

Erratum zur Dissertation „Immunantwort nach Steroidvorbehandlung hirntoter Organspender bei Nierentransplantationen“ von Johannes Schuller

Vorbemerkung

Aufgrund eines initial der falschen Gruppe zugeordneten Patienten wurden vor Einreichung der Dissertation alle bereits durchgeführte Rohdatenauswertungen und statistische Tests nochmals neu durchgeführt. *Im Ergebnisteil der Arbeit wurden nach Neuberechnung die Gruppengrößen sowie alle p-Werte korrekt angegeben.* Es wurde jedoch versäumt im Abstrakt, Methodenteil und im Diskussionsteil alle angegebenen Daten zu korrigieren; auf den entsprechenden Seiten 6, 7 und 26 wurden daher die Gruppengrößen falsch angegeben. Die korrekten Gruppengrößen finden sich auf S. 38/39 im Ergebnisteil. Der betreffende Patient war in der Gruppe der Eurotransplant Senior Program (ESP)-Patienten. Die Gruppe der ETKAS-Patienten, auf die sich die Hauptaussage der Arbeit bezieht, ist somit nicht von den Fehlern betroffen. Beim statistischen Vergleich aller Patienten (unabhängig von der Altersklasse) bezüglich akuter Rejektionen wurde der nicht signifikante p-Wert im Ergebnisteil auf S. 64 korrekt angegeben, im Diskussionsteil auf S.76 wurde der vor Korrektur noch signifikante p-Wert fälschlicherweise belassen.

Dieser Fehler hat keinen Einfluss auf die Grundaussage der Dissertation. Abgesehen davon, dass die korrekten Daten im Ergebnisteil zu finden sind, will ich dies zusätzlich im Folgenden begründen:

1. In der Dissertation wurde die Nullhypothese „Steroidvorbehandlungen haben keinen Einfluss auf die Immunantwort“ durch die experimentelle Methode des ELISPOT widerlegt. Die Betrachtung der akuten Rejektionen war in der vorliegenden Arbeit nicht die Methode zur Widerlegung der Nullhypothese (siehe S.23/24: Kapitel 1.6 Fragestellung und Methodenwahl).

2. Zudem wurde herausgearbeitet, dass die Widerlegung der Nullhypothese nur bei den Patienten des Eurotransplant Kidney Allokations Systems (ETKAS) gezeigt werden konnte (siehe z.B. S. 7, S. 77) und aufgrund der unterschiedlichen Voraussetzungen ETKAS- und Eurotransplant Senior Program (ESP)-Patienten getrennt voneinander beobachtet werden mussten (siehe S. 68 Z. 17f.). Bei den Patienten >65 Jahren des ESP konnte die Nullhypothese nicht widerlegt werden. Demzufolge wurden signifikante Ergebnisse bei Betrachtung aller Patienten unabhängig von der Altersgruppe in der Arbeit relativiert, da sie nur durch den höheren Anteil der ETKAS-Patienten am Gesamtpatientenpool zu begründen waren. Der fehlerhafte p-Wert wurde im Diskussionsteil zwar erwähnt, jedoch wurde hiermit nicht behauptet, dass somit eine Beeinflussung der Immunantwort durch die Spendervorbehandlung unabhängig von der Altersgruppe der Patienten nachgewiesen worden sei.

Fehlerangabe:

S. 6 unter „Methoden“ Z. 1-2: Statt n=27 muss es n=28 heißen. Statt n=30 muss es n=29 heißen.

S. 7 unter „Methods“ Z. 2-3: Statt n=27 muss es n=28 heißen. Statt n=30 muss es n=29 heißen.

S. 26 Tabelle 2.2: Gruppe 1: Statt n=30 muss es n=29 heißen. Gruppe 2: statt n=27 muss es n=28 heißen. Gruppe 5: Statt n=6 muss es n=5 heißen. Gruppe 6: Statt n=10 muss es n=11 heißen.

S. 74 Z. 17 und Z.20: Statt p=0,757 muss es p=0,818 heißen. Statt p=0,663 muss es p=0,700 heißen.

S. 76 unter „4.4 Akute Rejektionen“ Z. 7: Statt p=0,0475 muss es p=0,0792 heißen.

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

DISSERTATION

Immunantwort nach Steroidvorbehandlung hirntoter
Organspender bei Nierentransplantationen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Schuller

aus Konstanz

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	6
1. Einleitung	9
1.1 Nierentransplantation	9
1.1.1 Überblick.....	9
1.1.2 Organallokation bei hirntoten Nierenspendern	10
1.1.3 Perioperatives Management, Operation und Nachsorge.....	11
1.2 Grundlagen der Transplantationsimmunologie	11
1.2.1 Alloreaktivität und Abstoßungsreaktionen	11
1.2.1.1 Antigenpräsentierende Zellen	12
1.2.1.2 T-Helferzellen.....	12
1.2.1.3 Zytotoxische T-Lymphozyten	13
1.2.1.4 B-Lymphozyten	13
1.2.1.5 Natürliche Killer-Zellen.....	14
1.2.2 Grundlagen der Immunsuppression nach Organtransplantation	14
1.3 Hirntod des Organspenders als Risikofaktor für das Transplantatoutcome	15
1.3.1 Definition und Diagnose des Hirntods	16
1.3.2 Immunologische Aktivierung von Spenderorganen nach Hirntod	16
1.3.3 Pathophysiologische Prozesse und systemische Inflammation in Zusammenhang mit dem Hirntod	17
1.4 Ansätze zur Vorbehandlung hirntoter Organspender	18
1.4.1 Spendervorbehandlung mit Steroiden	18
1.4.2 Spendervorbehandlung mit Immunsuppressiva und Hormonen.....	19
1.5 Marginale Spenderorgane und „age-matching“.....	19
1.5.1 Marginale Spenderorgane	19
1.5.2 Einfluss des Empfänger- und Spenderalters	20
1.5.3 Konzept des „age-matching“.....	22
1.5.4 Eurotransplant Senior Program (ESP).....	22
1.6 Fragestellung und Methodenwahl	23

2. Material und Methoden	25
2.1 Studiendesign	25
2.2 Patientenkollektiv und Steroidvorbehandlung	25
2.3 IFN- γ ELISPOT assay	26
2.3.1 Isolierung der T-Lymphozyten aus Empfängerblut	27
2.3.1.1 Auftrennung nach Dichtegradienten (PBMC-Präparation)	27
2.3.1.2 Negative T-Lymphozyten-Isolation.....	27
2.3.2 Präparation der peripheren Blutmonozyten (PBMC) aus der Spendermilz....	28
2.3.3 ELISPOT	28
2.3.3.1 Vorbereitung der PVDF-Platte	28
2.3.3.2 Einsetzen der Zellen	29
2.3.3.3 Färbung.....	29
2.3.4 Auswertung.....	30
2.4 Durchflusszytometrische Leukozytentypisierung	30
2.4.1 Prinzip des „Fluorescent Activated Cell Sorting“.....	30
2.4.2 Durchführung.....	31
2.4.3 Auswertung.....	32
2.5 Klinische Parameter	32
2.6 Statistische Analyse	33
2.7 Materialien und Geräte.....	33
3. Ergebnisse	38
3.1 Patienten.....	38
3.1.1 Präoperative Patientendaten	38
3.1.2 Immunsuppression	39
3.2 Spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität	40
3.2.1 Alle Patienten	40
3.2.2 ETKAS-Patienten	41
3.2.3 ESP-Patienten	42
3.3 Leukozyten-Typisierung.....	43

3.3.1 Einfluss der Spendervorbereitung.....	43
3.3.2 Alle Patienten	44
3.3.2.1 Dendritische Zellen	44
3.3.2.2 T-Helferzellen.....	45
3.3.2.3 Zytotoxische T-Lymphozyten	46
3.3.2.4 Regulatorische T-Lymphozyten	48
3.3.2.5 B-Lymphozyten	49
3.3.2.6 Natürliche Killerzellen.....	50
3.3.3 ETKAS-Patienten	51
3.3.3.1 Dendritische Zellen	51
3.3.3.2 T-Helferzellen.....	52
3.3.3.3 Zytotoxische T-Lymphozyten	53
3.3.3.4 Regulatorische T-Lymphozyten	54
3.3.3.5 B-Lymphozyten	55
3.3.3.6 Natürliche Killerzellen.....	56
3.3.4 ESP-Patienten	57
3.3.4.1 Dendritische Zellen	57
3.3.4.2 T-Helferzellen.....	58
3.3.4.3 Zytotoxische T-Lymphozyten	59
3.3.4.4 Regulatorische T-Lymphozyten	60
3.3.4.5 B-Lymphozyten	61
3.3.4.6 Natürliche Killerzellen.....	62
3.4 Akute Rejektionen	63
3.4.1 Alle Patienten	63
3.4.2 ETKAS-Patienten	64
3.4.3 ESP-Patienten	65
4. Diskussion	66
4.1 Patienten.....	66
4.2 Spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität	67
4.3 Leukozytentypisierung	73
4.4 Akute Rejektionen	76

4.5 Schlussfolgerung.....	77
5. Literaturverzeichnis	79
Anhang	89
Abkürzungsverzeichnis	89
Eidesstattliche Versicherung.....	91
Curriculum vitae	92
Danksagung.....	93

Abstrakt

Fragestellung

Der Hirntod ist ein eigenständiger Risikofaktor für das Outcome bei Nierentransplantationen. Die mit dem Hirntod verbundenen pathophysiologischen Prozesse führen zu einem verstärkten Ischämie-/Reperfusionsschaden nach der Organtransplantation, einer schlechteren initialer Transplantatfunktion sowie zu vermehrten akuten Abstoßungsreaktionen. In experimentellen und klinischen Studien konnte ein positiver Einfluss von Steroidvorbehandlungen der Spender auf das Transplantatoutcome beobachtet werden. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss einer Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit Methylprednisolon auf die spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität und die frühe zelluläre Immunantwort des Organempfängers zu überprüfen.

Methoden

Nierenempfänger erhielten randomisiert Nieren von vorbehandelten (n=27) oder nicht vorbehandelten (n=30) hirntoten Nierenspendern. Sowohl ETKAS- (Eurotransplant Kidney Allocation System, Empfänger und Spender <65 Jahre) als auch ESP-Patienten (Eurotransplant Senior Program, Empfänger und Spender >65 Jahre) wurden in die Studie eingeschlossen. Die Vorbehandlung bestand aus einem 500 mg Methylprednisolon-Bolus i.v. 12 Stunden vor Organentnahme und anschließender Infusion von 100 mg Methylprednisolon pro Stunde i.v. bis zur Explantation. Mit dem IFN- γ -ELISPOT-Assay wurde die spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität der Empfänger pro $2,5 \times 10^6$ T-Lymphozyten in vitro bestimmt. Die Anzahl akuter Rejektionen wurde miteinander verglichen. Eine Charakterisierung der zellulären Immunantwort erfolgte mittels FACS-Analyse von T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen. ELISPOT und FACS-Analyse wurden sowohl präoperativ als auch am 7. postoperativen Tag durchgeführt.

Ergebnisse

Bei der Betrachtung aller Patienten unabhängig vom Allokationsprogramm war die T-Zell-Alloreaktivität präoperativ nicht unterschiedlich. An Tag 7 war die T-Zell-Alloreaktivität nach Spendervorbehandlung statistisch signifikant reduziert (p=0,0110). Die T-Zell-Alloreaktivität der ETKAS-Patienten war sowohl an Tag 0 (p=0,0021) als auch an Tag 7 (p=0,0049) statistisch signifikant reduziert. In der Gruppe der ESP-Patienten war die

Alloreaktivität nach Spendervorbehandlung an Tag 0 ausgeprägter als in der Kontrollgruppe, ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,0539$). An Tag 7 gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen.

Die Zahl akuter Rejektionen war in der Gruppe der ETKAS-Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression nach Spendervorbehandlung signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,0461$). Bei Patienten des ESP konnte keine Reduktion der Abstoßungsrate nach Spendervorbehandlung festgestellt werden.

Die Leukozytotypisierung zeigte einen vergleichbaren Status der einzelnen Patientengruppen in Bezug auf die relative Leukozytenzusammensetzung sowohl prä- als auch postoperativ.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse sprechen für eine Abschwächung der initialen Immunantwort nach Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon für ETKAS-Patienten. Eine Wirkung der Behandlung bei Patienten des ESP konnte nicht gezeigt werden. Eine zuverlässige Aussage in Bezug auf die Patienten des ESP ist jedoch aufgrund niedriger Fallzahlen nicht möglich.

Abstract

Background

Brain death is an independent risk factor in the outcome of renal transplantations. The pathophysiological processes related to brain death cause increased ischemia/reperfusion injury after organ transplantation, increased initial graft dysfunction and more frequent acute rejections. Experimental and clinical studies have shown a positive effect of pre-operative steroid donor treatment regarding the graft outcome. The goal of this study was to examine the effect of methylprednisolone treatment of brain-dead kidney donors on the donor-specific T-cell alloreactivity and the early cellular immune response of the recipient.

Methods

Recipients of renal transplants received kidneys of brain-dead kidney donors who were treated with methylprednisolone ($n=27$) were compared with recipients of untreated donor kidneys ($n=30$) within a randomized study. Both ETKAS- (Eurotransplant Kidney Allocation System, recipient and donor <65 years) and ESP-patients (Eurotransplant

Senior Program, recipient and donor >65 years) were included in the study. The pre-treatment consisted of an intravenous application of 500 mg methylprednisolone as a bolus 12 hours before organ explantation and successive intravenous application of 100 mg per hour until explantation. The donor-specific T-cell alloreactivity of recipients per $2,5 \times 10^6$ T-lymphocytes was determined in vitro using the IFN- γ -ELISPOT-assay. The number of acute rejections was compared. A characterisation of the cellular immune response was done using FACS-analysis of T-cells, B-cells, natural killer cells and dendritic cells. ELISPOT and FACS-analysis were performed before transplantation (day 0) and on post-operative day 7.

Results

When comparing all patients disregarding the allocation program T-cell alloreactivity was not different before organ transplantation. On day 7 T-cell alloreactivity after pre-treatment of the donors was significantly reduced ($p=0,0110$). T-cell alloreactivity of the ETKAS-patients was significantly reduced on day 0 ($p=0,0021$) and on day 7 ($p=0,0049$). On day 0 alloreactivity in ESP-patients after donor pre-treatment was higher compared to controls, without being statistically significant ($p=0,0539$). On day 7 there was no difference between the compared groups. The frequency of acute rejections was significantly reduced after donor pre-treatment in ETKAS-patients with similar post-operative immunosuppressive treatment ($p=0,0461$), whereas there was no difference in ESP-patients. Leukocyte characterisation showed similar relative leukocyte patterns in all patient groups on day 0 and day 7.

Conclusion

The results indicate an attenuation of the initial immune response after donor pre-treatment with methylprednisolone in ETKAS-patients. An effect in ESP-patients could not be shown in this study. However, a valid conclusion regarding the ESP-patients is not possible because of a low number of cases.

1. Einleitung

1.1 Nierentransplantation

1.1.1 Überblick

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation beim Menschen wurde 1954 zwischen eineiigen Zwillingen im Peter Bent Brigham Hospital in Boston unter der Leitung von John Merrill, Joseph Murray und Hartwell Harrison durchgeführt (1). Die rapide Entwicklung der Immunsuppressionstherapie in den darauffolgenden Jahrzehnten etablierte die Nierentransplantation als wichtige Therapieoption. Heute ist die Nierentransplantation Therapie der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz. Sie ist die am häufigsten durchgeführte Organtransplantation vor der Lebertransplantation. Im Einzugsgebiet der Eurotransplant International Foundation (ungefähr 124 Mio. Einwohner) wurden im Jahr 2012 4852 Nieren transplantiert (davon 1380 Lebendspenden) (2).

