransfusion oder Schwangerschaft. Die präformierten Antikörper binden an das Epitop des Endothels des Transplantats und aktivieren die Komplement- und Gerinnungskaskade. Dadurch kommt es zur erhöhten Gefäßdurchlässigkeit, aber auch zur schnelleren Koagulation und somit zur Thrombenbildung und Zerstörung des Transplantats. [23]

Die akzelerierte Abstoßung tritt zwischen dem 2. und 5. Tag nach der Transplantation auf. Ähnlich wie bei der hyperakuten Abstoßung handelt es sich um eine Sensibilisierung des Empfängers, jedoch ohne Nachweis donorreaktiver Antikörper. [24] Die in den ersten Monaten häufigste Abstoßungsreaktion ist die akute zellvermittelte Abstoßung, die über eine Aktivierung von CD4+ T-Helfer- und CD8+ zytotoxische T-Zellen vermittelt wird. Dies kann auf zwei Arten geschehen: über den indirekten oder den direkten Weg der Antigenpräsentation. Bei der direkten Alloaktivierung erkennen Empfänger-T-Zellen Donor-HLA-Moleküle auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) (dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen) des Spenders, die mit

dem Transplantat übertragen wurden (sogenannte „passenger leukocytes“). Dies erfolgt in der Frühphase nach Transplantation, wenn die noch lebensfähigen Spender-Leukozyten aus dem Transplantat in regionale Lymphknoten und in die Milz wandern, wo sie alloreaktive T-Zellen stimulieren. Auch im naiven Empfänger kann es Gedächtniszellen gegen solche Spender-HLA-Moleküle geben, falls bereits kreuzreaktive T-Zellen bei Infektionen entstanden sind. Mit der Zeit versterben die Spender-APC und werden durch die Empfänger-APC ersetzt, sodass sich die Reaktion abschwächt. Danach erfolgt die Präsentation der prozessierten Donor-HLA-Moleküle durch APC des Empfängers. Bei der indirekten Antigenpräsentation werden die fremden HLA-Moleküle zerlegt und in Form kleinerer Peptide in der Peptidtasche des MHC-Moleküls auf der Oberfläche der Empfänger-APC an T-Helfer-Zellen präsentiert. [25] Dieser Initialschritt sowie weitere costimulatorische Signale führen in der Folge zur Aktivierung der T-Zellen, welche über eine vermehrte Zytokinausschüttung die Stimulation und Proliferation weiterer alloantigen-spezifischer Effektorzellen (CD4+ Helfer- und CD8+ zytotoxische T-Zellen) sowie die Aktivierung Antikörper-produzierender B-Zellen induzieren. Die akute Abstoßung kann als Folge des Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) sowie zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation auftreten. Durch reife APC wird die Proliferation spezifischer T-Zellen koordiniert. APC sezernieren Zytokine und Chemokine und induzieren dadurch die Expression von Adhäsionsmolekülen, welche wiederum die Proliferation von spezifischen Lymphozyten stimulieren. Die Zytokinproduktion aktiviert ihrerseits T-Helfer-Zellen, die eine Subpopulation von Gedächtnis-T-Zellen aktivieren, welche im Falle einer Antigen Re-Exposition schnell rekrutiert werden können. T-Zellen sezernieren IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 und lösen die Aktivierung und Differenzierung antigen-spezifischer B-Zellen und die Antikörperproduktion aus. T-Helfer-Zellen schütten Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) aus und aktivieren hierdurch natürliche Killerzellen und Makrophagen. Diese sezernieren ihrerseits zytotoxische Moleküle wie Perforin oder Granzym B, welche Apoptose durch Freisetzung von TNF- $\alpha$  induzieren sowie die Phagozytose der geschädigten Zellen auslösen. [26] Makrophagen und NK-Zellen binden an die Fc-Region der Alloantikörper des Transplantats, welches zur Antikörper-vermittelten zellulären Destruktion führt. Im Vergleich zu T-Zellen exprimieren B-Zellen Immunglobulinmoleküle an der Zelloberfläche, die eigene Antigene erkennen und binden, wodurch die Selektion der antigen-spezifischen B-Zell-Population eingeleitet wird. B-Zellen können aber auch wie

APC agieren und über CD40-Moleküle fremde Antigene dem CD40-Liganden der T-Zellen präsentieren. [27] Außerdem werden andere kostimulatorische Signale mittels CD28 an der T-Zelle eingeleitet, die durch die Bindung an den Toll-like Rezeptor-Liganden die Expression von CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2) in den APC erstmal aktiviert und dann hochstimuliert wird. [28]

In den letzten 20 Jahren wurde nachgewiesen, dass akute Abstoßungsepisoden die Langzeitfunktion des Transplantats erheblich beeinflussen. Die indirekte Alloaktivierung sowie die humorale Antikörper-vermittelte Abstoßung stehen im Vordergrund bei der Entstehung einer chronischen Abstoßung. So ist z.B. die humorale Rejektion nach einer Nierentransplantation durch eine peritubuläre Kapillaritis und glomeruläre Entzündung gekennzeichnet. Eine Ablagerung des Komplement-Fragments C4d in den peritubulären Kapillaren korrelierte in mehreren Studien mit einer schlechteren Langzeitfunktion der Nierentransplantate. Allerdings wurde das Vorhandensein von C4d-Depos im Transplantat in der aktuellen BANFF-Klassifikation noch nicht als Kriterium für eine chronische Allotransplantat-Nephropathie (CAN) berücksichtigt. [24] [26]

Die Transplantation hat sich als Therapie der Wahl bei Patienten mit Niereninsuffizienz im Endstadium bewiesen. Trotz guter Funktion des transplantierten Organs in über 90% der Fälle im ersten Jahr, gibt es bis dato noch keine vorbeugenden Maßnahmen, die irreversible Langzeitschädigungsprozesse im Transplantat sicher verhindern. Vor Jahrzehnten wurde primär der zu einem frühen Zeitpunkt immunologisch induzierte Schaden für die Transplantatdysfunktion und den konsekutiven Funktionsverlust verantwortlich gemacht, sodass die antigen-unabhängigen Prozesse unterschätzt wurden. [29] Heutzutage ist klar, dass die chronische Allotransplantat-Nephropathie (CAN) sowohl von immunologischen als auch von nicht-immunologischen Vorgängen abhängt und sich über Monate bis Jahre nach der Transplantation entwickeln kann. CAN ist durch eine progressive renale Dysfunktion charakterisiert und mit schrittweise zunehmenden histologischen Veränderungen der Nephrone vergesellschaftet, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten auftreten:

Der frühe tubulo-interstitiale Schaden korreliert mit immunologischen Reaktionen, einschließlich der schweren Akut- sowie persistierenden subklinischen Abstoßung mit I/R-Schaden.

Der späte Schaden ist durch eine progressive Hyalinose der Arteriolen, ischämische Glomerulosklerose und Interstitialfibrose charakterisiert und mit der durch die Calcineurininhibitoren entstandenen Langzeitnephrotoxizität assoziiert. [30]

Zu den alloantigen-unabhängigen Faktoren gehören u.a. der schon erwähnten initiale I/R-Schaden, der inadäquate Verlust an Nephronmasse, die medikamenten-ausgelöste Nephrotoxizität und Virusinfektionen.

Die alloantigen-abhängigen Faktoren schließen die Häufigkeit der akuten Abstoßungsepisoden und den Grad des HLA-Mismatches mit ein. Trotz befriedigender Immunsuppression persistiert die Alloreaktivität wahrscheinlich weiter, sodass mit der Zeit die indirekte Präsentation von Spender-MHC-Peptiden an Bedeutung gewinnt. Nach mehreren subklinischen Abstoßungsepisoden kommt es zur progressiven Reduktion der Nephronmasse, was eine Überfunktion der restlichen Nephrone induziert. Dies führt zur Fibrosierung des Organs und zum Funktionsverlust.

Es wurde auch gezeigt, dass eine effektive Therapie der frühen akuten Abstoßungsepisoden (<3 Monaten) die Rate der chronischen Transplantatversagen im Gegensatz zu den späten Abstoßungsepisoden nicht beeinflusst. [31] [32] Andere nicht-immunologische Risikofaktoren sind ein hohes Spender- und Empfängeralter, Geschlecht, Rasse, hoher BMI, Spendervorerkrankungen, Hirntod mit den Konsequenzen des Ausfalls der Hirnstammfunktion sowie der Prozess der Organentnahmen. [32] [33] [34] Zusätzlich hat die Kombination aus einem hohen Spenderalter und prolongierten ischämischen Perioden eine synergistische schädliche Auswirkung auf das Transplantat. [33] Busson et al. zeigte, dass die Langzeitfunktion des Transplantats im Falle eines männlichen Spenders im Alter zwischen 6 und 50 Jahren optimal ist. [35]

Neben der akuten und chronischen Abstoßung ist die verzögerte postoperative Transplantatfunktion (delayed graft function-DGF) ein weiterer Faktor, der das Überleben des Allotransplantats wesentlich beeinflusst. In der Literatur sind verschiedene DGF-Definitionen zu finden. Eine davon ist der fehlende Nachweis einer Nierenschädigung bei Notwendigkeit der Fortführung einer Nierendialyse in der ersten Woche nach Transplantation. DGF zusammen mit einem I/R-Schaden löst die Ausschüttung von MHC-Antigenen aus, die möglicherweise eine Interaktion zwischen unspezifischer Immunantwort des Empfängers und antigen-abhängiger Alloimmunantwort begünstigen. Es wird vermutet, dass Risikofaktoren wie z.B.



Spenderalter, verlängerte Kalt- und/oder Warmischämie, Hirntod u.a. die 5-Jahre Transplantat-Überlebensrate auf 56% versus 75% signifikant reduzieren. [36] [37]

### **2.3. Hirntod-assoziierte Organschäden**

81,6% der im Jahr 2015 durchgeführten Transplantationen wurden nach postmortalen Spende durchgeführt. [20] Der Hirntod (HT) ist somit ein wesentlicher Risikofaktor, welcher aufgrund einer verstärkten Immunogenität des Spenderorgans und einer resultierenden gesteigerten Empfänger-Immunantwort das Transplantatoutcome maßgeblich beeinflusst. Der Hirntod leitet Veränderungen von einem nicht-aktiven zu einem immunologisch aktiven Organ ein. Nach Einsetzen des HTs werden molekulare und zelluläre Kaskaden inklusive der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren initiiert, sodass eine Transplantatdysfunktion vorprogrammiert wird. [38] Die Herkunft des Transplantats, d.h. Lebend- (LD) versus HT-Spender sowie die Organqualität beeinflussen das Auftreten einer Abstoßung. Im Falle einer Lebendspende kommt es bei ca. 17% der Empfänger zu einer Abstoßung, bei HT-Spendern bei ca. 20%. [39] Aus diesem Grund wird hier auf die durch den HT ausgelösten Prozesse eingegangen. Der Hirntod ist der irreversible Ausfall der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstammes [40], welcher erst nach klinischer Untersuchung sowie apparativer Diagnostik und von zwei dafür qualifizierten Ärzten, die den Organspender getrennt voneinander untersuchen, festgestellt wird. [41] Der Hirntod führt zu schweren pathophysiologischen Veränderungen und ist vom Funktionsverlust multipler Organe begleitet. Das Versagen von Hypothalamus und Hypophyse ruft eine hämodynamische und metabolische Instabilität hervor. [42] [43] Es kommt zur initialen Katecholaminausschüttung und Abnahme von Cortisol, Insulin, Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) und des antidiuretischen Hormons (ADH) mit der Folge eines Diabetes insipidus in ca. 80% der Fälle. Letzteres ist durch eine verstärkte Diurese, schwere Hypovolämie, Hyperosmolalität und Hybernatriämie charakterisiert. [44]

Während des HTs werden Katecholamine massiv freigesetzt, die histologisch nachweisbare Hypertonie-assoziierte Schäden verursachen. Zum Zeitpunkt des HTs kommt es zur ausgeprägten Vasokonstriktion mit ca. 4- bzw. 9-facher Erhöhung des Gefäßwiderstands in der Niere bzw. Milz. Nach dem „Katecholaminesturm“ kommt es zur hämodynamischen Instabilität, die eine vermehrte Flüssigkeitszufuhr und inotrope Unterstützung fordert. Aus der Kreislaufdepression nach dem HT resultiert eine

inadäquate Organperfusion mit Laktatanstieg bei anaerobem Metabolismus. Aufgrund der ausgeprägten Vasokonstriktion kommt es zur Minderdurchblutung und somit zur Ischämie [45].

Die Ischämie rund um die Transplantation wird in 3 Phasen eingeteilt. Die erste beschreibt eine transiente Episode der sog. Warmischämie als Folge von Hypotension und Vasokonstriktion des hirntoten Spenders - häufig verstärkt durch eine notwendige Therapie mit Katecholaminen. Die zweite Phase beinhaltet meist ein transportbedingtes verlängertes Kaltischämieintervall, welches mit explantationsvorbereitenden Maßnahmen wie Abkühlung, Spülung, Konservierung und Lagerung des Organs verbunden ist. Die dritte Periode bezieht sich auf den Zeitraum der Warmischämie während der Organrevaskularisierung im Empfänger. [46]

Nach Eintritt des Hirntodes kommt es durch den gesteigerten ATP-Verbrauch zur Azidose und zu Elektrolytverschiebungen (Hypokaliämie und -kalziämie). Infolgedessen kommt es zum Funktionsverlust bestimmter Enzyme, welche die Zell-Zell-Interaktion beeinträchtigen, sodass Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten einwandern. Zusätzlich wird die Expression von Zytokinen (Interleukine: vor allem IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, weitere Chemokine,) und Adhäsionsmolekülen (L-, P-, E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) erhöht, wodurch eine Entzündungsreaktion im Transplantat ausgelöst wird. [47] [48] [49] So konnte in einer Studie der Oxford Gruppe von W.N. Nijboer zum einen eine gesteigerte Genexpression von MCP-1 und folglich eine erhöhte Leukozytenanzahl bestehend aus Makrophagen und Monozyten in der Nierenbiopsie vor Reperfusion nachgewiesen werden. Zum anderen konnte auch ein signifikanter Anstieg der anti-inflammatorischen Mediatoren Hsp-70 (Hitze-Schock-Protein 70) und HO-1 (Hämoxygenase-1) in der HT-Gruppe gezeigt werden, wodurch allerdings kein protektiver Effekt in der HT-Gruppe abzuleiten war. [50] [51] Ähnliche Daten publizierten Nijboer et al. und Kusaka et al., die eine signifikant erhöhte Leukozyteninfiltration vor allem im Interstitium der Niere von Nierentransplantaten hirntoter Spender im Gegensatz zu Lebendspendern beobachteten. [52] [53] Die Untersuchungen belegen zudem ein erhöhtes Risiko einer späteren Transplantatdysfunktion, gekennzeichnet u.a. durch einen Anstieg des Serumkreatinins bis zu 3 Jahren nach der Tx (Transplantation) bei Nierentransplantatempfängern hirntoter Spender. [52] [50]

Durch den Mikrozirkulationsschaden nach Hirntod wird die Entstehung von Eicosanoiden und Plättchen-aktivierendem Faktor begünstigt, was zu Vasokonstriktion, Plättchenaktivierung, erhöhter Gefäßpermeabilität und verstärkter Granulozyten-

Einwanderung in das geschädigte Gewebe führt. [47] In mehreren Experimentalstudien wurde zudem eine erhöhte Expression von MHC-Molekülen der Klasse I und II vor allem auf Endothelzellen als Konsequenz der erhöhten IFN- $\gamma$ -Ausschüttung als Folge des I/R-Schadens bzw. des HTs nachgewiesen. Dies führt zu einer gesteigerten Immunogenität des Nierentransplantats, begünstigt die Entwicklung einer akuten Abstoßung und erklärt die eingeschränkte Langzeitfunktion eines Transplantats eines hirntoten Spenders. [54] [55] Nach Eintritt des Hirntods kommt es zusätzlich zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zur Bildung des sogenannten Membranangriffskomplexes (membrane attack complex=MAC): hierbei wird durch die Freisetzung von C3a und C5a in das entzündete Gewebe und die Sekretion von Zytokinen, die Aktivierung und Migration von Neutrophilen gefördert. [56] [57] Die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediatoren (ROI) im Transplantat wird durch diese Prozesse verstärkt. Final können diese Vorgänge je nach Schädigungsgrad zur Gewebsnekrose oder Apoptose führen. [47] [58]

#### **2.4. Die zentrale immunologische Rolle von IL-6**

Mit seinen umfangreichen Funktionen bei der Immunregulation, Hämatopoese, Entzündung sowie Onkogenese steht IL-6 als pleiotropes Zytokin seit mehreren Jahren im Mittelpunkt der Forschung. Es wird durch Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Mikrogliazellen sowie T- und B-Zellen gebildet und bei Gewebsverletzung/ -entzündung, vor allem bei Operationen oder Trauma ausgeschüttet. [59] [60] [61] Durch seinen frühen und massiven Anstieg gilt IL-6 als Hauptregulator bei der Akuten-Phase-Antwort und stimuliert somit die Synthese von Akuten-Phase-Proteinen, die hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Organen gebildet werden können. [62] Des Weiteren kontrolliert es homöostatische Funktionen, einschließlich des Glukosemetabolismus und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. [63]

Das assoziierte Rezeptorsystem umfasst den spezifischen IL-6-Rezeptor (IL-6R / CD126) und das Glykoprotein gp130, welche bei der Signalübertragung beteiligt sind. Durch Bindung an den IL-6R und nach Dimerisation mit gp130 aktiviert es die Rezeptor-assoziierten Kinasen (JAK1, JAK2 und TYK2) in der Zelle. Dies führt über die STAT/Janus-Kinasenaktivierung zur Bildung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa\beta$ , welche wiederum die Sezernierung weiterer Inflammationszytokine wie z.B. IL-8 und von IL-6 selbst induzieren. Der IL-6R ist ein membran-bindendes Protein,

welches von den Hepatozyten und bestimmten inflammatorischen Zellen exprimiert wird. Daneben gibt es den löslichen IL-6R (sIL-6R), der frei zirkuliert und an IL-6 bindet, sodass ein IL-6/sIL-6R-Komplex entsteht und dadurch die zirkulierende Halbwertszeit von IL-6 sowie seine Signalaktivität verlängert werden. Außerdem können auch andere Zellen (wie z.B. Gefäßendothelzellen), die zwar keinen IL-6R, jedoch gp130 exprimieren, aktiviert werden. Dieser Vorgang wird als IL-6-Transsignaling bezeichnet, der mit der Infiltration neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe und gleichzeitig mit der Begrenzung der Granulozyten-Akkumulation sowie mit der Freisetzung von CD3+ T-Lymphozyten einhergeht. Des Weiteren reguliert IL-6 die Homöostase von Leukozyten. Es induziert die Differenzierung, Proliferation und Polarisierung von T-Lymphozyten und hat zusätzlich antiapoptotische Wirkung auf ruhende oder aktivierte T-Lymphozyten. Es beeinflusst die Immunglobulin-Sekretion von B-Lymphozyten sowie ihre Differenzierung in Plasmazellen nach IL-4-Stimulation sowie die Monozyten/Makrophagen-Achse. In Anwesenheit von IL-2 bewirkt es die Differenzierung der T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen und die Proliferation der Thymozyten. IL-1 und TNF- $\alpha$  stimulieren die IL-6-Freisetzung, während IL-10 sie hemmt. Heutzutage werden IL-6 und sIL-6R als Biomarker für Entzündungsaktivität und Krankheitsprogredienz herangezogen und die Serumlevel routinemäßig überwacht. [59] [64] [65] [66] [67] [68]

Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, dass IL-6 bei ischämischer Gehirnverletzung bzw. bei Eintritt des Hirntods schnell ansteigt, obwohl hohe interindividuelle Schwankungen beobachtet wurden. Fassbender et al. zeigten den signifikant erhöhten IL-6-Spiegel im Serum innerhalb von wenigen Stunden nach dem Einsetzen der akuten zerebralen Ischämie, welcher nach ca. 10 Stunden bis zum 3. Tag ein Plateau entwickelte und bis zum 7. Tag wieder abfiel. [60] Kaminska et al. berichteten über eine signifikant erhöhte Genexpression von IL-6 in den renalen Tubuli hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern sowie über eine signifikant gesteigerte Genexpression in tubulären und glomerulären Biopsien im Vergleich mit IL-6-Werten nach akuter Abstoßung. Dies bestätigt erneut den Parenchymschaden, der durch den HT verursacht ist und die Schlüsselrolle von IL-6. [69] Außerdem stellte die Arbeitsgruppe von Reinhold fest, dass die Konzentration von IL-6 im Urin früh bei akuter Abstoßung ansteigt. [70]

Nakagiri et al. zeigten in einem Mausmodell nach pulmonaler Transplantation, dass IL-6 die Ausdifferenzierung der Th17-Zellen stimuliert und Treg supprimiert. Th17-Zellen

sezernieren ihrerseits IL-17, welches vor allem die Neutrophilenproliferation und -migration fördert. Außerdem begünstigen sie die Aktivierung und die Proliferation der Endothelzellen und der Fibroblasten, die für den Abstoßungsmechanismus essentiell sind. Desweiteren wiesen sie nach, dass es durch die Inhibition der Formation des IL-6/sIL-6R-Komplexes zur verminderten Poese der Th17-Zellen kommt und auf diese Weise die chronische Abstoßung reduziert wird. [71] [72] [73] [74]

Reviron et al. untersuchten die Beziehung zwischen dem Ausmaß an TNF- $\alpha$ - und IL-6 Produktion und dem Genpromoter-Polymorphismus bei Nierentransplantatempfängern. Die Analysen des Genotyp-Polymorphismus zeigten, dass hohe TNF- und IL-6-Genotyp-Frequenzen bei Patienten mit Abstoßungsepisoden (AE) im Gegensatz zu denen ohne AE minimal erhöht waren. [75]

IL-6 ist entscheidend für den Ausgleich der pro- und anti-Inflamationsprozesse. Dies liegt an der Fähigkeit, den Wechsel von angeborener zur erworbenen Immunität zu initiieren. Die bisherigen Studien zeigen, dass die IL-6-Aktivität von großer Bedeutung für das Management der akuten Entzündung/Abstoßung ist. Bei chronischen Entzündungen erwies sich die Blockade von IL-6-Transsignaling von Vorteil. [66]

### **3. Stand der Forschung und Fragestellung**

#### **3.1. Stand der Forschung**

Das große Interesse an der immunogenen Rolle von IL-6 besteht schon seit der Isolierung seines codierenden Gens. Erste Forschungsarbeiten zu IL-6 untersuchten das kardiale Myxom und konnten eine Verbindung zwischen der Freisetzung von großen Mengen an IL-6 und assoziierten Entzündungssymptomen nachweisen. [76] Ebenso wurde gezeigt, dass das Synovialgewebe der Gelenke von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöhte Mengen an IL-6 bildet, dadurch die Aktivität der T-Zellen und Th17-Zellen gesteigert wird und dies wiederum eine aktive Arthritis verursacht. [77] [61] Bei Patienten mit Morbus Castlemann mit massiver Lymphknotenschwellung und schweren Symptomen wie Anämie, hohem Fieber, erhöhten Akut-Phase-Proteinen wurden hohe IL-6-Konzentrationen im Serum sowie eine gesteigerte Produktion von IL-6 in den betroffenen Lymphknoten gemessen. [78] So konnte durch den therapeutischen Einsatz eines IL-6R-Antikörpers bei den o.g. Erkrankungen eine rasche Rückbildung der Entzündung mit Symptomreduktion bzw. Symptombefreiheit erreicht werden. [79] [80] [81]

Ferner konnte gezeigt werden, dass die eingeschränkte Nierenfunktion bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen mittels Tocilizumab (IL-6R-Antikörper) wieder hergestellt wird. [82] [83] [84] Auch der Fallbericht über die Normalisierung der laborchemischen und klinischen akuten Phase bei Morbus Crohn bestätigte die Effektivität einer einzigen Infusionsgabe eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-6R. [85]

Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-6 mit einer Nierenschädigung assoziiert ist. Bei Glomerulonephritis, zu frühen Zeitpunkten nach Nieren-Tx oder bei akuter Abstoßung steigt IL-6 schnell und massiv an. Es normalisiert sich jedoch nach Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion. [86] [87] [88]

Viele klinische und experimentelle Studien zeigten, dass die Veränderungen eines Transplantats direkt in Beziehung mit dem HT stehen, sodass im Vergleich zu Lebendspendern nach Transplantation eines Organs eines hirntoten Spenders nicht nur mit einem Anstieg inflammatorischer Zytokine (darunter auch IL-6) zu rechnen ist, sondern auch mit einem verstärkten I/R-Schaden sowie schlechterem Transplantatoutcome und einer hohen Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion. Eine verstärkte Genexpression inflammatorischer Marker, vor allem von IL-6, vor der

Entnahme im hirntoten Spender als auch vor Reperfusion des Organs haben dies bestätigt. [89]

Außerdem wurde eine Korrelation zwischen bestimmten Karzinomerkrankungen und IL-6-Spiegel im Serum festgestellt. Patienten mit erhöhten IL-6-Werten mit Brust-, Lungen- und hämatopoetischen Karzinomen haben eine schlechtere Prognose. [65] Jones et al. haben gezeigt, dass eine TGF- $\beta$ -Sekretion von den Tumor-infiltrierenden T-Zellen das Transsignaling von IL-6 blockiert und somit das Tumorwachstum verhindert. [66]

### **3.2. Ziele und Fragestellung**

#### **Ziele**

In einem etablierten Ratten-Nierentransplantationsmodell (F-344->Lewis) sollte der Einfluss einer Vorbehandlung hirntoter Spenderratten mit einem monoklonalen Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor (IL-6R mAb) auf die Immunantwort und die Transplantatfunktion in den Empfängertieren untersucht werden. Hierzu sollte die Produktion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine aus dem Blut der Empfängertiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation auf Proteinebene bestimmt werden. Desweiteren sollte die Immunantwort durch den Nachweis verschiedener Immunzellpopulationen (antigenpräsentierende Zellen; T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen) mittels Durchflusszytometrie im Blut, in der Milz sowie im Transplantat zu zwei frühen Zeitpunkten (18 Stunden und 7 Tage) sowie nach 5 Monaten charakterisiert werden. Ergänzend sollten die Transplantate hinsichtlich morphologischer Veränderungen histologisch zu allen Zeitpunkten untersucht und die Langzeittransplantatfunktion nach 5 Monaten durch Ermittlung der Kreatin clearance und der Proteinurie sowie die Messung von mehreren Elektrolyten und Albumin und Urea bewertet werden. Zum Vergleich sollten entsprechende Nierentransplantationen von Lebendspendern durchgeführt sowie in beiden Versuchsgruppen Kontrollen ohne Antikörperbehandlung mitgeführt werden.

#### **Fragestellung**

Kann die Vorbehandlung des hirntoten Spenders durch eine einmalige Applikation eines monoklonalen Antikörpers gegen den IL-6R vor Organentnahme die Immunantwort im Empfänger abschwächen und die Langzeitfunktion des Nierentransplantats verbessern?

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Versuchsaufbau

In einem etablierten Modell der allogenen Nierentransplantation in der Ratte (Spender: Fisher 344, Empfänger: Lewis, chronisches Modell) [90] untersuchten wir die Wirkung des anti-Maus/Ratte CD 126 (IL-6R monoklonalen Antikörpers (mAb) Klon D7715A7, Isotyp Rat IgG2b k, BioLegend/Biozol, Eching, Germany) auf den Reperfusionsschaden und die Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen sowie die Langzeittransplantatfunktion. Alle chirurgischen Bedingungen wurden sauber gehalten, jedoch nicht steril. Die Nierentransplantation wurde von Hirntod (HT)- und Lebendspender- (LD) Fischerratten (F344) zu Empfänger-Lewisratten (Lew) durchgeführt. Die Kontrollgruppen bestanden aus unbehandelten LD- und HT-Spendern sowie vorbehandelten LD. Zusätzlich gab es zwei Kontrollgruppen bestehend aus nativen F344 und Lew-Ratten, die zwar mit Anti-IL-6R mAb vorbehandelt wurden, bei denen jedoch keine Hirntodinduktion, keine Nierentransplantation und keine Cyclosporin A-Therapie erfolgten. Die Beobachtungszeiträume betragen 18 Stunden (h), 7 Tage (d) bzw. 5 Monate (Mo). Der HT beim Spender wurde 6 Stunden vor Explantation der Niere mittels eines okzipital gelegten intrazerebralen Ballonkatheters (Fogarty Katheter Größe 3) induziert. Eine Stunde nach Hirntodinduktion (5h vor Explantation) wurde der Spender mit anti-IL-6R mAb vorbehandelt. Die HT-Tiere sollten bis zur Explantation der Niere hämodynamisch stabil sein, um sicher zu stellen, dass die Nieren bis zur Entnahme ausreichend perfundiert waren, um Vorschädigungen der Explantate zu vermeiden. Anschließend erfolgte die orthotope Nierentransplantation der linken Niere in das Lew Empfängertier. Im chronischen Modell wurde eine Kurzzeitimmunsuppression mit low-dose-Behandlung mit CyA für 10d nach der Implantation des Organs durchgeführt, um akute Abstoßungen zu vermeiden. Am 10. postoperativen Tag wurde die kontralaterale Niere explantiert, um die Transplantatfunktion isoliert beurteilen zu können. Für den Zeitraum von 5Mo wurden serielle Messungen von Nierenfunktionsparametern (Proteinurie, Kreatinin-Clearance) durchgeführt. Am Versuchsende nach 5Mo wurden das Transplantat, die Milz und das Blut entnommen. Ein Teil der Proben wurde für die Analyse der an der Immunantwort beteiligten Zellpopulationen direkt nach Entnahme durchflusszytometrisch (fluorescence-activated cell sorting, FACS) aufgearbeitet. Weitere Proben wurden zur Bestimmung der Zytokin-Level auf Proteinebene im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bzw. der Zytokin-Genexpression mittels real-



time-RT-PCR sowie Gewebeproben für spätere immunhistologische Färbungen bei -80°C asserviert. [91] Zusätzlich wurden Gewebeproben in 4%iger Formaldehydlösung für die spätere Histologie bei Zimmertemperatur asserviert.

Im akuten Modell wurde die Transplantation der linken Niere ohne initiale CyA-Immunsuppression und ohne Entfernung der kontralateralen Niere durchgeführt. Die Beobachtungszeitpunkte wurden auf 18h und 7d festgelegt, da es am häufigsten in diesem Zeitraum zur akuten Abstoßungsreaktion kommt. [92] Alle Empfängertiere wurden nach dem jeweiligen Beobachtungszeitraum in Narkose getötet und die o.g. Untersuchungen ausgeführt.

Die Arbeit wurde im Rahmen des Projekts „Strategien zur Verbesserung der Organqualität hirntoter Spender“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

#### **4.2. Versuchsgruppen**

Die Empfängertiere wurden in drei großen Gruppen abhängig vom Beobachtungszeitraum (18h, 7d, 5Mo) eingeteilt. Diese wurden in vier weitere Gruppen abhängig von der Tierart (BD oder LD) sowie von der Vorbehandlung mit 0,5mg/ Ratte Anti-IL-6R mAb i.v. unterteilt (s. Tabelle 1).

Beobachtungszeitraum	Empfänger	Vorbehandlung	Nachbehandlung
18 Stunden	9x BD	ohne Anti-IL-6R mAb	keine
	7x BD	mit Anti-IL-6R mAb	
	3x LD	ohne Anti-IL-6R mAb	
	3x LD	mit Anti-IL-6R mAb	
7 Tage	8x BD	ohne Anti-IL-6R mAb	
	8x BD	mit Anti-IL-6R mAb	
	5x LD	ohne Anti-IL-6R mAb	
	4x LD	mit Anti-IL-6R mAb	
5 Monate	7x BD	ohne Anti-IL-6R mAb	Low-dose- Behandlung mit CyA für 10d
	7x BD	mit Anti-IL-6R mAb	
	4x LD	ohne Anti-IL-6R mAb	
	5x LD	mit Anti-IL-6R mAb	
Native Tiere	3x NATIV	ohne Anti-IL-6R mAb	keine
	5x NATIV	mit Anti-IL-6R mAb	

Tabelle 1: Übersicht der Versuchstiere

### 4.3. Versuchstiere

#### 4.3.1. Allogenes Modell der orthotopen Nierentransplantation

Aufgrund vieler Faktoren (Größe der Tiere, definierter genetischer Hintergrund: HLA-Antigene, etabliertes Modell) wurde der Versuch im Rattenmodell durchgeführt. Der Begriff allogene Transplantation bedeutet Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies.

#### 4.3.2. Tierausswahl, Haltung und Kennzeichnung

Für den Versuch wurden ausschließlich männliche F-344 und Lew-Ratten verwendet, die von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere ca. 3 Monate alt und hatten ein Gewicht von 200-250g. Sie wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité am Campus Virchow Klinikum gehalten und operiert. Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin

genehmigt (Genehmigungsnummer G 0069/05). Die Unterbringung der Tiere erfolgte in Standardkäfigen (THB 60x20x40cm; Tecniplast, Buguggiate, Italien) mit bis zu 6 Tieren/Käfig bei 22°C mit freiem Zugang zur Nahrung (ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser. Die Tiere wurden unter Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Kennzeichnung der Gruppenzugehörigkeit erfolgte durch eine Ohrlochmarkierung, die individuelle Identifikation wurde durch eine Farbmarkierung am Schwanz durchgeführt.