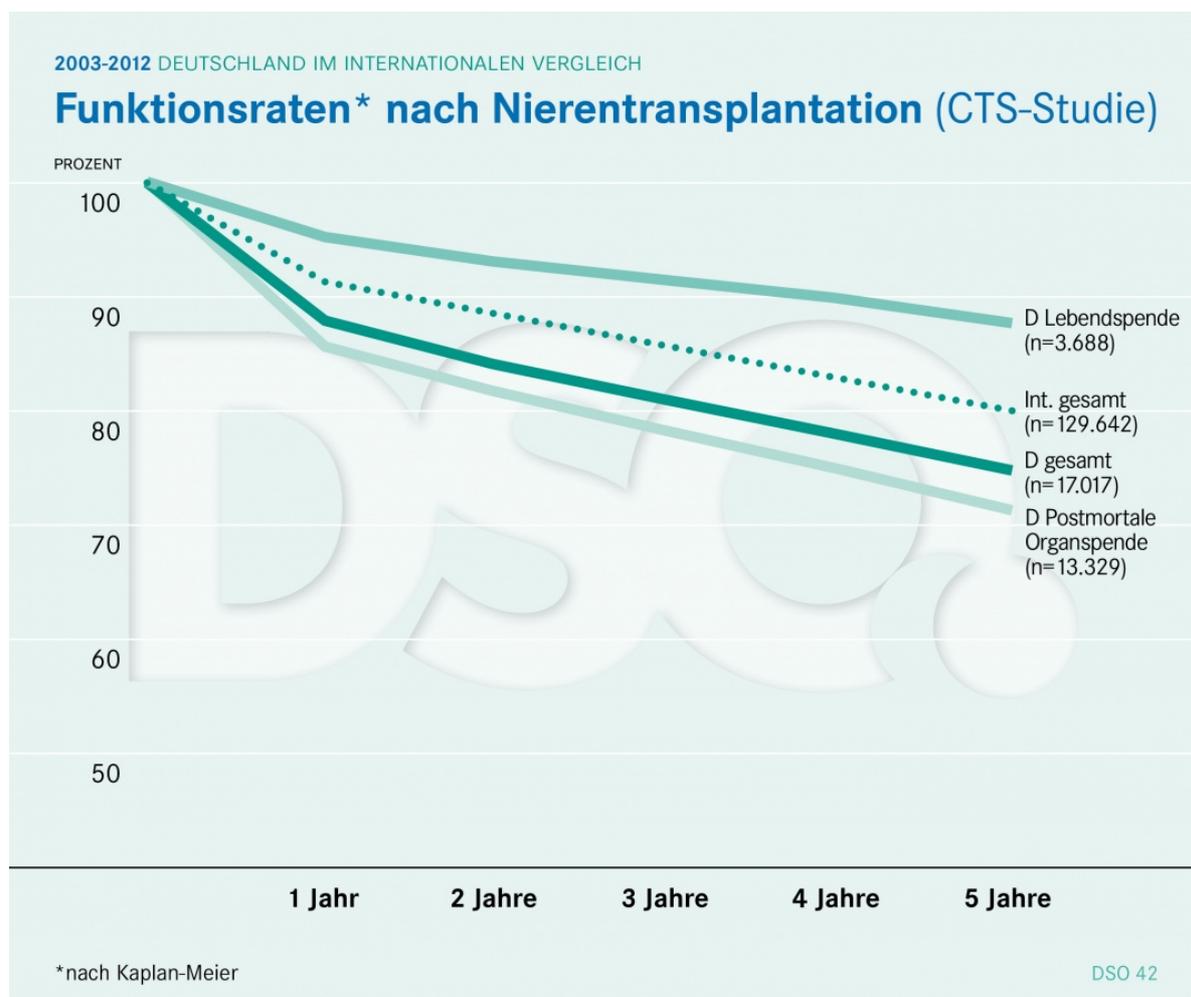


Abbildung 1.1: Funktionsraten nach Nierentransplantation. (Quelle: Deutsche Stiftung Organspende)

Die häufigsten Hauptdiagnosen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führen sind sekundäre Nierenerkrankungen bei Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, angeborene Nierenerkrankungen wie z.B. polyzystische Nieren, sowie chronische nephritische Syndrome. Kontraindikationen für die Nierentransplantation sind auf Seiten des Empfängers akute Nierenerkrankungen (z.B. Goodpasture-Syndrom), chronische, nicht sanierbare Infekte, akute gastrointestinale Erkrankungen, fortgeschrittene Zweiterkrankungen, wie nicht kurable Malignome, Non-Compliance des Patienten und fehlende Narkosefähigkeit. Vorerkrankungen auf Seiten des Spenders wie systemische Infektionserkrankungen, maligne Erkrankungen und Gefäßerkrankungen sind Kontraindikationen zur Organspende (3). Einen Überblick über die Funktionsraten der transplantierten Nieren gibt Abbildung 1.1.

1.1.2 Organallokation bei hirntoten Nierenspendern

Für die Mehrzahl der Nierentransplantationen werden Organe von hirntoten Spendern verwendet. In diesem Fall muss zunächst die Hirntoddiagnose gestellt werden (s. Kap. 1.3.1). Sobald eine Spenderniere eines hirntoten Spenders verfügbar ist, muss ein geeigneter Organempfänger gefunden werden. Dies ist im Raum Deutschland, Belgien, Kroatien, Luxemburg, in den Niederlanden, Österreich und Slowenien die Aufgabe der Eurotransplant International Foundation (EIF). Die EIF führt zudem Wartelisten von potentiellen Transplantatempfängern und entwickelt Zuweisungsalgorithmen, die regelmäßig aktualisiert werden (4). Die medizinische Dringlichkeit, die Wartezeit potentieller Empfänger, die geographische Distanz zwischen Spender und Empfänger, die Abwesenheit von Kontraindikationen sowie übereinstimmende Blutgruppen zwischen Spender und Empfänger sind allgemeine Kriterien, die für alle Organtransplantationen bedeutsam sind. Auch auf eine ausgeglichene Balance von Spendern und Empfängern zwischen den einzelnen Nationen wird geachtet. Bei Nierentransplantationen kommt ein spezieller Zuweisungsalgorithmus namens „Eurotransplant Kidney Allocation System“ (ETKAS) zur Anwendung. Er wird bei Spendern und Empfängern verwendet, die jünger als 65 Jahre alt sind. Dieses System berücksichtigt zusätzlich die Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger durch einen Vergleich der HLA-Genloci A, B und DR („HLA-Matching“). Diese drei Genorte sind von besonderer Bedeutung für eine mögliche T-Zell-vermittelte Immunreaktion des Empfängers nach der Transplantation (s. Kap. 1.2). Außerdem wird das Empfängerblut auf das Vorliegen präformierter Antikörper gegen humane Antigene untersucht. Dies wird mit dem Test auf „panel reactive allo-antibodies“

(PRA) festgestellt. Eine Prozentzahl gibt die Wahrscheinlichkeit für eine positive Kreuzprobe zwischen Empfängerserum und Spenderlymphozyten an. Ab einem Alter von 65 Jahren geschieht die Organzuweisung innerhalb des „Eurotransplant Senior Program“ (ESP) nach anderen Kriterien (s. Kap. 1.5.4) (3,5,6).

1.1.3 Perioperatives Management, Operation und Nachsorge

Nach Organentnahme werden die Nieren durch Perfusion gekühlt und müssen innerhalb eines Zeitraums von maximal 36 Stunden transplantiert werden. Diese Phase wird als „kalte Ischämiezeit“ („cold ischemia time“, CIT) bezeichnet. Eine möglichst kurze CIT wird angestrebt, da sie ein Risikofaktor für eine verzögerte Transplantatfunktion und das Langzeittransplantatüberleben ist (7). Für die Transplantation muss der Empfänger dialysiert und infektionsfrei sein. Die Niere wird heterotop retroperitoneal in die Darmbeingrube transplantiert. Die Nierengefäße werden mit der homolateralen Arteria und Vena iliaca anastomosiert, der Ureter wird in die Harnblase eingepflanzt (3). Nach der Operation – in manchen Situationen schon vor der Operation – wird der Transplantatempfänger immunsuppressiv behandelt, um eine Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus zu verhindern und gegebenenfalls zu behandeln (s. Kap. 1.2.2).

1.2 Grundlagen der Transplantationsimmunologie

1.2.1 Alloreaktivität und Abstoßungsreaktionen

Die wichtigste Komplikation der Nierentransplantation ist die Abstoßung des Organs, welche durch eine gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort des Empfängerorganismus ausgelöst wird. Die einzige Ausnahme stellt die Organtransplantation zwischen eineiigen Zwillingen dar. Das Erkennen von fremden Antigenen der Klasse MHC-I und MHC-II ist der wichtigste Auslöser dieser „alloreaktiven“, also gegen fremde Antigene gerichteten Immunantwort. Für die Transplantationsimmunologie sind die MHC-Klasse-I-Antigene HLA-A und HLA-B sowie das MHC-Klasse-II-Antigen HLA-DR am bedeutsamsten. Werden fremde Allele dieser Antigene durch das Immunsystem des Empfängers erkannt, werden zelluläre und humorale Elemente des Immunsystems aktiviert. Daraus resultiert eine Abstoßungsreaktion. Je nach zeitlichem Verlauf unterscheidet man hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen sowie die chronische Transplantatnephropathie („chronic allograft nephropathy“, CAN) (3).

Die hyperakute Form ist durch präformierte, gegen Spenderantigene gerichtete Antikörper im Empfängerorganismus bedingt. Diese Form der Abstoßung ist heutzutage aufgrund der sorgfältigen Auswahl geeigneter Spenderorgane extrem selten. Für die akute Abstoßungsreaktion ist vor allem die T-Zell-vermittelte alloreaktive Immunantwort verantwortlich (8,9). Eine akute Rejektion ist dem Fortschritt moderner Immunsuppression zum Trotz weiterhin eine ernste Komplikation, auch weil akute Rejektionen ein Risiko für die CAN sind und so auch das Langzeittransplantatoutcome verschlechtern (10–13). Für die CAN sind neben alloreaktiven Mechanismen zusätzlich Spätfolgen eines Ischämie-Reperfusionsschadens sowie zytotoxische Nebenwirkungen der Immunsuppressiva ursächlich (3). Die CAN ist der limitierende Faktor in Hinblick auf das Langzeittransplantatüberleben (14). Eine Verhinderung von akuten Abstoßungsreaktionen ist gerade vor diesem Hintergrund ein wichtiges Ziel im Bereich der Transplantationsforschung. Im folgenden wird auf die an den Abstoßungsreaktionen beteiligten Zellpopulationen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, genauer eingegangen.

1.2.1.1 Antigenpräsentierende Zellen

Der erste Schritt der spezifischen zellulären Immunantwort auf das Transplantat ist die Antigenpräsentation. Diese geschieht durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) und führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten. Die reifen dendritischen Zellen des peripheren Lymphgewebes spielen unter den APZ die wichtigste Rolle bei der T-Zell-Aktivierung. Die Aktivierung der T-Zellen durch APZ erfolgt nach der Organtransplantation über zwei verschiedene Wege. Die direkte Aktivierung beruht auf der Präsentation von Antigenen der Klasse MHC-I durch APZ des Spenders, die aus dem Transplantat in die Lymphknoten des Empfängerorganismus migrieren. Auf diesem Wege werden größtenteils CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert. Die indirekte Aktivierung erfolgt nach der Präsentation von Bestandteilen fremder MHC-II-Moleküle durch APZ des Empfängerorganismus. Hier sind die Effektorzellen vor allem CD4-positive T-Lymphozyten. Aktivierte dendritische Zellen exprimieren die Oberflächenantigene CD11c und CD86 (15).

1.2.1.2 T-Helferzellen

T-Helferzellen exprimieren charakteristischerweise die Oberflächenantigene CD3 und CD4. Man unterscheidet zwei Subpopulationen von aktivierten T-Helferzellen: Th1- und

Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren unter anderem die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ). IL-2 steigert die Proliferation von CD4- und CD8-positiven T-Zellen, durch IFN- γ wird die MHC-I- und MHC-II-Expression hochreguliert und die Aktivität von natürlichen Killerzellen gesteigert. Die Th2-Zellen produzieren unter anderem die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-10 und sind maßgeblich an der Aktivierung von B-Lymphozyten beteiligt. Sie stellen so eine Verbindung zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort her. Die Zytokine der Th1- und Th2-Zellen hemmen die Aktivierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subpopulation. Die alloreaktive Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation ist durch eine vorwiegend Th1-abhängige Immunantwort gekennzeichnet. Naive T-Helferzellen exprimieren das Adhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L), ein Adhäsionsmolekül, das für die Migration in sekundäre lymphatische Organe benötigt wird. Nach Antigenkontakt wandeln sich die T-Helferzellen zu zentralen Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen um, von denen die Effektor-Gedächtniszellen L-Selectin nicht mehr exprimieren (15,16).

1.2.1.3 Zytotoxische T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten exprimieren die Oberflächenantigene CD3 und CD8. Nach der Aktivierung attackieren die T-Lymphozyten spezifisch die fremden, das jeweilige Antigen tragenden Zellen des Transplantats. Die Freisetzung zytotoxischer Proteine (z.B. Perforin) führt zur Apoptose der Zielzelle. Außerdem produzieren zytotoxische T-Zellen die Zytokine IFN- γ , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). Aktivierte zytotoxische T-Zellen werden durchflusszytometrisch durch die zusätzliche Markierung des MHC-II-Antigens HLA-DR (neben CD3 und CD8) identifiziert (15).

1.2.1.4 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenantigen CD19. Aktivierte B-Lymphozyten transformieren zu Plasmazellen, welche anschließend antigenspezifische Antikörper produzieren. Die humorale Immunantwort spielt bei der Transplantatabstoßung im Vergleich zur zellvermittelten Immunantwort eine untergeordnete Rolle, allerdings können B-Lymphozyten die Immunantwort von Transplantationsempfängern langfristig durch Freisetzung von Zytokinen und in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen mitbeeinflussen (17,18). Aktivierte B-Zellen exprimieren das MHC-II-Antigen HLA-DR

und können dadurch durchflusszytometrisch von nicht aktivierten B-Zellen unterschieden werden (15).

1.2.1.5 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) exprimieren das Oberflächenantigen „Neural Cell Adhesion Molecule“ (NCAM, CD56). Sie sind ebenso an der Transplantatabstoßung beteiligt und benötigen als Zellen des angeborenen Immunsystems keine spezifische Aktivierung. Ähnlich wie zytotoxische T-Lymphozyten lysieren sie Zielzellen durch Freisetzung von Perforin. Sie produzieren IFN- γ und TNF- α . Aktivierte NK-Zellen exprimieren das Oberflächenantigen CD16 (15).

1.2.2 Grundlagen der Immunsuppression nach Organtransplantation

Außer nach Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen ist eine immunsuppressive Therapie immer notwendig, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern bzw. zu behandeln. Die Basisimmunsuppression (Erhaltungstherapie) setzt sich in der Regel aus einer Kombination eines Steroids, eines Calcineurin-Inhibitors und/oder eines weiteren proliferationshemmenden Medikamentes wie Mycophenolat-Mofetil (MMF) zusammen. Die sogenannte Induktionstherapie wird in der ersten postoperativen Woche angewendet, um in dieser kritischen Phase eine akute Abstoßungsreaktion zu verhindern. Hierfür werden in der Regel antilymphozytäre Antikörper verwendet. Die Therapie einer akuten Abstoßung geschieht mit hochdosierten Steroiden, bei ausbleibendem Erfolg mit antilymphozytären Medikamenten wie Antithymozytenglobulin (ATG) oder dem monoklonalen Antikörper Muromonab-CD3 (3). Im folgenden werden die Wirkmechanismen der wichtigsten Immunsuppressiva kurz erläutert.

Kortikosteroide wirken über intrazelluläre Rezeptoren und beeinflussen so die Expression einer Vielzahl von Genen. Dadurch erreichen sie eine systemische anti-inflammatorische Wirkung. Die Antimetabolite Azathioprin, Cyclophosphamid und Mycophenolat stören die DNS-Synthese und wirken unspezifisch proliferationshemmend. Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen durch eine Blockade des Enzyms Calcineurin die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und somit spezifisch die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten. Monoklonale Antikörper können zielgerichtet bestimmte Lymphozytenpopulationen angreifen. Man unterscheidet depletierende Antikörper, die zur Zerstörung der Zielzellen führen, von nicht depletierenden Antikörpern, die das Zielprotein der jeweiligen Zelle lediglich blockieren.

Der monoklonale Antikörper Muromonab-CD3 richtet sich gegen T-Lymphozyten. Basiliximab und Daclizumab sind monoklonale Antikörper, die gegen den IL-2-Rezeptor (Oberflächenantigen CD25) gerichtet sind, der u.a. auf aktivierten T- und B-Zellen, regulatorischen T-Zellen und ruhenden T-Gedächtniszellen exprimiert wird. Durch Blockade dieses Rezeptors wird die T-Zell-Proliferation gehemmt. Ein weiterer monoklonaler Antikörper ist Rituximab, das durch die Blockade des CD20-Oberflächenantigens unter anderem zu einer verminderten Expression des B-Zell-Rezeptors und zur Apoptose von B-Zellen führt. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen TNF- α richtet. Polyklonale Antikörper wie das Antithymozytenprotein (ATG) richten sich gegen verschiedene Lymphozyten-Oberflächenantigene. Inhibitoren des Proteins mTOR wie Sirolimus und Everolimus führen zu einer Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten. Belatacept ist ein Fusionsprotein, das durch Blockade des Oberflächenantigens CD152 die Aktivierung von T-Lymphozyten hemmt (3,15).