#### **4.3.3. Fisher-344/Lewis-Modell der chronischen Abstoßung**

Um die Langzeitfunktion des Transplantats beurteilen zu können, wurde das Rattenmodell F-344/Lew benutzt. Aufgrund der wenigen Unterschiede der beiden Inzuchtstämme in MHC-Klasse-I-Loci (RT1.C sowie RT6-Antigen) und Nicht-MHC-Loci ist dieses Modell mit humanen Transplantatlangzeitschäden vergleichbar. Das histologische Bild entspricht dem einer Chronischen Allograft Nephropathie (CAN) beim Menschen. Zum ersten Mal wurde das Modell von White et al beschrieben, später durch Tilney et al modifiziert. [93] [94] Durch die low-dose-Behandlung mit CyA (1,5mg/kg/d) für 10d bei den Gruppen mit Langzeitüberleben wurde die frühe akute Abstoßung des transplantierten Organs verhindert.

### **4.4. Operation und Probenentnahme**

#### **4.4.1. Operation des Lebendspenders**

Zuerst erfolgte die Inhalationsanästhesie mit einem Isofluran-Gemisch (Isofluran, O<sub>2</sub>, Luftgemisch) in einer Narkoseinduktionskammer. Anschließend wurde die Ratte rasiert und in Rückenlage auf die beheizte Korkunterlage unter dem Operationsmikroskop fixiert. Während der Operation erfolgte die Zufuhr des Narkosegasgemisches kontinuierlich durch eine Mund/Nasen-Narkosemaske. Anfänglich wurde die Isoflurankonzentration auf ca. 2,5 Vol.% eingestellt. Aufgrund der zunehmenden Narkosetiefe konnte es im Verlauf auf ca. 1,5 Vol.% reduziert werden. In der Gruppe der vorbehandelten Lebendspender erfolgte die Gabe des anti-IL-6R mAb in einer Dosierung von 500µg/Ratte i.v. in die Vena dorsalis penis fünf Stunden vor Entnahme des Organs.

Die Explantation der Niere wurde auf der linken Seite aufgrund der günstigeren Position der Niere sowie der Länge der Gefäße durchgeführt. Nach der Hautdesinfektion wurde

der mediane Laparotomieschnitt durchgeführt. Das Intestinum wurde auf die rechte Seite gelegt und mit 0,9%-NaCl durchtränkten Kompressen bedeckt. Nachdem die atraumatische Präparation der Nierengefäße und des Ureters unter dem Mikroskop abgeschlossen war, wurde eine einmalige Heparinisierung durch Gabe von 500 Einheiten Heparin in die Vena dorsalis penis durchgeführt. Danach wurde die Niere über eine Braunüle in der Aorta zuerst mit 2,5ml 0,9% NaCl-Lösung und danach mit 1,5ml UW-Lösung nochmals perfundiert. Anschließend erfolgte die Mobilisation der Niere, des Ureters und der Gefäße. Als Erstes wurde der Ureter zusammen mit periuretralem Gewebe zu dessen besserer Versorgung mittig zwischen der Niere und der Harnblase abgetrennt. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Arteria renalis mit Aortenpatch sowie der Vena cava. Das Organ wurde final gelöst und in einer UW-Lösung bei 4°C bis zur Transplantation gelagert.

#### **4.4.2. Operation des Hirntodspenders**

Für die Induktion des Hirntodes im Spendertier wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes standardisiertes Hirntodmodell verwendet. [95] Alle Hirntodspender erhielten eine Anästhesie mit Isofluran und wurden in Rückenlage fixiert. Danach erfolgte die Rasur des Halses, die Desinfektion und anschließend die zervikale Inzision in der Mittellinie des Halses. Durch die vertikale Trennung der Muskeln wurde die Trachea dargestellt und durch zwei Ligaturen vorgelegt. Es folgte ein kurzer transversaler Schnitt an der Trachea. Schließlich wurde eine stumpfe Kanüle als Tubus in die Trachea eingeführt und mit den vorgelegten Ligaturen dicht fixiert. Die Trachea wurde mit einer feuchten Mullkompressen bedeckt. Der externe Teil der Kanüle wurde mit dem Beatmungsgerät verbunden und das Tier wurde für 6h beatmet.

Im zweiten Schritt wurde eine 22G-Kanüle in die Arteria femoralis links im Sinne eines Katheters zur Blutdruckmessung gelegt. Der Hautschnitt an der Leiste wurde mittels einer spitz/stumpfen Schere durchgeführt und die Haut mit einem Retraktor offengehalten. Die Arterie wurde vorsichtig von der Vene und von dem restlichen Gewebe abpräpariert. Nach einer distalen Ligatur wurde auf das proximale Ende der Arterie eine mikrochirurgische Klemme gesetzt und ein kurzer longitudinaler Schnitt an der Vorderwand der Arterie vorgenommen. Durch eine scharfe Pinzette wurde das Gefäß dilatiert und der Katheter vorsichtig in die Arterie unter minimaler Eröffnung der mikrochirurgischen Klemme geschoben. Danach erfolgte die proximale und distale

Fixierung des Femoralkatheters mittels drei Ligaturen. Dieser wurde mit dem Druckaufnehmer verbunden, um den mittleren arteriellen Druck (MAD) permanent überwachen zu können.

Im dritten Schritt wurde das Tier in die Bauchlage gebracht und fixiert. Das vordere Neurokranium wurde freipräpariert und ein Bohrloch in die Sutura sagittalis mittels einer 20G-Kanüle zur Einführung des Fogarty Ballonkatheters (Größe 3) gesetzt. Durch vorsichtiges Aufblasen des Ballons wurde der intrakranielle Druck bis zum Eintritt des Hirntodes gesteigert. Der Katheter wurde an eine Spritze mit isotoner NaCl-Lösung angeschlossen, um den intrakraniellen Druck gegebenenfalls nachregulieren zu können. Der Hirntod wurde anhand verschiedener Parameter wie Apnoe für mindestens 30 Sekunden, ausgelöschte Reflexe und maximal dilatierte Pupillen diagnostiziert. Ab dem Zeitpunkt der HT-Einleitung bis zur Explantation der Niere (6h) wurden die Blutdruckwerte kontrolliert und das Spendertier bei nicht normotensiven Bedingungen, d.h. bei einem MAD unter 80mmHg aus dem Versuch ausgeschlossen, um Vorschädigungen des Transplantats durch Hypotension auszuschließen. In der Gruppe der vorbehandelten HT-Spender erhielten die Tiere eine Stunde nach HT-Einleitung die intravenöse Gabe von 500µg anti-IL-6R mAb. Fünf Stunden später erfolgte die Explantation des Organs wie oben beschrieben.

#### **4.4.3. Operation des Empfängers**

Nach den üblichen vorbereitenden Maßnahmen (beschrieben unter 4.4.1) erfolgte die stumpfe Präparation des Gewebes bis zur kompletten Exposition der linken Empfängerniere. Unter 25-facher Vergrößerung des Mikroskops wurden die Arterie und die Vene mit einer atraumatischen „De Bakey“-Klemme abgeklemmt und im Gegensatz zur Explantation im Spender organnah abgetrennt. Die Abtrennung des Ureters wurde auf der gleichen Weise wie beim Spender durchgeführt.

Die Spenderniere wurde auf die linke Seite des Abdomens platziert. Das Transplantat wurde permanent mit isotonischer Lösung feucht gehalten, um eine Austrocknung des Organs zu vermeiden.

Die Arterie mit dem Aortenpatch der Spenderniere wurde orthotop End-zu-Seite auf die Aorta des Empfängers mittels Prolene 10-0 anastomosiert. Dabei wurden zwei Eckhaltefäden vorgelegt - am kranialen und am kaudalen Ende. Am kranialen Ende

beginnend wurden zuerst die Hinterwand der Arterie und anschließend die Vorderwand verschlossen. Nach Überprüfung des Gefäßlumens wurden die Stiche einzeln geknotet. Die Venenenden wurden mit der End-zu-End-Technik mittels Prolene 8-0 anastomosiert. Die Darstellung der Gefäßenden und die Fixierung derselben erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der Arterie. Als erstes wurde die Hinterwand 4-6 Mal umstochen und sofort verknotet. Entsprechend wurde im Anschluss die Vorderwand vernäht, allerdings weniger fest verknotet, um mögliche Läsionen und nachfolgende Thrombosen zu verhindern.

Nach der Versorgung der Gefäßanastomosen wurden zuerst die „De Bakey“-Klemmen eröffnet. Das Entfernen der Gefäßklemmen verursachte meist eine nur leichte und kurze Blutung der Vene. Eine insuffiziente arterielle Anastomose wurde entweder durch Betupfen der blutenden Stelle oder durch eine zusätzliche Naht versorgt.

Als Letztes erfolgte die End-zu-End Anastomose des Ureters. Ähnlich wie bei den Gefäßen wurde der Ureter an den zwei Seiten durch Knoten fixiert. Die Vorderwand wurde durch einen Knoten in der Mitte versorgt. Danach wurde der Ureter mit Hilfe der Fixierknoten umgedreht und nach Überprüfung des Lumens ein zweiter Knoten an der Hinterwand gesetzt. Die Längslaparotomie wurde durch eine fortlaufende Naht geschlossen und gut desinfiziert. Die Warmischämie betrug im Mittel ca. 16 Minuten, die Kaltischämie weniger als 45 Minuten.

Um die Langzeitfunktion der transplantierten Niere beurteilen zu können, erfolgte die Nephrektomie der kontralateralen Niere am 10. postoperativen Tag bei Tieren mit einem Beobachtungszeitraum von 5 Monaten. Nach den standardisierten vorbereitenden Maßnahmen wurde die rechte Niere freigelegt und die dazugehörigen Gefäße und der Ureter für die Ligatur und die Abtrennung derselben präpariert. Die Niere wurde aus ihrer Kapsel entnommen und das Abdomen wieder verschlossen.

#### **4.4.4. Postoperative Versorgung**

Postoperativ erhielten alle Tiere zur Schmerzanalgesie Caprofen 5mg/kg s.c. für 2d sowie Metamizol 400mg/100ml Trinklösung für insgesamt 4d. Nach der Operation wurden sie unter einer Rotlichtlampe gewärmt und für einen Tag in einem separaten Käfig gehalten.

Nur die Gruppe der Langzeittiere (5 Monaten) erhielt eine Kurzzeit-Immunsuppression mit CyA (1.5mg/kg i.m.) für die ersten 10d post Tx, um akute Abstoßungsepisoden zu verhindern.

#### **4.4.5. Probenentnahme und Tötung der Tiere**

Wie oben beschrieben wurde das Tier narkotisiert und das Abdomen eröffnet. Das Transplantat wurde makroskopisch beurteilt. Oberhalb der Aortenbifurkation wurde ein Venenverweilkatheter gelegt, über den 3-5ml Blut in eine Heparin-Monovette abgenommen wurden. Nach Perfusion der Niere über den Venenverweilkatheter mit gekühlter 0,9% NaCl-Lösung wurden das Transplantat sowie die Milz entnommen.

Die Niere wurde auf eine Petrischale gelegt und sagittal in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde zur Zellisolierung für FACS-Analysen in entsprechende Probenröhrchen verbracht, die andere Hälfte wurde in drei repräsentative Scheiben von ca. 4 mm Dicke aufgeteilt und für die Histologie (4%ige Formaldehyd, 4°C), Immunhistologie und real-time RT-PCR (schockgefroren in flüssigem Stickstoff, Langzeitlagerung bei -80°C) asserviert. Die Milz wurde für FACS- und ELISA-Untersuchungen entnommen und bis zur Herstellung von Milzzellsuspensionen am selben Tag in einem Falcon-Röhrchen mit RPMI 1640 Medium aufbewahrt. Das Tier wurde nach einem diaphragmalen Schnitt und der Durchtrennung der großen Gefäße getötet.

### **4.5. Datenerhebung**

#### **4.5.1. Bestimmung von Proteinurie, Kreatininspiegel und Elektrolyten im Urin**

Im chronischen Modell erfolgte die Bestimmung der Urinparameter (Proteinurie, Kreatinin und Elektrolyte) an Tag 15 sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Monaten. Zur Bestimmung der Urinparameter wurde das Empfängertier für 24h im metabolischen Käfig gehalten, in welchem eine Urinsammlung getrennt vom Stuhlgang möglich ist. Die 24h-Urinmenge wurde vermerkt und eine Probe des Urins an das Labor des Instituts für Pathobiochemie und Laboratoriumsmedizin der Charité (Campus Virchow-Klinikum) übergeben. Dort erfolgte die Bestimmung der Proteinurie (Benzethoniumchloridreaktion; Hitachi 911 Analyzer), des Urin-Kreatinin-Spiegels (modifizierte Jaffeé-Reaktion) und

der Elektrolytkonzentrationen (Natrium, Kalium, Harnstoff) nach zertifizierten Standards. Bei jeder Probenentnahme wurde ergänzend das Gewicht der Tiere ermittelt.

#### **4.5.2. Bestimmung des Serumkreatinins und der Kreatinin-Clearance**

Zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance erfolgten parallel zu den Urinprobenentnahmen, Blutentnahmen zu den o.g. Zeitpunkten zur Bestimmung des Serumkreatinins. Hierfür wurden den Tieren in Narkose aus der Schwanzvene oder aus dem rechten Jugularvenenwinkel 1-2ml Blut in Heparin-Monovetten entnommen. Der Serumkreatininspiegel wurde im Labor der Charité ermittelt.

Die Kreatinin-Clearance konnte nach Erhalt aller notwendigen Laborwerte nach folgender Formel berechnet werden:

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

#### **4.5.3. Histomorphologische Untersuchung**

Die in Formalin fixierten Präparate wurden zunächst entwässert (Hypercenter XP, Fa Shandon, Astrom, Runcorn, U.K.) und anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet (Einbettstation Microm, Walldorf, Deutschland). Nach Kühlung und Erhärtung der Paraffinblöcke wurden Schnitte in einer Dicke von 5µm mit einem Schlittenmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, im Wasserbad (30°C) gestreckt, auf Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Präparate mittels Para-Clear-Bad (Xylolersatz, Quartett, Berlin, Deutschland) für 2 x 15 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol, absolut vergällt, 5l, Berlin; 2 x 2 min in 100%, 2 min in 95%, 2 min in 80%, 2 min in 70% Alkohol) rehydriert. Nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E), zweimaliger Spülung mit destilliertem Wasser zwischendurch und folgender Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min 80%, 1 min 95% und 2 x 2 min mit 100% Alkohol) erfolgte eine erneute Inkubation (2 x 15 min) im Para-Clear-Bad.

Hämatoxylin färbt das Chromatin im Zellkern blauviolett, Eosin bedingt die rote Färbung der Zellplasmaproteine, Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und Kollagens. Die Auswertung der Präparate wurde bei einer 200fachen Vergrößerung



unter dem Mikroskop (Olympus, Bx 41, Fa, Serotec, Biozol, Deutschland) durchgeführt. Für eine semi-quantitative Auswertung wurden je 20 Gesichtsfelder pro Schnittpräparat beurteilt. Alle Gewebeschnitte wurden in Anlehnung an die Banff-Klassifikation humaner Schnittpräparate untersucht. Auf einer Skala von 0 – 4 wurde der Grad der zellulären Infiltration, der tubulären Atrophie, der interstitiellen Fibrose und der Arteriosklerose beurteilt: Grad 0 = keine morphologischen Veränderungen, Grad 4 = völlige Destruktion. Zur Ermittlung des Grades der Glomerulosklerose wurden der prozentuale Anteil sklerotischer geschädigter Glomeruli durch Auszählung ermittelt und die Glomerulosklerose anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{Glomerulosklerose} = \text{Anzahl sklerotischer Glomeruli} / \text{Gesamtzahl Glomeruli}.$$

Es wurden 20 Gesichtsfelder/Schnitt ausgewertet.

Grad	0 „keine“	1 „leicht“	2 „mäßig stark“	3 „sehr stark“
Gefäßmorphologie	0%	<50%	50%	>50%
Tubulusmorphologie	0%	<50%	50%	>50%
Zelluläre Infiltration	0%	<50%	50%	>50%
Glomerulummorphologie	0%	<50%	50%	>50%
Glomerulosklerose (CAN)	Anzahl destrukturierter Glomeruli/ Gesamtzahl der Glomeruli pro Schnitt			
Arteriosklerose (CAN)	Anzahl arteriosklerotisch veränderter Arteriolen/ Gesamtzahl der Arteriolen pro Schnitt			

Tabelle 2: Histologisches Bewertungssystem des Schweregrades der Nierentransplantatschädigung nach allogener Transplantation, analog zu [91]

#### 4.5.4. ELISA, Herstellung von Milzzellkulturüberständen, Protokoll

##### Messprinzip

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein Verfahren zur Messung der Protein-/ Zytokinkonzentrationen in einer Lösung (z.B. Blut, Urin Zellkulturüberstand). In dem hier verwendeten Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper eingesetzt, die beide spezifisch, aber an unterschiedliche Epitope des zu detektierenden Antigens binden. An den Boden der Mikrotiterplattenvertiefungen (wells) wird der primäre spezifische

monoklonale Antikörper (*capture antibody*) gebunden (*coating*). Nach Zugabe der Probe bindet der *capture antibody* während einer längeren Inkubationszeit das nachzuweisende Antigen in der Lösung. Nach diversen Waschschritten zum Auswaschen nicht gebundener Probenanteile wird ein sekundärer Enzym- (Streptavidin-horseradish peroxidase, HRP) gekoppelter Antikörper (*detection antibody*) hinzugegeben. Durch die Bindung des Detektionsantikörpers an das Antigen entsteht so ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Enzym-Komplex. Nach weiteren Waschschritten erfolgt schließlich die Quantifizierung der Antigenmenge durch Zugabe eines für das verwendete Enzym geeigneten Substrats (Chromogen; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB). Das Produkt der Reaktion führt zu einem Farbumschlag und kann photometrisch als Extinktion gemessen werden, der Grad der Färbung ist proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens (Protein/Zytokin).

### **Herstellung von Milzzellkulturüberständen**

Zur Ermittlung der Zytokinproduktion im Empfänger nach Transplantation wurden Zellsuspensionen aus den Milzen der Empfängertiere hergestellt und die Zytokinproduktion der Leukozyten nach Stimulation *in vitro* in den Kulturüberständen bestimmt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz in einer Petrischale mechanisch in 10ml RPMI 1640 Medium (PromoCell Heidelberg, Deutschland) zerkleinert. Danach wurde die Lösung durch einen 70 mm Cell Strainer filtriert und anschließend auf 1200 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde die Suspension über einen 40 mm Cell Strainer filtriert und mittels eines Ficoll-Gradienten (Dichtgradientenzentrifugation) zur Isolierung mononukleärer Zellen weiter aufgereinigt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Überstände verworfen und die Leukozytenpellets in RPMI-Medium supplementiert mit 10%FCS (fetal calf serum) aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Probe der Suspension 1:100 mit Trypanblau verdünnt und die Anzahl lebender Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellzahl wurde auf  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden jeweils 0,5ml der Zellsuspension in die Wells einer Zellkulturplatte pipettiert. Zur Verstärkung des Nachweislevels wurden die Milzzellkulturen in Abhängigkeit der zu bestimmenden Zytokine mit Mitogenen unspezifisch stimuliert (Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>):

Für IL-2: 5ml ConA, 5h

Für IL-4: 2ml PMA / 2ml Ionomycin, 24h

Für IL-6: 10ml LPS, 5h

Für IL-10: 10ml LPS / 5ml ConA, 5h

Für TNF-Alpha: 10ml LPS, 5h

Für INF-Gamma: 5ml ConA, 5h

Nach der Inkubation wurden die Zellkulturüberstände gewonnen, 5 min bei 1200rpm zentrifugiert und die Aliquots bis zu Messung bei -80°C gelagert.

Für die Bestimmung der Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-Alpha und IFN- $\gamma$  in der Milz sowie die IL-6-Bestimmung im Serum wurden Sandwich-ELISAs (wie oben beschrieben) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die finale Farbreaktion des ELISAs wurde mit verdünnter HCL-Lösung gestoppt und die Extinktion bei 450nm Wellenlänge (mit einer eingestellten Korrektur am Gerät zwischen 540-570nm) gemessen. Anhand der mitgeführten Standardproben wurden Eichkurven erstellt und die Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt.

#### **4.5.5. Durchflusszytometrie- Messprinzip, Zellisolierung, Protokoll**

##### **Messprinzip**

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell sorting, FACS) dient zur Beurteilung der Eigenschaften (Form, Größe und Struktur) und Quantifizierung einzelner Zellpopulationen in einer Suspension, die durch vorangegangene Bindung an spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper nachgewiesen werden können. Die Messung beruht auf der Emission von Lichtsignalen der Zelle, die den Messbereich (Laserstrahl) passieren. Die farbmarkierten Zellen werden nacheinander im Laserstrahl gemessen. Dabei entsteht ein Fluoreszenzsignal (Streulicht), welches von einem Detektor ausgewertet wird und mit der Größe (gemessen durch Vorwärtsstreulicht, *forward angle light scatter*) und der Beschaffenheit (Granularität, Menge der Vesikel, Zellkerngröße etc.; gemessen durch Seitwärtsstreulicht, *side light scatter*) der Zellen einer Population korreliert.

##### **Zellisolierung aus Niere, Milz und Blut**

Die Leukozytenpräparation aus der Milz wurde wie unter 4.5.4. beschrieben durchgeführt. Die Niere wurde vor der mechanischen Zerkleinerung zusätzlich mit Kollagenaselösung behandelt, um die Isolierung der Leukozyten aus dem Nierenparenchym zu erleichtern. Für die FACS-Messungen wurde die Zellzahl der Nierenzellsuspensionen auf  $1 \times 10^6$ /ml, die der Milzzellsuspensionen auf  $5 \times 10^6$ /ml Zellen.

Die Zellen aus Milz und Niere wurden in FACS-Puffer suspendiert. Anschließend wurden die Proben bei 1200 U/min und 4°C 5 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden in unterschiedlichen Ansätzen Fluoreszenz-markierte spezifische Antikörper in verschiedenen Kombinationen (Panels, siehe unten) zu den Zellsuspensionen gegeben. Die Zellfärbung erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C. Den Biotin-enthaltenden Proben nämlich Panel III und IV wurde zusätzlich 0,5µl Streptavidin zugesetzt und sie wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 1ml 1% Paraformaldehyd für 15 Minuten bei 4°C fixiert. Nach dem letzten Waschen mit 2ml FACS-Puffer wurden die Proben im Kühlschrank bis zur Messung am folgenden Tag gelagert.

Die PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurden im Vorversuch für die FACS-Analyse vorbereitet. 2ml Vollblut wurden mit PBS bei Raumtemperatur auf 24ml in einem 50ml-Bluecap-tube aufgefüllt. 3ml Pancoll wurden mit 8ml Blut/PBS überschichtet und für 30min bei 20°C bei 2400U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der Zellring wurde abpipettiert, in RPMI-Medium überführt und einmal gewaschen. Nach der folgenden Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und zum Pellet wurde 1ml RPMI mit 10% FCS gegeben, gut gemischt und dabei mechanisch nicht zerstörbares Material entfernt. Zunächst wurden 50µl PMBC in jedes Probenröhrchen zu den verschiedenen Antikörperkombinationen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln bei 4°C wurden die Zellen mit 1ml Lysepuffer (8,29g NH<sub>4</sub> Cl; 1,02g KHCO<sub>3</sub>; 29,20mg EDTA-mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt) gemischt und erneut 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1800 U/min bei 18-20°C erfolgte das Abgießen und Vortexen mit anschließender dreimaligen Zugabe von 1ml PBS/NaN<sub>3</sub>. Dann erneutes Abgießen, Mischen und Zugabe von 0,5µl Streptavidin zu den Panels III und IV und Inkubation für weitere 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit 3ml PBS/NaN<sub>3</sub> wurden die Zellen zentrifugiert und mit 1ml PFA fixiert.

Alle Proben wurden nach Kompensation (zum Ausgleich von Signalüberschneidungen der verwendeten Fluorochrome) im FACS Calibur (BD Biociences, San Jose, CA, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACS-Software (FlowJo® Tree Star, Oregon, USA und Macintosh PC Apple) in zellspezifischen definierten Regionen, sogenannten *Gates*, und unter Berücksichtigung der mitgeführten Isotyp- und Negativkontrollen.

## **Panels**

Für die FACS-Analyse im Transplantat, in der Milz und im Blut wurden vier Panels erstellt, in denen unterschiedliche Immunzellen nachgewiesen wurden.

### Antikörper:

Panel I: CD 3 FITC, CD 4 APC, CD 8 PercP, CD 25 PE: T-Zellen

Panel II: CD 161a FITC, CD 4 APC, CD 8 PercP, CD 62L PE: NK-, NKT- und T-Zellen

Panel III: CD 45 RA FITC, CD 86 APC, MHC II PercP, Ox 62 PE: B- und Dendritische Zellen

Panel IV: CD 54 FITC, ED 1 APC, MHC II PercP, CD 31 PE: Monozyten / Makrophagen

### Negative Kontrollen:

IgG mouse FITC, IgG mouse APC, IgG mouse Percp, IgG mouse PE

## **4.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten sowie ihre grafische Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung und Standardfehler erfolgte mittels GraphPad Prism 6.0e (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Aufgrund der zwei Variablen „Zeit“ und „Behandlungsgruppe“ in den LD- und HT-Gruppen wurde der Two-way-ANOVA-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit einer Variablen (Zeit oder Behandlungsgruppe) wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Im Falle des direkten Vergleichs nur von zwei Gruppen wurde zusätzlich mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test ausgewertet. Für alle Tests wurde ein p-Wert von  $\leq 0.05$  als signifikant erachtet.

## **4.7. Materialien**

### **OP-Instrumente und Geräte**

Operationsmikroskop (Model M690)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Präparierschere (Modell No. 14519-14)	Fine Science Tools, Heidelberg, De
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

Blutdruckgerät Sirecust 1281	Siemens, Medical Electronics, Danvers, MA, USA
Zusatzgerät Sirem	„
Harvard Rodent Ventilator Model 683	Holliston, MA, USA
Fogarty Embolectomy Catheter	Intra special catheters, Rehlingen-Siersburg, DE

### **Laborgeräte**

Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrotom (HM 400)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tischmikroskop (EX41)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Cryotom (HM 500 OM)	Microm-Laborgeräte, Walldorf, De
FACSCalibur®	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS-Software (FlowJo®)	Tree Star, Oregon, USA
Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Macintosh PC	Apple Corporation, Cupertino, CA, USA
ELISA-Photometer (Fluostar Galaxy®)	BMG, Offenburg, Deutschland
ELISA-Software(Fluostar Galaxy® Ver. 4.21-0)	BMG, Offenburg, Deutschland
Ultraturex homogenizer T25	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germany
Photometer Fluostar Galaxy	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech, Osterode/ Harz, Deutschland
Schüttelgerät Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Statistiksoftware GraphPad Prism, Ver. 6.0	Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA

### **Verbrauchsmaterial**

Faden USP 10-0 / 8-0 (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, De
Pipettenspitzen, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg, 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
Blutmonovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cryoschnitt-Medium	Killik, Mailand, Italien
DAKO-Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
ELISA-Platten, Module je 16 Wells (F16 Maxisorp Loose®; Nr. 469914)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellsieb, 40 µm + 70 µm (Falcon® Cell Strainer)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Stickstofftanks	Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA
Zellkulturloch Platten	Falcon, Oxnard, USA
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	“
Zellsiebe, 40 und 100 µm Porengröße	“
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	“
Eppendorf-Gefäße, 2ml	Sarstedt AG&Co, Numbrecht, De
Petrischale	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich

### Pharmaka

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

### Allgemeine Reagenzien und Lösungen

Flüssiger Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyd-Lösung, 4%, gepuffert	Herbeta, Berlin, Deutschland
Ethanol, 100 Vol%, denaturiert	“
Aceton, pro analysi	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Paraffin (Kendall Paraplast Plus®)  
Trypanblau  
Tween-20  
Dichtegradient Pancoll (Niere)

Tyco, Mansfield, MA, USA  
Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, De  
Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, De  
BD Biosciences, San Jose, CA, USA

### Reagenzien und Lösungen FACS

Das RPMI-Medium enthielt:

RPMI-Lösung (RPMI 1640), 500 ml  
Natriumpyruvat (MEM 100MM), 5 ml  
Non essential amino acids, 5 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

Die RPMI/FCS-Lösung enthielt

RPMI-Medium wie oben beschrieben, 100 ml  
FCS, 10ml (Nr. (10106-169)

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Die PBS-Lösung enthielt

Aqua dest., 1000 ml  
D-PBS (10x), 10 ml (Nr. 14200-067)

Fresenius, Bad Homburg, Deutschland  
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

FACS-Puffer (Niere/Milz) enthielt

1%ig Bovines Serumalbumin in PBS (10g/l)  
Natrium-Acid 0,1% (1g/l)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland,  
Merck, Deutschland

FACS-Puffer (Blut) enthielt

1000 ml PBS  
Natrium-Acid 0,1%

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland,  
Merck, Deutschland

1%ige-Paraformaldehydsg. enthielt

5 g Paraformaldehyde in ca. 400ml PBS,  
Magnetührer, abkühlen lassen, auffüllen auf  
500ml mit PBS

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland



Lysepuffer Blut enthielt

auf 1000 Aqua dest.

8,29 NH<sub>4</sub>CL

1,02g KHCO<sub>3</sub>

29,20 mg EDTA

Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

Merck, Deutschland

Kollagenaselösung enthielt

10mg Kollagenase Typ IV in 10ml RPMI-Medium,

steril filtrieren

### **Antikörper FACS**

CD3 FITC Anti-Rat (Nr. 557354)

BD Bioscience, San Jose, CA, USA

CD 25 PE Anti-Rat (Nr. 554866)

“

MHC II PerCP Anti-Rat (Nr. 557016)

“

CD 4 APC Anti-Rat (Nr. 550057)

“

CD 8a PerCP Anti-Rat (Nr. 558824)

“

CD 31 PE Anti-Rat (Nr. 55027)

“

CD 161a FITC Anti-Rat (Nr. 555008)

“

CD 62L PE (Nr. 551398)

“

CD 45RC FITC Anti-Rat (Nr. 0999)

“

CD 86 Biotinlabeled Anti-Rat (Nr. 555017)

“

CD 54 FITC (Nr. 554969)

“

ED1 Biotinlabeled (Nr. 559992)

“

APC Streptavidin für CD 86, ED1

(Nr. 554067)

“

OX 62 PE Anti-Rat (Nr. 1029PE)

AbD Serotec, Raleigh, USA

### **Antikörper FACS – Isotypkontrollen:**

FITC Mouse IgG1 (Nr. 554679)

BD Bioscience, San Jose, CA, USA

PE Mouse IgG1 (Nr. 554680)

“

APC labeled Anti-Mouse IgG1 (Nr. 550874)

“

PerCP Mouse IgG1 (Nr. 559425)

“

### **Reagenzien und Lösungen H&E Färbung**

Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung (Nr. HHS32-1L)	“
Aqua dest., 1 l	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine (Nr. 1.09242.0100)	Merck, Darmstadt, Deutschland

### **Reagenzien und Lösungen ELISA**

LPS-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PMA-Lösung	“
ConA	“
PMA/Ionomycin-Lösung	“

### **Antikörper ELISA:**

Rat IL-2 (Nr: R2000)	alle Quantikine, Minneapolis, MN, USA
Rat IL-4 (R4000)	
Rat IL-6 (R6000B)	
IL-6 Anti-Rat	
Rat IL-10 (R1000)	
Rat TNF-a (RTA00)	
Rat IFN- $\gamma$ (RIF00)	

Tabelle 3: Aufstellung verwendeter Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Langzeit-Transplantatfunktion: Proteinurie und Kreatinin-Clearance

Nach 5 Monaten zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinurie in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontroll-Gruppe ( $p=0.0005$ ), während die Albuminkonzentration in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich der BD-Kontroll-Gruppe signifikant reduziert war ( $p=0.0251$ ). Beim Vergleich beider vorbehandelter Gruppen ergab sich eine signifikant niedrigere Proteinurie in der LD-Gruppe im Vergleich zur BD-Gruppe (LD+anti-IL6R mAb vs. BD+anti-IL6R mAb:  $13.79\pm 2.33\%$  vs.  $50.33\pm 15.82\%$ ;  $p<0.0001$ ).

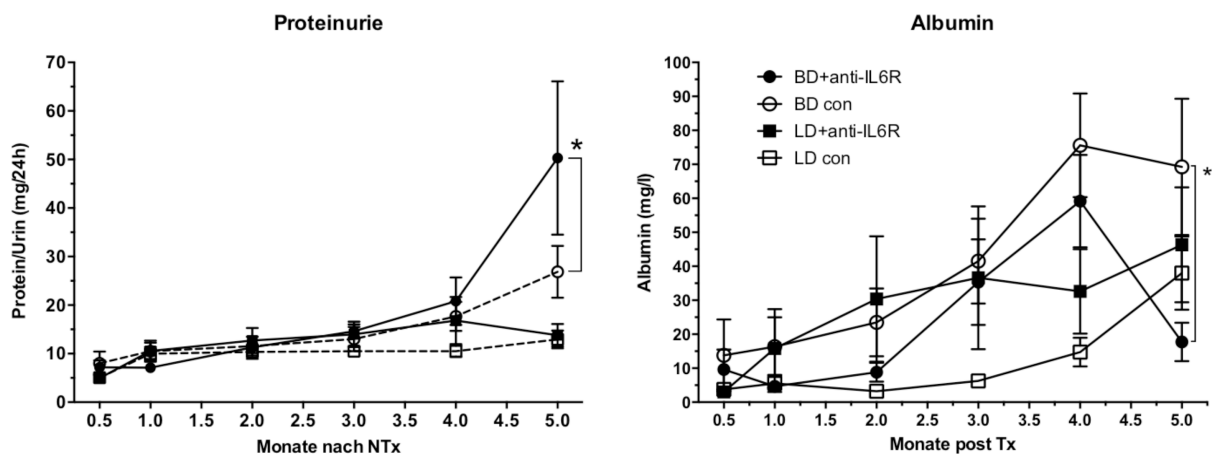


Abb. 1: Proteinurie und Albuminurie 5Mo nach Nierentransplantation

Bezüglich Kreatinin-Clearance, Harnstoff-, Kalium- und Natriumgehalt im Urin wurden nach 5 Monaten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet. Diese Ergebnisse wurden zum Teil bereits veröffentlicht. [91]

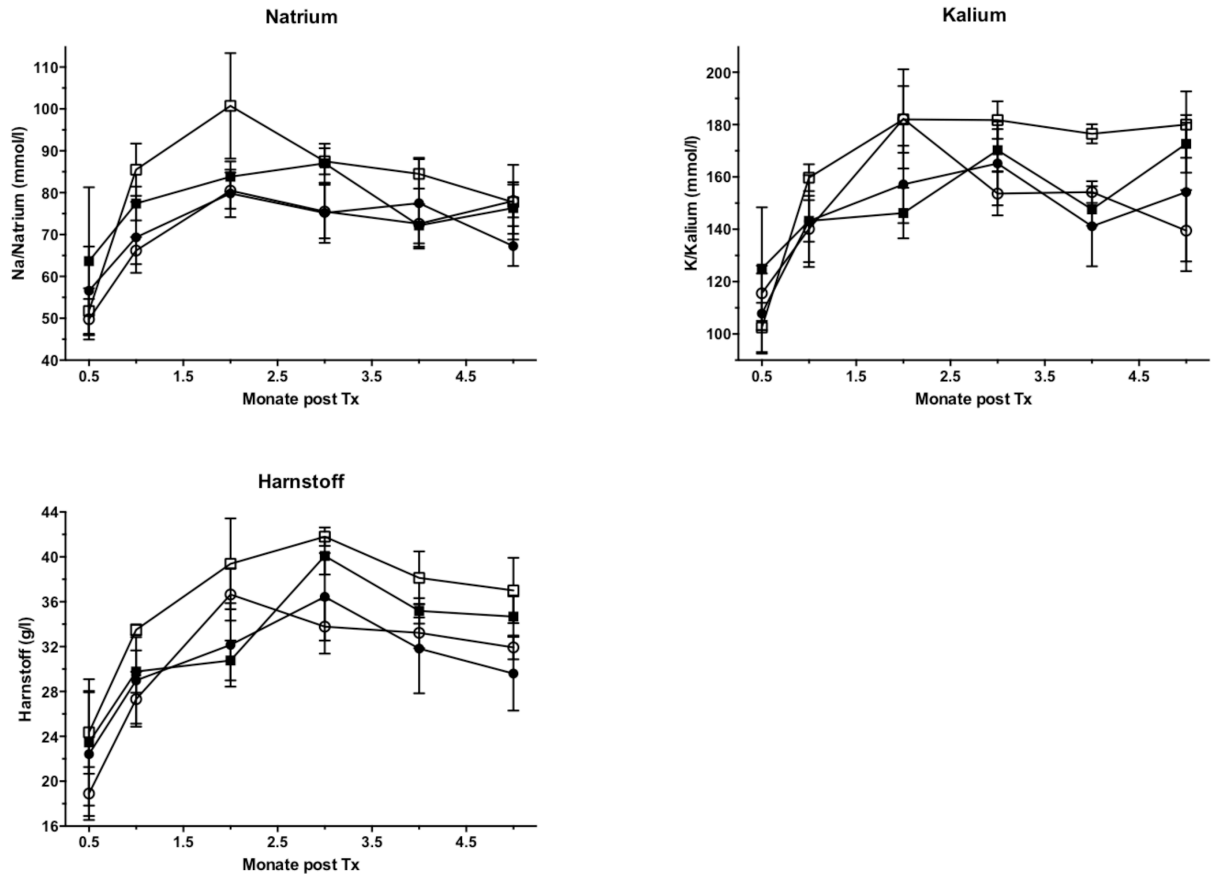


Abb. 2: Natrium-, Kalium- und Harnstoffgehalt im Urin 5Mo nach Nierentransplantation

## 5.2. Histologie

Wie oben schon beschrieben wurden die histologischen Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen zur Nierenfunktion bereits teilweise von der Arbeitsgruppe veröffentlicht. [91]

Im Vergleich beider BD-Gruppen 7 Tage nach Transplantation zeigte sich eine signifikant reduzierte Zellinfiltration und eine verringerte Glomerulischädigung ( $p=0.0430$ ) in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontroll-Gruppe. Im Vergleich der BD-Gruppen mit den jeweiligen LD-Gruppen sowie innerhalb der LD-Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dieser in der frühen Phase nach Transplantation protektive Effekt des IL-6R-Antikörpers auf die Morphologie der transplantierten Niere konnte histologisch nach 5 Monaten nicht bestätigt werden.

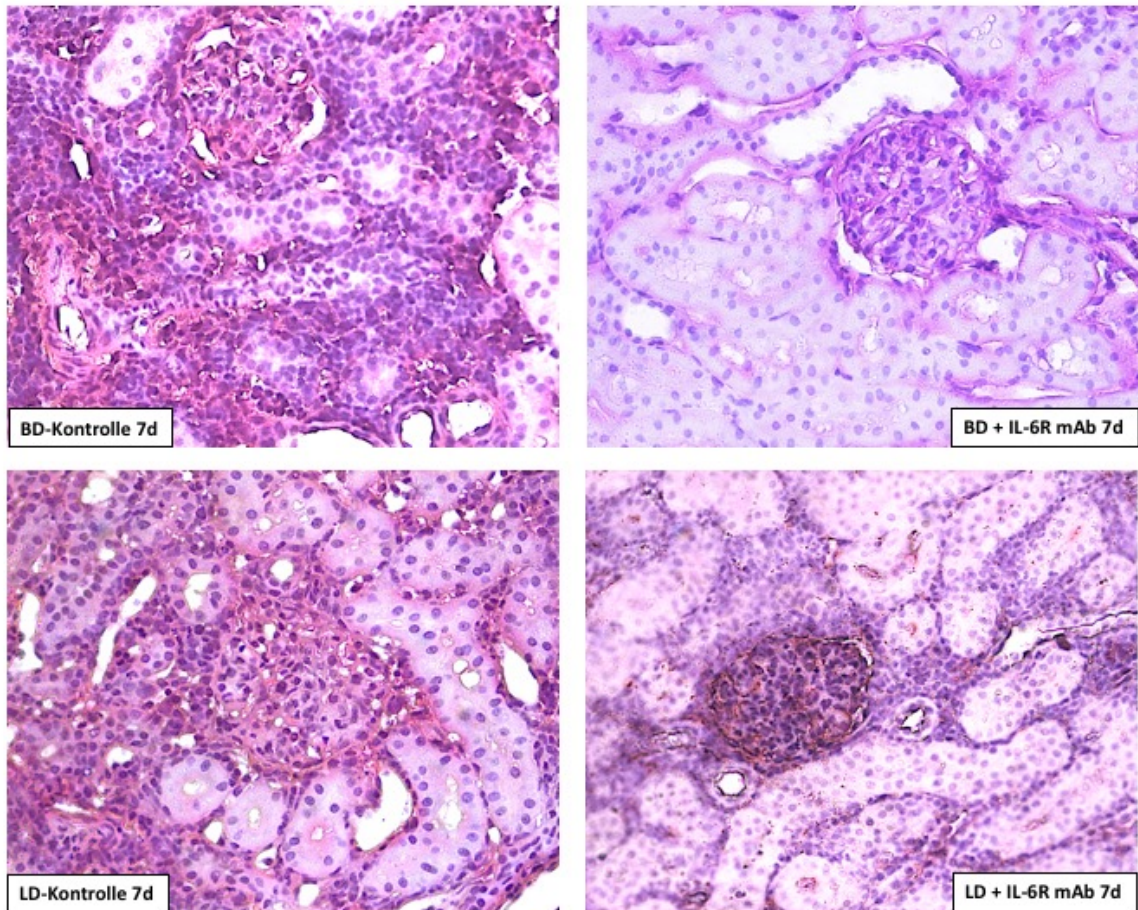


Abb. 3: H&E Färbung der Nierenallografte 7d p.t. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten LD- bzw. der anti-IL6R mAb behandelten und unbehandelten BD-Spender, (Lichtmikroskopie, 400x)

### 5.3. Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS); Niere

#### 5.3.1. Infiltration von Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ)

##### ED1+ Monozyten/Makrophagen

FACS-Analysen der ED1+ Monozyten-/Makrophagenpopulation der Niere 18h, 7d und 5 Monate nach Transplantation ergaben in der Two-Way-ANOVA-Analyse (TWA) hinsichtlich der Variable „Zeit“ einen signifikanten Anstieg der ED1+ Zellpopulation in der BD Kontrollgruppe von  $6.62 \pm 3.37\%$  18h post transplanatationem (p.t.) auf  $35.69 \pm 9.14\%$  an Tag 7 ( $p < 0.0001$ ). Nach 5 Monaten reduzierten sich die Zellzahlen erneut auf das Ausgangsniveau (Tag 7:  $35.69 \pm 9.14\%$  vs. 5 Monate:  $4.67 \pm 0.72\%$ ;  $p < 0.0001$ ). Dementsprechend ergab der Vergleich von BD-Kontrolle und behandelte BD-Gruppe an Tag 7 p.t. eine signifikant geringere Anzahl ED1+ Monozyten/Makrophagen in der vorbehandelten BD-Gruppe (BD+IL6R mAb:  $20.91 \pm 11.98\%$  vs. BD-Kontrolle:  $35.69 \pm 9.14\%$ ;  $p = 0.0179$ ).

Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf wie in der BD-Kontrollgruppe, also ein starker Anstieg nach 7 Tagen und erneuter Abfall nach 5 Monaten, zeigte sich bei den Lebendspenden interessanterweise in der behandelten Gruppe (LD+IL6R mAb-Gruppe: 18h:  $2.14 \pm 1.76\%$  vs. 7 Tage:  $41.70 \pm 5.09\%$  vs. 5 Monate:  $14.38 \pm 5.91\%$ ;  $p < 0.0001$ ), während bei der unbehandelten Gruppe (LD-Kontrolle) keine signifikanten zeitlichen Veränderungen zu beobachten waren. Tatsächlich zeigte sich an Tag 7 p.t. dementsprechend auch eine deutlich höhere Anzahl von ED1+ Monozyten/Makrophagen in den Transplantaten vorbehandelter Lebendspenden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (LD+IL6R mAb-Gruppe:  $41.70 \pm 5.09\%$  vs. LD-Kontrolle:  $24.82 \pm 17.89\%$ ;  $p = 0.0604$ ).

Zum Zeitpunkt 18h p.t. ergab sich eine signifikant verringerte Zellzahl in der LD+IL6R mAb-Gruppe mit  $2.18 \pm 1.76\%$  im Vergleich zur vorbehandelten BD-Gruppe mit  $14.70 \pm 3.81\%$  ( $p = 0.0268$ ), während 7d und 5Mo p.t. jeweils eine höhere Zellzahl in der LD+IL6R mAb-Gruppe im Vergleich zur BD+IL6R mAb-Gruppe beobachtet wurde (7d, LD+IL6R mAb-Gruppe:  $41.70 \pm 5.10\%$  vs. BD+IL-6R mAb-Gruppe:  $20.91 \pm 11.98\%$ ;  $p = 0.0061$  und 5Mo:  $14.38 \pm 5.91\%$  vs.  $7.03 \pm 1.12\%$ ;  $p = 0.0173$ ).

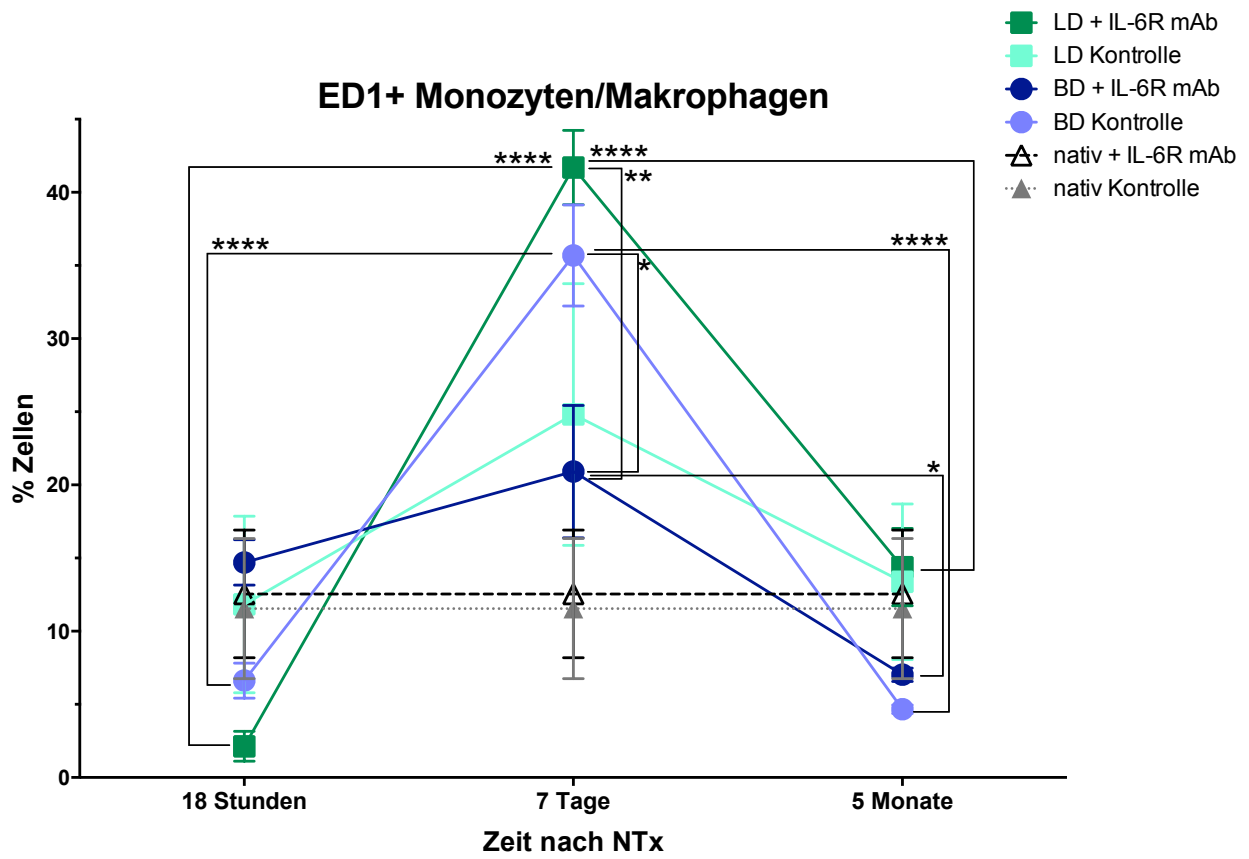


Abb. 4: ED1+ Monozyten/Makrophagen in der Niere (FACS: TWA)

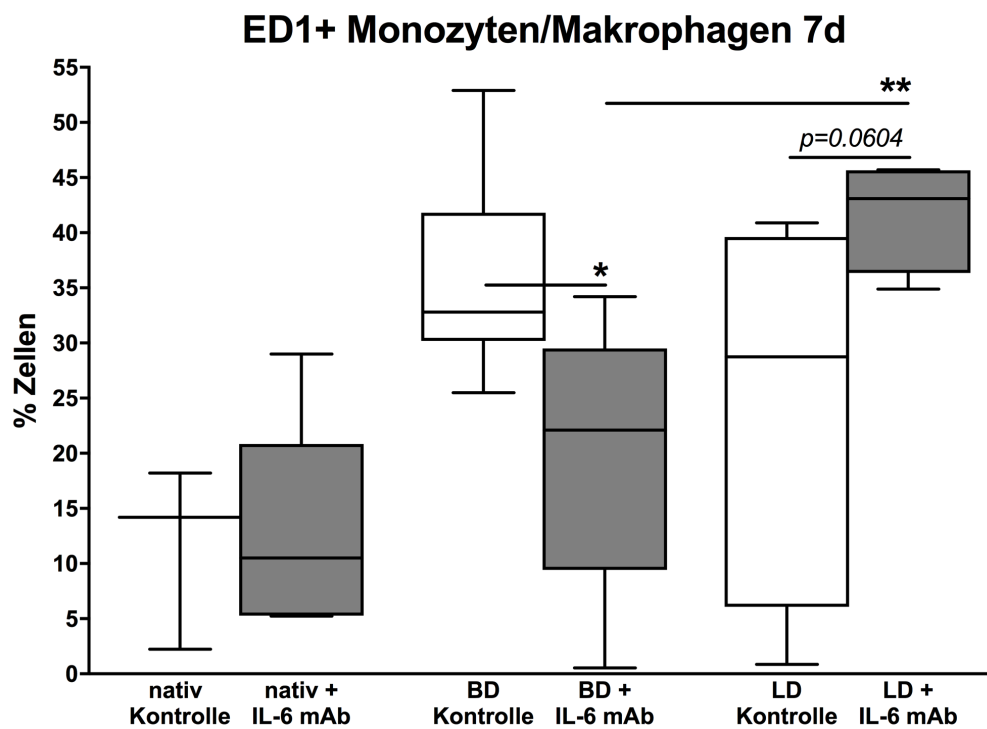


Abb. 5: ED1+ Monozyten/Makrophagen in der Niere (FACS: TWA) an Tag 7

### **ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen**

Die Zellzahl ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen stieg in der BD-Kontrollgruppe von  $2.13 \pm 1.87\%$  zum Zeitpunkt 18h p.t. auf  $22.84 \pm 5.19\%$  nach 7 Tagen ( $p < 0.0001$ ) an und fiel erneut auf  $4.95 \pm 1.45\%$  nach 5 Monaten ( $p < 0.0001$ ) ab. Ein vergleichbarer Verlauf war in der BD+IL6R mAb-Gruppe zu beobachten, hier stieg die Anzahl ED1+MHCII+ Monozyten/Makrophagen von  $1.11 \pm 0.96\%$  (18h) auf  $14.33 \pm 8.02\%$  (7d;  $p < 0.0001$ ) und fiel nach 5 Monaten wieder auf  $3.62 \pm 1.01\%$  ab ( $p < 0.0001$ ). Trotz eines vergleichbaren zeitlichen Verlaufs ergab der Vergleich von BD-Kontrolle und behandelter BD-Gruppe an Tag 7 auch hinsichtlich MHCII-exprimierender ED1+ Monozyten/Makrophagen eine signifikant reduzierte Anzahl dieser Zellpopulation in der vorbehandelten BD-Gruppe (BD+anti-IL6R mAb:  $14.33 \pm 8.02\%$  vs. BD-Kontrolle:  $22.84 \pm 5.19\%$ ;  $p = 0.0041$ ).

In den Versuchsgruppen der Lebendspenden waren die Ergebnisse erneut konträr zu denen in der Gruppe hirntoter Spender: hier zeigte die vorbehandelte LD-Gruppe einen signifikanten Anstieg ED1+MHCII+ Monozyten/Makrophagen von  $0.28 \pm 0.26\%$  nach 18h auf  $18.20 \pm 2.80\%$  nach 7 Tagen ( $p < 0.0001$ ) sowie einen signifikanten Abfall nach 5 Monaten ( $2.29 \pm 1.79\%$ ;  $p < 0.0001$ ). Ein Anstieg ED1+MHCII+ Monozyten/Makrophagen zwischen den Zeitpunkten 18h und 7 Tage p.t. war zwar auch in der LD-Kontrollgruppe zu beobachten, der Unterschied war allerdings hier nicht signifikant (18h:  $2.98 \pm 3.32\%$  vs. 7 Tage:  $9.93 \pm 10.11\%$ ; n.s.). Überraschenderweise zeigte sich bei den Lebendspenden an Tag 7 auch in Bezug auf die ED1+MHCII+ Monozyten-/Makrophagenpopulation eine signifikant erhöhte Anzahl in den Transplantaten vorbehandelter Lebendspenden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (LD+IL6R mAb-Gruppe:  $18.28 \pm 2.80\%$  vs. LD-Kontrolle:  $9.93 \pm 10.11\%$ ;  $p = 0.0456$ ).

Am geringsten war die Transplantatinfiltration von ED1+MHCII+ Zellen in der LD-Kontrolle mit  $9.93 \pm 10.11\%$ , am höchsten in der BD-Kontrolle mit  $22.84 \pm 5.19\%$  7d p.t. ( $p < 0.0001$ ).



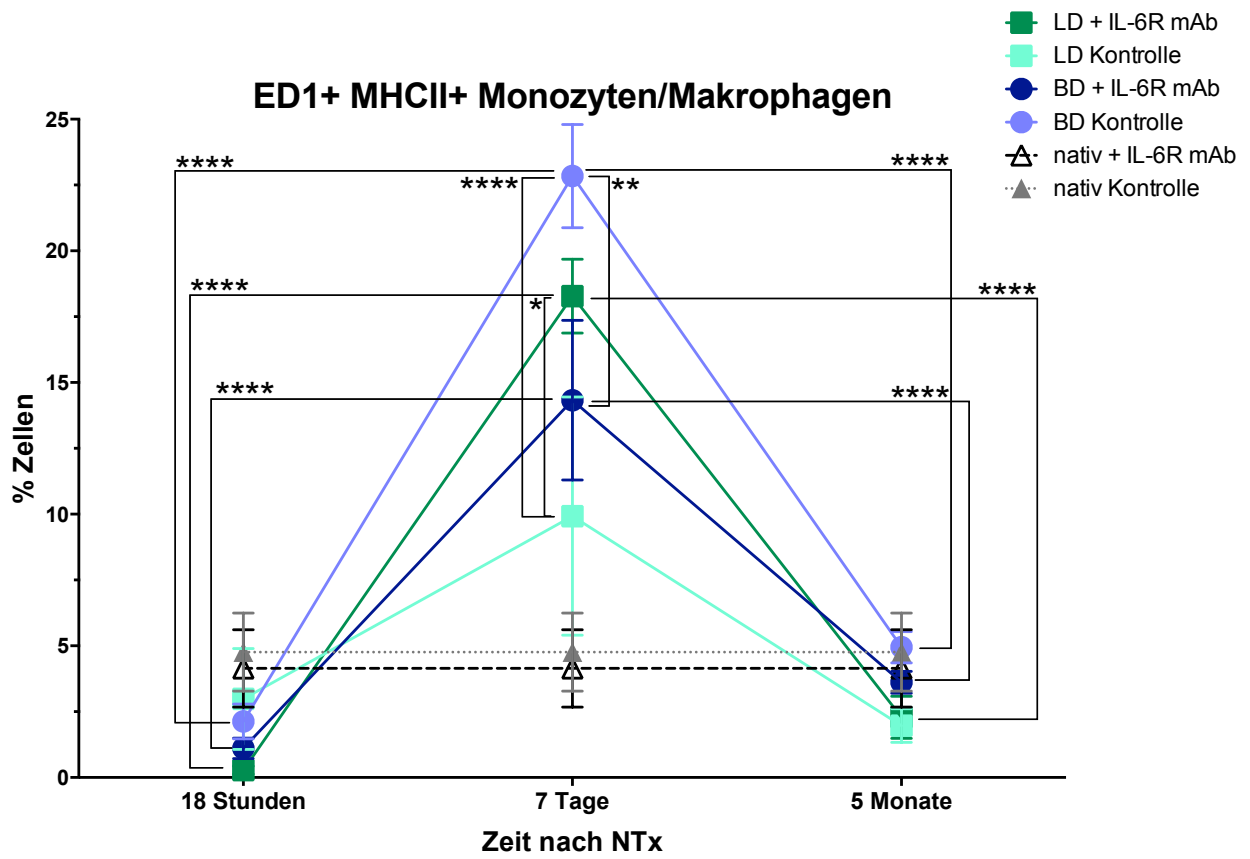


Abb. 6: ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen in der Niere (FACS: TWA)

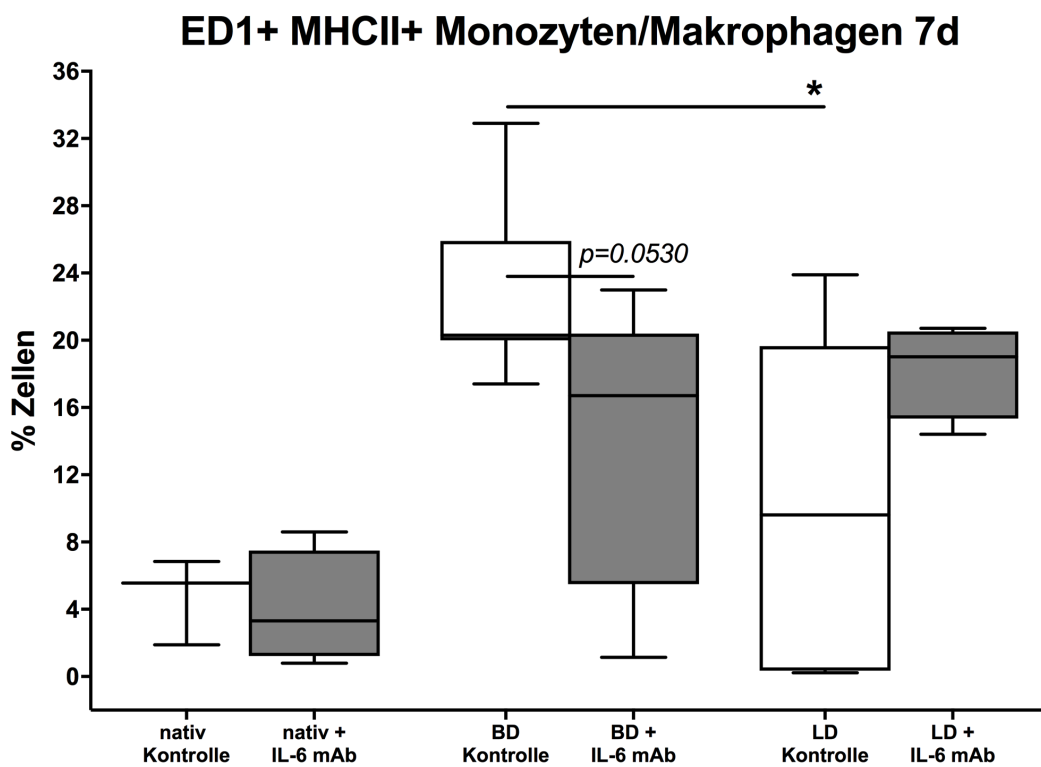


Abb. 7: ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen in der Niere (FACS: TWA) an Tag 7

## OX62+ Dendritische Zellen (DZ)

Die Anzahl OX62+ DZ in der BD-Kontrollgruppe erhöhte sich tendenziell von  $0.66 \pm 0.44\%$  nach 18h auf  $2.33 \pm 3.61\%$  an Tag 7 p.t. (n.s.) und fiel auf  $0.10 \pm 0.08\%$  nach 5 Monaten ( $p=0.0511$ ), ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht. In allen anderen Untersuchungsgruppen konnten keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. An Tag 7 war die Anzahl dendritischer Zellen in der Antikörper-behandelten BD-Gruppe im direkten Vergleich (Mann-Whitney-Test) deutlich, wenn auch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert (BD+IL6R mAb:  $2.33 \pm 3.61\%$  vs. BD-Kontrolle:  $0.79 \pm 0.95\%$ ;  $p=0.1195$ ). Weder zu anderen Zeitpunkten noch in der Lebendspender-Gruppe nach Antikörperbehandlung ergaben sich Unterschiede.

Im direkten Vergleich (MWT) war nach 5 Monaten die Anzahl OX62+ DZ in der Gruppe der vorbehandelten BD-Spender höher als in der BD-Kontrolle (BD+IL6R mAb:  $0.36 \pm 0.29\%$  vs. BD-Kontrolle:  $0.10 \pm 0.08\%$ ;  $p=0.0649$ ). Ebenso war die Anzahl OX62+ DZ in der vorbehandelten LD-Gruppe signifikant gegenüber der unbehandelten LD-Kontrolle erhöht (LD+IL6R mAb:  $0.76 \pm 0.13\%$  vs. LD-Kontrolle:  $0.28 \pm 0.08\%$ ;  $p=0.0159$ ).

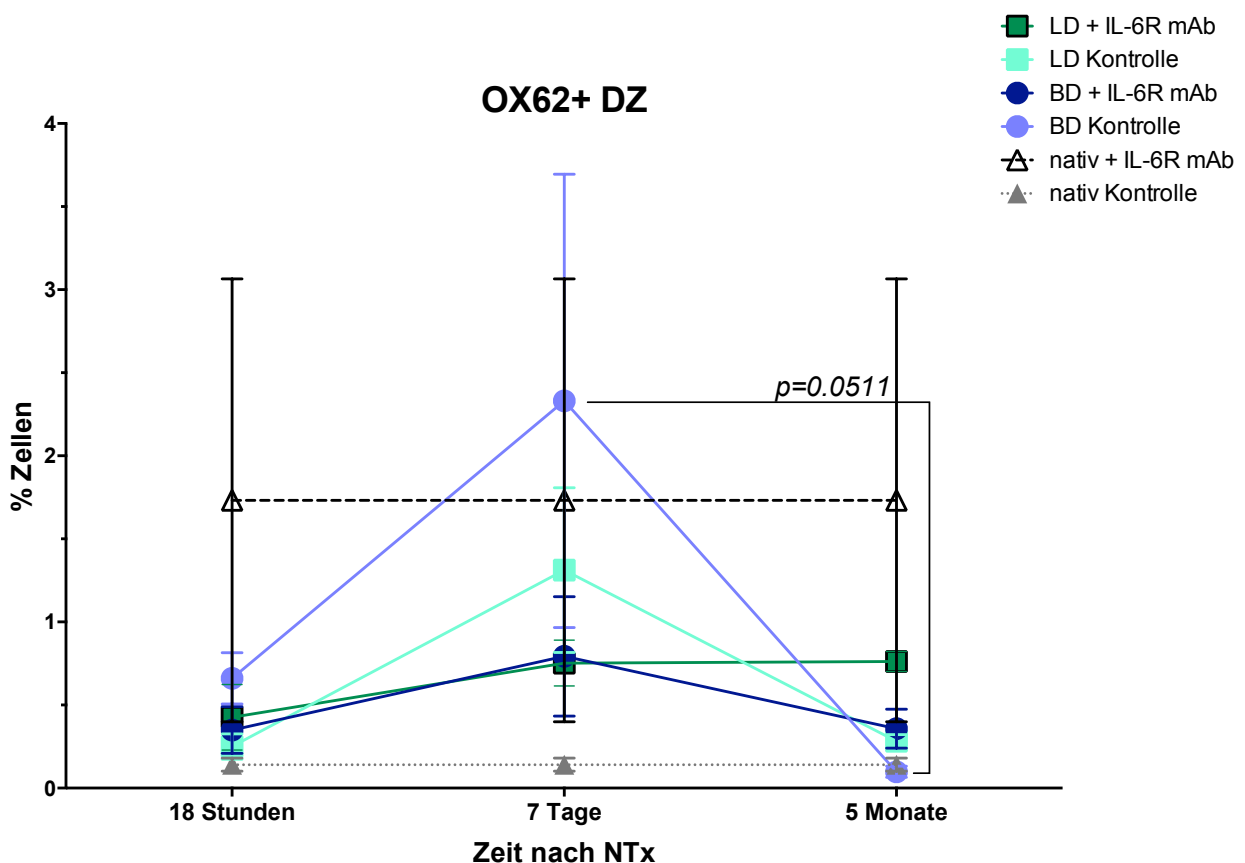


Abb. 8: OX62+ DZ in der Niere (FACS: TWA)

## OX62+ MHCII+ DZ

Die Anzahl OX62+MHCII+ DZ in der BD-Kontrollgruppe erhöhte sich signifikant von  $0.55 \pm 0.45\%$  nach 18h auf  $1.31 \pm 1.33\%$  an Tag 7 p.t. ( $p=0.0098$ ) und reduzierte sich nach 5 Monaten signifikant auf einen Wert von  $0.14 \pm 0.12\%$  ( $p=0.0002$ ). In allen übrigen Gruppen konnte auch hier kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Die Anzahl MHCII+ DZ lag in der BD-Kontrolle an Tag 7 p.t. mit  $1.31 \pm 1.33\%$  signifikant höher im Vergleich zur LD-Kontrolle mit  $0.30 \pm 0.31\%$  ( $p=0.0097$ ) 7d p.t. Eine Vorbehandlung hirntoter Spender erbrachte eine deutliche Reduktion der OX62+MHCII+ Zellzahlen an Tag 7 p.t. gegenüber der BD-Kontrolle (BD+IL6R mAb:  $1.31 \pm 1.33\%$  vs. BD-Kontrolle:  $0.59 \pm 0.73\%$ ;  $p=0.078$ ), während die Antikörperbehandlung in der Gruppe der Lebendspenden keinen Effekt zeigte (LD+IL6R mAb-Gruppe:  $0.30 \pm 0.31\%$  vs. LD-Kontrolle:  $0.35 \pm 0.13\%$ ; n.s.).