1.3 Hirntod des Organspenders als Risikofaktor für das Transplantatoutcome

Transplantierte Nieren von hirntoten Spendern haben ein höheres Risiko für eine Transplantatdysfunktion als solche von lebenden Spendern (19,20). Lange Zeit war die Annahme verbreitet, eine bessere Histokompatibilität, z.B. zwischen Verwandten, sei die Ursache für die besseren Ergebnisse nach Lebendspenden. Nachdem die Zahl der nicht mit dem Empfänger verwandten Lebendspender in den 90er Jahren in den USA zunahm, zeigten Terasaki et al., dass bei Lebendspenden selbst bei vergleichsweise schlechter Histokompatibilität ein sehr gutes Transplantatüberleben zu beobachten war. Dies wurde auf die gesunden Organe der Lebendspender zurückgeführt (19). In einer anschließenden Analyse wurde die Hypothese, dass die besseren Ergebnisse nicht allein auf ein besseres HLA-Match zurückzuführen waren, bestätigt (21). Demzufolge mussten die Ursachen für die schlechteren Ergebnisse in anderen Unterschieden zwischen den Transplantationen von Organen lebender und verstorbener Spender begründet sein. Neben einer in der Regel längeren kalten Ischämiezeit ist ein Hauptunterscheidungsmerkmal der Transplantation von Organen hirntoter Spender der Hirntod selbst. Der Hirntod und die mit ihm verbundenen pathophysiologischen Prozesse im Spenderorganismus waren anschließend ein Schwerpunkt experimenteller Forschung. Ein schlechteres Transplantatüberleben wurde für Nieren, Herz und Lunge beobachtet (22–24). Veränderungen auf kardiovaskulär-hämodynamischer, hormoneller,

morphologischer und zellulär-molekularer Ebene führen zu einer „immunologischen Aktivierung“ und somit zu einer erhöhten Immunogenität der somatischen Organe (s. Kap. 1.3.2 und 1.3.3). Dies führt zu einer Aktivierung der Immunantwort des Empfängers und zu beschleunigten Abstoßungsreaktionen (25). Diese durch den Hirntod bedingte unspezifische Vorschädigung der peripheren Organe ist im Sinne des Konzepts der „injury response“ ein wichtiger Ansatzpunkt für neue therapeutische Ansätze, auch um Langzeitfunktionsraten nach Nierentransplantationen zu verbessern (26,27) (siehe Kap. 1.4).

1.3.1 Definition und Diagnose des Hirntods

Unter Hirntod versteht man einen „Zustand der irreversibel erloschenen Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms“. Die Diagnose muss von zwei unabhängigen, erfahrenen Neurologen gestellt werden. Bei Vorliegen einer akuten primären oder sekundären Hirnschädigung müssen zunächst Ursachen für einen reversiblen Funktionsausfall wie Intoxikationen, Kreislaufschock oder primäre Unterkühlung ausgeschlossen werden. Der Verlust der Hirnfunktion muss durch die Feststellung verschiedener klinischer Zeichen festgestellt werden. Schließlich muss die Irreversibilität durch Beobachtung über einen definierten Untersuchungszeitraum oder durch apparative Diagnostik verifiziert werden (28).

1.3.2 Immunologische Aktivierung von Spenderorganen nach Hirntod

Organe hirntoter Spender weisen im Vergleich zu Organen von Lebendspendern eine Erhöhung verschiedener Entzündungsmarker, sowohl vor der Explantation als auch in einem größeren Maße nach der kalten Ischämiezeit auf. Nijboer et al. fanden bei Nieren hirntoter Spender vor Explantation im Vergleich zu Lebendspendern immunhistochemisch größere interstitielle Leukozyteninfiltrate sowie erhöhte Werte für das Adhäsionsmolekül E-Selektin. In der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde eine erhöhte Expression von Hämooxygenase-1 und Hitzeschockprotein-70 (Hsp70) gemessen (29). Diese Ergebnisse weisen auf eine inflammatorisch bedingte Schädigung noch vor der Explantation hin. Nach Explantation und nach der kalten Ischämiezeit wurde in den Nieren hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern immunhistochemisch eine vermehrte Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sowie von HLA-DR-Antigenen

gemessen (30). Eine hohe Expression von ICAM-1 und VCAM-1 scheint mit einem erhöhten Risiko für eine verzögerte Transplantatfunktion einherzugehen (31).

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-6, Interferon- γ oder TNF- α waren in Nieren hirntoter Spender erhöht (32). Nach Transplantation zeigen sowohl Lebern als auch Nieren hirntoter Spender zudem eine erhöhte Empfindlichkeit in Hinblick auf den Reperfusionsschaden (33,34). Die Dauer der kalten Ischämiezeit ist ein weiterer Einflussfaktor für das Ausmaß des Reperfusionsschadens. Diese immunologische Aktivierung der peripheren Organe korreliert mit schlechteren Transplantationsergebnissen (29,35,36). Ursächlich für die immunologische Aktivierung ist eine systemische Entzündungsreaktion des hirntoten Spenderorganismus, die sich aus dem Zusammenspiel verschiedener pathophysiologischer Prozesse in Zusammenhang mit dem Hirntod ergibt.

1.3.3 Pathophysiologische Prozesse und systemische Inflammation in Zusammenhang mit dem Hirntod

Äußere Ereignisse, die vor dem Hirntod stattfanden, wie z.B. Traumata, Operationen oder Blutungen können zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Spezifische Vorgänge, die durch den Hirntod selbst ausgelöst werden, tragen jedoch auch zu einer systemischen Entzündungsreaktion bei.

Der Hirntod hat Entgleisungen auf kardiovaskulär-hämodynamischer und hormonell-metabolischer Ebene zur Folge. Der sogenannte „autonome Sturm“ („autonomic storm“) ist Hauptauslöser der hämodynamischen Prozesse in Zusammenhang mit dem Hirntod (37,38). Der Begriff bezeichnet die schnelle und massive Freisetzung von Katecholaminen infolge einer Einklemmung des Hirnstamms bei erhöhtem intrakraniell Druck. Es kommt zu einer ausgeprägten peripheren Vasokonstriktion, welche eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Organe bewirkt (39). Eine anschließende Vasodilatation führt in Kombination mit einer potentiell gestörten Herzfunktion zu einem Kreislaufkollaps mit nicht ausreichendem Perfusionsdruck der Organe (40). 80% aller hirntoten Patienten entwickeln einen Diabetes insipidus infolge eines Vasopressin-Mangels. Folgen sind Polyurie und daraufhin Hypovolämie und Hypernatriämie (41). Außerdem setzt das ischämische Hirngewebe selbst proinflammatorische Zytokine frei (42,43).

1.4 Ansätze zur Vorbehandlung hirntoter Organspender

Die genannten pathophysiologischen Prozesse im Rahmen des Hirntods sind Ansatzpunkte für neue therapeutische Ideen. Dabei werden die jeweiligen Wirkstoffe dem Spender nach der Hirntoddiagnose verabreicht. Das Ziel ist, die aus den entzündlichen Prozessen resultierende immunologische Aktivierung der transplantierbaren Organe zu minimieren, um so die alloreaktive Immunantwort des Empfängers abzuschwächen. Analog zu den beschriebenen pathophysiologischen Prozessen kommen verschiedene Wirkstoffklassen als potentiell zielführend in Frage. In experimentellen und klinischen Studien wurden bereits Versuche mit Glukokortikoiden, Mycophenolat Mofetil, Tacrolimus, SDZ RAD, P-Selektin Ligand, Katecholaminen, Cortisol, Proteaseinhibitoren oder Hämoxygenase-1 u.a. durchgeführt (44–56).

1.4.1 Spendervorbehandlung mit Steroiden

Die entzündungshemmende Wirkung von Glukokortikoiden soll die systemische Inflammation nach dem Hirntod mildern. Frühe klinische Studien, in denen teilweise die Spendervorbehandlung mit einer Kombination aus Steroiden und Cyclophosphamid durchgeführt wurde, konnten keine Vorteile in Hinblick auf Transplantatfunktion und Langzeitüberleben nachweisen (44–46). In neueren experimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde allerdings eine positive Wirkung einer Spendervorbehandlung mit Steroiden beobachtet (47–49). Nach Vorbehandlung waren Arteriosklerose, Glomerulosklerose sowie Zellinfiltrate und MHC-II-Expression in Biopsien nach 6 Monaten signifikant reduziert. Auch die Transplantatfunktion nach 6 Monaten war nach Vorbehandlung mit Prednisolon verbessert (47,48). In einem Hirntodmodell waren morphologische Veränderungen und Zellinfiltrate nach Spendervorbehandlung mit Glukokortikoiden signifikant vermindert (49). In einer klinischen Studie nach Spendervorbehandlung mit Steroiden waren proinflammatorische Zytokine in Leberbiopsien noch vor Explantation signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (50). In einer weiteren experimentellen Studie wurde die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden erfolgreich genutzt, um durch den Hirntod bedingte kardiale Dysfunktionen abzuschwächen und so die Organqualität für Herztransplantationen potentiell zu erhöhen (51). Die Vorbehandlung hirntoter Spender mit Methylprednisolon vor Lebertransplantationen führte zu einer besseren Transplantatfunktion und einer niedrigeren Rate an akuten Abstoßungen nach der Transplantation. Außerdem wurde in

dieser Studie unter anderem eine reduzierte Expression von ICAM-1, TNF- α , MHC-II-Antigen sowie eine Senkung weiterer proinflammatorischer Zytokine erreicht (52).

1.4.2 Spendervorbehandlung mit Immunsuppressiva und Hormonen

Verschiedene Immunsuppressiva wurden in experimentellen Studien als Vorbehandlung von Organspendern getestet. Eine Spendervorbehandlung mit Mycophenolat Mofetil (MMF) zeigte einen positiven Einfluss auf den Ischämie-/ Reperfusionsschaden in einem Herztransplantationsmodell (57). Tacrolimus (FK 506) verlängerte das Transplantatüberleben in einem Xenotransplantationsmodell (58). MMF, Tacrolimus und SDZ RAD zeigten in einem Nierentransplantationsmodell jedoch eine geringere Wirkung als Prednisolon (47). Versuche einer Spendervorbehandlung mit P-Selektin Glykoprotein Ligand reduzierte ebenfalls die Transplantatschädigung nach Hirntod (49,53).

Die metabolisch-hormonelle Entgleisung nach Hirntod ist ein weiterer Ansatzpunkt für ein therapeutisches Eingreifen, vor allem bei hämodynamischer Instabilität. Eine Spendervorbehandlung mit Katecholaminen lindert Ischämie-/Reperfusionsschäden nach Nierentransplantation und verbessert die Transplantatfunktion (54). Bei hämodynamischer Instabilität bewirkte die Gabe von Cortisol in einem Hirntodmodell eine verbesserte hepatische Durchblutung (56). Die Vorbehandlung des hirntoten Spenders mit einer Kombination aus Triiodthyronin, Vasopressin, Methylprednisolon und Insulin soll einigen Studien zufolge günstige Effekte auf den Stoffwechsel und die Herzfunktion haben (59,60), während andere Studien dies nicht bestätigen konnten (61,62). Organe von Spendern, die auf diese Weise behandelt wurden, waren allerdings einer großen retrospektiven Studie zufolge öfter für eine Transplantation geeignet (63).

Neuere Studien zeigen eine verminderte Transplantatimmunogenität nach Induktion der Hämoxygenase-1 durch die Gabe von Cobalt-Protoporphyrin (CoPP) (55), nach Induktion von Kohlenmonoxid durch Methylenchlorid (MC) (64) sowie nach einer Spendervorbehandlung mit carbamylisiertem Erythropoietin (65) oder einem „Prolylhydroxylase-domain“-Inhibitor (PHD-Inhibitor) (66).

1.5 Marginale Spenderorgane und „age-matching“

1.5.1 Marginale Spenderorgane

Nach wie vor ist der limitierende Faktor für eine zeitnah zur Indikation durchgeführte Transplantation das Missverhältnis zwischen dem Angebot an Spenderorganen und dem tatsächlichen Bedarf. Am 31. Dezember 2012 standen 10525 Patienten im

Eurotransplantgebiet auf der aktiven Warteliste für eine Nierentransplantation, während nur 4852 Nierentransplantationen im Jahr 2012 durchgeführt werden konnten. Die Wartezeit betrug bei 1171 der Empfänger 60 oder mehr Monate. Seit Mitte der 1990er Jahre liegt die Zahl der Patienten auf der aktiven Warteliste stets über 10000 (2).

Um die Wartezeiten zu verkürzen und der Organnachfrage besser gerecht zu werden, wird seit Mitte der 1990er Jahre die Strategie verfolgt, durch eine Erweiterung der Spenderkriterien den Spenderpool zu vergrößern. Eine universell gültige Definition dieser erweiterten Spenderkriterien existiert jedoch nicht. Allgemein werden unter diesem Begriff Spendercharakteristika zusammengefasst, die mit einem erhöhten Risiko für eine verzögerte Transplantatfunktion, für eine akute Abstoßungsreaktion oder mit einer negativen Beeinflussung des Langzeitüberlebens oder der Langzeittransplantatfunktion assoziiert sind. Zu diesen Eigenschaften zählen ein hohes Spenderalter, Vorerkrankungen des Spenders wie Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie, eine lange kalte Ischämiezeit, Niereninsuffizienz sowie Herzstillstand (67–72). Transplantatempfänger dieser sogenannten „marginalen“ Spendernieren haben ein schlechteres Outcome als Empfänger von Lebendorganspenden oder von nicht marginalen Spendernieren (73). Das Langzeitüberleben ist jedoch nach Verwendung dieser marginalen Spenderorgane signifikant besser als bei konservativer Therapie (74).

1.5.2 Einfluss des Empfänger- und Spenderalters

Zu den erweiterten Spenderkriterien gehört auch ein erhöhtes Spenderalter. Großangelegte retrospektive Analysen von Faktoren, die das Nierentransplantationsoutcome beeinflussen, zeigten, dass ein erhöhtes Spenderalter einen negativen Effekt auf das Patientenüberleben sowie auf das 1-Jahres- als auch auf das 5-Jahres-Transplantatüberleben hat (75,76). In einer weiteren retrospektiven Studie wurde eine Korrelation zwischen Spenderalter und der Häufigkeit akuter Abstoßungen vom interstitiellen Typ festgestellt. Die Daten der Studie zeigten, dass der negative Effekt des Spenderalters auf die Langzeittransplantatfunktion auf dieser erhöhten Rate an akuten Abstoßungsreaktionen beruht (77). Auch die Häufigkeit einer verzögerten Transplantatfunktion korreliert mit einem erhöhtem Spenderalter (7). Hohes Spenderalter ist zudem ein Risikofaktor für die chronische Transplantatnephropathie (78). Im Rattenmodell konnte eine Verschlechterung der Transplantatfunktion bei verlängerter kalter Ischämiezeit insbesondere bei Verwendung älterer Spenderorgane festgestellt werden (79). Für die schlechteren Ergebnisse wird das Zusammenspiel von

altersspezifischen immunologischen und morphologischen Veränderungen des Spenderorgans verantwortlich gemacht. Eine verminderte Anzahl funktionierender Nephrone im Alter, die die Fähigkeit zur Anpassung der Nierenfunktion an Stresssituationen verschlechtert, sowie die erhöhte Prävalenz von vaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder Arteriosklerose beeinflussen das Transplantationsoutcome negativ (71,80). Eine veränderte Wundheilung im Alter sowie eine chronische Stimulation des Immunsystems führen zu chronischen Entzündungsprozessen, die eine verstärkte Immunantwort des Empfängerorganismus hervorrufen können (26,81,82). Im Rattenmodell wurde eine verstärkte Immunantwort im Zeitraum kurz nach der Transplantation bei Verwendung älterer Spenderorgane anhand von erhöhten Werten peripherer T- und B-Zellen, einer verstärkten T-Zell-Alloreaktivität und einer erhöhten Produktion der Zytokine IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-10 beobachtet (83). Weiterhin kann die vermehrte HLA-Expression von APZ im Alter als begünstigender Faktor für eine stärkere Allogenität des Transplantats angesehen werden (84).

Auch ein hohes Empfängeralter spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf das Transplantationsoutcome. Einerseits ist bei alten Empfängern das Risiko für akute Abstoßungsreaktionen insgesamt bei vielen Organtransplantationen erniedrigt, wobei dies jedoch im Falle der Nierentransplantation durch andere Faktoren kaschiert wird (85,86). Das nach Patiententod zensierte Transplantatüberleben ist bei Nierentransplantationen im Vergleich zu jüngeren Empfängern höher (87,88). Andererseits korreliert ein hohes Empfängeralter mit schlechterem Patientenüberleben, wobei die häufigste Ursache für Transplantatverlust der Tod mit einem noch funktionierenden Transplantat ist (89,90). Ein hohes Empfängeralter ist auch ein unabhängiger Risikofaktor für die chronische Transplantatnephropathie (87). Die im Alter global veränderte Funktion des Immunsystems (91,92) beeinflusst Stärke und zeitlichen Ablauf der Immunantwort nach einer Organtransplantation. Die für die Transplantationsmedizin wichtigsten Veränderungen des Immunsystems im Alter betreffen vor allem die T-Lymphozyten. CD3-, CD4- und CD8-positive Zellen werden vermehrt nachgewiesen. Andererseits verringert sich im Alter der Aktivierungsgrad der T-Lymphozyten durch eine geringere Expression des für die Kostimulation wichtigen Rezeptormoleküls CD28. Außerdem vergrößert sich die Zahl der Gedächtniszellen im Verhältnis zu den naiven T-Zellen (91,93,94). Natürliche Killer-Zellen werden bei älteren Menschen in höherer Anzahl gemessen (93).