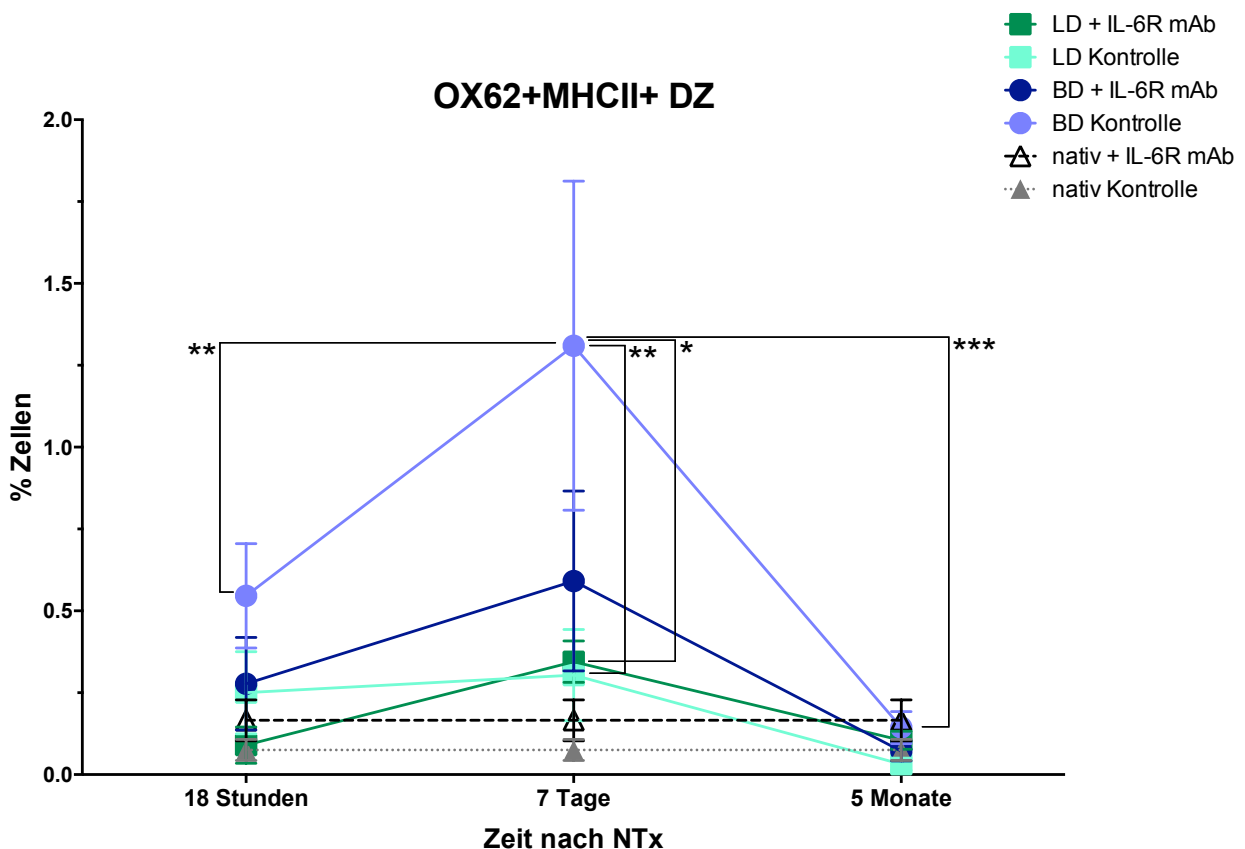


Abb. 9: OX62+ MHCII+ DZ in der Niere (FACS: TWA)

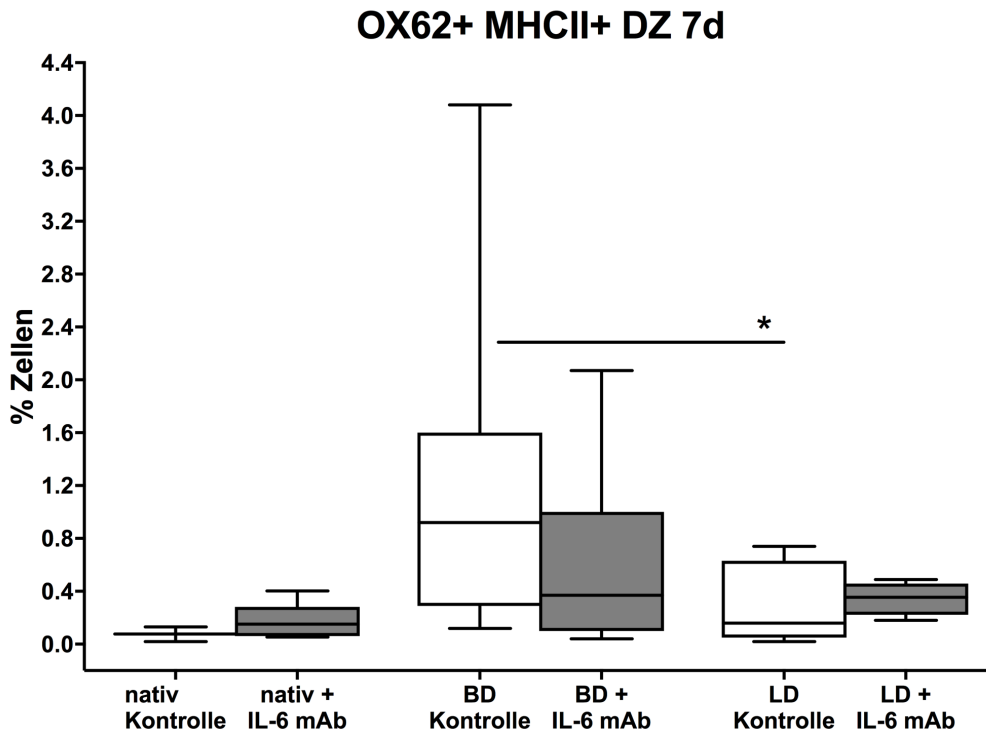


Abb. 10: OX62+ MHCII+ DZ in der Niere (FACS: TWA) an Tag 7

### OX62+ CD86+ DZ

Im Zeitraum 18h bis 7d p.t. stieg die Zellzahl in der BD-Kontrolle von  $0.44 \pm 0.35\%$  auf  $1.50 \pm 1.13\%$  signifikant an ( $p=0.0002$ ) und fiel 5 Monate nach Transplantation wieder auf  $0.27 \pm 0.24\%$  ab ( $p<0.0001$ ). Weitere Unterschiede im Zeitverlauf wurden auch bezüglich dieser Zellpopulation nicht nachgewiesen.

Auch hier zeigte die BD-Kontrollgruppe an Tag 7 p.t. eine signifikant erhöhte Zellzahl gegenüber der LD-Kontrollgruppe ( $1.50 \pm 1.13\%$  vs.  $0.61 \pm 0.52\%$ ,  $p=0.0223$ ). Während eine Vorbehandlung in der Lebendspender-Gruppe zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied ergab, konnte in der Gruppe der hirntoten Spender durch Vorbehandlung eine signifikante Reduktion OX62+CD86+ DZ an Tag 7 p.t. erreicht werden (BD-Kontrolle:  $1.50 \pm 1.13\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $0.51 \pm 0.63\%$ ;  $p=0.0025$ ).

Interessanterweise war die Anzahl OX62+ CD86+ DZ in der Gruppe der vorbehandelten LD-Spender niedriger als in der vorbehandelten BD-Gruppe im direkten Vergleich (MWT) nach 5 Monaten (LD+IL6R mAb:  $0.08 \pm 0.04\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $0.42 \pm 0.54\%$ ;  $p=0.0519$ ).

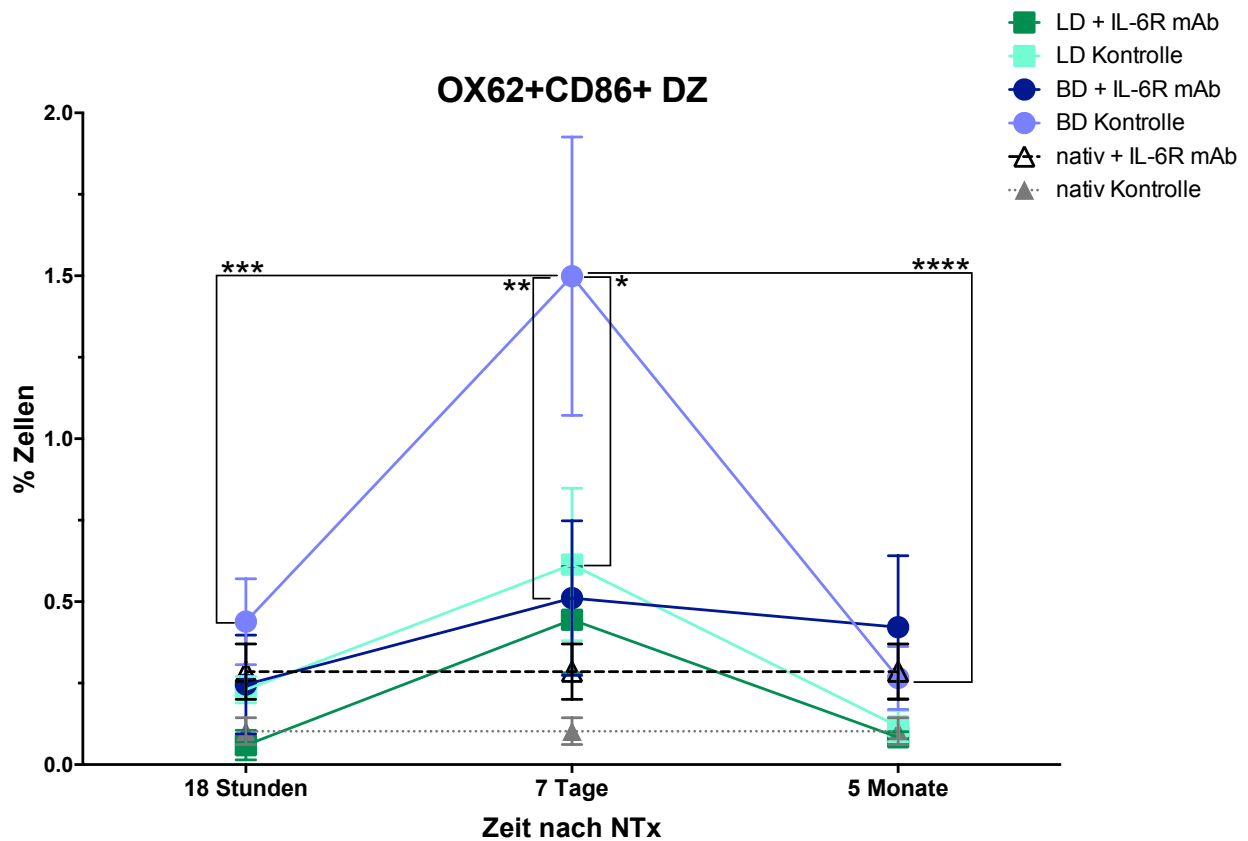


Abb. 11: OX62+ CD86+ DZ in der Niere (FACS: TWA)

### CD45RA+ B-Zellen

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellpopulationen wurde nur eine geringe Anzahl von B-Zellen im Transplantat gefunden. Die Anzahl CD45RA+ B-Zellen in der LD-Kontrollgruppe erhöhte sich signifikant von  $1.13 \pm 0.52\%$  nach 18h auf  $3.96 \pm 2.06\%$  an Tag 7 p.t. ( $p=0.0029$ ) und reduzierte sich nach 5 Monaten signifikant auf einen Wert von  $1.10 \pm 0.34\%$  ( $p=0.0011$ ). In allen übrigen Gruppen konnte auch hier kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Im direkten Vergleich (MWT) der 5Mo-Gruppen war die Anzahl CD45RA+ B-Zellen in der Gruppe der vorbehandelten LD-Spender knapp signifikant niedriger als in der vorbehandelten BD-Gruppe (LD+IL6R mAb:  $0.68 \pm 0.32\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $1.89 \pm 0.91\%$ ;  $p=0.0519$ , n.s.).

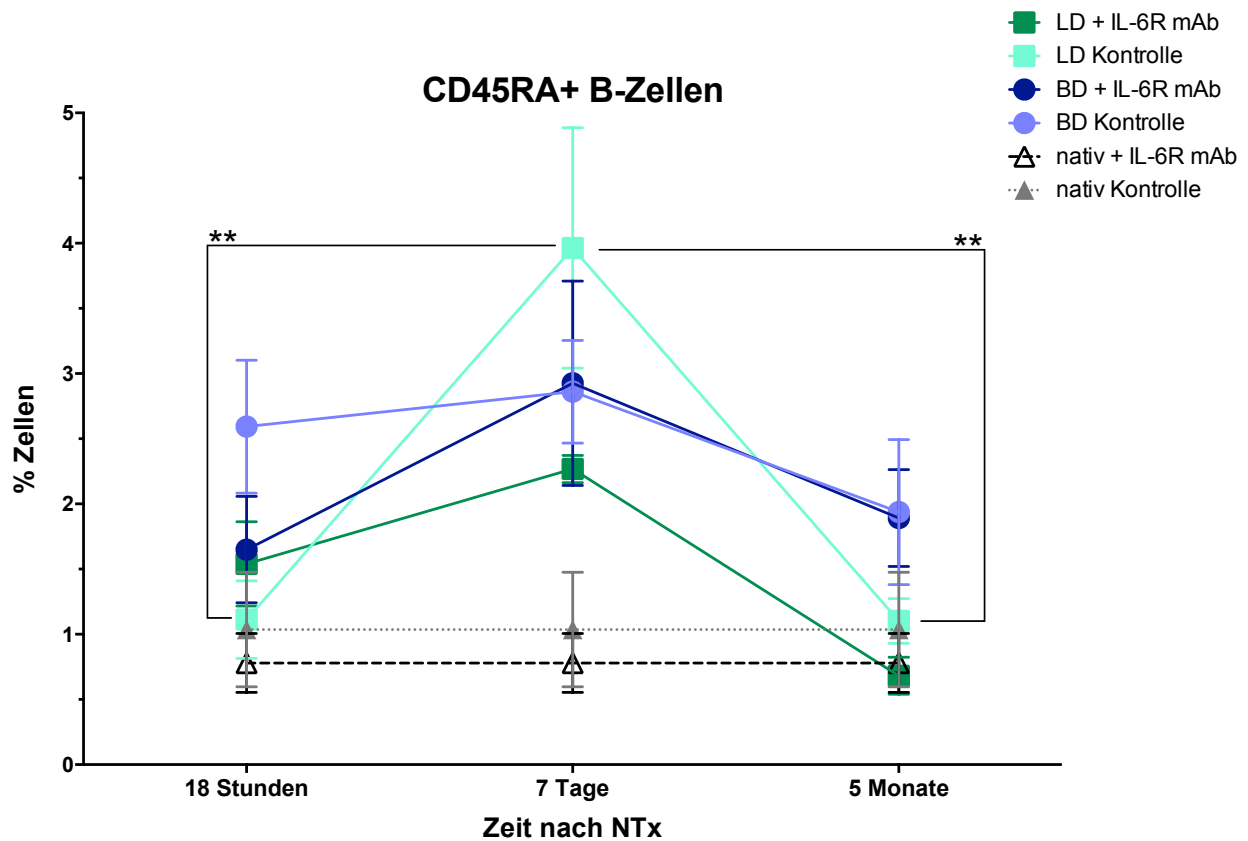


Abb. 12: CD45RA+ B-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD45RA+ MHCII+ B-Zellen

Die Anzahl CD45RA+ MHCII+ B-Zellen in der BD-Kontrollgruppe erhöhte sich tendenziell von  $1.47 \pm 1.26\%$  nach 18h auf  $2.35 \pm 1.49\%$  an Tag 7 p.t. (n.s.) und fiel auf  $0.81 \pm 0.53\%$  nach 5 Monaten ab ( $p=0.0038$ ). Ein ähnlicher Verlauf wurde in der LD-Kontrollgruppe gesehen, in der die Anzahl CD45RA+ MHCII+ B-Zellen von  $0.74 \pm 0.60\%$  auf  $1.87 \pm 0.75\%$  7d p.t. anstieg (n.s.) und wieder auf  $0.15 \pm 0.11\%$  nach 5 Monaten abfiel ( $p=0.0080$ ). In allen anderen Untersuchungsgruppen konnten keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Im direkten Vergleich der 5-Mo-Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl CD45RA+ MHCII+ B-Zellen der BD-Kontrollgruppe und der LD-Kontrollgruppe (BD-Kontrolle:  $0.81 \pm 0.53\%$  vs. LD-Kontrolle:  $0.15 \pm 0.11\%$ ,  $p=0.0095$ ), während keine signifikanten Unterschiede zwischen den vorbehandelten Gruppen gezeigt wurden (LD+IL6R mAB:  $0.27 \pm 0.25\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $0.64 \pm 0.35\%$ ; n.s.).

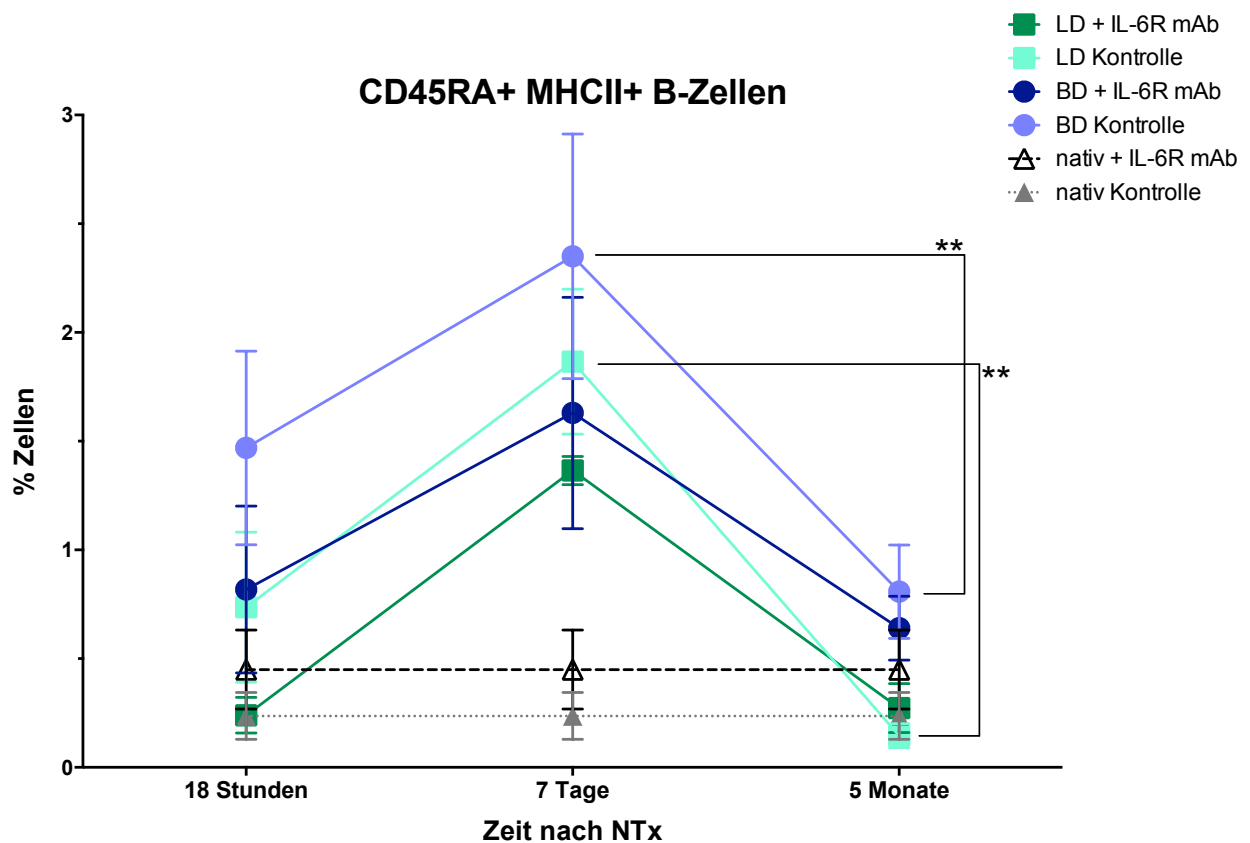


Abb. 13: CD45RA+ MHCII+ B-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD45RA+ CD86+ B-Zellen

Die Zellzahl CD45RA+ CD86+ B-Zellen stieg in der vorbehandelten LD-Gruppe von  $0.12 \pm 0.09\%$  18h p.t. auf  $1.56 \pm 0.53\%$  nach 7 Tagen ( $p=0.0358$ ) an und fiel erneut auf  $0.18 \pm 0.14\%$  ab ( $p=0.0203$ ). Ein vergleichbarer Verlauf war in der BD+IL6R mAb-Gruppe zu beobachten, hier stieg die Anzahl CD45RA+ CD86+ B-Zellen von  $0.87 \pm 0.35\%$  nach 18h auf  $1.65 \pm 1.27\%$  7d p.t. an (n.s.) und fiel nach 5 Monaten wieder auf  $0.35 \pm 0.22\%$  ab ( $p=0.0071$ ). Die Anzahl CD45RA+ CD86+ B-Zellen in der LD-Kontrolle stieg tendenziell von  $0.80 \pm 0.59\%$  nach 18h auf  $1.44 \pm 0.24\%$  nach 7 Tagen an (n.s.) und fiel auf einen Wert von  $0.09 \pm 0.03\%$  nach 5Mo wieder ab ( $p=0.0234$ ).

Auch hier wurde im direkten Vergleich der 5Mo-Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl CD45RA+ MHCII+ B-Zellen der BD-Kontrollgruppe und der LD-Kontrollgruppe gezeigt (BD-Kontrolle:  $0.48 \pm 0.34\%$  vs. LD-Kontrolle:  $0.09 \pm 0.03\%$ ,  $p=0.0095$ ), während keine signifikanten Unterschiede zwischen den vorbehandelten Gruppen gezeigt wurden (LD+IL6R mAB:  $0.18 \pm 0.14\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $0.35 \pm 0.22\%$ ; n.s.).

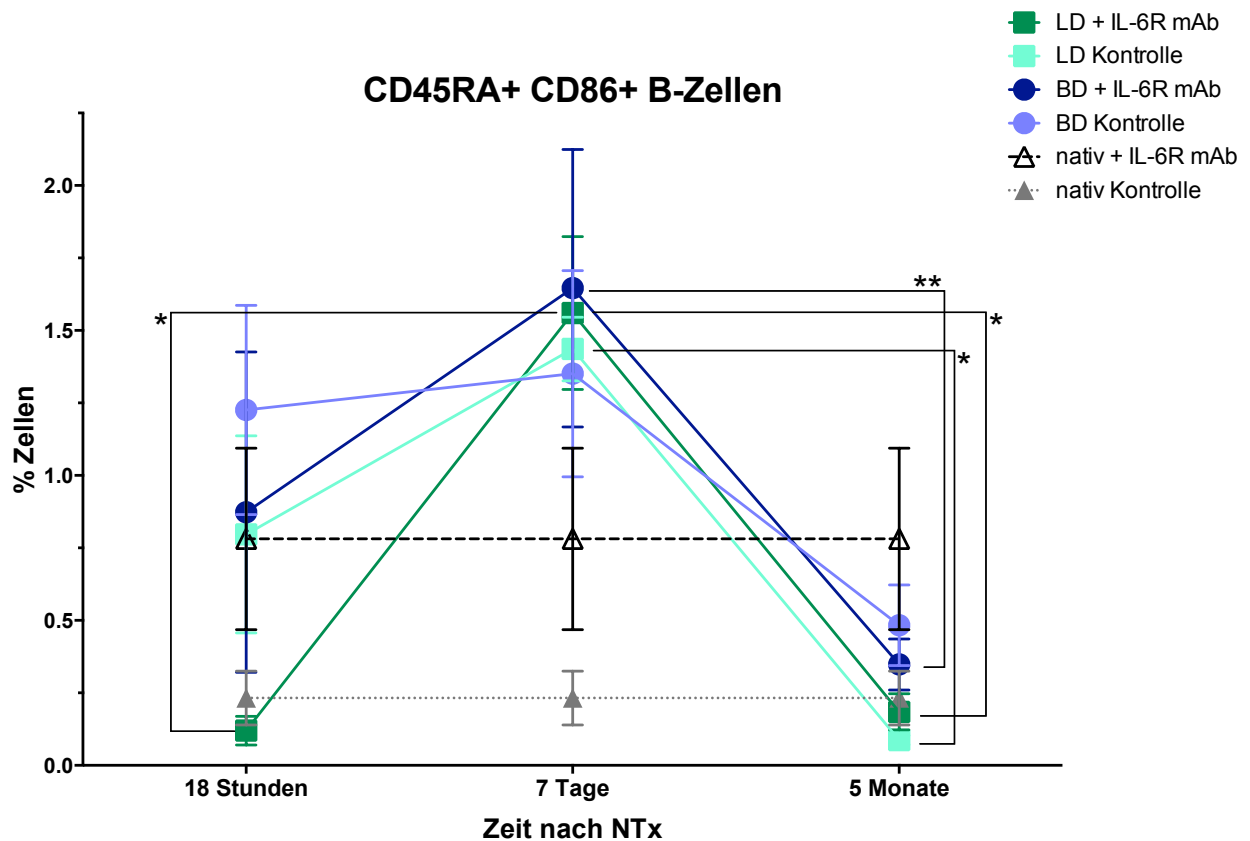


Abb. 14: CD45RA+ CD86+ B-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### 5.3.2. Infiltration von CD161a+ Natürliche Killerzellen (NK) und Natürliche Killer-T- Zellen (NKT)

#### CD161a+ NK-Zellen

Die Anzahl CD161a+ NK-Zellen stieg in der BD-Kontrollgruppe von  $8.18 \pm 3.66\%$  18h p.t. auf  $39.39 \pm 6.41\%$  7d p.t. an ( $p < 0.0001$ ) und fiel nach 5Mo wieder auf  $1.12 \pm 0.37\%$  ab ( $p < 0.0001$ ). Ein vergleichbarer Verlauf war zu beobachten, hier stieg die Zellzahl CD161a+ NK-Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe von  $6.48 \pm 2.53\%$  zum Zeitpunkt 18h p.t. auf  $33.39 \pm 14.92\%$  nach 7 Tagen ( $p < 0.0001$ ) an und fiel erneut auf  $4.01 \pm 6.96\%$  nach 5Mo ab ( $p < 0.0001$ ). Die Anzahl CD161a+ NK-Zellen in der LD-Kontrolle erhöhte sich von  $8.29 \pm 3.29\%$  18h p.t. auf  $22.42 \pm 12.32\%$  7d p.t. ( $p = 0.0105$ ) und fiel nach 5Mo auf  $1.49 \pm 0.51\%$  wieder ab ( $p < 0.0001$ ). In der LD+IL6R mAb-Gruppe zeigten sich ein Zellanzug von CD161a+ NK-Zellen von  $9.43 \pm 6.46\%$  18h p.t. auf  $22.55 \pm 5.20\%$  7d p.t. ( $p = 0.0189$ ) und ein Abfall auf  $0.94 \pm 0.18\%$  nach 5Mo ( $p < 0.0001$ ).

Trotz eines vergleichbaren zeitlichen Verlaufs ergab der direkte Vergleich (MWT) von BD- und LD-Kontrollgruppe an Tag 7 auch hinsichtlich CD 161a+ NK-Zellen eine



signifikant reduzierte Anzahl dieser Zellpopulation in der LD-Kontrolle (LD-Kontrollgruppe:  $22.42 \pm 12.32\%$  vs. BD-Kontrollgruppe:  $33.39 \pm 14.92\%$ ,  $p=0.0006$ ).

Im direkten Vergleich (MWT) der 5Mo-Gruppen war die Anzahl CD161a+ NK-Zellen in der Gruppe der vorbehandelten LD-Spender deutlich niedriger als in der LD-Kontrolle (LD+IL6R mAb:  $0.94 \pm 0.18\%$  vs. LD-Kontrolle:  $1.49 \pm 0.51\%$ ,  $p=0.0635$ ).

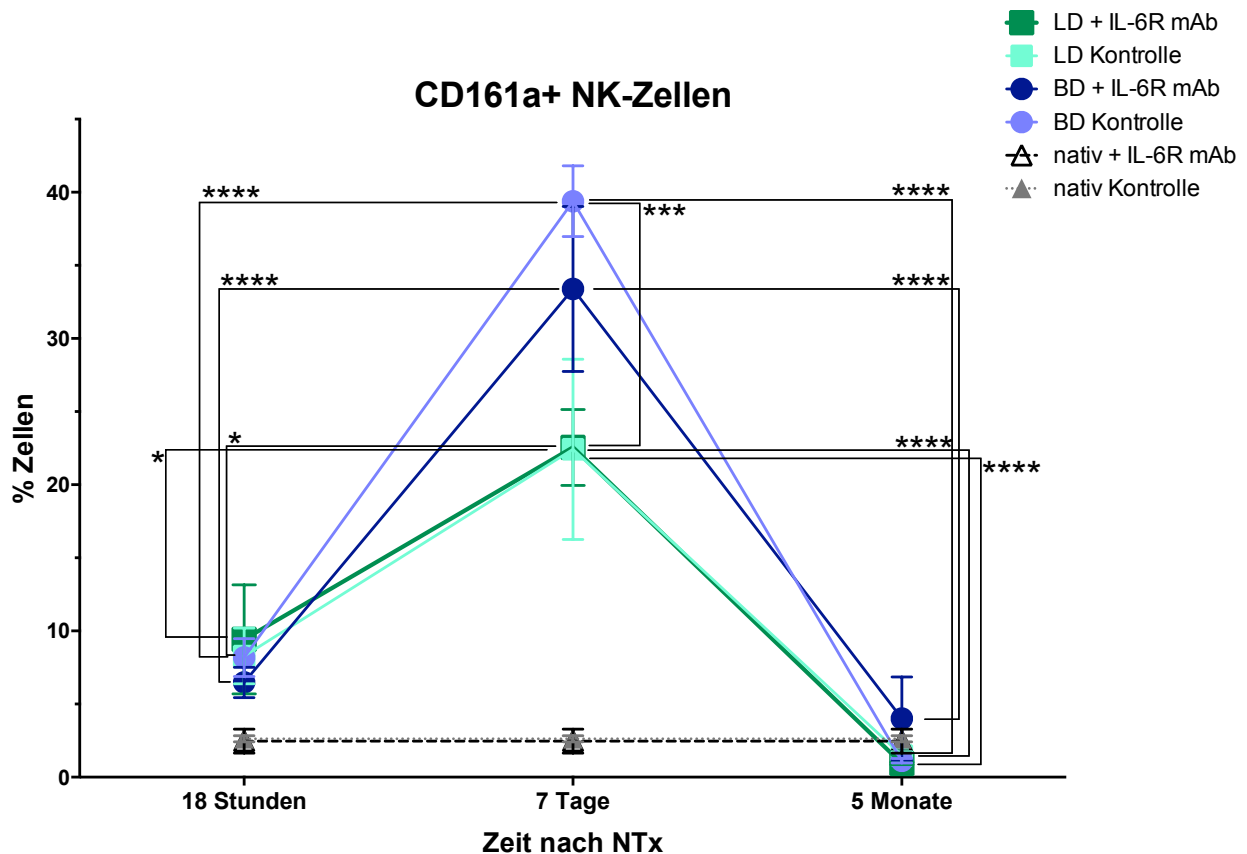


Abb. 15: CD161a+ NK-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD4+ CD161a+ NKT-Zellen

Die Anzahl CD4+ CD161a+ NKT-Zellen stieg in der BD-Kontrollgruppe von  $0.72 \pm 0.85\%$  18h p.t. auf  $11.41 \pm 6.17\%$  7d p.t. signifikant an ( $p < 0.0001$ ) und fiel signifikant auf  $0.10 \pm 0.06\%$  nach 5Mo ab ( $p < 0.0001$ ). Ein ähnlicher Verlauf wurde in der vorbehandelten BD-Gruppe gesehen, in der die Anzahl CD4+ CD161a+ NKT-Zellen von  $0.46 \pm 0.39\%$  18h p.t. auf  $10.70 \pm 6.12\%$  7d p.t. anstieg ( $p < 0.0001$ ) und wieder auf  $0.31 \pm 0.56\%$  nach 5Mo abfiel ( $p < 0.0001$ ). Allerdings konnten keine Unterschiede aufgrund der Antikörperbehandlung beobachtet werden.

Die Anzahl CD4+ CD161a+ NK-Zellen fiel nach 7 Tagen in allen LD-Gruppen ab verglichen zu den BD-Gruppen (LD-Kontrolle:  $3.16 \pm 2.35\%$  vs. BD-Kontrolle:

11.41±6.17%, p<0.0001 und LD+IL6R mAb: 2.66±0.73% vs. BD+IL6R mAb: 10.70±6.12%, p=0.0001).

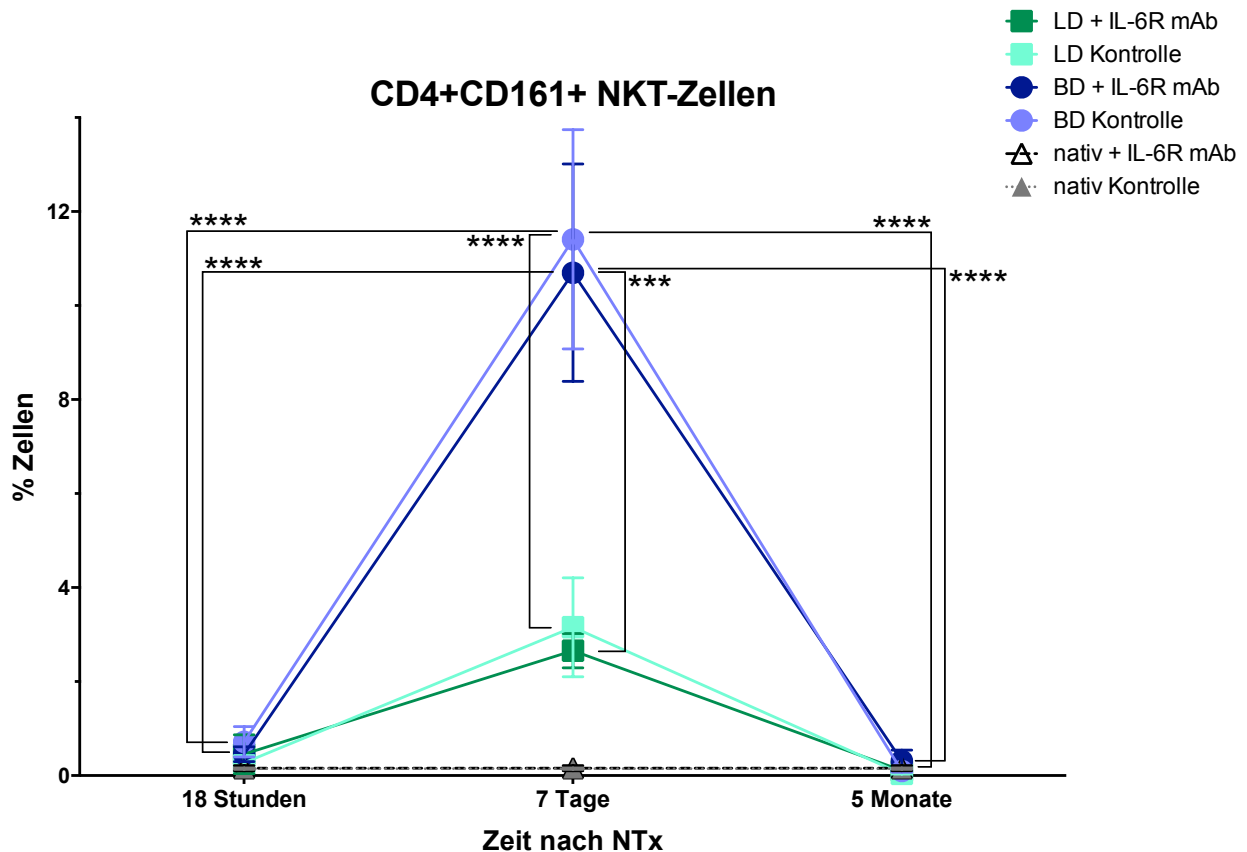


Abb. 16: CD4+ CD161a+ NKT-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD8+ CD161a+ NKT-Zellen

Die Anzahl CD8+ CD161a+ NKT-Zellen stieg in der BD-Kontrolle von 2.40±1.15% 18h p.t. auf 5.40±0.79% 7d p.t. signifikant an (p=0.0001) und fiel dann auf 0.54±0.47% nach 5Mo ab (p<0.0001). Ein vergleichbarer Verlauf war in der LD-Kontrollgruppe zu beobachten, hier stieg die Zellzahl CD8+ CD161a+ NKT-Zellen von 2.07±1.79% 18h p.t. auf 6.39±3.91% 7d p.t. signifikant an (p<0.0001) und fiel erneut auf 0.39±0.34% nach 5Mo ab (p<0.0001). Über die Zeit (18h vs. 5 Mo) fiel die Zellzahl der CD8+ CD161+ NKT-Zellen in der BD+IL6R mAb-Gruppe und in der LD+IL6R mAb signifikant ab (BD+IL6R mAb-Gruppe: 3.46±1.52% 18h p.t. vs. 0.94±0.56% 5Mo p.t. (p=0.0039); LD+IL6R mAb-Gruppe: 3.33±1.36% 18h p.t. vs. 0.47±0.23% 5Mo p.t. (p=0.0105). Die Zellzahl CD8+ CD161a+ NKT-Zellen fiel in der vorbehandelten BD-Gruppe von 4.65±1.02% 7d p.t. auf 0.94±0.56% 5Mo nach NTx ab (p<0.0001). Die Anzahl CD8+ CD161a+ NKT-Zellen fiel in der LD-IL6R mAb-Gruppe von 4.77±0.90% 7d p.t. auf 0.47±0.23% 5Mo p.t. ab (p<0.0001).

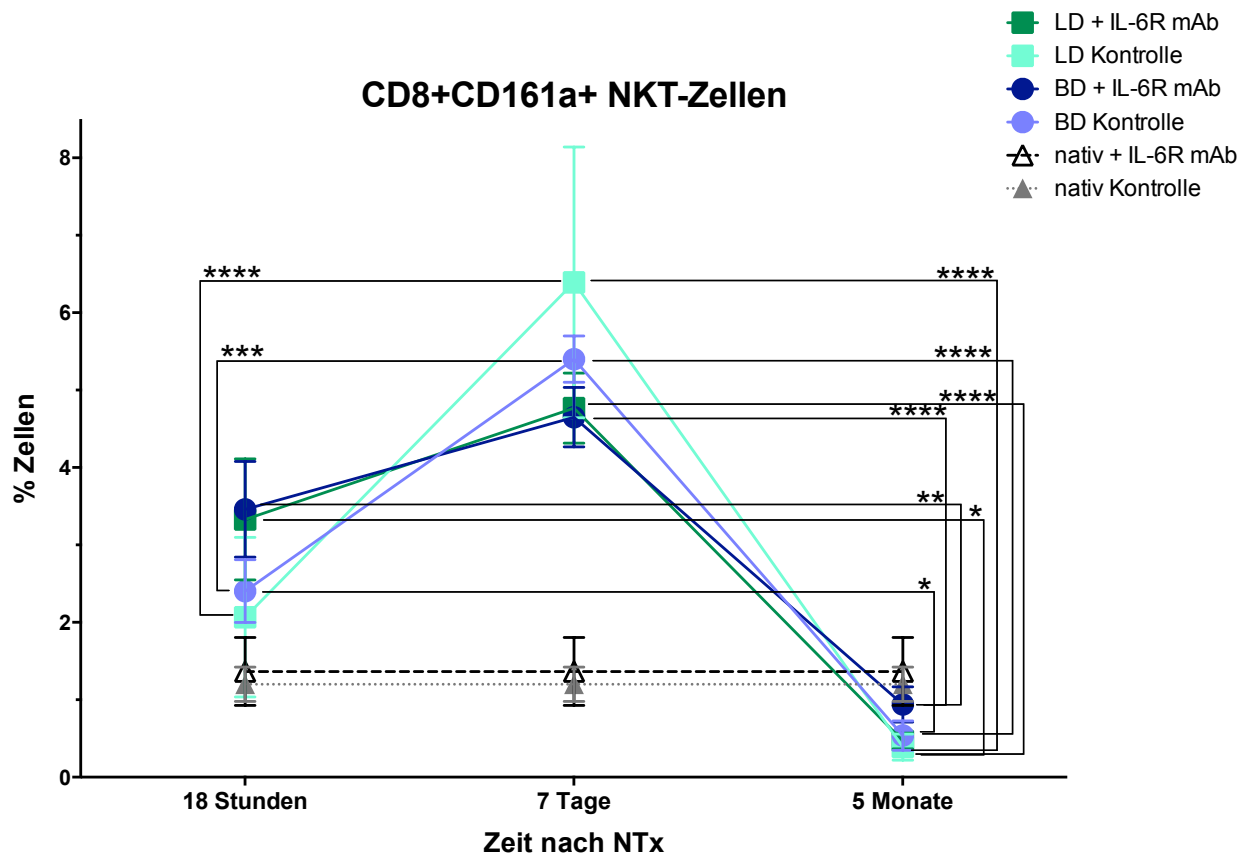


Abb. 17: CD8+ CD161a+ NKT-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### 5.3.3. Infiltration von CD3+ T-Zellen

#### CD3+ CD4+ T-Zellen

Die Anzahl CD3+ CD4+ T-Zellen in der BD-Kontrollgruppe erhöhte sich signifikant von  $6.45 \pm 2.64\%$  nach 18h auf  $16.89 \pm 3.67\%$  an Tag 7 p.t. ( $p < 0.0001$ ) und blieb etwa auf diesem Niveau bis 5 Mo nach Transplantation (BD-Kontrollgruppe:  $6.45 \pm 2.64\%$  18h p.t. vs.  $12.94 \pm 6.40\%$  5Mo p.t. ( $p = 0.0025$ )). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich in der BD+IL6R mAb-Gruppe, in der die Anzahl CD3+ CD4+ T-Zellen von  $7.08 \pm 2.28\%$  18h p.t. auf  $15.54 \pm 4.85\%$  7d p.t. anstieg ( $p < 0.0001$ ) und etwa auf diesem Niveau nach 5Mo blieb ( $7.08 \pm 2.28\%$  18h p.t. vs.  $15.22 \pm 4.62\%$  5Mo p.t.;  $p = 0.0004$ ).

Wie oben in der vorbehandelten LD-Gruppe ergab sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl CD3+ CD4+ T-Zellen von  $3.14 \pm 1.23\%$  18h p.t. auf  $14.13 \pm 2.66\%$  7d p.t. ( $p = 0.0003$ ). Über die Zeit (7d/5Mo) fiel die Anzahl CD3+ CD4+ T-Zellen in der LD-Kontrolle von  $14.80 \pm 1.83\%$  7d p.t. auf  $8.08 \pm 2.58\%$  5Mo p.t. ab ( $p = 0.0140$ ).

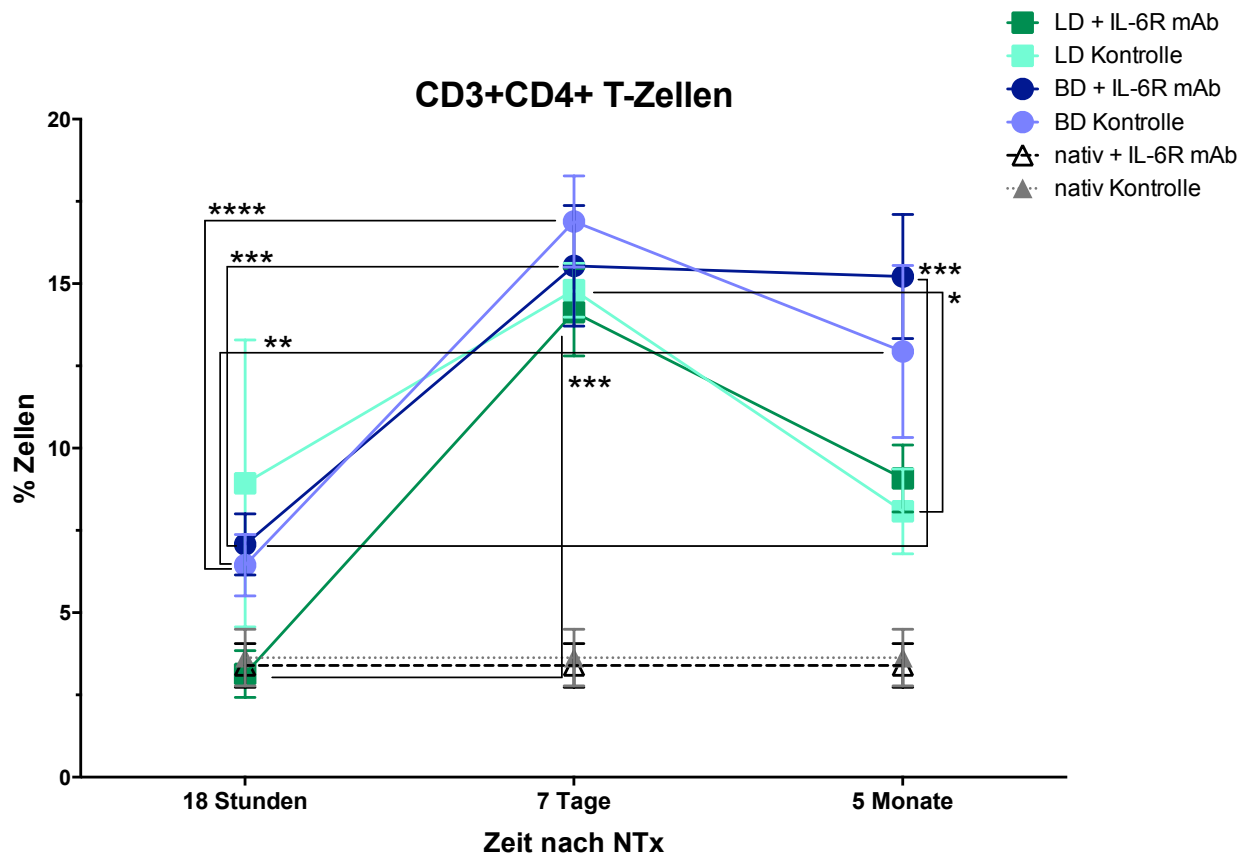


Abb. 18: CD3+ CD4+ T-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD3+ CD8+ T-Zellen

In allen vorbehandelten BD-, LD- und Kontrollgruppen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von 18h auf 7d p.t. und ein signifikanter Abfall nach 5Mo p.t. In der BD-Kontrolle stieg die Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von  $5.04 \pm 1.78\%$  18h p.t. auf  $42.79 \pm 8.41\%$  7d p.t. an ( $p < 0.0001$ ) und fiel nach 5Mo wieder auf  $5.71 \pm 2.84\%$  ab ( $p < 0.0001$ ). In der BD+IL6R mAb zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von  $8.38 \pm 5.86\%$  18h p.t. auf  $34.60 \pm 7.46\%$  an Tag 7 ( $p < 0.0001$ ) und danach Abfall auf  $6.39 \pm 2.91\%$  5Mo p.t. ( $p < 0.0001$ ).

Die Zellzahl CD3+ CD8+ T-Zellen stieg in der LD-Kontrollgruppe von  $15.13 \pm 18.08\%$  zum Zeitpunkt 18h p.t. auf  $38.40 \pm 8.46\%$  nach 7 Tagen an ( $p < 0.0001$ ) und fiel erneut auf  $2.95 \pm 2.15\%$  nach 5 Monaten ab ( $p < 0.0001$ ). Im Vergleich der 18h und 5Mo-Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in der LD-Kontrolle von  $15.13 \pm 18.08\%$  18h p.t. auf  $2.95 \pm 2.15\%$  5Mo p.t. ( $p = 0.0141$ ). Ein vergleichbarer Verlauf war in der LD+IL6R mAb-Gruppe zu beobachten, hier stieg die Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von  $5.11 \pm 3.03\%$  (18h) auf  $30.30 \pm 3.21\%$  an (7d;  $p < 0.0001$ ) und fiel nach 5 Monaten wieder auf  $4.07 \pm 2.46\%$  ab ( $p < 0.0001$ ).

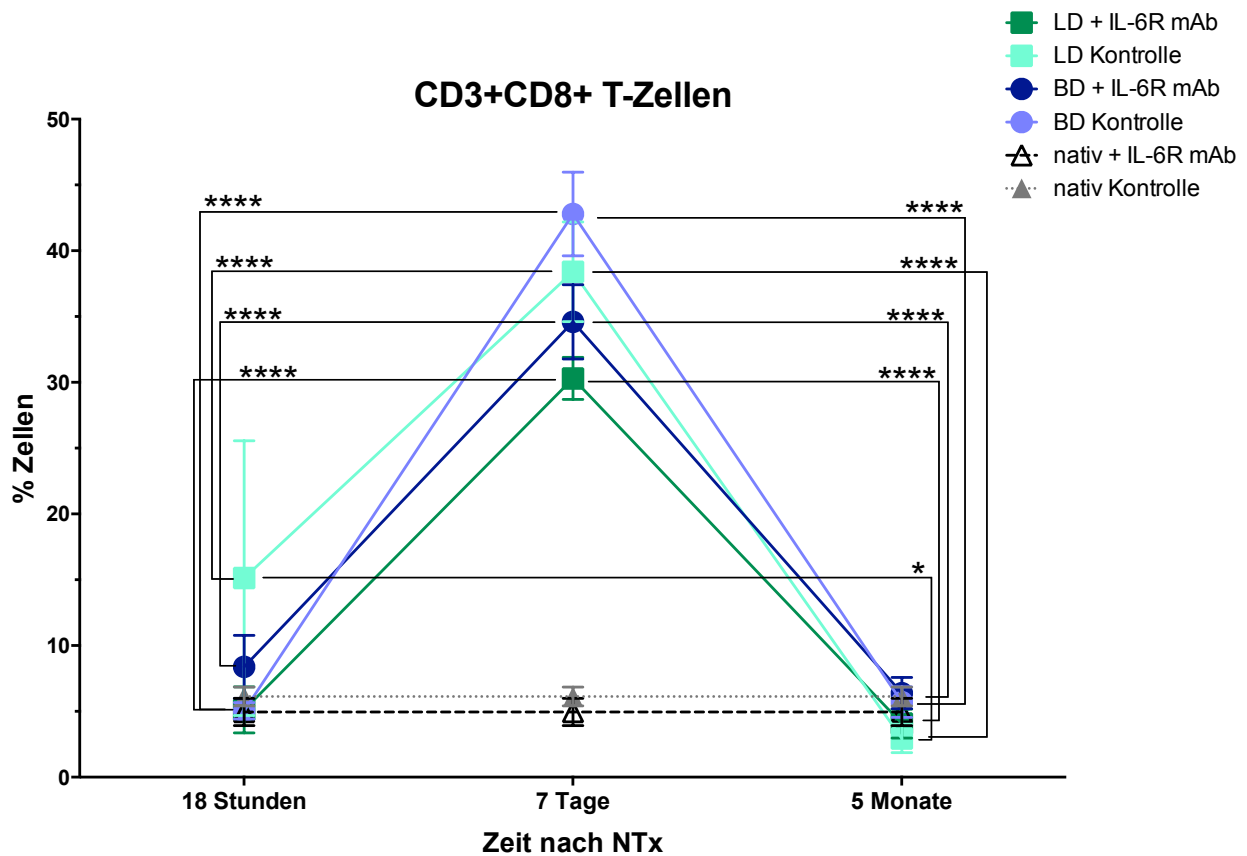


Abb. 19: CD3+ CD8+ T-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### 5.3.4. Infiltration von CD62L+ T-Zellen

#### CD4+ CD62L+ T-Zellen

Im Zeitraum 18h bis 7d p.t. stieg die Zellzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen in der BD-Kontrolle von  $0.56 \pm 0.60\%$  auf  $1.94 \pm 0.88\%$  7d p.t. signifikant an ( $p=0.0012$ ) und fiel bis 5 Monate nach Transplantation wieder auf  $0.14 \pm 0.11\%$  ab ( $p<0.0001$ ). In der vorbehandelten BD-Gruppe reduzierte sich die Anzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen von  $1.11 \pm 1.15\%$  7d p.t. auf  $0.11 \pm 0.12\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0329$ ). In der LD+IL6R mAb-Gruppe stieg die Anzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen von  $0.07 \pm 0.05\%$  18h p.t. auf  $1.67 \pm 2.24\%$  7d nach NTx an ( $p=0.0103$ ) und fiel nach 5Mo wieder auf  $0.25 \pm 0.12\%$  ab ( $p=0.0091$ ). Im direkten Vergleich (MWT) der 5Mo-Gruppen war die Anzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen in der LD-Kontrolle deutlich niedriger als in der vorbehandelten LD-Gruppe (LD-Kontrolle:  $0.03 \pm 0.004\%$  vs. LD+IL6R mAb:  $0.25 \pm 0.12\%$ ,  $p=0.0515$ ).

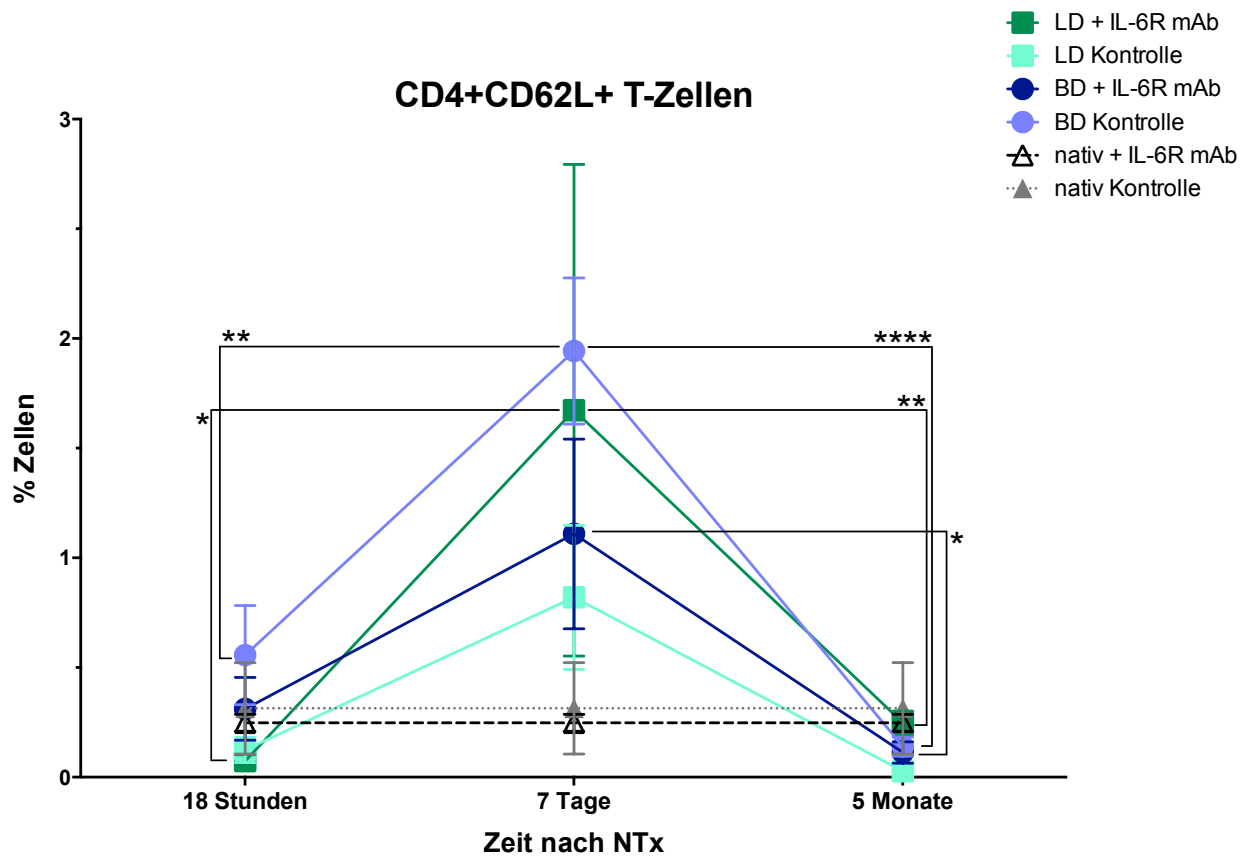


Abb. 20: CD4+ CD62L+ T-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

### CD8+ CD62L+ T-Zellen

Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf zeigte sich auch hier in der BD-Kontrollgruppe und in der vorbehandelten LD-Gruppe, also ein starker Anstieg nach 7 Tagen und erneuter Abfall nach 5 Monaten (BD-Kontrollgruppe: 18h:  $1.59 \pm 2.27\%$  vs. 7 Tage:  $4.90 \pm 1.65\%$  ( $p=0.0273$ ) vs. 5 Monate:  $0.24 \pm 0.20\%$  ( $p=0.0019$ ); LD+IL6R mAb-Gruppe: 18h:  $0.22 \pm 0.17\%$  vs. 7 Tage:  $7.80 \pm 10.01\%$  ( $p=0.0002$ ) vs. 5 Monate:  $0.30 \pm 0.15\%$  ( $p<0.0001$ ). Hingegen waren bei der vorbehandelten BD-Gruppe und bei der unbehandelten Gruppe (LD-Kontrolle) keine signifikanten zeitlichen Veränderungen zu beobachten. Tatsächlich zeigte sich an Tag 7 p.t. interessanterweise auch eine deutlich höhere Anzahl von CD8+ CD62L+ T-Zellen in den Transplantaten vorbehandelter Lebendspenden im Vergleich zu den vorbehandelten BD-Kontrollen (LD+IL6R mAb-Gruppe:  $7.80 \pm 10.01\%$  vs. BD+IL6R mAb:  $2.86 \pm 1.72\%$ ;  $p=0.0155$ ).

Zusätzlich zeigte sich im direkten Vergleich (MWT) der 7d-Gruppen eine signifikante Reduktion der Zellzahl in der BD-IL6R mAb-Gruppe mit  $2.86 \pm 1.72\%$  verglichen zu dieser in der BD-Kontrollgruppe mit  $4.90 \pm 1.65\%$  ( $p=0.0262$ ).

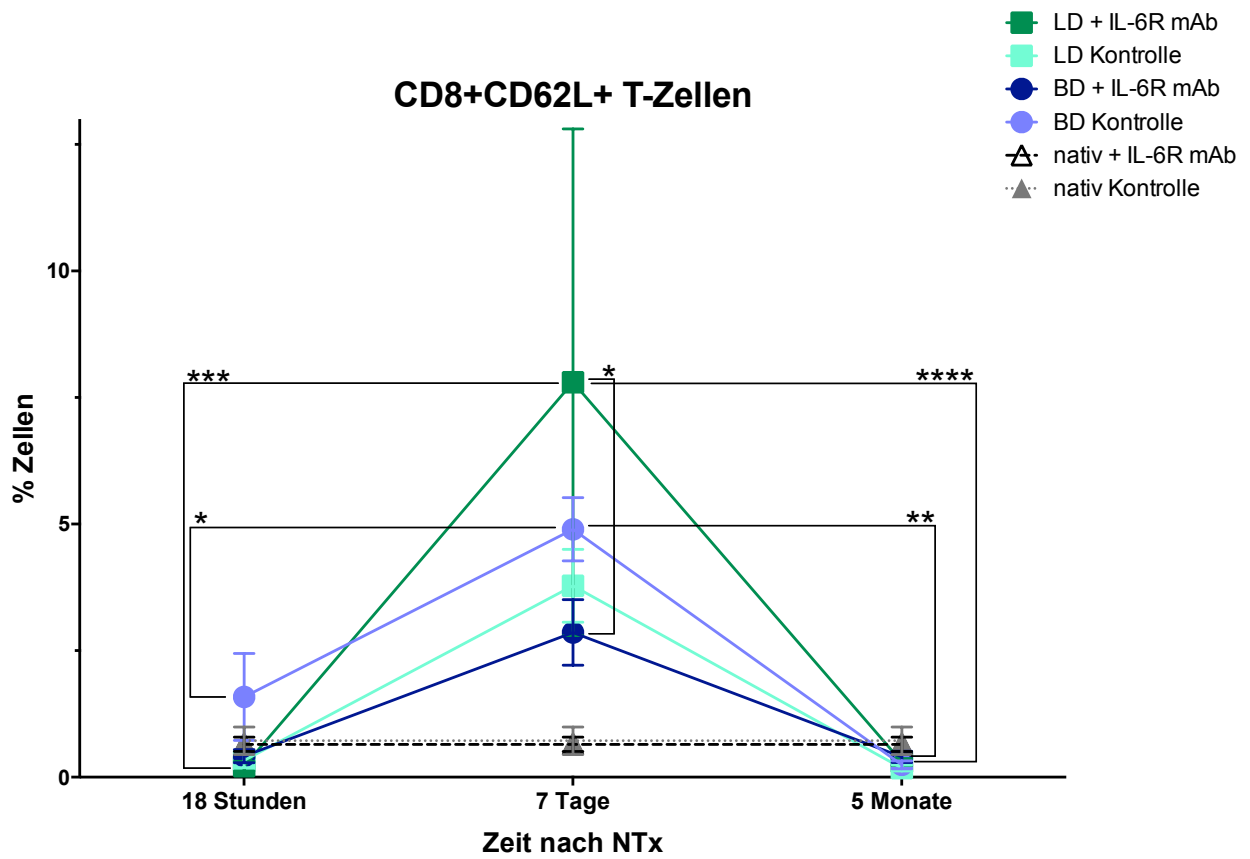


Abb. 21: CD8+ CD62L+ T-Zellen in der Niere (FACS: TWA)

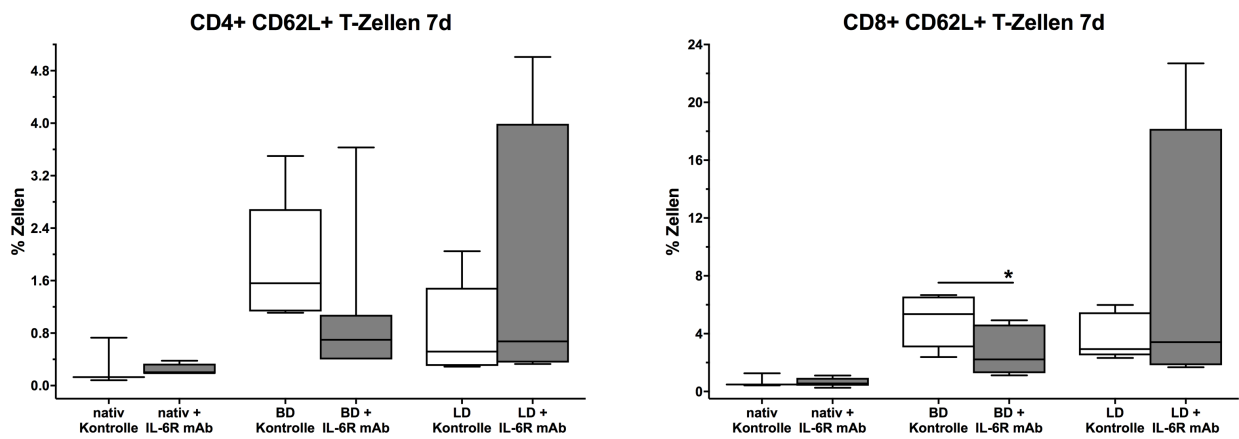


Abb. 22: CD4+ CD62L+ T-Zellen und CD8+ CD62L+ T-Zellen in der Niere (FACS: TWA) an Tag 7

## 5.4. FACS-Milz

### 5.4.1. Infiltration von APZ

#### ED1+ Monozyten/Makrophagen

FACS-Analysen der ED1+ Monozyten-/Makrophagenpopulation der Milz ergaben in der TWA hinsichtlich der Variablen „Zeit“ einen signifikanten Abfall der ED1+ Zellpopulation in der BD Kontrollgruppe von  $23.43 \pm 11.30\%$  18h p.t. auf  $12.23 \pm 3.74\%$  an Tag 7 p.t. ( $p=0.0183$ ).

Im 18h-MWT ergab sich eine deutliche Reduktion der Zellzahl ED1+ Monozyten / Makrophagen zwischen den beiden Kontrollgruppen (BD-Kontrolle vs. LD-Kontrolle:  $23.43 \pm 11.30\%$  vs.  $8.93 \pm 9.00\%$ ;  $p=0.0909$ ). Eine signifikante Reduktion ED1+ Monozyten / Makrophagen zeichnete sich in der vorbehandelten LD-Gruppe (LD-IL6R mAb-Gruppe vs. BD-IL6R mAb-Gruppe:  $4.27 \pm 3.60\%$  vs.  $12.56 \pm 5.04\%$  ( $p=0.0333$ )).

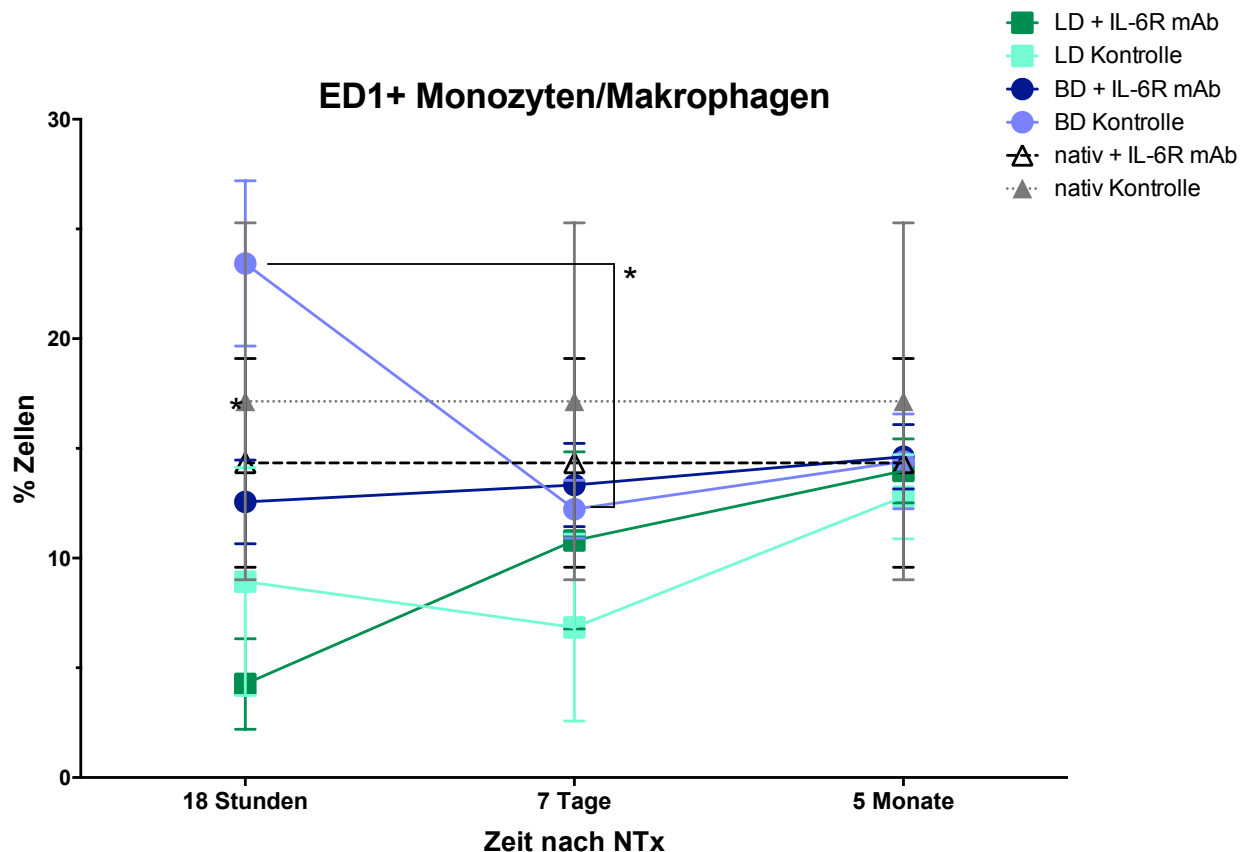


Abb. 23: ED1+ Monozyten/Makrophagen in der Milz (FACS: TWA)



### ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen

Im Zeitraum 18h bis 7d p.t. fiel die Zellzahl in der BD-Kontrolle von  $20.50 \pm 5.06\%$  auf  $11.19 \pm 2.89\%$  signifikant an ( $p=0.0219$ ).