1.5.3 Konzept des „age-matching“

Die Gruppe der älteren (über 65-jährigen) Patienten auf der Warteliste wächst in den westlichen Industriestaaten genauso wie die Zahl der älteren Organspender (95). Im Vergleich zur Langzeitdialysetherapie führt die Nierentransplantation auch bei Patienten über 70 Jahren und sogar über 75 Jahren zu besseren Ergebnissen bezüglich Überleben und Lebensqualität, auch wenn ein marginales Spenderorgan verwendet wurde (74,96,97). Andererseits ist eine häufige Ursache des Transplantatversagens bei älteren Empfängern der Tod bei noch funktionierendem Transplantat (89). Das Konzept des prospektiven „age-matching“ soll die effizientere Nutzung der vermehrt zur Verfügung stehenden marginalen Spenderorgane in einer Weise ermöglichen, die das Gesamtlangzeitergebnis der Transplantatempfänger nicht negativ beeinflusst. Dadurch soll die Organqualität und damit die wahrscheinliche Halbwertszeit des Transplantatüberlebens an die Lebenserwartung des Empfängers angepasst werden. Außerdem soll die funktionelle Leistung des Spenderorgans den Anforderungen des Empfängerorganismus eher entsprechen. Es konnte gezeigt werden, dass die Transplantation alter Organe in junge Empfänger schlechtere Ergebnisse liefert als beim „age-matching“ (98). Unter der Vorstellung, dass ein schwächeres Immunsystem bei älteren Empfängern trotz potentiell immunogenerer älterer Spenderorgane zu einer reduzierten Transplantatabstoßung führen könnte, wurde die Hypothese aufgestellt, alte Spenderorgane hätten womöglich das beste Transplantatüberleben, wenn sie älteren Empfängern zugeordnet werden (67).

1.5.4 Eurotransplant Senior Program (ESP)

Die Umsetzung dieses Konzepts geschieht im Einzugsgebiet der EIF im Rahmen des „Eurotransplant Senior Program“ (ESP). Das ESP ordnet Spendernieren von Spendern >65 Jahre Empfängern >65 Jahre zu. Die Organe werden Empfängern in geographischer Nähe zugeteilt, um die kalte Ischämiezeit zu minimieren. Im Gegensatz zum ETKAS wird ein HLA-Matching nicht durchgeführt (99). Der Fokus des ESP, die kalte Ischämiezeit zu reduzieren und dabei auf ein HLA-Match zu verzichten, beruht auf der Beobachtung, dass ältere Organe durch eine verlängerte CIT einen verhältnismäßig großen Schaden nehmen (79). Seit dem Beginn des ESP 1999 verdoppelte sich die Verwendung von Spendernieren älterer Spender, die Wartezeit für ältere Empfänger nahm ab (100). Die Anzahl Nierentransplantationen mit Spenderorganen über 65jähriger Leichenspender

erhöhte sich bis 2010 stetig bis auf 838 im Jahr 2010, 2012 waren es 761 (2). Die kalte Ischämiezeit konnte deutlich verkürzt, die Häufigkeit einer verzögerten Organfunktion herabgesenkt werden (99). Die Langzeitergebnisse des ESP in Bezug auf Patienten- und Transplantatüberleben zeigen jedoch immer noch schlechtere Werte im Vergleich zum ETKAS (99).

1.6 Fragestellung und Methodenwahl

Ein Ansatz, um die Ergebnisse von Organtransplantationen hirntoter Spender zu verbessern, ist die Vorbehandlung des Spenderorganismus mit Methylprednisolon vor der Organentnahme. Experimentelle Studien aus unserer Arbeitsgruppe lieferten ermutigende Ergebnisse dieser Vorbehandlung in Nierentransplantationsmodellen (47,49). Die Vorschädigung des Organs und damit die Immunogenität des Organs soll durch eine Abschwächung der Entzündungsprozesse im Spenderorganismus gesenkt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer Steroidvorbehandlung der Spender auf die Immunantwort des Empfängers im Rahmen einer klinischen Studie untersucht. Als Outcome wurde die im IFN- γ ELISPOT Assay gemessene spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität der Empfänger festgelegt. Mit Hilfe des IFN- γ ELISPOT Assays werden IFN- γ -produzierende T-Lymphozyten des Empfängers nach Stimulation mit Spenderleukozyten in vitro quantifiziert. Die Aktivierung erfolgt hier sowohl über den direkten als auch über den indirekten Weg. Die zentrale Rolle der T-Lymphozyten des Empfängers bei akuten Abstoßungsreaktionen macht die Anzahl der gemessenen spenderspezifischen, alloreaktiven T-Lymphozyten zu einem Surrogatparameter für die Immunantwort des Empfängers (101). Präoperativ durchgeführte ELISPOTs geben Hinweise auf eine Präsensitivierung der Empfänger-T-Lymphozyten unabhängig von anderen Parametern wie z.B. HLA-Mismatch, präformierten Antikörpern (PRA) oder vorausgegangenen Nierentransplantationen (102,103). Hohe präoperative ELISPOT-Ergebnisse korrelieren mit der Anzahl akuter Abstoßungen nach Nierentransplantation (103,104). Die Steroidvorbehandlung eines Organspenders könnte sich so durch eine verminderte MHC-Expression auf Spenderleukozyten, wie sie in vorangegangenen Studien beobachtet wurde (47), auf die alloreaktive Antwort der Empfänger-T-Lymphozyten auswirken. Ein Vorteil dieser Methode war auch, Informationen über die Alloreaktivität erhalten zu können, bevor die postoperative Immunsuppression begonnen hat. So war eine Wirkung der

Vorbehandlung zu erkennen, die bei isolierter Betrachtung von Häufigkeiten akuter Rejektionen eventuell durch eine postoperative immunsuppressive Therapie kaschiert werden würde. In einem postoperativen ELISPOT wurde die T-Zell-Alloreaktivität unter immunsuppressiver Therapie gemessen.

Die Nullhypothese dieser Arbeit lautete, dass sich die spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität nach Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit Methylprednisolon statistisch nicht signifikant von einer Kontrollgruppe unterscheidet. Angesichts der oben genannten, vor Beginn dieser Arbeit veröffentlichten experimentellen Studien wurde erwartet, dass die Alloreaktivität durch die Spendervorbehandlung abgeschwächt und die Nullhypothese somit widerlegt wird.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit explorativ das Leukozytenprofil der eingeschlossenen Patienten mittels FACS-Analyse untersucht. Die FACS-Analyse gibt durch die Quantifizierung verschiedener Leukozytenpopulationen Hinweise auf die im Empfängerorganismus ablaufende Immunantwort. Die wichtigsten an Abstoßungsreaktionen beteiligten Zellen sind die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen sowie die verschiedenen T-Lymphozytenpopulationen. Zusätzlich wurden B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, welche auch an den Abstoßungsreaktionen beteiligt sein können, untersucht. Eine FACS-Analyse an Tag 0 sollte vorbestehende immunologische Unterschiede zwischen den Gruppen evaluieren. Eine am siebten postoperativen Tag durchgeführte FACS-Analyse sollte Hinweise auf mögliche Unterschiede als Folge der Spendervorbehandlung liefern.

Zusätzlich wurde die Inzidenz von akuten Rejektionen als klinisches Korrelat der mit dem ELISPOT gemessenen alloreaktiven Immunantwort untersucht. Analog zu den Erwartungen bezüglich der ELISPOT-Ergebnisse wurde eine niedrigere Rate an Rejektionen nach Spendervorbehandlung erwartet.

Die unterschiedlichen Gegebenheiten der im Rahmen des ETKAS und des ESP durchgeführten Transplantationen, bezüglich der Allokationsalgorithmen, aber auch in Hinblick auf die immunologischen und morphologischen Voraussetzungen (s. Kap. 1.5.2), machten eine getrennte Beobachtung dieser beiden Patientengruppen notwendig. Eine Abschwächung der Immunantwort durch die Spendervorbehandlung wäre speziell vor dem Hintergrund gehäuft auftretender akuter Rejektionen bei älteren Transplantatempfängern (77) von großem Wert.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer monozentrischen, offenen, prospektiven, randomisierten klinischen Studie, die in Zusammenarbeit mit der Deutschen Stiftung Organspende Berlin-Brandenburg zwischen Juni 2006 und Juli 2008 durchgeführt wurde. Innerhalb der Studie wurden einerseits experimentelle Untersuchungen durchgeführt, andererseits klinische Daten ausgewertet. Die Analyse der klinischen Ergebnisse ist Thema der Dissertation „Der Einfluss von Steroidvorbehandlung der Spenderorgane auf die initiale Transplantatfunktion bei allogener Nierentransplantation“ von Sabine Schulz, während sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit den experimentellen Ergebnissen befasst. Alle in dieser Arbeit untersuchten Transplantationen wurden zwischen August 2006 und Februar 2008 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Campus Virchow Klinikum in Berlin-Wedding durchgeführt. Die Ethikkommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum, befürwortete die Durchführung der Studie (Votum Nr. 149/2004, Amendment Nr. I vom 21.07.2005). Patienten, die unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie in Frage kamen, wurden ausführlich über Ziel und Methoden der Studien informiert und nach Ihrer Bereitschaft zur Teilnahme gefragt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Diese konnte zu jedem Zeitpunkt und ohne Angabe von Gründen widerrufen werden.

2.2 Patientenkollektiv und Steroidvorbehandlung

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten sind ausschließlich Empfänger von verstorbenen, hirntoten Spendern. Die Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien	Abbruchkriterien
Alter > 18 Jahre	Alter < 18 Jahre	Tod des Patienten
Vorliegen der Einwilligungserklärung	Fehlen der Einwilligungserklärung	Widerruf der Einwilligung
Verstorbener Spender	Lebendspende	Transplantatversagen
Erfolgreiche Nierentransplantation	Schwangerschaft, Stillzeit	

Tabelle 2.1: Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien.

Insgesamt wurden im experimentellen Teil der Studie 57 Nierentransplantatempfänger von Organen hirntoter Spender untersucht (m: 35, w: 22). Davon wurden 16 Patienten im Rahmen des Eurotransplant Senior Program transplantiert. Ein Teil der Organspender erhielt randomisiert eine Steroidvorbehandlung. In diesem Fall wurde zunächst 12 Stunden vor der Organentnahme 500 mg Methylprednisolon als Bolus, anschließend kontinuierlich 100 mg Methylprednisolon pro Stunde (250 mg / 50 ml) intravenös verabreicht. Insgesamt erhielten die Spender in 27 Fällen die Steroidvorbehandlung. Eine Übersicht über die verschiedenen Patientengruppen gibt Tab. 2.2.

Gruppen-Nr.	Bezeichnung	Gruppengröße
1	Kontrollgruppe, alle Patienten	n=30
2	Steroidgruppe, alle Patienten	n=27
3	Kontrollgruppe, ETKAS-Patienten	n=24
4	Steroidgruppe, ETKAS-Patienten	n=17
5	Kontrollgruppe, ESP-Patienten	n=6
6	Steroidgruppe, ESP-Patienten	n=10

Tabelle 2.2: Patientengruppen.

2.3 IFN- γ ELISPOT assay

Der IFN- γ Enzyme Linked Immunosorbent Spot assay (ELISPOT) wurde zur in vitro-Quantifizierung spenderspezifischer alloreaktiver T-Zellen im Empfängerblut verwendet. Zunächst werden aus dem Blut des Empfängers isolierte T-Lymphozyten durch aus der Milz des Spenders isolierte Leukozyten in vitro stimuliert. Von den T-Lymphozyten produziertes IFN- γ wird anschließend mit Hilfe eines Antikörpers an eine PVDF-Platte gebunden und dann nach Zugabe eines Detektionsantikörpers angefärbt. Die auf diese Weise sichtbar gemachten „Spots“ repräsentieren jeweils eine IFN- γ -produzierende Zelle und können nun mit Hilfe eines speziellen Photoscanners und geeigneter Software quantifiziert werden (105).

Der ELISPOT wurde pro Patient zweimal durchgeführt. Dafür wurde den Empfängern einmal vor der Transplantation und einmal sieben Tage nach der Transplantation jeweils 12 ml peripher-venöses Blut in Heparin-Monovetten für den ELISPOT entnommen. Diese Zeitpunkte wurden als „Tag 0“ und „Tag 7“ definiert. Zur Isolation der Spenderleukozyten stand jeweils ein circa 1 cm³ großes Stück der im Rahmen der Organasservierung erhaltenen Spendermilz zur Verfügung. Für die Untersuchung an Tag 7 wurden die bereits isolierten Spenderleukozyten tiefgefroren.

Alle unter 2.3.1.1-2.3.3.3 aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen und mit sterilen Utensilien durchgeführt.

2.3.1 Isolierung der T-Lymphozyten aus Empfängerblut

2.3.1.1 Auftrennung nach Dichtegradienten (PBMC-Präparation)

Die 12 ml Heparinblut wurden mit 12 ml RPMI-Medium gemischt. Jeweils 6 ml der Blutsuspension wurden vorsichtig auf vier mit jeweils 3 ml Lymphoprep befüllte Reagenzgläser verteilt. Nach Zentrifugation (2400 U/min für 30 min bei 20° C, keine Bremse) wurde der PBMC-Zellring abpipettiert und direkt in RPMI-Medium überführt. Nach erneuter Zentrifugation (1200 U/min für 5 min bei 20° C) wurden die Zellen in 0,75 ml PBS/BSA/EDTA-Lösung resuspendiert. 20 µl der Probe wurden mit 980 µl Trypanblau-Lösung gefärbt und daraufhin unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.3.1.2 Negative T-Lymphozyten-Isolation

In diesem Arbeitsschritt werden B- und NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten mit monoklonalen Antikörpern markiert. Mit Hilfe sogenannter Dynabeads, die an die Antikörper binden, und eines speziellen Magneten lassen sich diese Zellen anschließend von den verbleibenden T-Lymphozyten trennen.

Nach Zugabe von 20 µl FCS und 20 µl Antikörper-Mix wurde die Zellsuspension 20 min lang bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml PBS/BSA/EDTA und anschließender Zentrifugation (1200 U/min, 8 min, 4° C) gewaschen. 100 ml der nach Herstellerangaben gewaschenen Dynabeads wurden zusammen mit 900 ml PBS/BSA/EDTA hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde 15 min bei Raumtemperatur und unter ständigem Mischen inkubiert. Nun wurde zweimal 1 ml PBS/BSA/EDTA hinzugegeben, das Röhrchen für 2 min in den Magneten gestellt und die Zellsuspension abpipettiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung und eine Einstellung der Zellkonzentration auf $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml mit Hilfe von Zentrifugation und der Zugabe von RPMI/FCS-Lösung. 100 µl der Zellen wurden nun für die FACS-Färbung zur Bestimmung des tatsächlichen T-Zell-Anteils bereitgestellt. Der Rest der Zellsuspension wurde über Nacht im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ aufbewahrt.

Alle in diesem Abschnitt angegebenen Mengen und Volumina der verwendeten Reagenzien beziehen sich auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen / ml. Bei

abweichender Zellkonzentration wurden die Mengen und Volumina entsprechend angepasst.

2.3.2 Präparation der peripheren Blutmonozyten (PBMC) aus der Spendermilz

Das Milzstück wurde mechanisch zerkleinert und durch einen 70 µl-Zellsieb filtriert. Anschließend wurde das Zellmaterial durch Zentrifugation (bei 1200 U/min für 5 min bei 20° C), Verwerfen des Überstandes und Resuspension in RPMI-Medium gewaschen. Die Erythrozyten wurden durch die Zugabe von Aqua dest. (20 ml auf 10 ml für 10 s) lysiert. Nach zwei weiteren Waschsritten wurden die Zellen in 20 ml RPMI/FCS-Lösung suspendiert. Nun wurde die Zellkonzentration durch manuelle Zählung der Zellen am Lichtmikroskop (s. oben), Errechnen der Zellkonzentration und entsprechender Verdünnung bzw. Konzentration der Zellsuspension auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Für den ELISPOT wurde eine ausreichende Menge an Zellen für über Nacht für mindestens 8 Stunden in den Inkubator (37° C, 5% CO₂) gestellt. Die restlichen Zellen wurden für den ELISPOT an Tag 7 eingefroren. Dazu wurden die Zellen nach Zentrifugation zunächst in 0,5 ml des Einfriermediums A resuspendiert. In diese Lösung wurde tröpfchenweise und unter ständigem vorsichtigem Schütteln des Gefäßes das Einfriermedium B hinzugegeben. Die Zellen wurden in einer Styroporbox zunächst für eine Nacht bei -80° C und für die restlichen sechs Tage bei -150° C eingefroren.

Am 7. postoperativen Tag wurden die Zellen aus dem Kühlschrank genommen und schonend per Handwärme und Wasserbad angetaut. Sofort danach wurden die Zellen in 20° C warmem RPMI/FCS resuspendiert. Nach Zentrifugation (bei 1200 U/min für 5 min bei 20° C) und erneuter Resuspension in 2 ml RPMI/FCS wurde die Einstellung der Zellkonzentration auf $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml wie zuvor beschrieben vorgenommen. Danach wurden die Zellen bei 37° C und 5% CO₂ über Nacht im Inkubator aufbewahrt.

2.3.3 ELISPOT

2.3.3.1 Vorbereitung der PVDF-Platte

Zunächst wurden sechs Wells der sterilen PVDF-Platte mit 100 µl 70% Ethanol für 10 min aktiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung (jeweils 200 µl pro Well) wurde pro Well 100 µl anti-human-IFN- γ -Antikörper-Lösung (2,8 µl Antikörper/700 µl PBS) hinzugegeben. Die Platte wurde in Alufolie gehüllt und über Nacht für mindestens 8 Stunden bei 4° C inkubiert.

2.3.3.2 Einsetzen der Zellen

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung wurden unspezifische Bindungen mit PBS/BSA-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln blockiert. Währenddessen wurden die Stimulatorzellen mit einer subletalen Dosis von 30 Gray bestrahlt, um eine interferierende Zytokinproduktion dieser Zellen zu unterbinden.