Im Vergleich aller 18h-Gruppen im MWT zeigte sich eine signifikante Verringerung der Zellzahl unter der Anti-IL6R mAb-Vorbehandlung (BD-IL6R mAb-Gruppe:  $12.10 \pm 4.74\%$  vs. BD-Kontrollgruppe:  $20.50 \pm 5.06\%$ ,  $p=0.0052$ ). Die Zellzahl in der LD+IL-6R mAb reduzierte sich signifikant im Vergleich zur vorbehandelten BD-Gruppe (LD-IL6R mAb-Gruppe:  $3.63 \pm 3.09\%$  vs. BD-IL6R mAb-Gruppe:  $12.10 \pm 4.74\%$ ,  $p=0.0333$ ). Ähnliche deutliche Zellzahlreduktion ergab sich in den BD- und LD-Kontrollgruppen (BD-Kontrolle:  $20.50 \pm 5.06\%$  vs. LD-Kontrollgruppe:  $8.60 \pm 8.76\%$ ,  $p=0.0636$ ).

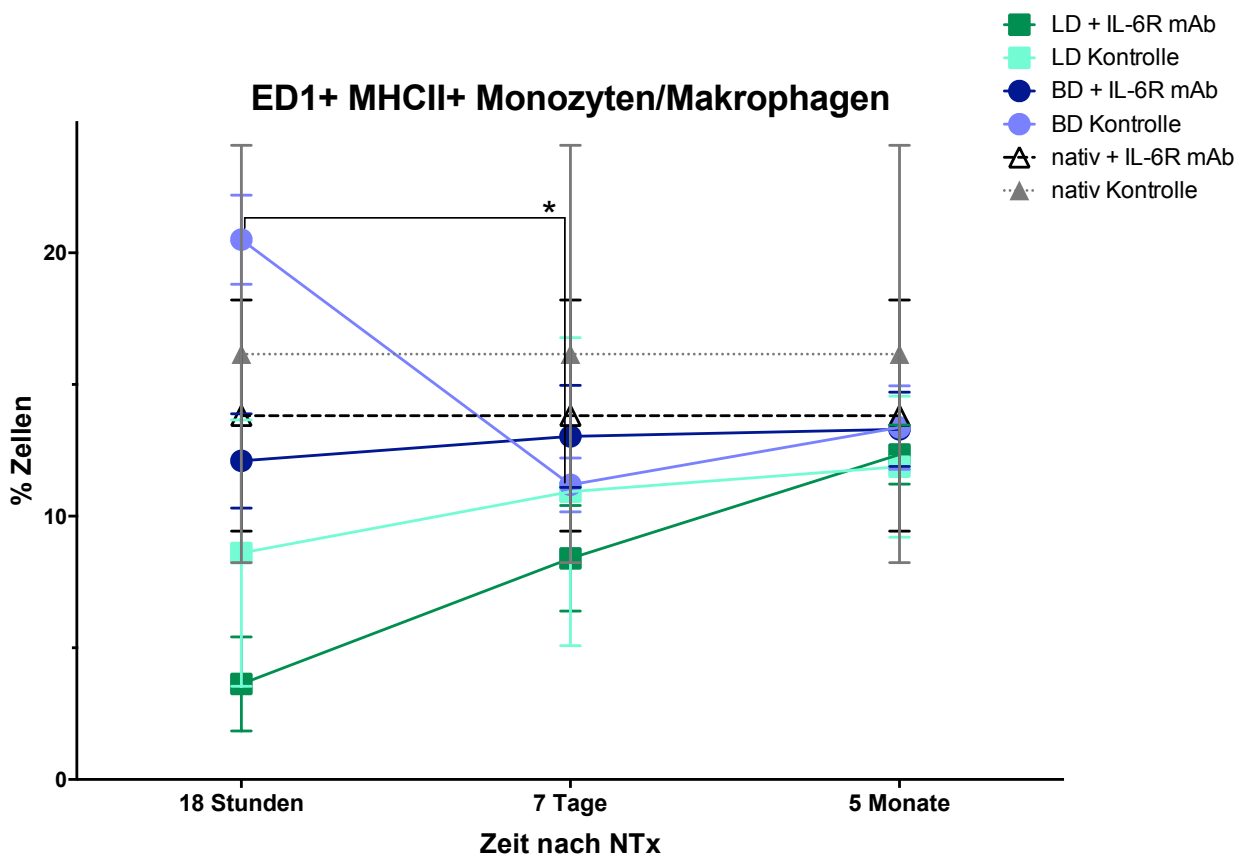


Abb. 24: ED1+ MHCII+ Monozyten/Makrophagen in der Milz (FACS: TWA)

### OX62+ DZ

In der BD-Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Zellzahlabfall von  $3.26 \pm 1.21\%$  18h p.t. auf  $0.78 \pm 0.66\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0236$ ). Ein weiterer signifikanter Abfall der OX62+ DZ-Zellzahl zeigte sich von Tag 7 auf 5Mo p.t. (BD-Kontrollgruppe:  $3.61 \pm 2.29\%$  7d p.t. auf  $0.78 \pm 0.66\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0104$ ). Die Anzahl OX62+ DZ fiel in der LD-Kontrollgruppe von  $4.76 \pm 1.66\%$  18h p.t. auf  $0.78 \pm 0.57\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0108$ ).

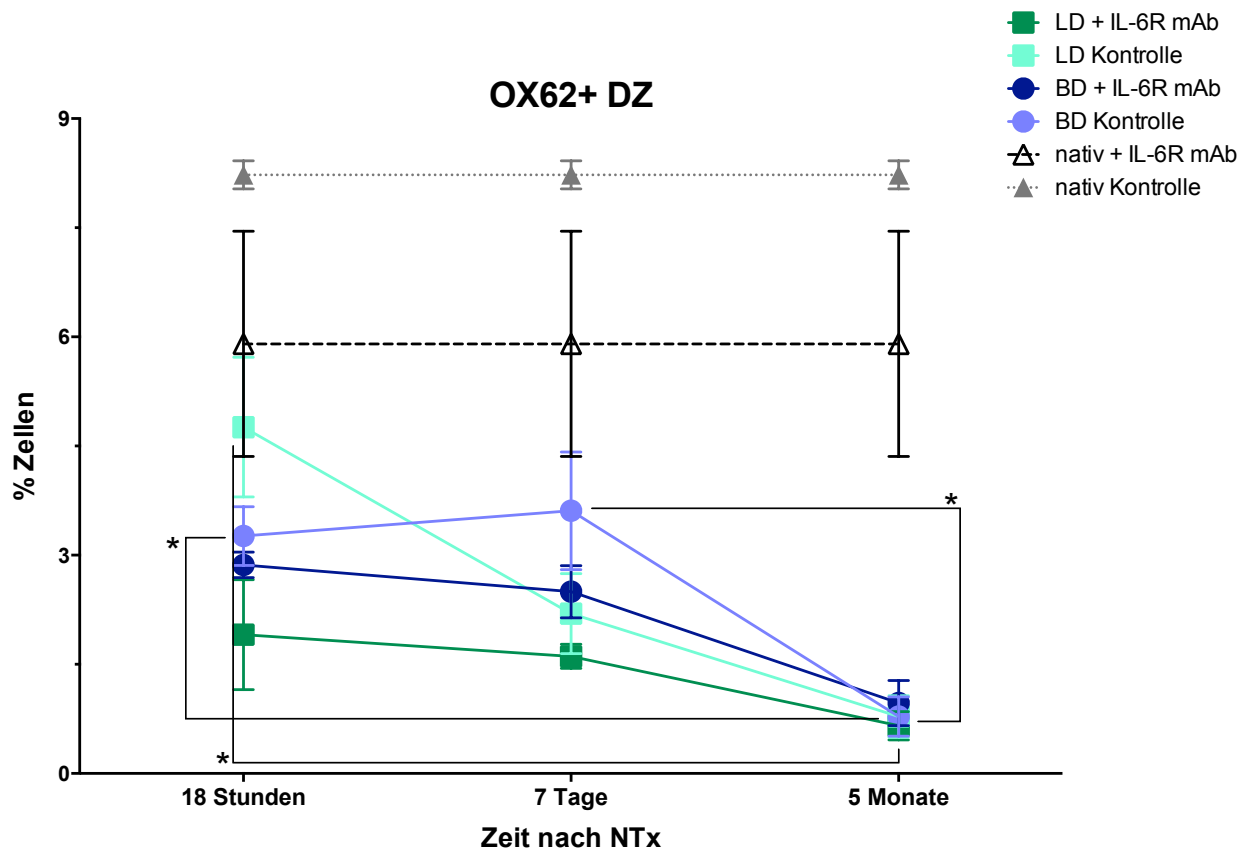


Abb. 25: OX62+ DZ in der Milz (FACS: TWA)

### OX62+ MHCII+ DZ

In allen Two-Way-ANOVA-Untersuchungsgruppen konnten keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Im direkten Vergleich (MWT) war nach 7 Tagen die Anzahl OX62+ MHCII+ DZ in der Gruppe der LD-Kontrolle deutlich verringert zur BD-Kontrolle (LD-Kontrolle:  $0.05 \pm 0.06\%$  vs. BD-Kontrollgruppe:  $0.24 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0909$ ).

### OX62+ CD86+ DZ

In der TWA zeigte sich ein signifikanter Zellzahlabfall in der BD-Kontrollgruppe von  $1.62 \pm 1.05\%$  18h p.t. auf  $0.89 \pm 0.38\%$  7d p.t.,  $p=0.0374$ . Dazu ergab sich ein signifikanter Abfall der Zellzahl in dieser Gruppe im Vergleich der 18h und 5Mo-Werte (BD-Kontrollgruppe:  $1.62 \pm 1.05\%$  18h p.t. auf  $0.69 \pm 0.27\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0088$ ). Außerdem zeigte sich eine signifikante Zellzahlreduktion in der LD+IL6R mAb im Vergleich zu der vorbehandelten BD-Gruppe 18h p.t. (LD+IL6R mAb:  $0$  vs. BD+IL6R mAb:  $1.21 \pm 0.33\%$ ,  $p=0.0453$ ).

### **CD45RA+ B-Zellen**

In der vorbehandelten LD-Gruppe fiel die Zellzahl der CD45RA+ B-Zellen von  $45.23 \pm 5.95\%$  7d p.t. auf  $34.67 \pm 7.18\%$  5Mo p.t. ab,  $p=0.0159$ .

### **CD45RA+ MHCII+ B-Zellen**

Nur in der LD+IL6R mAb-Gruppe zeigte sich eine Zellzahlreduktion der CD45RA+ MHCII+ B-Zellen von  $43.13 \pm 5.25\%$  7d p.t. auf  $29.80 \pm 13.11\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0010$ .

### **CD45RA+ CD86+ B-Zellen**

Ein signifikanter Zellzahlabfall CD45RA+ CD86+ B-Zellen ergab sich in der LD-Kontrollgruppe von  $13.70 \pm 1.74\%$  18h p.t. auf  $5.65 \pm 1.43\%$  7d p.t. ( $p=0.0486$ ) und stieg dann wieder auf  $15.43 \pm 4.65\%$  an ( $p=0.0061$ ). Im Vergleich der 18h-Gruppen ergab sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der vorbehandelten LD-Gruppe mit  $0.07 \pm 0.06\%$  im Vergleich zur CD45RA+ CD86+ B-Zellen in der LD-Kontrollgruppe mit  $13.70 \pm 1.74\%$  ( $p=0.0065$ ). Die Zellzahl in der LD+IL6R mAb-Gruppe stieg von  $0.07 \pm 0.06\%$  18h p.t. auf  $9.80 \pm 3.85\%$  7d p.t. signifikant an,  $p=0.0188$ . Eine Zellzahlsteigerung zeigte sich ebenfalls in der o.g. Gruppe von  $0.07 \pm 0.06\%$  18h p.t. auf  $13.76 \pm 2.91\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0003$ . In der BD+IL6R mAb-Gruppe zeigte sich eine signifikante Zellzahlerhöhung von  $7.36 \pm 4.20\%$  7d p.t. auf  $14.13 \pm 3.13\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0212$ .

Im MWT zeigte sich eine tendenziell erhöhte Zellzahl in der LD-Kontrollgruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe (LD-Kontrollgruppe:  $13.70 \pm 1.74\%$  vs. BD-Kontrollgruppe:  $10.95 \pm 1.76\%$ ,  $p=0.0955$ ).

## **5.4.2. Infiltration von CD161a+ NK und NKT**

### **CD161a+ NK-Zellen**

Die Zellzahl CD161a+ NK-Zellen fiel in der BD-Kontrollgruppe von  $14.79 \pm 2.78\%$  18h p.t. auf  $6.87 \pm 2.27\%$  5Mo p.t. ab,  $p=0.0199$ . In der BD-Kontrolle zeigte sich eine Zellzahlreduktion von  $20.75 \pm 1.37\%$  7d p.t. auf  $6.87 \pm 2.27\%$ ,  $p<0.0001$ . Die Anzahl CD161a+ NK-Zellen lag in der BD-Kontrolle 5Mo p.t. mit  $6.87 \pm 2.27\%$  signifikant niedriger im Vergleich zur vorbehandelten BD-Gruppe mit  $17.13 \pm 18.22\%$  ( $p=0.0201$ ) 5Mo p.t. Die Zellzahl CD161a+ NK-Zellen in der vorbehandelten LD-Gruppe war signifikant geringer als diese in der vorbehandelten BD-Gruppe (LD+IL6R mAb:

4.81±1.47% vs. BD+IL6R mAb: 17.13±18.22%; p=0.0098). In der vorbehandelten LD-Gruppe fiel die Zellzahl von 21.93±2.78% 7d p.t. auf 4.81±1.47% 5Mo p.t. ab, p<0.0001. Im 18h- und 7d-MWT zeigte sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der LD-Kontrolle im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe (LD-Kontrolle: 10.37±1.95% vs. BD-Kontrolle: 14.79±2.78% 18h p.t., p=0.0636; LD-Kontrolle: 17.88±1.72% vs. BD-Kontrolle: 20.75±1.37% 7d p.t., p=0.0054).

Im 7d-KWS ergab sich eine signifikante verringerte Zellzahl CD161a+ NK-Zellen in der BD+IL6R mAb-Gruppe mit 13.98±1.72% im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe mit 20.75±1.37%, p=0.0075. Außerdem zeigte sich eine signifikante Zellzahlerhöhung in der LD-IL6R mAb-Gruppe mit 21.93±2.78% im Vergleich zur BD+IL6R mAb-Gruppe mit 13.98±1.72%, p=0.0365.

Im 5Mo-MWT zeigte sich eine signifikant erhöhte Zellzahl CD161a+NK-Zellen in der BD+IL6R mAb-Gruppe mit 17.13±18.22% im Vergleich zur BD-Kontrolle mit 6.87±2.27%, p=0.0152. Dazu zeigte sich eine signifikant niedrigere Zellzahl in der LD-IL6R mAb-Gruppe mit 4.81±1.47% im Vergleich zu der BD-IL6R mAb-Gruppe mit 17.13±18.22%, p=0.0095.

#### **CD4+ CD161a+ NKT-Zellen**

In der TWA zeigte sich eine Zellzahlreduktion in der BD-Kontrolle von 8.07±1.57% 7d p.t. auf 1.84±1.25% 5Mo p.t., p=0.0011. Ähnliche Zellzahlreduktion zeigte sich in der vorbehandelten LD-Gruppe von 7.04±2.74% auf 0.67±0.27%, p=0.0083.

Im 7d-MWT ergab sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der BD+IL6R mAb-Gruppe mit 5.33±2.62% im Vergleich zu der BD-Kontrollgruppe mit 8.07±1.57%, p=0.0379. Dazu zeigte sich eine signifikante niedrigere Zellzahl in der LD-Kontrolle mit 5.01±2.33% im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe mit 8.07±1.57%, p=0.0295.

Im 5Mo-MWT ergab sich eine Zellzahlerniedrigung in der LD+IL6R mAb-Gruppe mit 0.67±0.27% im Vergleich zur BD+IL6R mAb-Gruppe mit 3.26±2.59%, p=0.0043.

#### **CD8+ CD161a+ NKT-Zellen**

Beim Vergleich der 7d- und der 5Mo-Gruppen fiel die Zellpopulation CD8+ CD161a+ NKT-Zellen in der BD-Kontrolle von 10.07±1.18% auf 4.39±1.12% ab, p=0.0001. Ebenso reduzierte sich die Anzahl CD8+ CD161a+ NKT-Zellen in der LD-Kontrollgruppe von 9.83±1.08% 7d p.t. auf 3.58±1.38% 5Mo p.t., p=0.0005. In der

vorbehandelten BD-Gruppe ergab sich auch eine Zellzahlerniedrigung von  $8.43 \pm 1.45\%$  7d p.t. auf  $4.39 \pm 0.60\%$  5Mo p.t.,  $p < 0.0001$ .

Im 7d-Gruppenvergleich zeigte sich eine signifikant reduzierte Zellzahl in der vorbehandelten BD-Gruppe mit  $8,43 \pm 1,45\%$  im Vergleich zur LD+IL6R mAb-Gruppe mit  $11,13 \pm 1,72\%$ ,  $p = 0.0110$ .

Zusätzlich ergab sich in der LD+IL6R mAb-Gruppe ein signifikanter Anstieg CD8+ CD161a+ NKT-Zellen von  $7.22 \pm 1.99\%$  auf  $11.13 \pm 1.72\%$  7d p.t.,  $p = 0.0004$ . Nach 5 Monaten fiel die Zellzahl der o.g. Gruppe auf  $3.21 \pm 0.96\%$  signifikant ab,  $p < 0.0001$ .

Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der BD+IL6R mAb-Gruppe von  $8.43 \pm 1.45\%$  im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe mit  $10.07 \pm 1.18\%$  im 7d-MWT ( $p = 0.0289$ ). Es ergab sich jedoch zum selben Zeitpunkt eine signifikant erhöhte Zellzahl in der LD+IL6R mAb-Gruppe mit  $11.13 \pm 1.72\%$  im Vergleich zur BD-IL6R mAb-Gruppe 7d p.t.

Im 5Mo-MWT zeigte sich eine niedrigere Zellzahl in der vorbehandelten LD-Gruppe  $3.21 \pm 0.96\%$  im Vergleich zur vorbehandelten BD-Gruppe mit  $4.39 \pm 0.60\%$ ,  $p = 0.0584$ .

### **5.4.3. Infiltration von CD3+ T-Zellen**

#### **CD3+ CD4+ T-Zellen**

In der TWA stieg die Zellzahl CD3+ CD4+ T-Zellen in der BD-Kontrollgruppe von  $28.36 \pm 1.66\%$  7d p.t. auf  $36.13 \pm 3.14\%$  5Mo p.t., an,  $p = 0.0058$ . Ein signifikanter Anstieg der Zellzahl CD3+ CD4+ T-Zellen zeigte sich in der vorbehandelten BD-Gruppe von  $28.39 \pm 3.53\%$  7d p.t. auf  $35.92 \pm 3.40\%$  ( $p = 0.0101$ ) 5Mo p.t. In der vorbehandelten LD-Gruppe fiel die Anzahl CD3+ CD4+ T-Zellen von  $36.37 \pm 3.69\%$  auf  $26.53 \pm 1.54\%$  ( $p = 0.0151$ ) 7d p.t. ab und stieg dann wieder auf  $34.78 \pm 1.93\%$  5Mo p.t. an ( $p = 0.0214$ ).

#### **CD3+CD8+ T-Zellen**

Die Zellzahl in der BD-Kontrollgruppe stieg von  $13.37 \pm 1.64\%$  18h p.t. auf  $17.24 \pm 3.08\%$  7d p.t. an ( $p = 0.0380$ ) und fiel dann wieder auf  $12.52 \pm 1.42\%$  5Mo p.t. ab ( $p = 0.0203$ ). In der vorbehandelten BD-Gruppe fiel die Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von  $18.06 \pm 6.11\%$  7d p.t. auf  $11.39 \pm 0.91\%$  ( $p = 0.0006$ ) 5Mo p.t. ab. In der LD-Kontrollgruppe reduzierte sich die Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen von  $17.98 \pm 1.37\%$  7d p.t. auf  $8.39 \pm 7.21\%$  5Mo p.t. ( $p = 0.0005$ ). In der vorbehandelten LD-Gruppe sank die Zellzahl von  $16.20 \pm 2.71\%$  7d p.t. auf  $9.33 \pm 5.25\%$  5Mo p.t. ab ( $p = 0.0054$ ).

#### **5.4.4. Infiltration von CD62L+ T-Zellen**

##### **CD4+ CD62L+ T-Zellen**

Die Anzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen in der BD-Kontrollgruppe erniedrigte sich signifikant von 23.63±8.91% 18h p.t. auf 13.76±5.93% 5Mo p.t., p=0.0013. In der TWA ergab sich eine Zellzahlreduktion in der vorbehandelten BD-Gruppe von 24.71±5.14% 18h p.t. auf 14.35±3.54% 5Mo p.t., p=0.0014. Ähnlich zeigte sich die Reduktion der Zellzahl in der LD-Kontrollgruppe von 27.73±2.97% 18h p.t. auf 11.76±5.02% 5Mo p.t., p=0.0003. In der LD+IL6R mAb-Gruppe zeigte sich eine Zellzahlreduktion von 28.63±5.24% 18h p.t. auf 14.14±5.70% 5Mo p.t. (p=0.0006). Im 7d/5Mo-Gruppenvergleich zeigte sich eine Zellzahlreduktion CD4+ CD62L+ T-Zellen in der LD-Kontrollgruppe von 21.64±6.73% 7d p.t. auf 11.76±5.02% 5Mo p.t. (p=0.0138) sowie auch in der LD+IL6R mAb-Gruppe von 22.73±3.35% 7d p.t. auf 14.14±5.70% 5Mo p.t. (p=0.0371).

##### **CD8+ CD62L+ T-Zellen**

In der BD-Kontrollgruppe zeigte sich eine reduzierte Zellzahl CD8+ CD62L+ T-Zellen von 10.87±1.56% 18h p.t. auf 5.50±2.17% 5Mo p.t. (p=0.0016) sowie von 10.79±4.58% 7d p.t. auf 5.50±2.17% 5Mo p.t. (p=0.0025). In der vorbehandelten BD-Gruppe fiel die Zellzahl CD8+ CD62L+ T-Zellen von 11.48±2.93% 18h p.t. auf 5.18±1.63% 5Mo p.t. ab (p=0.0004) sowie auch von 11.45±3.48% 7d p.t. auf 5.18±1.63% 5Mo p.t. (p=0.0003). In der LD-Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Zellzahlreduktion CD8+ CD62L+ T-Zellen von 12.38±2.68% 7d p.t. auf 6.00±0.63% 5Mo p.t. (p=0.0035) sowie im 18h/5Mo-Gruppenvergleich von 12.60±1.65% 18h p.t. auf 6.00±0.63% 5Mo p.t. (p=0.0087).

Ein signifikanter Zellzahlabfall zeigte sich in der LD+IL6R mAb-Gruppe von 13.37±2.01% 18h p.t. auf 5.75±1.92% 5Mo p.t. (p=0.0012) und von 13.37±2.01% 18h p.t. auf 8.10±0.58% 7d p.t. (p=0.044).

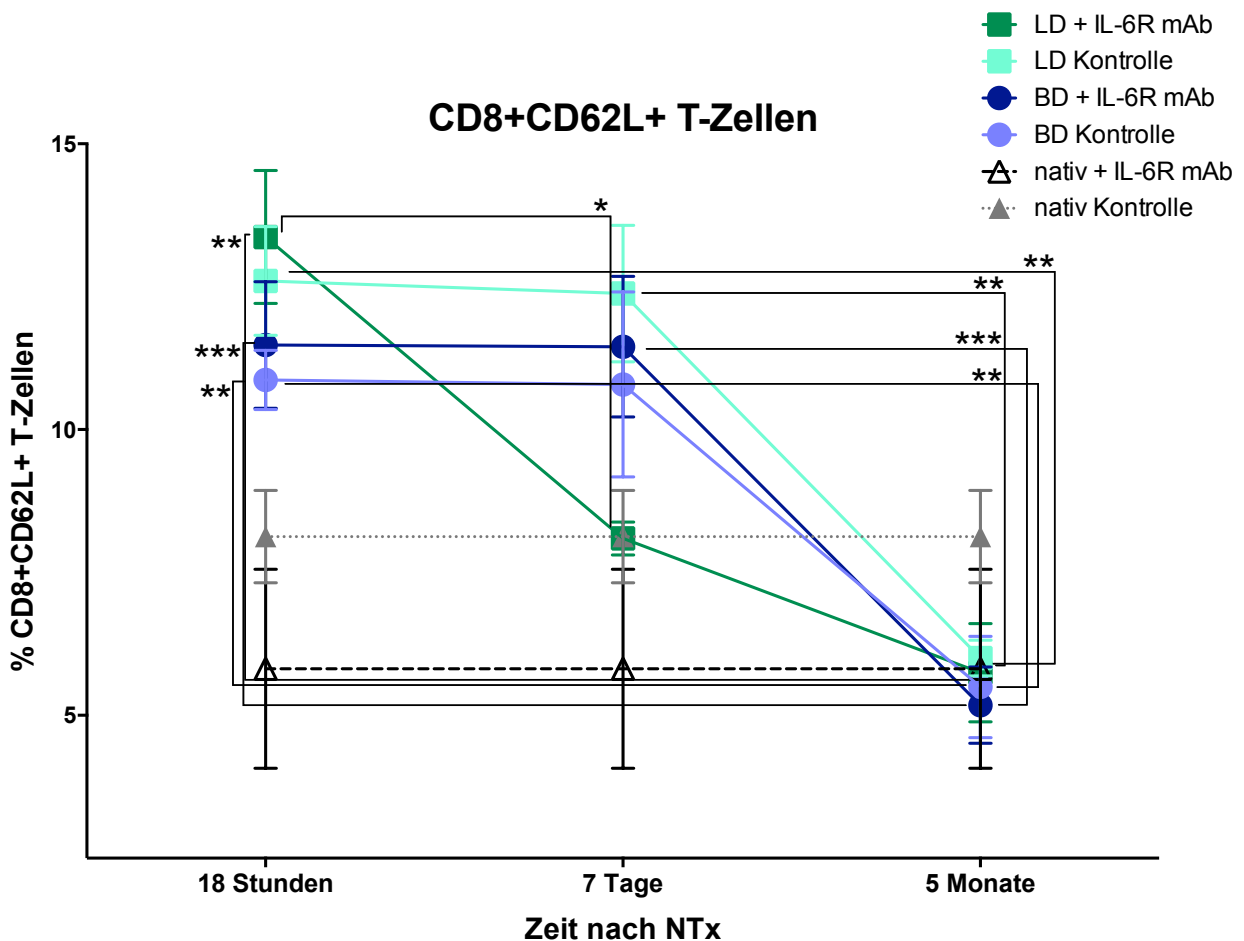


Abb. 26: CD8+ CD62L+ T-Zellen in der Milz (FACS: TWA)

## 5.5. FACS Blut

### 5.5.1. Infiltration von APZ

In der TWA im Blut ergaben sich nur wenige signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen in der Niere und in der Milz.

Im Gruppenvergleich der 18h-Tiere zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl CD45RA+ B-Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe mit  $9.99 \pm 8.89\%$  im Vergleich zu der vorbehandelten LD-Gruppe mit  $27.44 \pm 3.31\%$  18h p.t.,  $p=0.0225$ .

Im MWT 7d p.t. zeigte sich eine signifikant erhöhte Zellzahl CD45RA+ B-Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe mit  $23.32 \pm 3.42\%$  im Vergleich zu der BD-Kontrollgruppe mit  $15.35 \pm 5.14\%$ ,  $p=0.0476$ . Interessanterweise zeigte sich eine signifikant höhere Zellzahl in der LD-Kontrollgruppe mit  $25.53 \pm 4.61\%$  im Vergleich zu der BD-Kontrollgruppe mit  $15.35 \pm 5.14\%$ ,  $p=0.0381$ .

Bei den dendritischen Zellen zeigte sich der gleiche Trend wie in der Niere, jedoch ohne Signifikanz. Die Zellzahl ist von 18h p.t. auf 7d p.t. angestiegen und dann wieder nach 5 Monaten abgefallen.

### **5.5.2. Infiltration von CD161a+ NK- und NKT-Zellen**

Im Vergleich der CD8+CD161a+ NKT-Zellpopulationen zeigte sich der bekannte Zellzahlverlauf, wie schon oben beschrieben.

Die Anzahl CD 8+ CD161a+ NK-Zellen in der vorbehandelten LD-Gruppe fiel signifikant von  $11.14 \pm 2.81\%$  7d p.t. auf  $3.62 \pm 1.29\%$  5Mo p.t. ab,  $p=0.0030$ .

### **5.5.3. Infiltration von CD3+ T-Zellen**

Im Vergleich der CD3+CD8+ T-Zellen zeigte sich erneut der gleiche Verlauf des erstmaligen Anstieges der Zellzahl von 18h p.t. auf 7d p.t. und danach des Zellzahlabfalls auf 5Mo p.t. Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in der BD-Kontrollgruppe mit  $10.79 \pm 3.14\%$  im Vergleich zu der LD-Kontrollgruppe mit  $5.52 \pm 2.71\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0461$ .

### **5.5.4. Infiltration von CD62L+ T-Zellen**

#### **CD4+ CD62L+ T-Zellen**

In der TWA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl CD4+ CD62L+ T-Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe mit  $47.09 \pm 7.39\%$  18h p.t. auf  $26.53 \pm 9.42\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0003$ . Die Zellzahl in der vorbehandelten LD-Gruppe erniedrigte sich signifikant von  $45.75 \pm 3.23\%$  7d p.t. auf  $28.76 \pm 5.00\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0156$ .

#### **CD8+ CD62L+ T-Zellen**

Hier zeigte sich der typische Verlauf der Zellzahl mit primärem Anstieg von 18h p.t. auf 7d p.t. und danach der Abfall in der 5Mo-Gruppe. Die Anzahl CD8+ CD62L+ T-Zellen in der LD+IL6R mAb-Gruppe reduzierte sich von  $19.63 \pm 4.41\%$  7d p.t. auf  $6.98 \pm 2.65\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0359$ .



## **5.6. ELISA**

### **5.6.1. IFN- $\gamma$**

In der TWA zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl in der BD-Kontrollgruppe von  $10.37 \pm 4.19\%$  18h p.t. auf  $17.18 \pm 7.06\%$  5Mo p.t.,  $p=0.0246$ . Die Zellzahl stieg auch in der LD-Kontrollgruppe von  $7.45 \pm 6.94\%$  18h auf  $17.20 \pm 5.03\%$  5Mo nach NTx an,  $p=0.0160$ . In der vorbehandelten BD-Gruppe erhöhte sich ebenso die Zellzahl von  $9.29 \pm 2.58\%$  18h p.t. auf  $18.85 \pm 6.23\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0011$ ) sowie von  $9.42 \pm 2.34\%$  7d p.t. auf  $18.85 \pm 6.23\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0027$ ). In der vorbehandelten LD-Gruppe ergab sich ein Anstieg von  $8.62 \pm 1.50\%$  18h p.t. auf  $16.13 \pm 3.39\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0434$ ).

Im Vergleich der 7d-Gruppen ergab sich eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der BD-Kontrolle mit  $13.56 \pm 1.64\%$  im Vergleich zu der BD+IL6R mAb-Gruppe mit  $9.42 \pm 2.34\%$ ,  $p=0.0317$ .

### **5.6.2. IL-2**

In der TWA fiel die Zellzahl signifikant in der BD-Kontrolle von  $23.06 \pm 5.61\%$  18h p.t. über  $13.07 \pm 3.86\%$  7d p.t. ( $p=0.0018$ ) auf  $30.81 \pm 2.52\%$  5Mo p.t. ( $p<0.0001$ ). Die Zellzahl stieg in der LD-Kontrollgruppe von  $18.90 \pm 12.20\%$  18h p.t. auf  $33.44 \pm 1.63\%$  5Mo p.t. an ( $p=0.0009$ ) und von  $8.26 \pm 1.71\%$  7d p.t. auf  $33.44 \pm 1.63\%$  5Mo p.t. ( $p<0.0001$ ). In der vorbehandelten BD-Gruppe fiel Zellzahl von  $22.59 \pm 4.51\%$  auf  $10.48 \pm 4.50\%$  7d p.t. ab ( $p=0.0004$ ) und stieg dann wieder auf  $30.38 \pm 3.09\%$  5Mo p.t. an ( $p<0.0001$ ). Ähnliche Verläufe gab es in der LD+IL6R mAb-Gruppe: von  $21.57 \pm 0.98\%$  18h p.t. über  $8.00 \pm 1.59\%$  7d p.t. ( $p=0.0004$ ) auf  $31.97 \pm 2.04\%$  5Mo p.t. ( $p<0.0001$ ).

### **5.6.3. IL-6 im Serum**

Aufgrund der zwei zeitlichen Variablen (18h und 7d) wurde die Signifikanz der Werte mittels MWT und KWT überprüft und ergab sich eine grenzwertige Erhöhung der Zellzahl in der LD+IL6R mAb- mit  $159.40 \pm 6.02\%$  im Vergleich zu der LD-Kontrollgruppe mit  $146.10 \pm 7.09\%$ ,  $p=0.0857$ .

### **5.6.4. IL-10**

Es ergaben sich keine Signifikanzen im Vergleich der Werte in der TWA, KWT und MWT.

### **5.6.5. TNF- $\alpha$**

In der BD-Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Zellzahlanstieg von  $361.70 \pm 232.70\%$  18h p.t. auf  $1673.00 \pm 517.40\%$  7d p.t. ( $p=0.0166$ ). In der LD-Kontrollgruppe zeigte sich zuerst ein Zellzahlanstieg von  $237.40 \pm 78.03\%$  18h p.t. auf  $1697.00 \pm 834.90\%$  7d p.t. ( $p=0.0294$ ) und dann wieder Abfall auf  $224.60 \pm 28.30\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0277$ ). Die Zellzahl in der BD+IL6R mAb-Gruppe stieg von  $268.80 \pm 223.40\%$  18h p.t. auf  $1612.00 \pm 1013.00\%$  7d p.t. an ( $p=0.0138$ ) und fiel dann nach 5 Monaten wieder auf  $423.20 \pm 167.10\%$  ab ( $p=0.0245$ ). Ähnlich war der Verlauf in der LD+IL6R mAb-Gruppe von  $183.50 \pm 41.86\%$  18h p.t. über  $2395.00 \pm 1317.00\%$  7d p.t. ( $p=0.0006$ ) auf  $239.80 \pm 90.43\%$  5Mo p.t. ( $p=0.0001$ ).

### **5.6.6. IL-6 Milz**

In der BD-Kontrollgruppe zeichnete sich zuerst eine Zellzahlerhöhung von  $544.70 \pm 319.80\%$  18h p.t. auf  $1376.00 \pm 662.50\%$  7d p.t. ( $p=0.0013$ ) und dann wieder eine Reduktion auf  $261.00 \pm 105.50\%$  5Mo p.t. ( $p<0.0001$ ). In der LD-Kontrollgruppe stieg die Zellzahl zuerst von  $221.80 \pm 206.10\%$  18h p.t. auf  $1334.00 \pm 729.80\%$  7d p.t. an ( $p=0.0004$ ) und fiel nach 5 Monaten auf  $198.40 \pm 27.15\%$  ab ( $p<0.0001$ ). Ähnliche Verläufe zeigten sich in der vorbehandelten BD-Gruppe mit Anstieg von  $360.80 \pm 141.90\%$  auf  $1027.00 \pm 417.60\%$  7d p.t. ( $p=0.0112$ ) und Abfall 5 Monate nach NTx auf  $273.00 \pm 96.09\%$  p.t. ( $p=0.0023$ ). In der vorbehandelten LD-Gruppe zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl von  $419.60 \pm 35.51\%$  auf  $1745.00 \pm 638.00\%$  ( $p<0.0001$ ) und folgendem Abfall auf  $256.90 \pm 123.70\%$  5Mo p.t. ( $p<0.0001$ ).

Im Vergleich der 7d-Gruppen zeigte sich eine signifikant niedrigere Zellzahl in der BD+IL6R mAb- mit  $1027.00 \pm 417.60\%$  im Vergleich zu der LD+IL6R mAb-Gruppe mit  $1745.00 \pm 638.00\%$ ,  $p=0.0282$ .

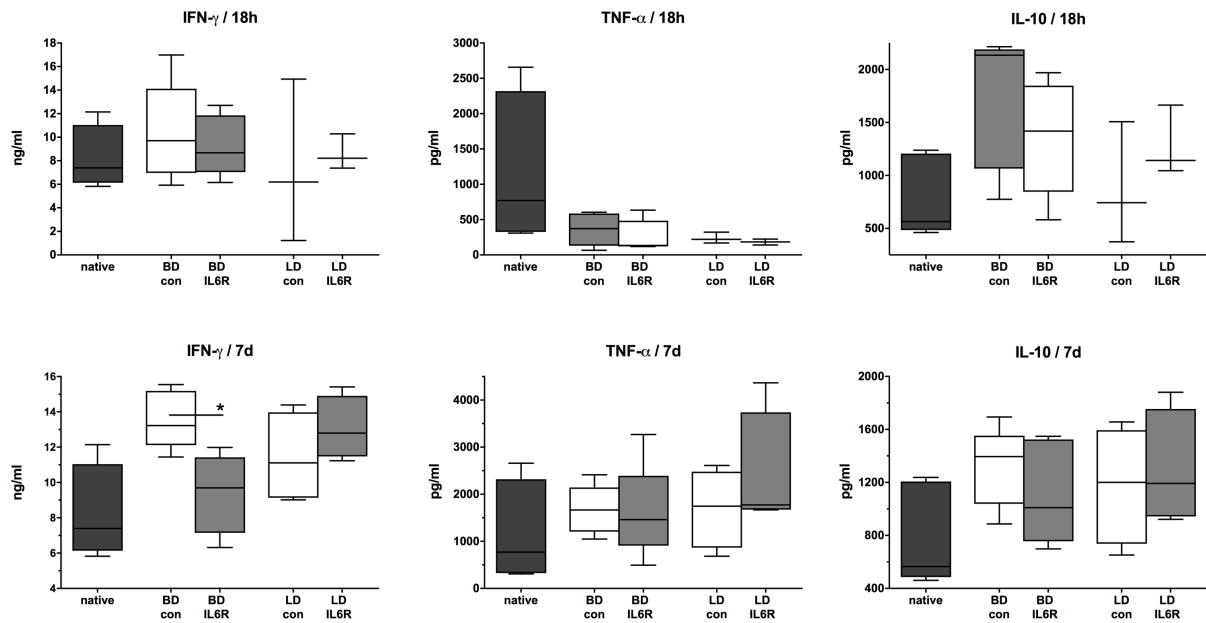


Abb. 27: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 (FACS: TWA) 18h und 7d p. t.

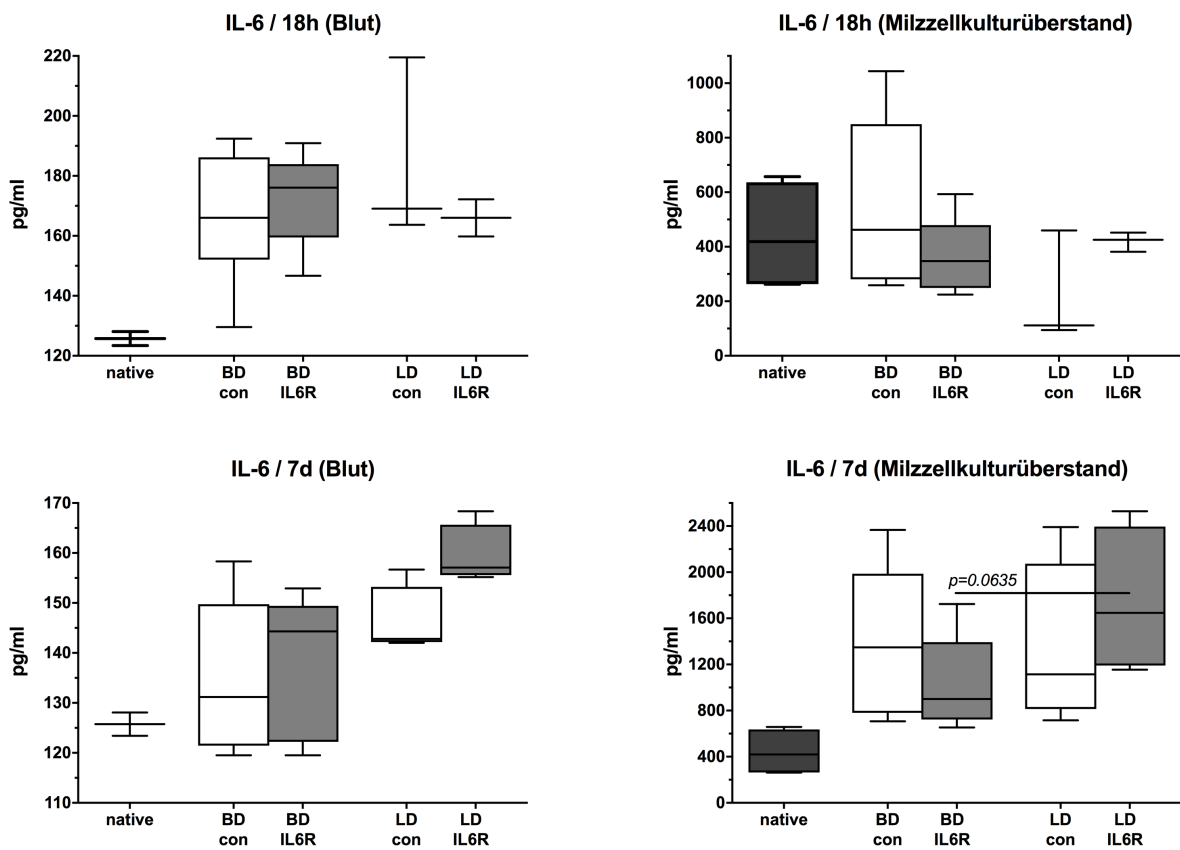


Abb. 28: IL-6 im Serum und im Milzzellkulturüberstand (FACS: TWA) 18h und 7d p.t.

## 6. Diskussion

Die Nierentransplantation stellt die Therapie der Wahl bei terminalem Nierenversagen dar, vor allem aus gesundheitlich ökonomischem Aspekt. Aufgrund des seit Jahren weiter zunehmenden Organbedarfs und dazu führenden Organmangels wurden die Spenderkriterien erweitert und die Transplantation „marginaler“ Organe eingeführt. Dadurch steigt das Risiko für primäre Dysfunktion und es kommt zu erhöhten Raten an Komorbiditäten, Retransplantationen und Mortalitäten. Organe mit primärer Dysfunktion zeigen außerdem ein signifikant niedrigeres Überleben, vermehrte Episoden mit akuter Abstoßung und eine erhöhte Inzidenz chronischer Organdysfunktionen im Vergleich zu Organen mit initial guter Funktion. [96]

Der Erfolg der Nierentransplantation hängt von verschiedenen Faktoren ab: neben den alloantigen-abhängigen Faktoren, wird die Immunantwort des Empfängers zudem von diversen alloantigen-unabhängigen Faktoren beeinflusst. So kann u.a. die Herkunft des Transplantats, Lebendspender versus hirntoter Spender, die Immunogenität des Transplantats und in der Folge die Alloreaktivität im Empfänger verstärken und den frühen sowie späten Schaden des Organs beeinflussen. Zusätzlich zum Hirntod sind andere alloantigen-unabhängige Risikofaktoren wie Alter, Vorerkrankungen des Spenders wie Diabetes mellitus, Hypertension und der I/R-Schaden von großer Bedeutung und beeinflussen das Outcome des Transplantats. [53] So weisen die Transplantate nicht verwandter Lebendspender im Gegensatz zu hirntoten Spendern seltener akute oder chronische Abstoßungen auf und zeigen eine bessere Langzeitfunktion. [97] Hinzu kommt die verzögerte Transplantatfunktion (DGF). Ghadiani et al zeigten, dass die DGF-Gruppe eine signifikant höhere Rate an Akutabstoßungen sowie ein erhöhtes Risiko für das Transplantatversagen nach 1 und 5 Jahren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ohne DGF aufweist. [98]

Während der kalten Ischämiezeit (Kaltlagerung des Organs) entstehen die ersten Entzündungsreaktionen, die durch Nekrose und Apoptose des Gewebes in einer Parenchymschädigung resultieren. Durch die Reanastomosierung und Reperfusion kommt es zu einer gesteigerten Zytokin- und Chemokinproduktion sowie einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen im Transplantat, was die Infiltration neutrophiler Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und Lymphozyten auslöst. Durch das Einströmen der aktivierten Zellen kann es zu einem Verschluss der Kapillaren kommen, was in der Folge wiederum zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zur Ausschüttung reaktiver Sauerstoffverbindungen führt, die ihrerseits das Transplantat destruieren. [99]

Wie schon beschrieben, ist die schlechte Organfunktion mit der erhöhten Ausschüttung und Expression von Zytokinen, vor allem von IL-6, tatsächlich auch bereits vor Organentnahme im Spender assoziiert. Aufgrund seiner umfassenden Funktion bezüglich Zellwachstum und -ausdifferenzierung sowie der Epithelialzellregeneration in den renalen Tubuli, wurde es als Prädiktor für akute Abstoßungsepisoden angesehen und als Risikomarker für einen anhaltenden renalen Schaden wie z.B. bei akuter Pyelonephritis sowie bei wiederkehrenden Abstoßungsepisoden eingesetzt. [100] [101] IL-6 kontrolliert die Ausdifferenzierung der Monozyten in Dendritische Zellen und Makrophagen und kann die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , CD40-Ligand, IL-4, IL-13 und GM-CSF stimulieren. [102] Außerdem kann IL-6 die NF- $\kappa$ B -Aktivität hemmen und die Expression von CCR7 (Chemokinrezeptor Typ 7) auf dendritischen Zellen unterdrücken. CCR7 beeinflusst u.a. die Reifung von DZ sowie das Homing von T-Zellen. Durch die IL-6-Ausschüttung von dendritischen Zellen werden zudem Toll-like-Rezeptoren aktiviert, wodurch die immunsuppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen unterdrückt wird.

DZ in der Niere sowie Makrophagen präsentieren ein konstitutives Gebilde aus Immunzellen, welches durch IL-6 beeinflusst wird. Zum ersten Mal zeigten Penfield et al., dass DZ "mobile Wächter" der Organe sind und die Hauptregulation der Antigenstimulation von CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Allotransplantation erfüllen. Die Rekrutierung der DZ wird durch die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen in das Organ eingeleitet, kann aber auch durch den durch die Transplantation entstandenen inflammatorischen Organschaden per se initiiert werden. Nachdem Empfänger DZ in das Organ migriert sind, wandern diese nach Kontakt mit dem Fremdantigen zur Milz und zu den Lymphknoten, um dort die T-Zell-Antwort zu induzieren. [65] [66] [103] [104]

IL-6 kontrolliert die neutrophile Infiltration bzw. hemmt die Neutrophilenakkumulation bei Entzündung. Darüber hinaus selektiert und reguliert es die T-Zell-Migration und -adhäsion. [66] IL-6 ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vor der Hämodialyse erhöht und kann sogar während der Dialyse noch weiter ansteigen. [70] Zusätzlich zu seiner Rolle in der Akute-Phase-Reaktion wie z.B. auch nach zerebraler Ischämie berichteten Vila et al., dass frühzeitig erhöhte IL-6-Werte mit einer schnelleren neurologischen Verschlechterung ohne Korrelation zur Initialgröße, Topografie oder zum Mechanismus des ischämischen Infarktes assoziiert waren. [105]

Ebenso wurde beschrieben, dass IL-6 als autokriner Wachstumsfaktor die Mesangialzellenproliferation (MZ) in der Ratte beeinflusst und möglicherweise mit der humanen pathologischen Proliferation der MZ bei der proliferativen Glomerulonephritis (PGN) in Verbindung steht, sodass IL-6 für ein Monitoring der PGN genutzt werden kann. [106]

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Vorbehandlung hirntoter Spender (versus Lebendspender) durch eine einmalige Applikation von IL-6R mAb vor der Organentnahme auf die Immunantwort des Empfängers und die Transplantatqualität untersucht.

Hierzu wurden schon teilweise histologische, immunhistologische und molekularbiologische Teilergebnisse von der Arbeitsgruppe veröffentlicht. [91]

Bisherige Studien zeigen, dass der I/R-Schaden bei Transplantaten von hirntoten Spendern mit einer gesteigerten Expression von IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 einhergeht. [107] [108] Auch in der klinischen Studie unserer Klinik zur Qualität von Lebertransplantaten hirntoter Spender wurden erhöhte Serumspiegel von IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  im Spender vor Laparotomie sowie eine erhöhte Genexpression von IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und MIP-1a in Transplantatbiopsien unmittelbar nach Laparotomie bei hirntoten Spendern im Vergleich zu Lebendspendern nachgewiesen [109]. In unseren Zytokinanalysen (ELISA), die zu den Zeitpunkten 18h, 7d und 5Mo durchgeführt wurden, zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den IL-6-Serumspiegeln, jedoch ergab sich eine tendenzielle Reduktion von IL-6 in den Milzzellkulturüberständen unter anti-IL-6R mAb-Vorbehandlung in der hirntoten Gruppe im Vergleich zur vorbehandelten LD-Gruppe 7d p.t., während in der Gruppe der Lebendspender ein gegenteiliger Effekt zu beobachten war. Ein vergleichbarer Trend wurde in den Genexpressionsuntersuchungen im Transplantat beobachtet. [91] Allerdings konnte in den ELISA-Analysen passend zu den immunhistologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine tendenziell geringere Expression von IFN- $\gamma$  und IL-10 in den vorbehandelten hirntoten Gruppen verglichen zu den vorbehandelten Lebendspendern 7d p.t. gezeigt werden. Auch Rogers et al. konnten zeigen, dass die IFN- $\gamma$  vermehrt nach I/R exprimiert wird, was wiederum die Expression von MHC Klasse I und II-Antigenen verstärkt. Dies prädisponiert die transplantierten Nieren für eine Abstoßungsreaktion. [55] Konträr zu unseren ELISA-Analysen wurde in der

immunhistologischen Untersuchung eine signifikante Reduktion der Zytokinexpression von IL-10 durch eine einmalige anti-IL-6R-Vorbehandlung in der hirntoten Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe 7d p.t. gezeigt. Wie schon häufig bewiesen, belegten auch Lacha et al., dass die genetische Vorbestimmung (genetic determination) von IL-10 mit einem DGF sowie mit einer Transplantatabstoßungs-reaktion assoziiert sein kann. [110]

In den RT-PCR Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-4 Genexpression 18h und 7d p.t. in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise waren die IL-4-Werte auf Proteinebene in unserer ELISA-Analyse nicht messbar.

Zusätzlich zeigte sich eine minimale nicht signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe an allen drei Zeitpunkten. Die Blockade des IL-6R in unseren Experimenten könnte eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B und daraus resultierend eine reduzierte Sekretion von TNF- $\alpha$  bewirkt haben.

Takada et al. konnten bereits 1998 in einem Hirntodinduktionsmodell der Ratte zeigen, dass von Makrophagen sezernierte Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  unmittelbar nach der Hirntodinduktion massiv anstiegen. In der Folge beobachteten auch sie eine gesteigerte Ausschüttung Th1-assoziiertes Zytokine wie z.B. IFN- $\gamma$ , während kein Anstieg Th2-assoziiertes Zytokine wie IL-4 nachgewiesen werden konnte. [111]

Eine akute Abstoßung erfolgt in Folge des I/R-Schadens, der mit Schädigungen einhergeht, welche die Tubuli, das glomeruläre System sowie interstitielle Gefäßkompartimente betreffen. In mehreren Modellstudien wird eine zentrale Rolle von Makrophagen bei der akuten und chronischen Organabstoßung beschrieben. Außerdem ist eine reduzierte glomeruläre Infiltrationsrate mit einer gesteigerten Genexpression von Makrophagen in der transplantierten Niere assoziiert.

In einer Microarray-Analyse konnte die Korrelation zwischen den histologischen Veränderungen wie Interstitialfibrose, tubuläre Atrophie und Entzündung und der Makrophagen-Signatur gezeigt werden. [112] In Nagermodellen ist die chronische Allograft-Nephropathie (CAN) u.a. durch eine persistierende Makrophageninfiltration charakterisiert und kann entsprechend durch die Blockade von Makrophagen abgemildert werden. [113] Renale DZs und Makrophagen repräsentieren phänotypisch

und funktionell heterogene Zelltypen, die eine Immunreaktion nach Nierenschädigung maßgeblich modulieren und regulieren. [103]

Unsere FACS-Analysen des Nierentransplantatgewebes ergaben signifikant geringere Zellzahlen von ED1+ Monozyten/Makrophagen in der Gruppe vorbehandelter hirntoter Spender im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe 7d p.t., während in der Gruppe der Lebendspender die Vorbehandlung interessanterweise einen Anstieg der ED1+ Zellpopulation bewirkte. Ebenso war die Anzahl transplantatinfiltrierender ED1+MHCII+ Monozyten/Makrophagen in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe 7d p.t. signifikant reduziert. Diese Ergebnisse konnten durch die parallelen immunhistologischen und histologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt werden. [91] Immunhistologisch ergab sich nach Spendervorbehandlung in der hirntoten Gruppe eine deutlich verringerte Anzahl von transplantatinfiltrierenden ED1+ Monozyten/Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle. Histomorphologisch zeigte sich eine signifikant geringere Zellinfiltration und eine signifikant reduzierte Glomerulidestruktion. Pratschke et al. konnten bereits in früheren Untersuchungen in einem Rattennieren-Transplantationsmodell zeigen, dass es zu einer signifikant gesteigerten Expression ED1+ mononukleärer Zellen (zwischen 6 Stunden und 7 Tagen p.t.) in Nierentransplantaten unbehandelter hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern kommt. Histologisch wurde in dieser Studie eine massive zelluläre Infiltration insbesondere an den Gefäßen und Tubuli in der unbehandelten hirntoten Gruppe schon nach 3d beobachtet. [114]

In einem Dünndarm-Ischämie-/Reperusionsmodell erreichten Chen et al. eine signifikante Verringerung infiltrierender ED1+-Makrophagen in den proximalen und distalen Abschnitten des Transplantats sowie eine Verminderung des I/R-Schadens nach Depletion residenter Makrophagen mittels Cl2MBP Liposomen (Liposome encapsulated dichloromethylene bisphosphonate). [115] Ebenso konnte in einem Dünndarmtransplantationsmodell in der Ratte die Infiltration ED1+ Monozyten/Makrophagen durch eine Empfängerbehandlung mit dem TNF- $\alpha$  Inhibitor Infliximab 6 Monate p.t. signifikant in den proximalen und distalen Transplantatabschnitten erzielt werden. [116]

In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe, in der der Einfluss des alloantigen-unabhängigen Faktors Alter untersucht wurde, konnte nach Vorbehandlung marginaler,



älterer Spender mit bekannten erprobten Immunsuppressiva (Prednisolon, MMF, SDZ/RAD, Tacrolimus), insbesondere mit Prednisolon eine verbesserte Transplantat-Langzeitfunktion (Proteinurie  $p < 0.05$  vs. unbehandelter Kontrolle) nachgewiesen werden. Immunhistologisch war auch hier die Anzahl transplantatinfiltrierender ED1+ Monozyten/Makrophagen und CD4+ T-Zellen 6 Monate p.t. signifikant reduziert. Auch zeigte sich hier zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 3 p.t.) eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Genexpression sowie eine signifikante Erhöhung der IL-10 Expression (Tag 10 p.t.). [33] Trotz vergleichbarer Ergebnisse hinsichtlich transplantatinfiltrierender Zellen und der Zytokinexpression konnte in der eigenen Arbeit keine Verbesserung der Langzeittransplantatfunktion durch eine einmalige Vorbehandlung hirntoter Spender erreicht werden. Auch in den Untersuchungen von Diamond et al. waren nach Allo- und Iso-Nierentransplantation in der Ratte die Serumkreatinin- und Albuminexkretionswerte im Urin in beiden Gruppen nach 16 Wochen trotz 10-tägiger Empfängerbehandlung mit Cyclosporin signifikant erhöht. Ebenso zeigte sich eine signifikant erhöhte glomeruläre Sklerosierung nach 24 Wochen. [117] Auch in der vorliegenden Studie konnte keine Reduktion der Glomerulosklerose weder in der Gruppe der hirntoten Spender noch in der Gruppe der Lebendspender durch die einmalige Spendervorbehandlung mit IL-6R mAb erreicht werden. [91]

In unseren FACS-Analysen zeigte sich eine tendenziell reduzierte Anzahl von CD4+CD3+ und CD4+CD62L+ T-Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe 7d p.t., jedoch wurden nach 5 Monaten keine Unterschiede mehr bezüglich der T-Zellpopulationen beobachtet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der experimentellen Arbeit von Reutzel-Selke et al. zur Vorbehandlung älterer Nierenspender tatsächlich eine signifikante Reduktion transplantatinfiltrierender T-Zellen nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten. [33]

In der eigenen Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Anzahl transplantatinfiltrierender antigenpräsentierender Zellen in der BD-Gruppe durch eine Spendervorbehandlung mittels anti-IL-6R mAb verringert werden kann. So war die Anzahl OX62+ und OX62+MHCII+ dendritischer Zellen in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrolle 7d p.t. tendenziell reduziert. Eine signifikante Reduktion zeigte sich bezüglich der Anzahl OX62+CD86+ Zellen in der BD+ IL6R mAb-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe 7d nach Transplantation. Parallel zu diesen

Befunden, beobachteten wir in der vorbehandelten BD-Gruppe in den Genexpressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe eine entsprechende verringerte Expression von CCL-21 und CCL-19, Chemokine, die bei der Migration und dem Homing von T-Zellen und DZ eine entscheidende Rolle spielen. [118]

Auch in der experimentellen Studie von Atanasov et al. war die Anzahl OX62+ dendritischer Zellen bereits 20 min nach Reperfusion sowie 7d nach Dünndarmtransplantation in den distalen Anteilen des Transplantats signifikant reduziert. [116]

Hinsichtlich der B-Zellpopulationen, die sowohl als Antikörper-produzierende Zellen als auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren können, wurden in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in Blut, Milz oder Transplantat festgestellt. In den immunhistochemischen Analysen der Arbeitsgruppe zeigte sich kein signifikanter Anstieg der CD45RA+ B-Zellen in der BD-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe [91]. In unseren FACS-Analysen ergaben sich ähnliche Ergebnisse: kein signifikanter Anstieg der CD45RA+/ CD45RA+ MHCII+/ CD45RA+ CD86+ Zellen im Vergleich der vorbehandelten BD- oder LD-Gruppen mit den Kontrollgruppen an den drei verschiedenen Zeitpunkten.

Neben Monozyten/Makrophagen und DZ spielen verschiedene T-Zell-Populationen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort nach Transplantation. Lazarevic et al. beschrieben, dass T-bet, ein von CD4+ Zellen exprimierter T-box-Transkriptionsfaktor, die Aktivierung naiver CD4+ T-Zellen durch APZ in der Peripherie und folgende Differenzierung in verschiedene T-Helfer-Zellsubtypen wie z.B. Th1, Th2, Th17, T folliculäre-Helferzelle oder Treg-Zelle, reguliert. [119] Die entsprechende Differenzierung hängt von dem Zytokinmilieu ab, welches während der Aktivierungsphase vorhanden ist. So hemmt IL-6 einerseits die Bildung der Foxp3+ Treg Zellen, die ihrerseits durch TGF- $\beta$  induziert werden, beeinflusst andererseits aber zusammen mit TGF- $\beta$  die Ausdifferenzierung pathogener Th17-Zellen. Th17-Zellen sezernieren IL-17, welches mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht wird. Auch CD8+ T-Zellen und NKT-Zellen wandern in das Transplantat ein und lösen anfänglich lokale Entzündungsprozesse aus, die das Gewebe massiv schädigen. [119] [74] Auch in unseren Analysen zeigte sich in der Durchflusszytometrie tendenziell eine höhere

Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in den Kontrollgruppen verglichen zu den vorbehandelten Gruppen. Im Falle aktivierter CD8+ CD62L+ T-Zellen ergab sich eine signifikante Reduktion in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur vorbehandelten LD-Gruppe.

Die akute Entzündung führt zur CD8+ T-Zell-Aktivierung, -teilung und -differenzierung. Durch die Entzündung werden die Zellen in Tcm (central memory) und in Tem (effector memory) weiter differenziert. Die naiven CD8+ T-Zellen besitzen eine hohe CD62L+-Expression/Rezeptorendichte. In der Effektorphase wird CD62L+ nicht exprimiert. Es wurde auch gezeigt, dass durch die Zellteilung die Umformung der CD62L+ Zellen erfolgt (von CD62L+ high in CD62L+ low). Schlub et al. konnten in ihrer Studie den Ausmaß der Zellteilung ausmessen, die CD62L+ Expression bestimmt und beobachteten den Zusammenhang zwischen der Zellteilung und den Umfang der Gedächtnisformation in vivo. Die Zytokinexpression oder zytolytische Funktion werden auch durch die Ausdehnung der Zellteilung bestimmt. [120]

In der Immunhistologie von Weiss et al. wurde eine gesteigerte Lymphozyteninfiltration gezeigt und signifikant höhere Werte von CD3 mRNA-Expression in der BD-Gruppe detektiert. [109]

In den immunhistologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe erwies sich die CD8+ T-Zell-Population als die größte transplantatinfiltrierende Zellpopulation. Zu den Zeitpunkten 18h und 7d war sowohl in der Gruppe hirntoter Spender als auch bei Lebendspendern die Anzahl CD8+ T-Zellen in Transplantaten vorbehandelter Spender im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich verringert. Darüber hinaus ergab sich eine erhöhte Infiltration von CD8+ T-Zellen über die Zeit (18h und 7d) in der BD-Kontrollgruppe verglichen zur vorbehandelten BD-Gruppe. Stabile et al demonstrierten die Komplexität und Multidimensionalität der T-Zellfunktion in homozygoten CD8-defizienten Mäusen, in denen sich ein reduzierter Blutfluss sowie eine verstärkte muskuläre Atrophie und Fibrose zeigten. Durch die Veränderung der Expressionsrate dieser Zellen in einem Entzündungsgebiet werden Organkompartimente vielseitig angegriffen (s.o.). [121]

In weiteren FACS-Analysen zeigte sich an Tag 7 p.t. eine geringere Infiltration von CD161a+ NK-Zellen in der LD-Kontrollgruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe Die Anzahl CD161a+ NK-Zellen war zu diesem Zeitpunkt in der vorbehandelten BD-Gruppe im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe reduziert. Ein ähnlicher Trend war hinsichtlich der

Infiltration von CD4+ CD161a+ NKT-Zellen zu beobachten. Die Zellzahl in den jeweiligen Kontrollgruppen war nach Spendervorbehandlung geringfügig reduziert, während sich allerdings eine signifikant geringere Anzahl CD4+ CD161a+ NKT-Zellen in beiden LD-Gruppen im Vergleich zu den BD-Gruppen 7d p.t. ergab. Interessanterweise war die Infiltration der CD8+ CD161a+ NKT-Zellen in beiden vorbehandelten Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen erniedrigt. Insgesamt können diese Ergebnisse mit dem beobachteten geringeren histologischen Schädigungsgrad des Transplantats in der vorbehandelten BD-Gruppe gedeutet werden.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach 18h keinen klaren Vorteil von der Hirntod-Vorbehandlung gibt, jedoch wurden die positiven Effekte der HT-Vorbehandlung nämlich die signifikante Reduktion der transplantatinfiltrierenden Zellen 7d p.t. gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Dies kann einerseits durch die noch nicht aktivierten Empfängerzellen oder durch die noch supprimierten Spenderzellen bzw. noch nicht die voll entfaltete Wirkung von anti-IL-6R mAb erklärt werden. Andererseits bedeutet es, dass der monoklonale Antikörper anti-IL-6R 7d nach NTx Wirksamkeit aufwies und somit die entzündungsfördernden Prozesse unterbinden bzw. reduzieren konnte. Ähnliches zeigte Zhang et al in ihrer Studie, indem sich durch die Tocilizumab-Vorbehandlung die CRP-Konzentration als Indikator für den gehemmten IL-6-Rezeptor massiv erst nach einigen Tagen (ca. 11d) verringerte. Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten war auch um den Tag 7 am geringsten. [122]

In der Histomorphologie ergab sich eine reduzierte strukturelle Transplantatschädigung nach anti-IL-6R mAb-Vorbehandlung nach 18h und 7d p.t., jedoch zeigten die Langzeitergebnisse keinen positiven Effekt einer Vorbehandlung mit dem monoklonalen Antikörper. Sogar im Gegenteil: es kam zu einer signifikant größeren Zellinfiltration und einer signifikant ausgeprägten Tubulusatrophie / Arteriosklerose.

Die Daten legen den Schluss nahe, dass die IL-6-Blockade die strukturelle Transplantatschädigung zu frühen Zeitpunkten nach Tx minimieren kann.