Nach wiederholtem Waschen der PVDF-Platte wurden nun die Zellen wie in Tabelle 2.3 angegeben in die PVDF-Platte eingesetzt. Die Platte wurde nun für 24 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Funktion des Wells	Inhalt
Negativkontrolle Responderzellen	100 µl Responderzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl RPMI/FCS-Medium
Spezifische Stimulation 1	100 µl Responderzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl Stimulatorzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml)
Spezifische Stimulation 2	100 µl Responderzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl Stimulatorzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml)
Spezifische Stimulation 3	100 µl Responderzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl Stimulatorzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml)
Positivkontrolle Responderzellen	100 µl Responderzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl Mitogenlösung (2% PHA in RPMI/FCS)
Negativkontrolle Stimulatorzellen	100 µl Stimulatorzellen (bei 2,5 x 10 ⁶ Zellen / ml) 100 µl RPMI/FCS-Medium

Tabelle 2.3: Inhalt der einzelnen ELISPOT-Wells.

2.3.3.3 Färbung

Die Wells wurden entleert und für 10 min mit jeweils 200 µl PBS/Tween-Lösung bei 4° C inkubiert. Nach zusätzlichem Waschen der Wells mit PBS/Tween-Lösung wurden die Wells mit jeweils 100 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers beschichtet (0,4% in PBS/BSA/Tween) und für 2 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/Tween-Lösung wurde jeweils 100 µl Streptavidin-HRP (0,05% in PBS/BSA/Tween) in die Wells gegeben. Die Platte wurde bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank für 45 min inkubiert. Danach wurden die Wells jeweils dreimal mit PBS/Tween-Lösung und PBS-Lösung gewaschen. Durch sterile Filtration einer Mischung aus 100 µl AEC-Lösung und 3 ml AEC-Puffer und anschließender Zugabe von 1,5 µl

Wasserstoffperoxid wurde nun die Visualisierungslösung hergestellt. Mit jeweils 200 µl Visualisierungslösung wurden die Wells für 3-4 min gefärbt. Die Visualisierungsreaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt. Die Platten wurden, nachdem sie getrocknet waren, in Alufolie verpackt und anschließend bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

2.3.4 Auswertung

Die ELISPOT Assays wurden mit dem BIOREADER 3000 C / BIOCOUNTER System gemessen. Mit Hilfe der Software ImmunoSpot v4.0.13 wurde die Anzahl der Spots in den einzelnen Wells bestimmt. Von dem Mittelwert der drei Wells mit spezifischer Stimulation wurden die Werte der Negativkontrollen subtrahiert. Das Ergebnis wurde nun auf die mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmte absolute Anzahl tatsächlich eingesetzter T-Zellen bezogen.

2.4 Durchflusszytometrische Leukozytentypisierung

2.4.1 Prinzip des „Fluorescent Activated Cell Sorting“

Das „Fluorescent Activated Cell Sorting“ (FACS) ist eine durchflusszytometrische Methode zur Sortierung und Quantifizierung von biologischen Zellen, welche ursprünglich von Bonner und Hulett entwickelt wurde (106). Hierbei wird zunächst die zu untersuchende Zellsuspension mit Überdruck in das Durchflusszytometer befördert. Eine schnellfließende „Hüllstromflüssigkeit“ reiht nun die Zellen hintereinander auf, so dass sie im Zentrum der Messzelle nacheinander analysiert werden können. An diesem Punkt werden die Zellen von einem Laserstrahl getroffen, dessen Licht nach vorne und zur Seite streut. Die unterschiedliche Streuung im Seitwärtsstreulicht erlaubt Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle, die unterschiedliche Streuung im Vorwärtsstreulicht Rückschlüsse auf die Zellgröße. Die Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern erlaubt zusätzlich die Identifizierung der exprimierten Oberflächenantigene der Zellen. Die gefärbten Zellen werden im Durchflusszytometer durch den Laserstrahl angeregt und entsenden anschließend ein fluoreszierendes Signal. Je nach verwendetem Antikörper weist dieses Signal eine unterschiedliche Wellenlänge auf. Das Signal wird von Photodetektoren erfasst und erlaubt so die relative Quantifizierung verschiedener Leukozytensubpopulationen im untersuchten Material.

2.4.2 Durchführung

Den Nierentransplantatempfängern wurde im Rahmen der stationären Aufnahme vor der Transplantation und sieben Tage nach der Transplantation jeweils 3 ml peripher-venöses Blut in EDTA-Monovetten entnommen. Diese Vollblutproben wurden mit Hilfe der FACS-Analyse auf verschiedene dendritische Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen untersucht. Die verwendeten Antikörper sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich durch verschiedene Fluoreszenzspektren aus, welche in Tabelle 2.5 aufgelistet sind.

untersuchte Zellpopulation	verwendetes Material	verwendete Antikörper
Dendritische Zellen „Panel I“	50 µl EDTA-Vollblut	lineage cocktail 1 (FITC) CD86 (PE) HLA-DR (PerCP) CD11c (APC)
T-Lymphozyten „Panel II“	50 µl EDTA-Vollblut	CD4 (FITC) CD62L (PE) HLA-DR (PerCP) CD8 (APC)
B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen „Panel III“	50 µl EDTA-Vollblut	CD19 (FITC) CD16 (PE) HLA-DR (PerCP) CD56 (APC)
Regulatorische T-Lymphozyten „Panel IV“	50 µl EDTA-Vollblut	CD4 (FITC) CD25 (PE) CD3 (PerCP) CD8 (APC)
T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen „ELISPOT-Panel“	100 µl Suspension isolierter T-Lymphozyten	CD4 (FITC) CD16 (PE) CD3 (PerCP) CD56 (APC)

Tabelle 2.4: Untersuchte Leukozytenpopulationen und verwendete fluoreszierende Antikörper.

Zusätzlich wurde auch eine Probe der T-Zell-Suspension für den ELISPOT untersucht, um den tatsächlichen Anteil der T-Lymphozyten zu bestimmen. Negativkontrollen und Isotypenkontrollen wurden mitgeführt. Für die Isotypenkontrolle wurden die Mausantikörper IgG1, IgG2a und IgG2b verwendet.

Fluoreszenzfarbstoffe	Fluoreszenzspektrum
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494-520 nm
Phycoerythrin (PE)	496-578 nm
Peridinin-Chlorophyll (PerCP)	482-678 nm
Allophycocyanin (APC)	650-660 nm

Tabelle 2.5: Fluoreszenzspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe.

Nach Antikörper-Zugabe (jeweils 2,5 µl pro Antikörper) und Inkubation (15 min, 20° C, im Dunkeln) wurden die Erythrozyten der EDTA-Vollblutproben mit 3 ml Lysepuffer für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln lysiert. Danach wurden alle Proben mit jeweils 3 ml PBS/NaN₃ gewaschen, bevor sie mit jeweils 1 ml Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert wurden. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift. Die Zellen wurden über Nacht bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.3 Auswertung

Die gefärbten Zellen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur® II und mit der Software CellQuest® Pro Version 5.2.1 gemessen und ausgewertet. Mit Hilfe von Isotypenkontrollen wurden die Grenzen für eine positive Färbung von Oberflächenmarkern festgelegt. Bei der Untersuchung der natürlichen Killerzellen sowie der T- und B-Lymphozyten wurden die Lymphozyten im Streulichtplot eingegrenzt.

2.5 Klinische Parameter

Die klinischen Parameter Spender- und Empfängeralter, Geschlecht des Empfängers, HLA-mismatch, das Vorliegen von präformierten Antikörpern gegen Spenderantigene (PRA-Test), die Dauer der kalten Ischämiezeit sowie die Anzahl vorausgegangener Nierentransplantationen wurden erhoben, um eventuelle Unterschiede der untersuchten Patientengruppen zu identifizieren. Im Rahmen der klinischen Studie wurde auch eine umfassende Erhebung und Dokumentation klinischer Funktionsparameter durchgeführt. Hiermit befasst sich die Dissertation von Sabine Schulz ausführlich (s. oben). Auf die Zahl akuter Rejektionen wird jedoch auch in dieser Arbeit eingegangen. Die Diagnose der akuten Abstoßungsreaktion wurde durch eine histologische Untersuchung einer Nierenbiopsie gesichert. Borderline-Rejektionen wurden als Abstoßungsreaktion mitgezählt.

2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism 4 verwendet. Für den Vergleich der jeweiligen Patientengruppen (Steroidvorbehandlung vs. Kontrolle, ETKAS Steroidvorbehandlung vs. ETKAS Kontrolle, ESP Steroidvorbehandlung vs. ESP Kontrolle) wurde bei den normal verteilten Daten der t-Test, in den restlichen Fällen der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde zusätzlich ein Two-way-ANOVA-Test mit den zwei Variablen „Steroidvorbehandlung des Spenders“ und „Zeitpunkt“ durchgeführt. Damit sollte ein möglicher Einfluss der Spendervorbehandlung bei eventuell unterschiedlichen präoperativen Ausgangswerten identifiziert werden. Um eine Gauß'sche Normalverteilung zu erreichen, mussten die Daten teilweise logarithmiert werden. Relative Häufigkeiten wurden mit dem exakten Test nach Fisher analysiert. Um die Kovarianz zwischen der T-Zell-Alloreaktivität und dem HLA-mismatch zu evaluieren, wurde eine nicht-parametrische Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Zu beachten ist das am Messzeitpunkt Tag 0 unterschiedliche Voraussetzungen für die Bestimmung der T-Zell-Alloreaktivität mittels ELISPOT und der Leukozytentypisierung mittels FACS-Untersuchung bestanden: während beim ELISPOT eine spezifische in vitro-Stimulation der Empfänger-T-Zellen mit Spenderzellen stattfindet, hatten die für die FACS-Untersuchung verwendeten Leukozyten an Tag 0 noch keinen Kontakt mit Spenderantigenen.

2.7 Materialien und Geräte

In den Tabellen 2.6-2.9 sind die verwendeten Labormaterialien, Geräte und Computerprogramme aufgelistet.

Geräte	Hersteller
Gamma-Bestrahlungsanlage 08 29/4 9503-11	Steuerungstechnik, Strahlenschutz, Braunschweig, Deutschland
BIOREADER 3000 C / BIOCOUNTER System	BIO-SYS, Karben, Deutschland
Durchflusszytometer (FACSCalibur® II)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinwaage (AC121A)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Lichtmikroskop (Axio Scope)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter (CG840)	Schott, Mainz, Deutschland

pH-Sonde (52000102)	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultratiefkühltruhe	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge Megafuge 11R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Laborgeräte.

Laborutensilien	Hersteller
Blutmonovetten	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Einfrierbox	Nalgene
Einwegpipetten	Bibby Sterikin Ltd., Stone, UK
Einwegpasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ELISPOT MultiScreen, 96-Well Plates	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Falcon Tubes	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinpipetten Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnpipetten	Labsystems, Quickborn, Deutschland
Glasbehälter	Duran Group GmbH, Deutschland
Petrischalen	Falcon, Oxnard, CA, USA
Pipettboy	Integra Biosciences, Chur, Schweiz (Fernwald, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyrolröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rührfisch / Gerät MR 3001 K	Heidolph
Feather Disposable Scalpel No. 20	Feather
Steriler Filter	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Zellsieb 70 µl	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Laborutensilien.

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
AEC-Lösung bestehend aus: AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol), 500 mg DMF (N, N Dimethylformamid), 50 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
AEC-Puffer (Azetatpuffer 0,1 M) bestehend aus: Essigsäure (0,2 M), 148 ml Natrium-Azetat-Lösung (0,2 M) (s. oben), 352 ml Aqua dest., 500 ml pH auf 5,0 eingestellt	(s. oben) (s. oben) Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
anti-human-IFN- γ Antikörper	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

anti-human-IFN- γ -biotin Antikörper	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Einfriermedium „freeze A“ bestehend aus: RPMI-Medium (s. oben), 40% FCS (fetal calf serum), 60% (Nr. 10106-169) Steril filtriert	(s. oben) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Einfriermedium „freeze B“ bestehend aus: DMSO, 20% FCS (fetal calf serum), 80% (Nr. 10106-169)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA (Perbio, Bonn, Deutschland / Pierce) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure bestehend aus: Aqua dest., 200 ml Eisessig, 2,3 ml	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS-Antikörper	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS-Lysepuffer bestehend aus: Aqua dest., 1000 ml NH ₄ Cl, 8,29 g KHCO ₃ , 1,02 g EDTA, 29,2 mg	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FCS (fetal calf serum) (Nr. 10106-169)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lymphoprep	Axis-Shield PoC, Oslo, Norwegen
Mitogenlösung bestehend aus: 3 μ l PHA (Polyhydroxyalkanoat) 150 μ l RPMI/FCS	Biochrom KG, Berlin, Deutschland (s. oben)
Natrium-Acetat-Lösung bestehend aus: Natriumacetat, 27,2 g Aqua dest., 1000 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS-Lösung bestehend aus: Aqua dest., 1000 ml D-PBS (10x), 10 ml (Nr. 14200-067)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS/BSA-Lösung bestehend aus: PBS-Lösung (s. oben), 50 ml BSA (bovine serum albumin) Fraktion 5, 0,5 g Steril filtriert	(s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/Tween-Lösung bestehend aus: PBS-Lösung (s. oben), 25 ml Tween 20, 50 μ l Steril filtriert	(s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/BSA/Tween-Lösung bestehend aus:	

PBS-Lösung (s. oben), 50 ml Tween 20, 25 µl BSA (bovine serum albumin) Fraktion V, 0,5 g Steril filtriert	(s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/BSA/EDTA-Lösung bestehend aus: PBS-Lösung (s. oben), 1000 ml EDTA, 744,48 mg BSA (bovine serum albumin) Fraktion V, 1 g	(s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/Natriumazid-Lösung bestehend aus: PBS-Lösung (s. oben), 500 ml Natriumazid, 0,5 g (0,1%)?	(s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI-Medium bestehend aus: RPMI-1640, 500 ml L-Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat (MEM 100MM), 5 ml Nichtessenzielle Aminosäuren, 5 ml Pen-Strep, 5 ml β-Mercaptoethanol (0,25m oder 0,025m?), 1 ml	PAA, Pasching, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Biochrome, Cambridge, Großbritannien Biosciences, La Jolla, CA, USA
RPMI-FCS-Lösung bestehend aus: RPMI-Medium (s. oben), 100 ml FCS (fetal calf serum), 10 ml (Nr. 10106-169)	(s. oben) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Streptavidin-house-radish-Peroxidase	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
T cell depletion kit Ver II, Inhalt: Dynabeads Antikörper-Mix: IgG-Maus-Antikörper gegen CD8, CD14, CD16a, CD16b, CD19, CD36, CD56, CDw123, CD235a Magnet	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau-Lösung Trypanblau, 10% Aqua dest.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Visualisierungslösung bestehend aus: AEC-Lösung (s. oben), 100 µl AEC-Puffer (s. oben), 3 ml Steril filtriert, danach Zugabe von: Wasserstoffperoxid (30%), 1,5 µl	(s. oben) (s. oben) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Reagenzien und Lösungen.

Software	Hersteller
CellQuest® Pro ver. 5.2.1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

GraphPad Prism®, ver. 4	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
GraphPad InStat®, ver. 3.0	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImmunoSpot® ver. 4.0.13	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA
Microsoft Office 2000	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Computersoftware.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten

3.1.1 Präoperative Patientendaten

Bezüglich Geschlecht, Spender- und Empfängeralter, kalter Ischämiezeit und dem Vorliegen vorangegangener Nierentransplantationen unterschieden sich die Vergleichsgruppen nicht. Bei keinem der untersuchten Patienten war das Testergebnis für präformierte Antikörper größer als 25%. Die Gruppe der Patienten nach Steroidvorbehandlung hatte ein statistisch signifikant höheres HLA-mismatch als die Kontrollgruppe (Tab. 3.1).

Parameter	Kontrolle	Steroide	statistische Signifikanz
Anzahl	29	28	
Geschlecht (m / w)	18 / 11	16 / 12	ns
Spenderalter	51,28 ± 2,96	56,57 ± 3,08	ns
Empfängeralter	53,62 ± 2,73	53,89 ± 2,20	ns
HLA-mismatch	2,31 ± 0,32	3,68 ± 0,28	p=0,0061
PRA > 25%	0	0	ns
kalte Ischämiezeit [min]	610 ± 49	624 ± 51	ns
Vor-NTX ja / nein	6 / 23	5 / 23	ns

Tabelle 3.1: Präoperative klinische Daten aller Patienten.

In der Gruppe der ETKAS-Patienten war bei den Patienten nach Spendervorbehandlung das Empfängeralter signifikant niedriger als in der

Parameter	ETKAS Kontrolle	ETKAS Steroide	statistische Signifikanz
Anzahl	24	17	-
Geschlecht (m / w)	16 / 8	8 / 9	ns
Spenderalter	46,96 ± 2,82	46,53 ± 3,07	ns
Empfängeralter	50,79 ± 2,22	44,18 ± 2,30	p=0,03
HLA-mismatch	2,00 ± 0,29	2,82 ± 0,26	ns (p=0,0536)
PRA > 25%	0	0	ns
kalte Ischämiezeit [min]	640 ± 56	725 ± 68	ns
Vor-NTX ja / nein	6 / 18	5 / 12	ns

Tabelle 3.2: Präoperative klinische Daten der ETKAS-Patientengruppen.

Kontrollgruppe ($p=0,03$; Mann-Whitney-Test). Das HLA-mismatch war in dieser Gruppe grenzwertig nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,0536$; t-Test) (Tab. 3.2). Die restlichen Parameter zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei den Patienten des ESP konnten keine Unterschiede hinsichtlich der präoperativen klinischen Parameter zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden (Tab. 3.3).

Parameter	ESP Kontrolle	ESP Steroide	statistische Signifikanz
Anzahl	5	11	
Geschlecht (m / w)	2 / 3	8 / 3	ns
Spenderalter	72,00 ± 2,41	72,09 ± 1,57	ns
Empfängeralter	67,20 ± 1,96	68,91 ± 0,97	ns
HLA-mismatch	3,8 ± 1,02	5,00 ± 0,27	ns
PRA > 25%	0	0	ns
kalte Ischämiezeit [min]	468 ± 66	468 ± 47	ns
Vor-NTX ja / nein	0 / 5	0 / 11	ns

Tabelle 3.3: Präoperative klinische Daten der ESP-Patientengruppen.

3.1.2 Immunsuppression

Immunsuppressive Therapien können sich auf die ELISPOT- und FACS-Ergebnisse an Tag 7 auswirken. Deshalb wurden bei der Auswertung der ELISPOT- und FACS-Ergebnisse an Tag 7 Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression zusätzlich separat analysiert. In der Gruppe mit „vergleichbarer Immunsuppression“ wurden alle Patienten zusammengefasst, die eine Kombination aus einem Steroid, einem Calcineurin-Inhibitor, Mycophenolat-Mofetil und Basiliximab erhielten. Patienten, die mit anderen immunsuppressiven Medikamenten behandelt wurden, wurden bei dieser statistischen Analyse nicht berücksichtigt (Tab. 3.4).

Vergleichbare Immunsuppression	Kontrolle	Steroide
Alle Patienten	25	25
ETKAS-Patienten	20	15
ESP-Patienten	5	10

Tabelle 3.4: Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression.

3.2 Spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität

Die FACS-Analyse der für den ELISPOT verwendeten T-Zellsuspension gab Aufschluss über die tatsächliche Zahl eingesetzter T-Zellen. Im Mittel waren nach Isolation der T-Lymphozyten $88,56\% \pm 1,08\%$ (n=99) der eingesetzten Zellen CD3-positiv. Bei den erfolgreich durchgeführten ELISPOTs betrug der Mittelwert $88,55\% \pm 1,23\%$ (n=85). Die absolute Zahl der gezählten Spots wurde jeweils auf den Standardwert von 250 000 T-Zellen hochgerechnet.

Bei 4 Patienten konnten keine ELISPOTs durchgeführt werden, da kein oder zu wenig Spendermaterial vorhanden war. Bei einem Patienten konnte an Tag 7 kein ELISPOT durchgeführt werden, da nicht ausreichend Empfängermaterial vorhanden war. Bei 2 Patienten konnte der ELISPOT an Tag 7 nicht durchgeführt werden, da die Konzentration von T-Lymphozyten im peripheren Blut nach einer Muromonab-CD3-Behandlung nicht ausreichend hoch war. Von den durchgeführten ELISPOTs waren an Tag 0 und Tag 7 jeweils 8 ELISPOTs nicht valide auswertbar, da die Spots nicht sicher voneinander abgrenzbar waren. An Tag 7 war dies teilweise durch einen vermehrten Zelluntergang der eingefrorenen Stimulatorzellen zu erklären. Bei einem Patienten stand statt einer Milzbiopsie ein Lymphknoten zur Isolation der Spenderzellen zur Verfügung, hieraus ergaben sich keine relevanten Konsequenzen für die Auswertung.

Nach Betrachtung der Ergebnisse wurde in Zusammenhang mit einem auffällig hohen HLA-Mismatch der ETKAS-Patienten mit Steroidvorbehandlung eine nicht-parametrische Kovarianzanalyse nach Spearman durchgeführt. Zwischen HLA-Mismatch und T-Zell-Alloreaktivität bestand zu beiden Messzeitpunkten in beiden Patientengruppen keine Korrelation.

3.2.1 Alle Patienten

An Tag 0 war die Anzahl IFN- γ -produzierender Zellen pro 250000 T-Zellen bei den Patienten nach Steroidvorbehandlung der Spender niedriger als in der Kontrollgruppe, das statistische Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht (Kontrolle $129,30 \pm 22,65$; n=22; vs. Steroide $85,91 \pm 18,20$; n=23; p=0,1431; Mann-Whitney-Test). An Tag 7 waren die Werte der vorbehandelten Patienten statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Kontrolle $99,37 \pm 22,27$; n=19; vs. Steroide $38,52 \pm 13,34$; n=23; p=0,0110; Mann-Whitney-Test) (Abb. 3.1).

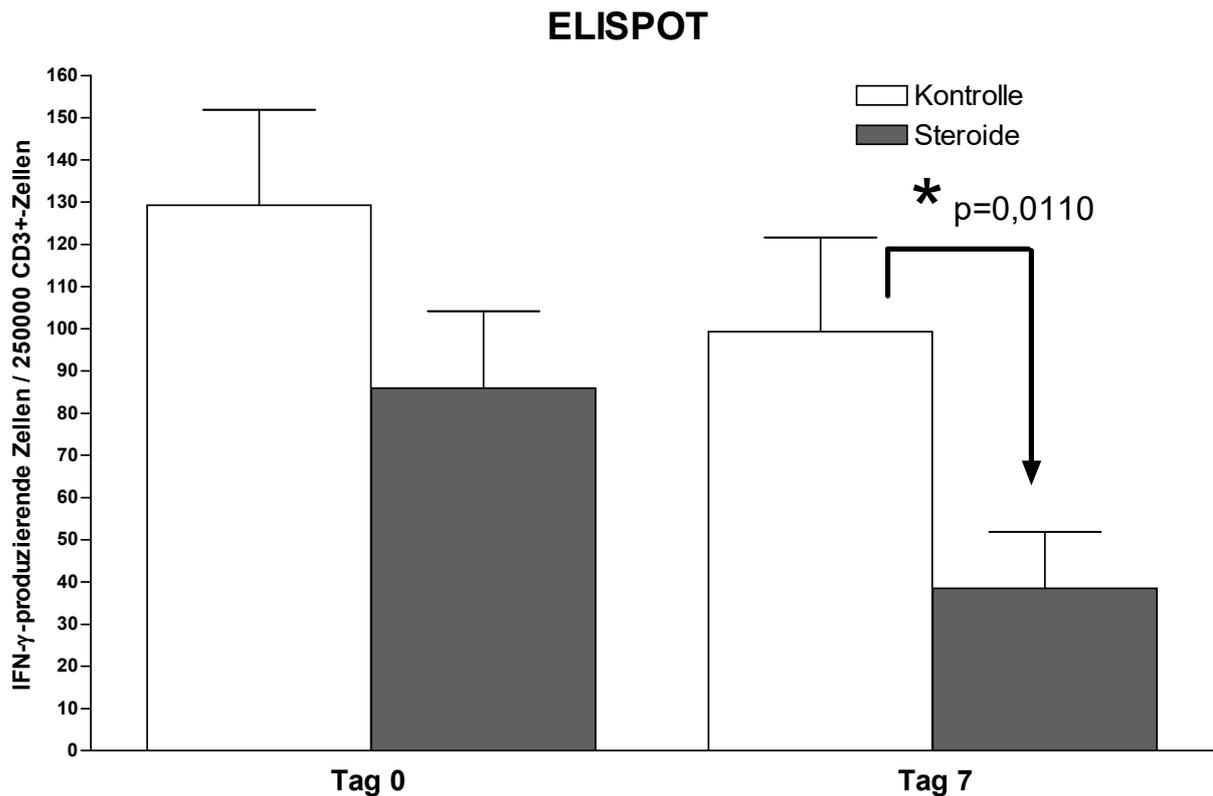


Abbildung 3.1: IFN- γ -produzierende Zellen / 250000 T-Lymphozyten, alle Patienten.

Innerhalb der Patientengruppe mit vergleichbarer Immunsuppression war der Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen an Tag 7 nicht mehr statistisch signifikant (Kontrolle $93,24 \pm 24,38$; n=17; vs. Steroide $43,65 \pm 15,04$; n=20; p=0,0584; Mann-Whitney-Test).

3.2.2 ETKAS-Patienten

Die Anzahl IFN- γ -produzierender Zellen pro 250000 CD3+-Zellen war nach Steroidvorbehandlung des Spenders bei den Patienten unter 65 Jahren sowohl an Tag 0 (Kontrolle $148,80 \pm 25,38$; n=18; vs. Steroide $42,38 \pm 11,43$; n=13; p=0,0021; t-Test) als auch an Tag 7 (Kontrolle $118,90 \pm 25,72$; n=15; vs. Steroide $32,08 \pm 20,18$; n=13; p=0,0049; Mann-Whitney-Test) statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 3.2).

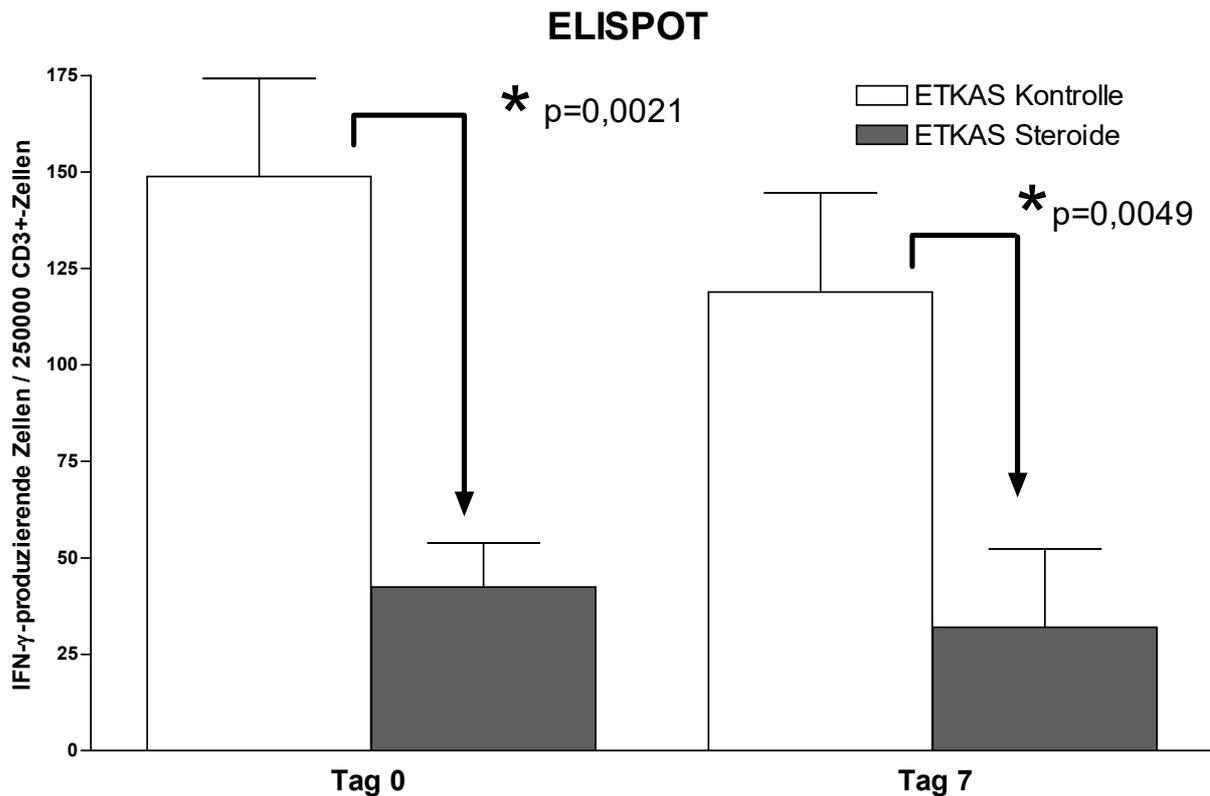


Abbildung 3.2: IFN- γ -produzierende Zellen / 250000 T-Lymphozyten, ETKAS-Patienten.

Auch beim ausschließlichen Vergleich der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 war der Unterschied statistisch signifikant (Kontrolle $113,80 \pm 29,37$; n=13; vs. Steroide $36,73 \pm 23,72$; n=11; p=0,0203; Mann-Whitney-Test).

3.2.3 ESP-Patienten

In der Gruppe der ESP-Patienten war die Anzahl der IFN- γ -produzierenden Zellen pro 250000 T-Zellen nach Steroidvorbehandlung des Spenders sowohl an Tag 0 (Kontrolle $41,25 \pm 12,61$; n=4; vs. Steroide $142,50 \pm 31,73$; n=10) als auch an Tag 7 (Kontrolle $26,25 \pm 17,54$; n=4; vs. Steroide $46,90 \pm 16,78$; n=10) nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Es fiel auf, dass die Mittelwerte der Patienten nach Steroidvorbehandlung des Spenders größer waren als die der Kontrollgruppe. An Tag 0 zeigte sich fast eine statistische Signifikanz (p=0,0539; Mann-Whitney-Test) (Abb. 3.3). Innerhalb der Patientengruppe mit vergleichbarer Immunsuppression war das Ergebnis an Tag 7 nicht signifikant unterschiedlich (Kontrolle $26,25 \pm 17,54$; n=4; vs. Steroide $52,11 \pm 17,84$; n=9).

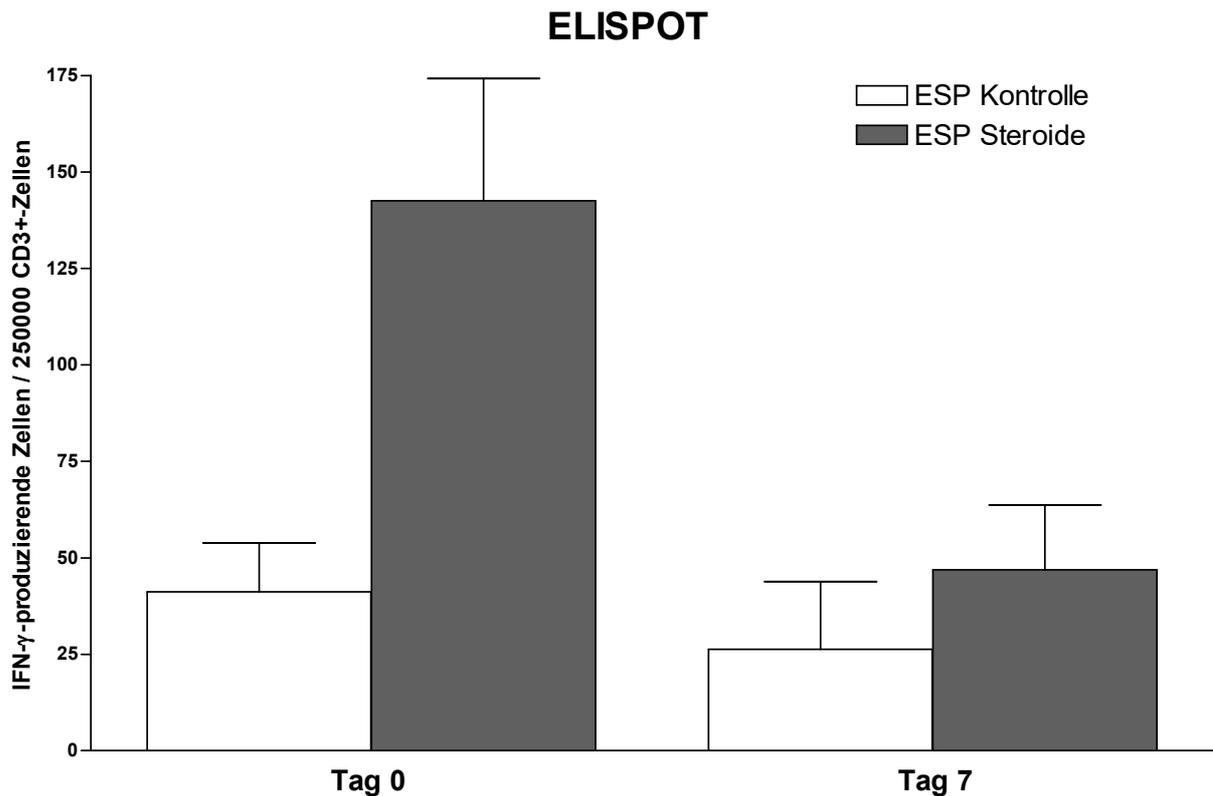


Abbildung 3.3: IFN- γ -produzierende Zellen / 250 000 T-Lymphozyten, ESP-Patienten.

3.3 Leukozyten-Typisierung

Aufgrund einer fehlerhaften Dosierung des anti-CD62L-Antikörpers wurden einige Werte von der Wertung ausgeschlossen. Da das Probenmaterial zeitnah zur Blutabnahme verwendet werden muss und nur eine begrenzte Menge an Probenmaterial zur Verfügung stand, konnten die Messungen nicht wiederholt werden. Eine erneute Probengewinnung zu einem späteren Zeitpunkt konnte aufgrund des Studiendesigns mit festgelegten Messzeitpunkten nicht durchgeführt werden. Die Behandlung mit Basiliximab führte bei einem Großteil der Patienten zu niedrigen Werten bei der durchflusszytometrischen Messung regulatorischer CD25-positiver T-Zellen.