Auch bei der Analyse der Langzeitfunktion des Transplantats mittels des Vergleichs metabolischer und klinischer Parameter, ergaben sich ähnliche Ergebnisse: die vorbehandelte BD-Gruppe hatte eine signifikant schlechtere Proteinurie, jedoch eine signifikant reduzierte Albuminurie bei gleich bleibender Kreatinin-Clearance im Vergleich zur BD-Kontrollgruppe.

Entsprechend zu unseren FACS-Ergebnissen zeigte sich auch immunhistochemisch eine signifikant reduzierte Anzahl ED1+ Monozyten/Makrophagen sowie CD8+ T-Zellen im Transplantat im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine einmalige Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit dem anti-IL-6R mAb die frühe Immunantwort beeinflussen und somit akute Abstoßungsepisoden verhindern könnte. Im chronischen Modell zeigte sich zwar kein nachteiliger Effekt der Antikörperbehandlung auf die Transplantatfunktion im Sinne einer beschleunigten Transplantatabstoßung oder eines verringerten Überlebens, ein Benefit der Spendervorbehandlung bezüglich der Transplantat-Langzeitfunktion konnte allerdings in unserem Modell nicht nachgewiesen werden.

Der Effekt einer mehrfachen Vorbehandlung der Spender zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. eine kombinierte oder/und auch höher dosierte Spender- und Empfängervorbehandlung mit dem IL-6R monoklonalen Antikörper, evtl. auch in Kombination mit etablierten Immunsuppressiva, muss überprüft werden.

Die Ergebnisse der Lebendspender-Gruppen lassen annehmen, dass diese Gruppe nicht von einer Vorbehandlung profitieren würde, auch wenn hier die geringere Versuchstierzahl in den Gruppen berücksichtigt werden muss.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] L. A. Fariña-perez, "Jaques-Louis Reverdin (1842-1929): the Surgeon and the Needle," *Arch. Esp. Uro*, vol. 63, no. 4, pp. 269–274, 2010.
- [2] N. S. Hakim, *Introduction to organ transplantation*, 2nd ed. London: Imperial College Press, 2012.
- [3] T. Schlich, "The origins of organ transplantation," *Lancet*, vol. 378, no. 9800, pp. 1372–1373, 2011.
- [4] L. Aida, "Alexis Carrel (1873-1944): visionary vascular surgeon and pioneer in organ transplantation.," *J. Med. Biogr.*, vol. 22, no. 3, pp. 172–5, 2014.
- [5] P. Rous and J. B. Murphy, "on Immunity To Transplantable Chicken Tumors.," *J. Exp. Med.*, vol. 20, no. 4, pp. 419–32, 1914.
- [6] T. E. Starzl, "History of clinical transplantation.," *World J. Surg.*, vol. 24, no. 7, pp. 759–82, Jul. 2000.
- [7] W. Müller-Ruchholtz, "Glances at the history of transplantation immunology," *Transplant. Proc.*, vol. 31, no. 3, pp. 1443–1451, 1999.
- [8] R. M. Zinkernagel and P. C. Doherty, "The discovery of MHC restriction," *Immunol. Today*, vol. 18, no. 1, pp. 14–17, 1997.
- [9] P. J. Morris, "Transplantation--a medical miracle of the 20th century.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 26, pp. 2678–80, Dec. 2004.
- [10] T. E. Starzl, "The mystique of organ transplantation.," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 201, no. 2, pp. 160–70, Aug. 2005.
- [11] R. Y. Calne, D. J. White, S. Thiru, D. B. Evans, P. McMaster, D. C. Dunn, G. N. Craddock, B. D. Pentlow, and K. Rolles, "Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors.," *Lancet (London, England)*, vol. 2, no. 8104–5, pp. 1323–7, 1978.
- [12] M. H. Sayegh and C. B. Carpenter, "Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 26, pp. 2761–6, Dec. 2004.
- [13] H. Schrem, H. Barg-Hock, C. P. Strassburg, A. Schwarz, and J. Klempnauer, "Aftercare for patients with transplanted organs.," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 106, no. 9, pp. 148–56, Feb. 2009.
- [14] U. P. Neumann, M. Schmeding, R. Pfitzmann, and P. Neuhaus, *Praxis der Viszeralchirurgie Gastroenterologische Chirurgie*, 3. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag GmbH, 2011.

- [15] G. Vergoulas, P. Boura, and G. Efstratiadis, "Brain dead donor kidneys are immunologically active: Is intervention justified?," *Hippokratia*, vol. 13, no. 4, pp. 205–210, 2009.
- [16] M. A. Schnitzler, K. L. Lentine, D. Axelrod, A. Gheorghian, M. You, A. Kalsekar, and G. L'Italien, "Use of 12-month renal function and baseline clinical factors to predict long-term graft survival: Application to BENEFIT and BENEFIT-EXT trials," *Transplantation*, vol. 93, no. 2, pp. 172–181, Jan. 2012.
- [17] R. Pichlmayr, E. Albert, R. Grundmann, H. Pichlmaier, W. Brendel, C. Hammer, and C. Chaussy, *Transplantationschirurgie*, vol. 3. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981.
- [18] J. J. van Rood, F. H. J. Claas, A. Brand, M. G. J. Tilanus, and C. Van Kooten, "Half a century of Dutch transplant immunology," *Immunol. Lett.*, vol. 162, no. 2, pp. 145–149, 2014.
- [19] Eurotransplant International Foundation, "Yearly Statistics Overview Eurotransplant," 2015.
- [20] Deutsche Stiftung Organtransplantation, "Jahresbericht DSO 2015," 2015.
- [21] D. Tittelbach-Helmrich, D. Bausch, O. Drognitz, H. Goebel, C. Schulz-Huotari, A. Kramer-Zucker, U. T. Hopt, and P. Pisarski, "Hyperacute Rejection of a Living Unrelated Kidney Graft," *Case Rep. Med.*, vol. 2014, pp. 1–4, 2014.
- [22] M. Pereira, J. Guerra, J. Gonçalves, A. Santana, C. Nascimento, and A. G. da Costa, "Hyperacute Rejection in a Kidney Transplant With Negative Crossmatch: A Case Report," *Transplant. Proc.*, vol. 48, no. 7, pp. 2384–2386, 2016.
- [23] R. P. Wüthrich, *Nierentransplantation*, 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 1995.
- [24] S. Leyking, M. Wolf, J. Mihm, M. Schaefer, R. M. Bohle, D. Fliser, M. Sester, and U. Sester, "Alloreactive T Cells to Identify Risk HLA Alleles for Retransplantation after Acute Accelerated Steroid-Resistant Rejection," *Transplant. Proc.*, vol. 47, no. 8, pp. 2425–2432, 2015.
- [25] D. Fahlenkamp, B. Schönberger, G. Tufveson, and S. A. Loening, *Lebendspende-Nierentransplantation Podium-Urologie Band 3*. Berlin: Blackwell Wissenschaft, 1997.
- [26] L. E. Becker, C. Morath, and C. Suesal, "Immune mechanisms of acute and chronic rejection," *Clin. Biochem.*, vol. 49, no. 4–5, pp. 320–323, 2016.
- [27] K. J. Wood and R. Goto, "Mechanisms of Rejection: Current Perspectives," *Transplantation*, vol. 93, no. 1, pp. 1–10, 2012.

- [28] D. M. Sansom, "CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?," *Immunology*, vol. 101, no. 2, pp. 169–77, Oct. 2000.
- [29] R. Shapiro, M. L. Jordan, A. Basu, V. Scantlebury, S. Potdar, H. P. Tan, E. A. Gray, P. S. Randhawa, N. Murase, A. Zeevi, A. J. Demetris, J. Woodward, A. Marcos, J. J. Fung, and T. E. Starzl, "Kidney transplantation under a tolerogenic regimen of recipient pretreatment and low-dose postoperative immunosuppression with subsequent weaning.," *Ann. Surg.*, vol. 238, no. 4, pp. 520–5; discussion 525–7, Oct. 2003.
- [30] B. J. Nankivell and J. R. et al Chapman, "The natural history of chronic allograft nephropathy.," *J. Urol.*, vol. 173, no. 6, p. 2106, 2005.
- [31] S. G. Tullius, M. Nieminen, W. O. Bechstein, S. Jonas, T. Steinmüller, Y. Qun, J. Pratschke, E. Graser, P. Sinha, H. D. Volk, P. Neuhaus, and N. L. Tilney, "Contribution of early acute rejection episodes to chronic rejection in a rat kidney retransplantation model," *Kidney Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 465–472, 1998.
- [32] S. G. Tullius, U. Heemann, W. W. Hancock, H. Azuma, and N. L. Tilney, "Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection," *Ann. Surg.*, vol. 220, no. 4, p. 425, 1994.
- [33] A. Reutzel-Selke, T. Zschockelt, C. Denecke, U. Bachmann, A. Jurisch, J. Pratschke, G. Schmidbauer, H. D. Volk, P. Neuhaus, and S. G. Tullius, "Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/ reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors," *Transplantation*, vol. 75, no. 11, pp. 1786–1792, 2003.
- [34] M. Hassanain, E. Simoneau, S. A. Doi, M. Aljiffry, A. Aloraini, A. Madkhali, and P. Metrakos, "Trends in brain-dead organ donor characteristics: a 13-year analysis.," *Can. J. Surg.*, vol. 59, no. 3, pp. 154–60, Jun. 2016.
- [35] M. Busson, G. Benoit, P. N'Doye, and J. Hors, "Analysis of cadaver donor criteria on the kidney transplant survival rate in 5,129 transplantations.," *J. Urol.*, vol. 154, no. 2 Pt 1, pp. 356–60, Aug. 1995.
- [36] a Siedlecki, W. Irish, and D. C. Brennan, "Delayed graft function in the kidney transplant," ... *J. Transplant.*, vol. 11, no. 11, pp. 2279–2296, 2011.
- [37] a J. McLaren, W. Jassem, D. W. Gray, S. V Fuggle, K. I. Welsh, and P. J. Morris, "Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation.," *Clin. Transplant.*, vol. 13, no. 3, pp. 266–272, 1999.



- [38] J. Pratschke, P. Neuhaus, and S. G. Tullius, "What can be learned from brain-death models?," *Transpl. Int.*, vol. 18, no. 1, pp. 15–21, 2005.
- [39] B. Long and A. Koyfman, "The Emergency Medicine Approach to Transplant Complications," *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 34, no. 11, pp. 2200–2208, 2016.
- [40] D. Bundestag, "Gesetz über die Spende , Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz - TPG )," *Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz*, pp. 1–25, 2013.
- [41] Deutsche Stiftung Organtransplantation, *Kein Weg zurück... Informationen zum Hirntod*, 7. Auflage. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), 2012.
- [42] D. Novitzky, D. K. C. Cooper, D. Morrell, and S. Isaacs, "Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy," *Transplantation*, vol. 45, no. 1. pp. 32–36, 1988.
- [43] K. Hahnenkamp, K. Bohler, H. Wolters, K. Wiebe, D. Schneider, and H. H.-J. Schmidt, "Organ-Protective Intensive Care in Organ Donors.," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 113, no. 33–34, pp. 552–558, 2016.
- [44] M. Smith, "Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor.," *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 23, no. 9 Suppl, pp. S217-22, Sep. 2004.
- [45] P. Herijgers, V. Leunens, T. B. Tjandra-Maga, K. Mubagwa, and W. Flameng, "Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines.," *Transplantation*, vol. 62, no. 3, pp. 330–335, 1996.
- [46] J. Pratschke, S. G. Tullius, and P. Neuhaus, "Brain death associated ischemia/reperfusion injury.," *Ann. Transplant.*, vol. 9, no. 1, pp. 78–80, 2004.
- [47] C. Schmaderer, J. Lutz, M. Stangl, and U. Heemann, "Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation," *TransplantLinc*, vol. 10, pp. 15–25, 2005.
- [48] M. Stangl, T. Zerkaulen, and E. Faist, "Influence of brain death on cytokine release in organ donors and renal transplants," *Transplant. Proc.*, vol. 33, no. 1–2, pp. 1284–1285, 2001.
- [49] K. Kotsch, M. Francuski, A. Pascher, R. Klemz, M. Seifert, J. Mittler, G. Schumacher, R. Buelow, H. D. Volk, S. G. Tullius, P. Neuhaus, and J. Pratschke, "Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors," *Am. J. Transplant.*, vol. 6, no. 3, pp. 477–486, 2006.

- [50] W. N. Nijboer, T. A. Schuurs, J. A. B. van der Hoeven, S. Fekken, J. Wiersema-Buist, H. G. D. Leuvenink, S. Hofker, J. J. Homan van der Heide, W. J. van Son, and R. J. Ploeg, "Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys.," *Transplantation*, vol. 78, no. 7, pp. 978–86, Oct. 2004.
- [51] W. N. Nijboer, T. A. Schuurs, R. J. Ploeg, and G. Kidney, "Effect of brain death and donor treatment on organ inflammatory response and donor organ viability," *Organ Transplant.*, vol. 9, no. June, pp. 110–115, 2004.
- [52] W. N. Nijboer, T. A. Schuurs, J. A. B. Van Der Hoeven, H. G. D. Leuvenink, J. J. H. Van Der Heide, H. Van Goor, and R. J. Ploeg, "Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney," *Transplant. Proc.*, vol. 37, no. 1, pp. 367–369, 2005.
- [53] M. Kusaka, J. Pratschke, M. J. Wilhelm, F. Ziai, K. Zandi-Nejad, H. S. Mackenzie, W. W. Hancock, and N. L. Tilney, "Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death.," *Transplantation*, vol. 69, no. 3, pp. 405–10, Feb. 2000.
- [54] J. Pratschke, M. J. Wilhelm, I. Laskowski, M. Kusaka, F. Beato, S. G. Tullius, P. Neuhaus, W. W. Hancock, and N. L. Tilney, "Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 12, no. 11, pp. 2474–81, 2001.
- [55] M. A. R. C. Daemen, B. de Vries, and W. A. Buurman, "Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury.," *Transplantation*, vol. 73, no. 11, pp. 1693–700, Jun. 2002.
- [56] B. de Vries, J. Kohl, W. K. G. Leclercq, T. G. A. M. Wolfs, A. A. J. H. M. van Bijnen, P. Heeringa, W. A. Buurman, J. Köhl, W. K. G. Leclercq, T. G. A. M. Wolfs, A. A. J. H. M. van Bijnen, P. Heeringa, and W. A. Buurman, "Complement Factor C5a Mediates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Independent from Neutrophils," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 7, pp. 3883–3889, 2003.
- [57] T. R. Welch, "The complement system in renal diseases.," *Nephron*, vol. 88, no. 3, pp. 199–204, Jul. 2001.
- [58] S. Homer-Vanniasinkam, J. N. Crinnion, and M. J. Gough, "Post-ischaemic organ dysfunction: a review.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 14, no. 3, pp. 195–203, Sep. 1997.
- [59] T. Kishimoto, "IL-6: From its discovery to clinical applications," *Int. Immunol.*, vol. 22, no. 5, pp. 347–352, May 2010.

- [60] K. Fassbender, S. Rossol, T. Kammer, M. Daffertshofer, S. Wirth, M. Dollman, and M. Hennerici, "Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease," *J. Neurol. Sci.*, vol. 122, no. 2, pp. 135–139, 1994.
- [61] I. B. McInnes and G. Schett, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 429–42, Jun. 2007.
- [62] J. Damman, W. N. Nijboer, T. a Schuurs, H. G. Leuvenink, A. M. Morariu, S. G. Tullius, H. van Goor, R. J. Ploeg, and M. a Seelen, "Local renal complement C3 induction by donor brain death is associated with reduced renal allograft function after transplantation.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 26, no. 7, pp. 2345–2354, Jul. 2011.
- [63] V. Chesnokova and S. Melmed, "Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules.," *Endocrinology*, vol. 143, no. 5, pp. 1571–4, May 2002.
- [64] G. K. Sonkar, S. Singh, S. K. Sonkar, U. Singh, and R. G. Singh, "Evaluation of serum interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha levels, and their association with various non-immunological parameters in renal transplant recipients," *Singapore Med. J.*, vol. 54, no. 9, pp. 511–515, 2013.
- [65] S. A. Jones, J. Scheller, and S. Rose-John, "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 9, pp. 3375–83, Sep. 2011.
- [66] S. A. Jones, "Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 6, pp. 3463–3468, 2005.
- [67] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2012.
- [68] A. C. Rawstron, J. A. Fenton, J. Ashcroft, A. English, R. A. Jones, S. J. Richards, G. Pratt, R. Owen, F. E. Davies, J. A. Child, A. S. Jack, and G. Morgan, "The interleukin-6 receptor alpha-chain (CD126) is expressed by neoplastic but not normal plasma cells.," *Blood*, vol. 96, no. 12, pp. 3880–3886, Dec. 2000.
- [69] D. Kaminska, B. Tyran, O. Mazanowska, J. Rabczynski, P. Szyber, D. Patrzalek, P. Chudoba, W. G. Polak, and M. Klinger, "Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis.," *Transplantation*, vol. 84, no. 9, pp. 1118–24, 2007.

- [70] S. W. Reinhold, R. H. Straub, B. Krüger, B. Kaess, T. Bergler, C. Weingart, M. C. Banas, B. K. Krämer, and B. Banas, "Elevated urinary sVCAM-1, IL6, sIL6R and TNFR1 concentrations indicate acute kidney transplant rejection in the first 2 weeks after transplantation," *Cytokine*, vol. 57, no. 3, pp. 379–388, Mar. 2012.
- [71] T. Nakagiri, M. Inoue, E. Morii, M. Minami, N. Sawabata, T. Utsumi, Y. Kadota, K. Ideguchi, T. Tokunaga, and M. Okumura, "Local IL-17 production and a decrease in peripheral blood regulatory T cells in an animal model of bronchiolitis obliterans.," *Transplantation*, vol. 89, no. 11, pp. 1312–9, 2010.
- [72] T. Nakagiri, M. Inoue, M. Minami, Y. Shintani, and M. Okumura, "Immunology mini-review: The basics of T H17 and interleukin-6 in transplantation," in *Transplantation Proceedings*, 2012, vol. 44, no. 4, pp. 1035–1040.
- [73] J. A. Sullivan, A. B. Adams, and W. J. Burlingham, "The Emerging Role of TH17 Cells in Organ Transplantation.," *Transplantation*, vol. 00, no. 00, pp. 1–7, 2013.
- [74] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo, "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells," *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 235–238, 2006.
- [75] D. Reviron, B. Dussol, M. Andre, P. Brunet, P. Mercier, and Y. Berland, "TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients.," *Transplant. Proc.*, vol. 33, no. 1–2, pp. 350–1, 2001.
- [76] M. Jourdan, R. Bataille, J. Seguin, X. G. Zhang, P. A. Chaptal, and B. Klein, "Constitutive production of interleukin-6 and immunologic features in cardiac myxomas.," *Arthritis Rheum.*, vol. 33, no. 3, pp. 398–402, Mar. 1990.
- [77] T. Hirano, T. Matsuda, M. Turner, N. Miyasaka, G. Buchan, B. Tang, K. Sato, M. Shimizu, R. Maini, and M. Feldmann, "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1797–801, Nov. 1988.
- [78] K. Yoshizaki, T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, and T. Komori, "Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease.," *Blood*, vol. 74, no. 4, pp. 1360–7, Sep. 1989.
- [79] A. Maeshima, M. Nakasatomi, D. Henmi, S. Yamashita, Y. Kaneko, T. Kuroiwa, K. Hiromura, and Y. Nojima, "Efficacy of tocilizumab, a humanized neutralizing antibody against interleukin-6 receptor, in progressive renal injury associated with

- Castleman's disease.,” *CEN case reports*, vol. 1, no. 1, pp. 7–11, May 2012.
- [80] H. Komaba, T. Nakazawa, Y. Yamaguchi, S. Kumagai, and M. Fukagawa, “Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in various renal involvements associated with multicentric Castleman's disease: a report of three cases.,” *NDT Plus*, vol. 1, no. 6, pp. 423–426, Dec. 2008.
- [81] E. H. Choy, A. F. Kavanaugh, and S. A. Jones, “The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA.,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 9, no. 3, pp. 154–63, Mar. 2013.
- [82] A. Cañas-Ventura, E. Rodríguez, M. Andreu, and L. Márquez, “Tocilizumab in amyloidosis-associated kidney disease secondary to inflammatory bowel diseases.,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 58, no. 9, pp. 2736–7, Sep. 2013.
- [83] G. Wu, N. Chai, I. Kim, A. S. Klein, and S. C. Jordan, “Monoclonal anti-interleukin-6 receptor antibody attenuates donor-specific antibody responses in a mouse model of allosensitization.,” *Transpl. Immunol.*, vol. 28, no. 2–3, pp. 138–43, Mar. 2013.
- [84] G. G. Illei, Y. Shirota, C. H. Yarboro, J. Daruwalla, E. Tackey, K. Takada, T. Fleisher, J. E. Balow, and P. E. Lipsky, “Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study.,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 2, pp. 542–52, Feb. 2010.
- [85] H. Ito, “Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody.,” *J. Gastroenterol.*, vol. 40 Suppl 1, pp. 32–4, Mar. 2005.
- [86] M. H. Van Oers, A. A. Van der Heyden, and L. A. Aarden, “Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 71, no. 2, pp. 314–9, Feb. 1988.
- [87] W. Zhang, W. Wang, H. Yu, Y. Zhang, Y. Dai, C. Ning, L. Tao, H. Sun, R. E. Kellems, M. R. Blackburn, and Y. Xia, “Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage,” *Hypertension*, vol. 59, no. 1, pp. 136–144, 2012.
- [88] K. Budde, J. Waiser, and H. H. Neumayer, “The diagnostic value of GM-CSF and IL-6 determinations in patients after renal transplantation.,” *Transpl. Int.*, vol. 7 Suppl 1, pp. S97-101, 1994.
- [89] K. Kotsch, F. Ulrich, A. Reutzel-Selke, A. Pascher, W. Faber, P. Warnick, S. Hoffman, M. Francuski, C. Kunert, O. Kuecuk, G. Schumacher, C. Wesslau, A.

- Lun, S. Kohler, S. Weiss, S. G. Tullius, P. Neuhaus, and J. Pratschke, "Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial.," *Ann. Surg.*, vol. 248, no. 6, pp. 1042–50, Dec. 2008.
- [90] M. L. Marco, "The Fischer-Lewis model of chronic allograft rejection--a summary.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 21, no. 11, pp. 3082–6, Nov. 2006.
- [91] F. Beiglböck, "Dissertation-2\_07.10\_F\_Dig.pdf," Berlin, 2016.
- [92] B. Shrestha and J. Haylor, "Experimental rat models of chronic allograft nephropathy: a review.," *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.*, vol. 7, pp. 315–22, 2014.
- [93] E. White, W. H. Hildemann, and Y. Mullen, "Chronic kidney allograft reactions in rats.," *Transplantation*, vol. 8, no. 5, pp. 602–17, Nov. 1969.
- [94] N. L. Tilney, W. D. Whitley, J. R. Diamond, J. W. Kupiec-Weglinski, and D. H. Adams, "Chronic rejection--an undefined conundrum.," *Transplantation*, vol. 52, no. 3, pp. 389–98, Sep. 1991.
- [95] J. Pratschke, M. J. Wilhelm, M. Kusaka, I. Laskowski, and N. L. Tilney, "A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats.," *Transplantation*, vol. 69, no. 3, pp. 427–30, Feb. 2000.
- [96] J. A. van der Hoeven, R. J. Ploeg, F. Postema, I. Molema, P. de Vos, A. R. Girbes, P. T. van Suylichem, R. van Schilfgaarde, and G. J. Ter Horst, "Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors.," *Transplantation*, vol. 68, no. 12, pp. 1884–90, 1999.
- [97] D. D. Koo, K. I. Welsh, A. J. McLaren, J. A. Roake, P. J. Morris, and S. V Fuggle, "Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation.," *Kidney Int.*, vol. 56, no. 4, pp. 1551–9, Oct. 1999.
- [98] M. H. Ghadiani, S. Peyrovi, S. N. Mousavinasab, and M. Jalalzadeh, "Delayed graft function, allograft and patient survival in kidney transplantation.," *Arab J. Nephrol. Transplant.*, vol. 5, no. 1, pp. 19–24, Jan. 2012.
- [99] D. Linfert, T. Chowdhry, and H. Rabb, "Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury.," *Transplant. Rev. (Orlando)*, vol. 23, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2009.
- [100] F. Casiraghi, P. Ruggenenti, M. Noris, G. Locatelli, N. Perico, A. Perna, and G. Remuzzi, "Sequential monitoring of urine-soluble interleukin 2 receptor and interleukin 6 predicts acute rejection of human renal allografts before clinical or

- laboratory signs of renal dysfunction.,” *Transplantation*, vol. 63, no. 10, pp. 1508–14, May 1997.
- [101] O. Kwon, B. A. Molitoris, M. Pescovitz, and K. J. Kelly, “Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 41, no. 5, pp. 1074–1087, 2003.
- [102] P. Chomarat, J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka, “IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages.,” *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 6, pp. 510–4, Dec. 2000.
- [103] N. M. Rogers, D. a Ferenbach, J. S. Isenberg, A. W. Thomson, and J. Hughes, “Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil.,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 10, no. 11, pp. 625–43, 2014.
- [104] J. G. Penfield, I. A. Dawidson, A. Ar’Rajab, M. A. Kielar, D. R. Jeyarajah, and C. Y. Lu, “Syngeneic renal transplantation increases the number of renal dendritic cells in the rat.,” *Transpl. Immunol.*, vol. 7, no. 4, pp. 197–200, Dec. 1999.
- [105] N. Vila, J. Castillo, a Dávalos, and a Chamorro, “Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke.,” *Stroke.*, vol. 31, no. 10, pp. 2325–2329, 2000.
- [106] Y. Horii, A. Muraguchi, M. Iwano, T. Matsuda, T. Hirayama, H. Yamada, Y. Fujii, K. Dohi, H. Ishikawa, and Y. Ohmoto, “Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis.,” *J. Immunol.*, vol. 143, no. 12, pp. 3949–55, 1989.
- [107] K. Lopau, J. Mark, L. Schramm, E. Heidbreder, and C. Wanner, “Hormonal changes in brain death and immune activation in the donor.,” *Transpl. Int.*, vol. 13 [Suppl, pp. S282-5, 2000.
- [108] J. Pratschke, G. Kofla, M. J. Wilhelm, A. Vergopoulos, I. Laskowski, G. D. Shaw, S. G. Tullius, H. D. Volk, P. Neuhaus, and N. L. Tilney, “Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor.,” *Ann. Surg.*, vol. 234, no. 6, pp. 732–40, 2001.
- [109] S. Weiss, K. Kotsch, M. Francuski, A. Reutzel-Selke, L. Mantouvalou, R. Klemz, O. Kuecuk, S. Jonas, C. Wesslau, F. Ulrich, A. Pascher, H. D. Volk, S. G. Tullius, P. Neuhaus, and J. Pratschke, “Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation,” *Am. J. Transplant.*, vol. 7, no. 6, pp. 1584–1593, Jun. 2007.
- [110] J. Lacha, P. Hribova, K. Kotsch, I. Brabcova, K. Bartosova, H.-D. Volk, and S.

- Vitko, "Effect of cytokines and chemokines (TGF-beta, TNF-alpha, IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES) gene polymorphisms in kidney recipients on posttransplantation outcome: influence of donor-recipient match.," *Transplant. Proc.*, vol. 37, no. 2, pp. 764–6, Mar. 2005.
- [111] M. Takada, K. C. Nadeau, W. W. Hancock, H. S. Mackenzie, G. D. Shaw, A. M. Waaga, A. Chandraker, M. H. Sayegh, and N. L. Tilney, "Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat.," *Transplantation*, vol. 65, no. 12, pp. 1533–42, 1998.
- [112] M. Mengel, J. Chang, D. Kayser, W. Gwinner, A. Schwarz, G. Einecke, V. Broecker, K. Famulski, D. G. De Freitas, L. Guembes-Hidalgo, B. Sis, H. Haller, and P. F. Halloran, "The molecular phenotype of 6-week protocol biopsies from human renal allografts: Reflections of prior injury but not future course," *Am. J. Transplant.*, vol. 11, no. 4, pp. 708–718, 2011.
- [113] A. Shimizu, K. Yamada, D. Sachs, and R. Colvin, "Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine," *Lab. Investig.*, vol. 82, no. 6, pp. 673–86, 2002.
- [114] J. Pratschke, M. J. Wilhelm, M. Kusaka, F. Beato, E. L. Milford, W. W. Hancock, and N. L. Tilney, "Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors.," *Ann. Surg.*, vol. 232, no. 2, pp. 263–71, 2000.
- [115] Y. Chen, V. C. H. Lui, N. V. Rooijen, and P. K. H. Tam, "Depletion of intestinal resident macrophages prevents ischaemia reperfusion injury in gut.," *Gut*, vol. 53, no. 12, pp. 1772–80, Dec. 2004.
- [116] U. A. Gerlach, G. Atanasov, L. Wallenta, D. Polenz, A. Reutzel-Selke, M. Kloepfel, A. Jurisch, M. Marksteiner, C. Loddenkemper, P. Neuhaus, B. Sawitzki, and A. Pascher, "Short-term TNF-alpha inhibition reduces short-term and long-term inflammatory changes post-ischemia/reperfusion in rat intestinal transplantation," *Transplantation*, vol. 97, no. 7, pp. 732–739, 2014.
- [117] J. R. Diamond, N. L. Tilney, J. Frye, G. Ding, J. McElroy, I. Pesek-Diamond, and H. Yang, "Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection.," *Transplantation*, vol. 54, no. 4, pp. 710–6, Oct. 1992.
- [118] I. Comerford, Y. Harata-Lee, M. D. Bunting, C. Gregor, E. E. Kara, and S. R. McColl, "A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system," *Cytokine*



- Growth Factor Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 269–283, 2013.
- [119] V. Lazarevic, L. H. Glimcher, and G. M. Lord, “T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 11, pp. 777–89, 2013.
- [120] T. E. Schlub, V. P. Badovinac, J. T. Sabel, J. T. Harty, and M. P. Davenport, “Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo.,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 88, no. 2, pp. 157–64, Feb. 2010.
- [121] E. Stabile, T. Kinnaird, A. Ia Sala, S. K. Hanson, C. Watkins, U. Campia, M. Shou, S. Zbinden, S. Fuchs, H. Kornfeld, S. E. Epstein, and M. S. Burnett, “CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16.,” *Circulation*, vol. 113, no. 1, pp. 118–24, Jan. 2006.
- [122] X. Zhang, A. Georgy, and L. Rowell, “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, following single-dose administration by subcutaneous and intravenous routes to healthy subjects.,” *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 51, no. 6, pp. 443–55, Jun. 2013.

## **8. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Mariya Petrova Stührk, geb. Velikova, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vorbehandlung hirntoter Spenderratten mit anti-IL-6R monoklonalem Antikörper bei allogener Nierentransplantation schwächt die frühe inflammatorische Immunantwort ab“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Mariya Petrova Stührk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: A. Reutzel-Selke, F. Beiglboeck, M. Velikova, M. Marksteiner, D. Polenz, S. Lippert, P. Neuhaus, K. Kotsch, J. Pratschke. Treatment of brain dead donors with anti-IL-6R monoclonal antibody attenuates the early and late inflammatory immune response, TTS 2010

Beitrag im Einzelnen: „Alle Ergebnisse der FACS- und der ELISA-Analysen stammen aus meiner statistischen Auswertung. Die Auswertung der renalen Funktion sowie der histologischen Präparate wurde teilweise von mir und teilweise von Fabian Beiglböck durchgeführt.“

Publikation 2: A. Reutzel-Selke, F. Beiglboeck, M. Velikova, M. Marksteiner, D. Polenz, P. Neuhaus, K. Kotsch, J. Pratschke. (2012). Treatment of Brain Dead Donors with Anti-IL-6R mAb Attenuates the Inflammatory Immune Response. Transplantation Journal. 94. 455. 10.1097/00007890-201211271-00865.

Beitrag im Einzelnen: „Alle Ergebnisse der FACS- und der ELISA-Analysen stammen aus meiner statistischen Auswertung. Die Auswertung der renalen Funktion sowie der histologischen Präparate wurde teilweise von mir und teilweise von Fabian Beiglböck durchgeführt.“

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers  
(Prof. Dr. J. Pratschke)

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 9. Lebenslauf

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

## 10. Publikationsliste

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

A. Reutzel-Selke, F. Beiglboeck, **M. Velikova**, M. Marksteiner, D. Polenz, P. Neuhaus, K. Kotsch, J. Pratschke. (2012). Treatment of Brain Dead Donors with Anti-IL-6R mAb Attenuates the Inflammatory Immune Response. Transplantation Journal. 94. 455. 10.1097/00007890-201211271-00865.

## 11. Danksagung

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

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

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei den Herren Dipl. Ing. Dietrich Polenz und Steffen Lippert, Frau Marion Marksteiner für die Hilfe bei der Ausführung der Experimente und der mikrochirurgischen Operationen. Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup und den Mitarbeitern der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité sowie Herrn Prof. Dr. R. Tauber und den Mitarbeitern des Zentrallabors CVK danke ich für die Unterstützung bei der Versuchstierbetreuung und für die gute Zusammenarbeit.

Einen sehr großen Dank möchte ich meiner großen Familie nämlich meinem Ehemann Dr. med. Julian Stührk, meiner Schwester Ina Mohr, meinen Eltern Dr. Tanya Velikova und Dr. Petar Velikov aussprechen, durch deren Mithilfe und emotionale Unterstützung im Studium sowie auch während der langjährigen Zeit als Ärztin, ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Diese Arbeit ist meinen Kindern, meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Ehemann gewidmet.