3.3.1 Einfluss der Spendervorbehandlung

Die two-way-ANOVA-Tests wurden einerseits für das gesamte Patientenkontingent, andererseits für die Gruppe der ETKAS-Patienten durchgeführt. Die geringe Fallzahl der ESP-Patienten reichte nicht aus, um aussagekräftige Ergebnisse durch two-way-ANOVA-Tests zu erhalten.

Zusammengefasst wurde bei keiner Leukozytensubpopulation ein Einfluss der Spendervorbehandlung festgestellt, weder bei Betrachtung aller Patienten, noch in der Untergruppe der ETKAS-Patienten. In beiden Fällen wurden die two-way-ANOVA-Tests auch ausschließlich mit den Daten durchgeführt, die von Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression stammen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Spendervorbehandlung.

3.3.2 Alle Patienten

3.3.2.1 Dendritische Zellen

An Tag 0 gab es bei der Anzahl dendritischer Zellen (jeweils pro 100 000 Leukozyten) keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe ($294,4 \pm 30,0$; $n=29$) und der Gruppe nach Spendervorbehandlung ($241,9 \pm 22,4$; $n=28$). Ein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen konnte auch an Tag 7 nicht festgestellt werden (Kontrolle $124,6 \pm 15,2$; $n=27$; vs. Steroide $119,4 \pm 16,9$; $n=28$). Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression waren die Mittelwerte ebenfalls nicht unterschiedlich (Kontrolle $125,4 \pm 16,0$; $n=24$; vs. Steroide $127,2 \pm 18,0$; $n=25$).

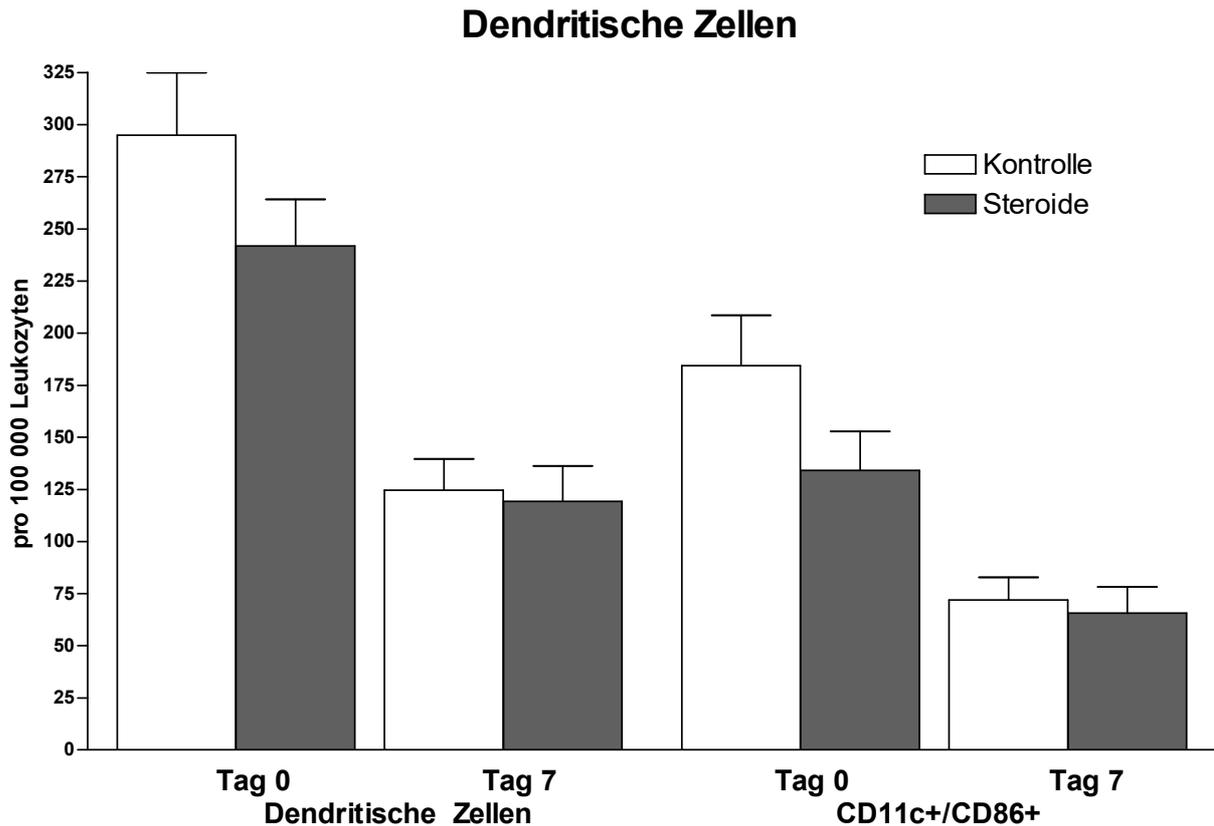


Abbildung 3.5: FACS-Analyse der dendritischen Zellen, alle Patienten.

Auch die Anzahl aktivierter dendritischer Zellen (CD11c+/CD86+) (pro 100 000 Leukozyten) zeigte weder an Tag 0 (Kontrolle $184,5 \pm 24,0$; n=28; vs. Steroide $134,0 \pm 18,7$; n=28) noch an Tag 7 (Kontrolle $72,0 \pm 11,0$; n=27; vs. Steroide $65,7 \pm 12,6$; n=28) statistisch signifikante Unterschiede. Auch der Vergleich zwischen den Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 erbrachte keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten (Kontrolle $77,8 \pm 11,9$; n=24; vs. Steroide $70,6 \pm 13,6$; n=25) (Abb. 3.5).

3.3.2.2 T-Helferzellen

Der Anteil der T-Helferzellen (CD3+/CD4+) an der Lymphozytenfraktion war sowohl an Tag 0 (Kontrolle $44,93\% \pm 1,68\%$; n=29; vs. Steroide $42,98\% \pm 2,37\%$; n=25) als auch an Tag 7 (Kontrolle $45,01\% \pm 2,26\%$; n=25; vs. Steroide $44,31\% \pm 2,73\%$; n=26) nicht unterschiedlich. Die Ergebnisse an Tag 7 unterschieden sich auch bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression nicht (Kontrolle $44,97\% \pm 2,39\%$; n=22; vs. Steroide $45,71\% \pm 2,77\%$; n=24).

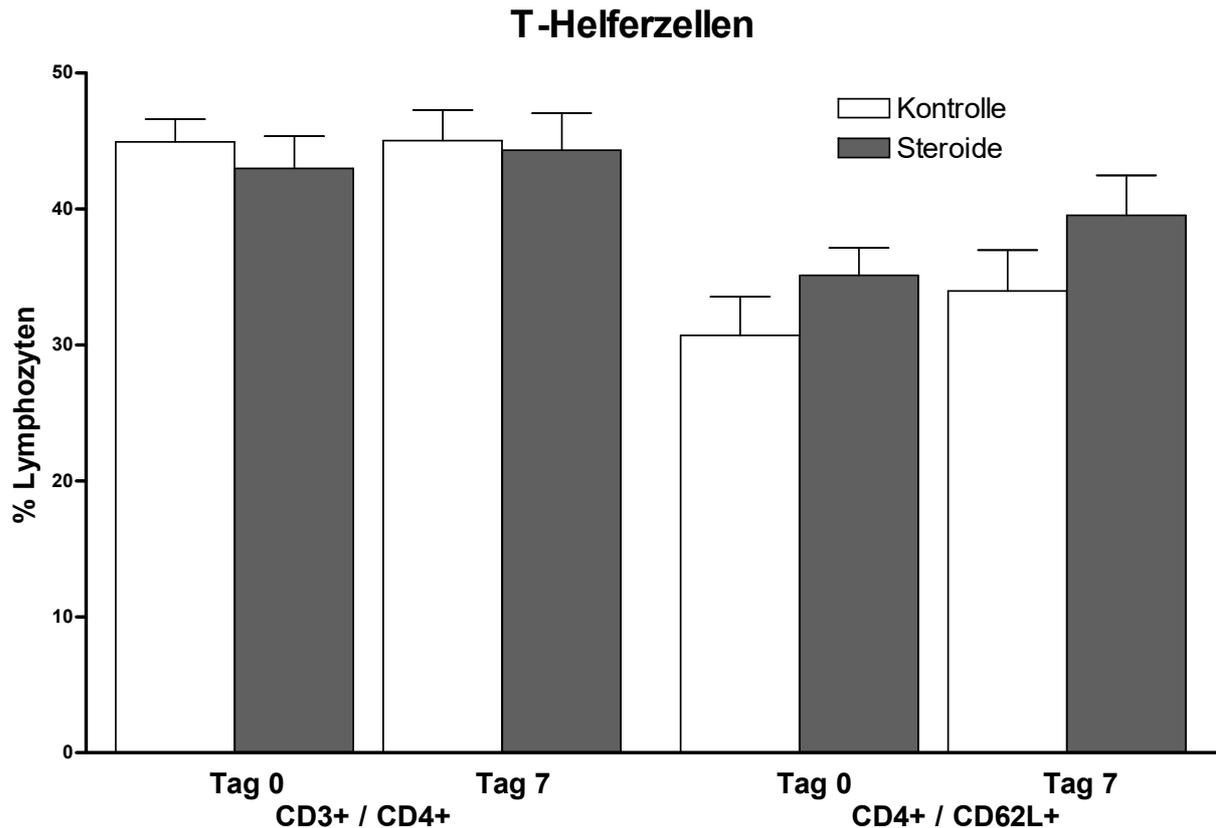


Abbildung 3.6: FACS-Analyse der T-Helferzellen, alle Patienten.

Bei den naiven T-Helferzellen (CD4+/CD62L+) konnte an Tag 0 (Kontrolle 30,71% ± 2,83%; n=15; vs. Steroide 35,11% ± 2,04%; n=21) und an Tag 7 (Kontrolle 33,97% ± 3,01%; n=14; vs. Steroide 39,53% ± 2,94%; n=18) ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen beobachtet werden. Der ausschließliche Vergleich von Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 zeigte einen grenzwertig nicht signifikant höheren Wert der CD62+-T-Helferzellen in der Gruppe nach Spendervorbehandlung (Kontrolle 33,97% ± 3,01%; n=14; vs. Steroide 41,93% ± 2,71%; n=16; p=0,0584; t-Test) (Abb. 3.6).

3.3.2.3 Zytotoxische T-Lymphozyten

Beim Anteil zytotoxischer T-Zellen (CD3+/CD8+) an der Lymphozytenfraktion konnte an Tag 0 (Kontrolle 28,16% ± 2,12%; n=29; vs. Steroide 25,25% ± 1,95%; n=24) kein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden. An Tag 7 war der Mittelwert in der Gruppe der Patienten nach Spendervorbehandlung tendenziell niedriger, eine statistische Signifikanz war jedoch auch hier nicht gegeben (Kontrolle 26,54% ±

2,14%; n=24; vs. Steroide 21,81% ± 1,62%; n=26; p=0,0818; t-Test). Bei den Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression fand sich an Tag 7 kein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen, der p-Wert liegt hier deutlicher über der Signifikanzschwelle (Kontrolle 26,24% ± 2,41%; n=21; vs. Steroide 22,11% ± 1,69%; n=24; p=0,1602; t-Test). Bei der Betrachtung der aktivierten T-Zellen (CD8+/HLA-DR+) an Tag 0 (Kontrolle 4,06% ± 0,51%; n=26; vs. Steroide 6,03% ± 0,74%; n=28; p= 0,0569; Mann-Whitney-Test) und an Tag 7 (Kontrolle 3,29% ± 0,35%; n=27; vs. Steroide 5,08% ± 0,70%; n=26; 0,0860; Mann-Whitney-Test) fanden sich zu beiden Messzeitpunkten tendenziell höhere Werte in der Gruppe mit Spendervorbehandlung. Der two-way-ANOVA-Test zeigte keinen Einfluss der Spendervorbehandlung, so dass von einem zufällig höherem Ausgangswert der Patientengruppe mit Spendervorbehandlung ausgegangen werden muss. Die Auswertung der Ergebnisse aller Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 lieferte allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten (Kontrolle 3,28% ± 0,34;% n=24; vs. Steroide 5,07% ± 0,76%; n=24) (Abb. 3.7).

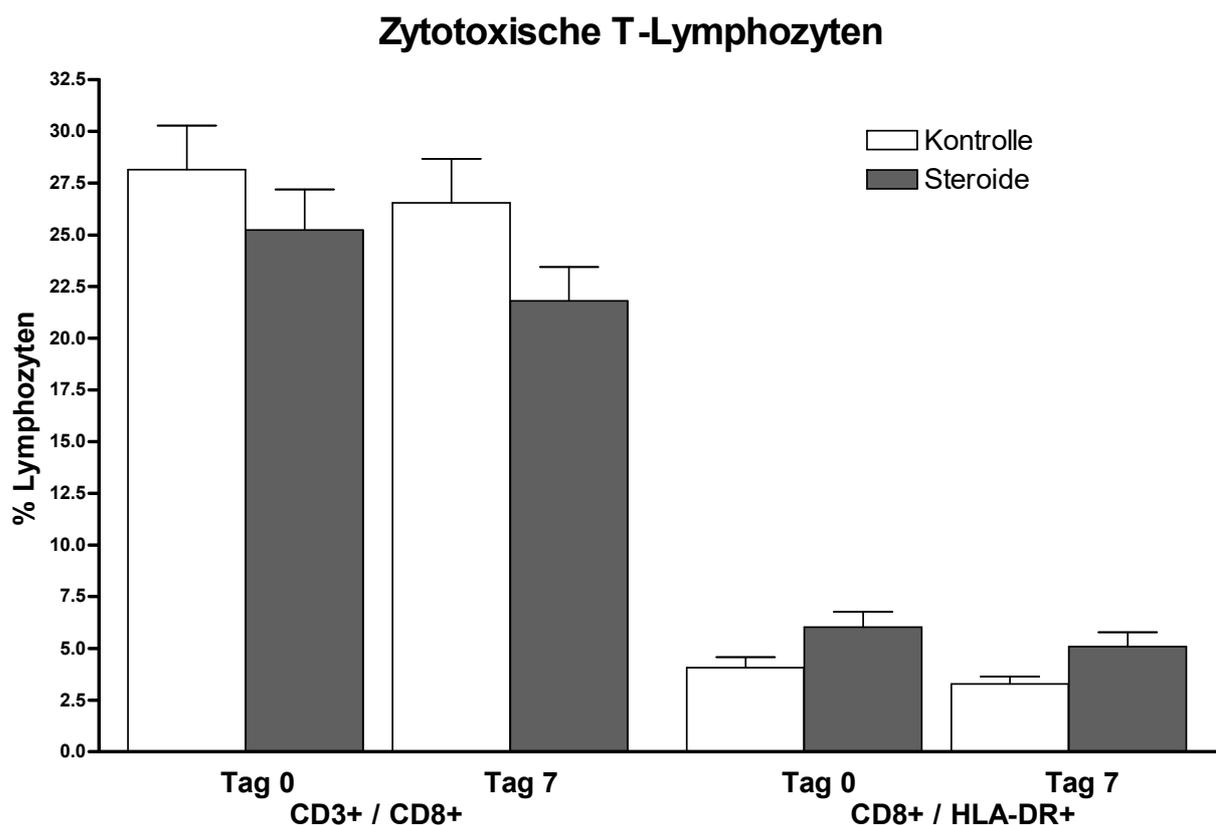


Abbildung 3.7: FACS-Analyse der zytotoxischen T-Lymphozyten, alle Patienten.

3.3.2.4 Regulatorische T-Lymphozyten

An Tag 0 war der Anteil der regulatorischen T-Helferzellen (CD4+/CD25+) an der Lymphozytenfraktion war in der Kontrollgruppe tendenziell niedriger als in der Steroidgruppe (Kontrolle 23,33% \pm 1,80%; n=29; vs. Steroide 27,73% \pm 1,62%; n=26), erreichte das Signifikanzniveau jedoch nicht ganz (p=0,0778; t-Test). An Tag 7 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kontrolle 6,26% \pm 1,96%; n=26; vs. Steroide 4,51% \pm 1,64%; n=26). Ein ähnliches Ergebnis fand sich bei ausschließlicher Analyse von Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 (Kontrolle 4,62% \pm 1,65%; n=23; vs. Steroide 4,13% \pm 1,68%; n=24). Auch nach zusätzlichem Ausschluss von Patienten, die mit Basiliximab behandelt wurden, war kein signifikanter Unterschied festzustellen (Kontrolle 6,53% \pm 2,61%; n=14; vs. Steroide 5,86% \pm 2,82%; n=14).

Die Mittelwerte der regulatorischen zytotoxischen T-Zellen (CD8+/CD25+) waren sowohl an Tag 0 (Kontrolle 4,16% \pm 0,60%; n=29; vs. Steroide 4,49% \pm 0,50%; n=26), als auch an Tag 7 (Kontrolle 1,20% \pm 0,40%; n=26; vs. Steroide 1,57% \pm 1,15%; n=26) nicht unterschiedlich. Auch bei der ausschließlichen Analyse von Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 lag kein Unterschied zwischen den Gruppen vor (Kontrolle 0,81% \pm 0,30%; n=23; vs. Steroide 1,63% \pm 1,25%; n=24). Das war auch nach Ausschluss von Patienten mit Basiliximab-Therapie der Fall (Kontrolle 1,21% \pm 0,47%; n=14; vs. Steroide 2,70% \pm 2,13%; n=14) (Abb. 3.8).

Regulatorische T-Lymphozyten

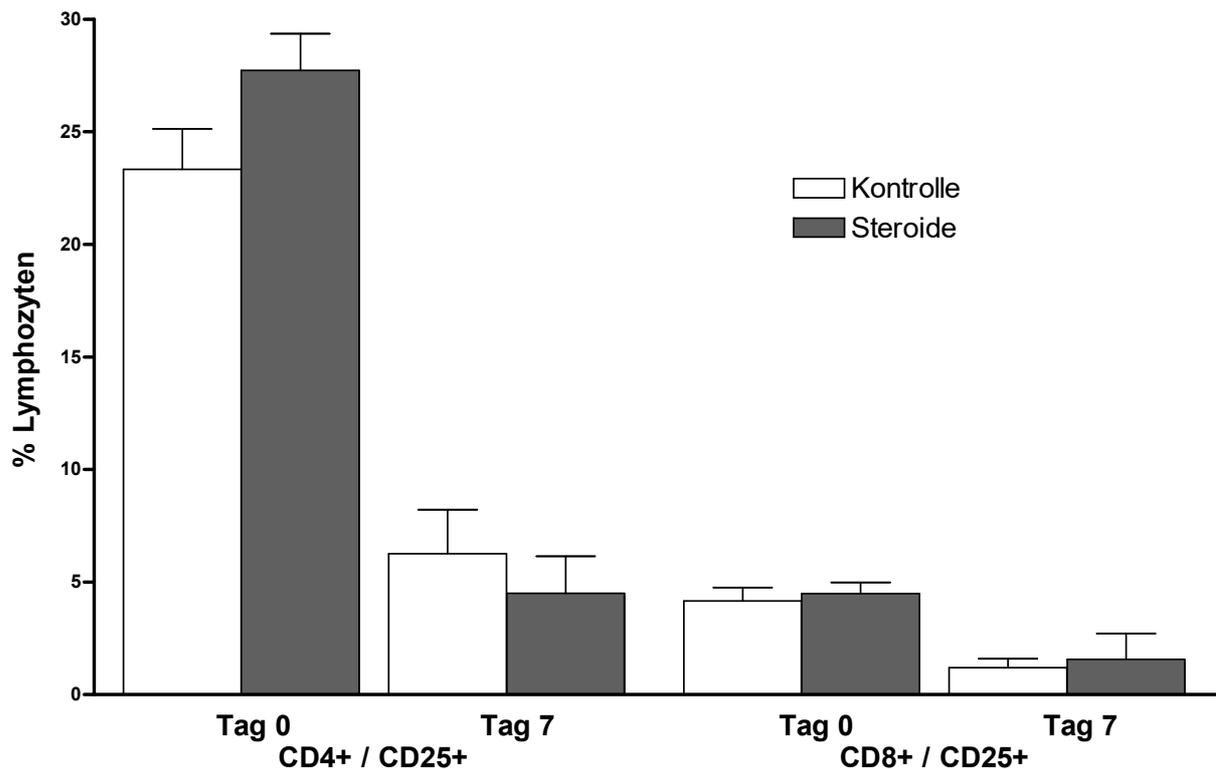


Abbildung 3.8: FACS-Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten, alle Patienten.

3.3.2.5 B-Lymphozyten

Der Anteil der B-Lymphozyten (CD19+) an der Lymphozytenfraktion zeigte an Tag 0 keinen Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (Kontrolle 8,29% ± 1,00%; n=29; vs. Steroide 7,70% ± 0,77%; n=26). Auch an Tag 7 konnte kein Unterschied festgestellt werden (Kontrolle 16,04% ± 2,46%; n=25; vs. Steroide 18,61% ± 2,92%; n=26). Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 lag auch kein Unterschied zwischen den Mittelwerten vor (Kontrolle 15,47% ± 2,60%; n=23; vs. Steroide 17,41% ± 2,98%; n=24).

Das gleiche Bild stellte sich bei den aktivierten B-Zellen (CD19+/HLA-DR+) an Tag 0 (Kontrolle 8,13% ± 1,02%; n=29; vs. Steroide 7,27% ± 0,79%; n=26) und an Tag 7 (Kontrolle 15,46% ± 2,49%; n=25; vs. Steroide 18,39% ± 2,90%; n=26) dar. Genauso lag auch bei ausschließlicher Berücksichtigung von Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor (Kontrolle 14,84% ± 2,62%; n=23; vs. Steroide 17,20% ± 2,97%; n=24) (Abb. 3.9).

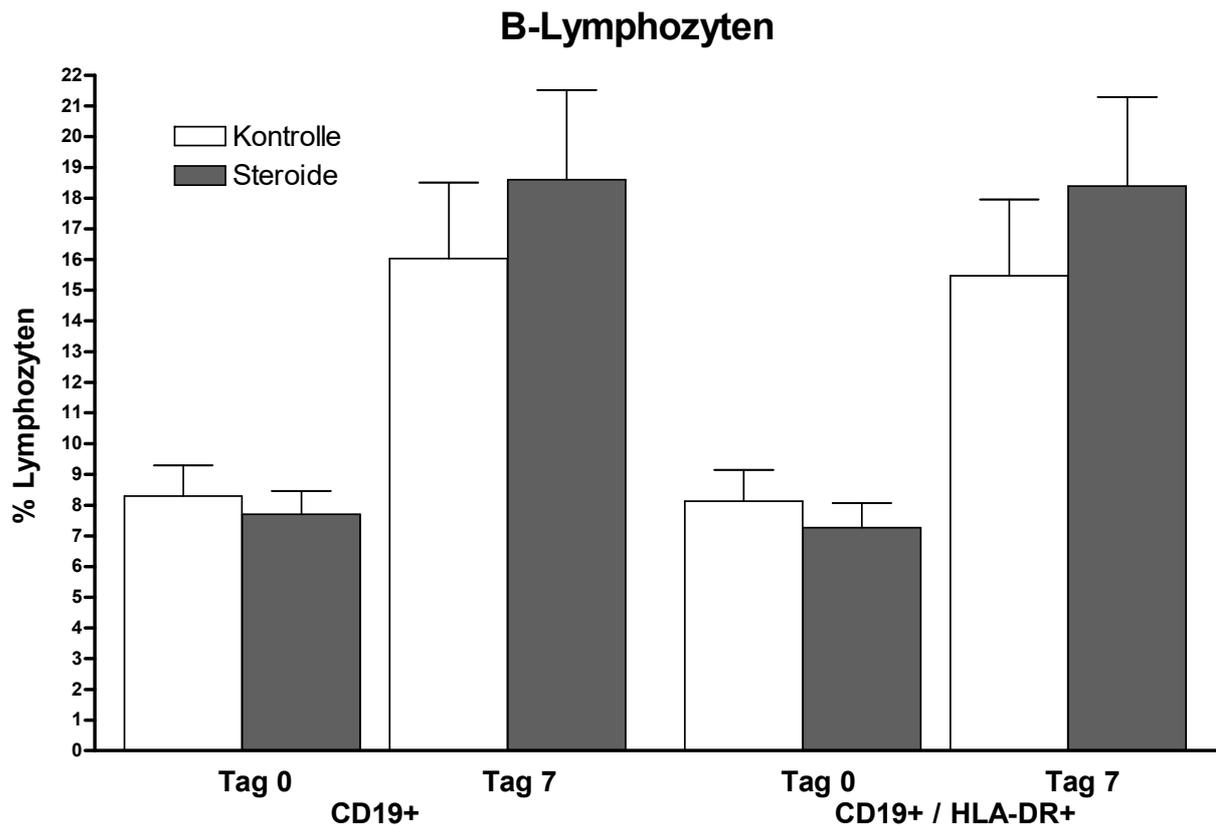


Abbildung 3.9: FACS-Analyse der B-Lymphozyten, alle Patienten.

3.3.2.6 Natürliche Killerzellen

Der Anteil der natürlichen Killerzellen (CD56+) an der Lymphozytenfraktion war sowohl an Tag 0 (Kontrolle 17,99% ± 1,47%; n=29; vs. Steroide 17,46% ± 1,99%; n=26) als auch an Tag 7 (Kontrolle 11,09% ± 1,31%; n=27; vs. Steroide 11,24% ± 1,50%; n=26) nicht unterschiedlich. Ein ähnliches Ergebnis stellte sich bei exklusiver Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 dar (Kontrolle 11,33% ± 1,37%; n=24; vs. Steroide 11,53 ± 1,60%; n=24).

Auch bei den aktivierten natürlichen Killerzellen (CD56+/CD16+) konnte weder an Tag 0 (Kontrolle 13,14% ± 1,23%; n=29; vs. Steroide 14,80% ± 1,85%; n=25) noch an Tag 7 (Kontrolle 8,32% ± 1,06%; n=26; vs. Steroide 8,96% ± 1,32%; n=25) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das Gleiche galt für die Ergebnisse der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 (Kontrolle 9,09% ± 1,09%; n=23; vs. Steroide 9,20% ± 1,40%; n=23) (Abb. 3.10).

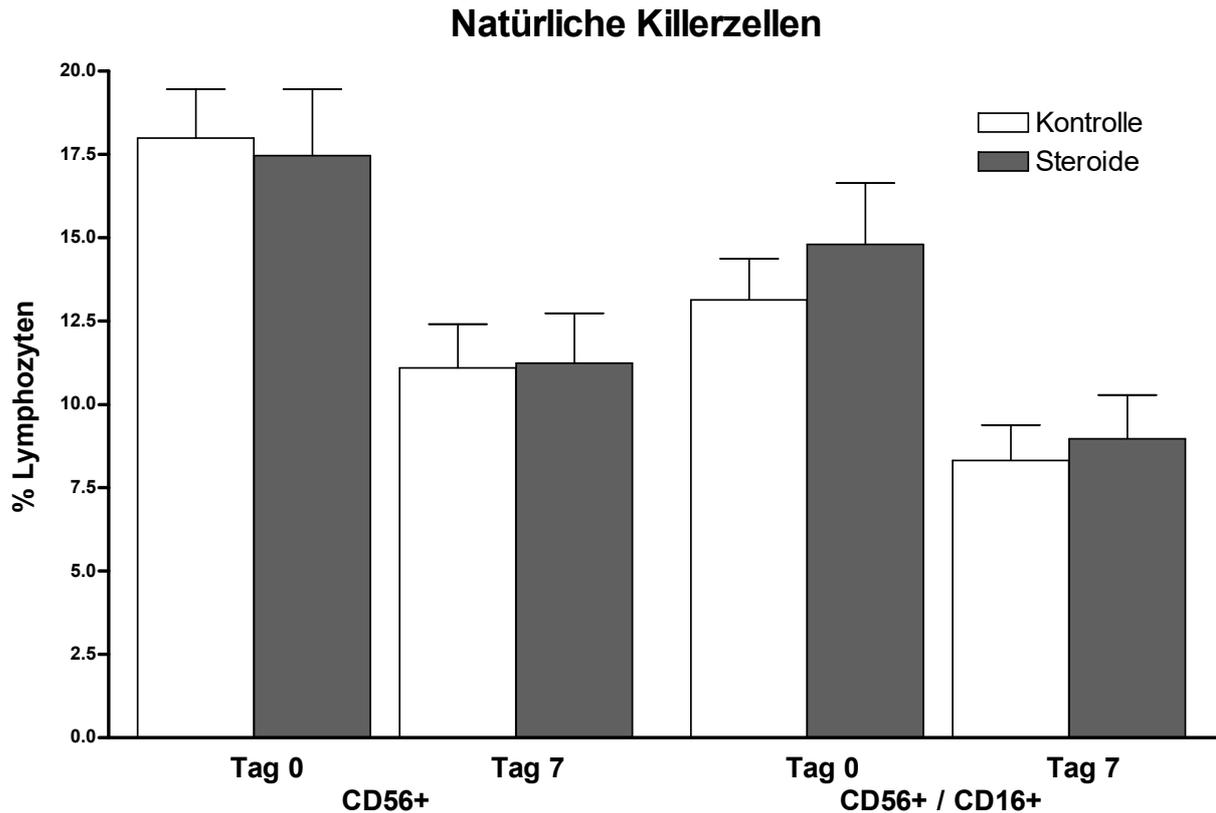


Abbildung 3.10: FACS-Analyse der natürlichen Killerzellen, alle Patienten.

3.3.3 ETKAS-Patienten

3.3.3.1 Dendritische Zellen

Die Zahl der dendritischen Zellen pro 100 000 Leukozyten zeigte sowohl an Tag 0 (Kontrolle $286,0 \pm 31,4$; $n=24$; vs. Steroide $256,6 \pm 29,4$; $n=17$) als auch an Tag 7 (Kontrolle $137,4 \pm 16,0$; $n=22$; vs. Steroide $128,2 \pm 23,1$; $n=17$) keine signifikanten Unterschiede. Auch die Anzahl der aktivierten dendritischen Zellen (CD11c+/CD86+) pro 100 000 Leukozyten war weder an Tag 0 (Kontrolle $178,9 \pm 27,5$; $n=23$; vs. Steroide $142,1 \pm 26,5$; $n=17$) noch an Tag 7 (Kontrolle $78,6 \pm 11,9$; $n=22$; vs. Steroide $75,4 \pm 18,5$; $n=17$) statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 3.11).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 bestand ebenso kein Unterschied zwischen den Mittelwerten, weder bei den Mittelwerten aller dendritischen Zellen (Kontrolle $140,5 \pm 16,7$; $n=19$; vs. Steroide $137,9 \pm 24,6$; $n=15$), noch bei den Mittelwerten der aktivierten dendritischen Zellen (Kontrolle $87,0 \pm 12,7$; $n=19$; vs. Steroide $80,9 \pm 20,3$; $n=15$).

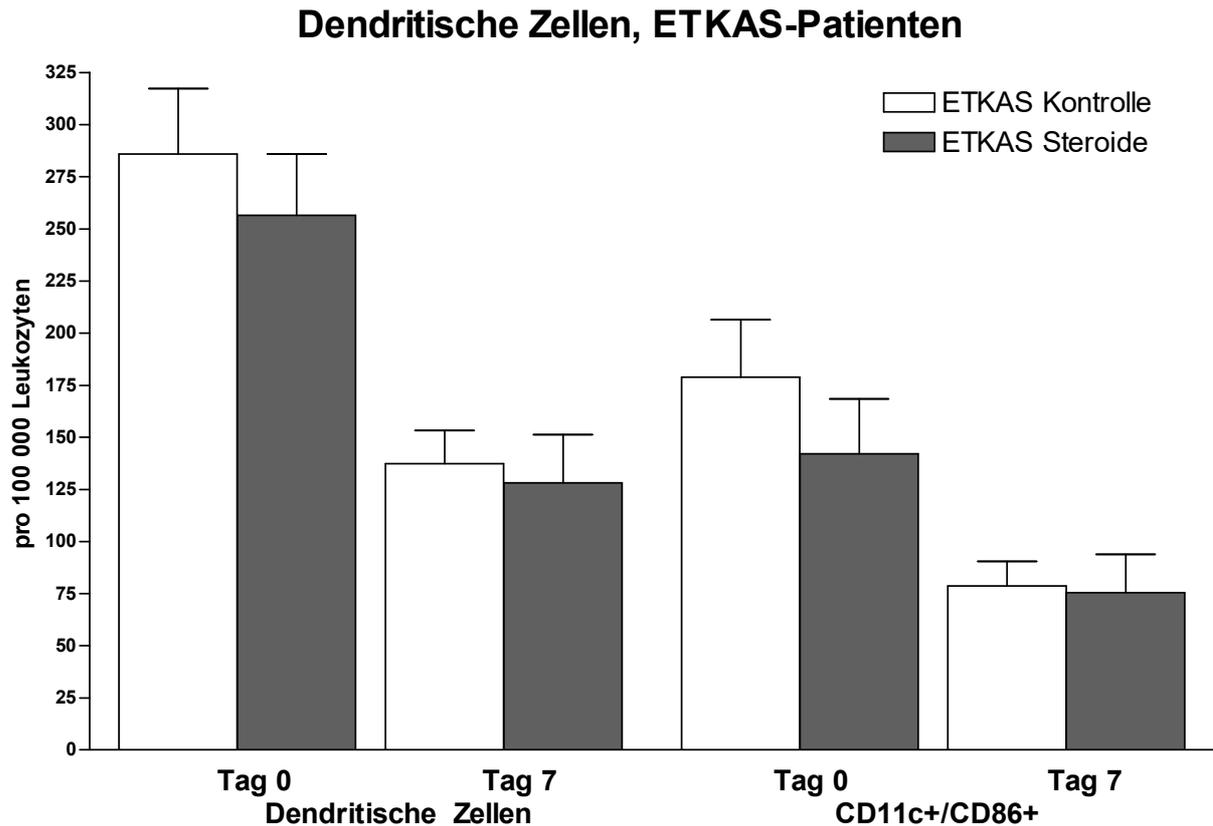


Abbildung 3.11: FACS-Analyse der dendritischen Zellen, ETKAS-Patienten.

3.3.3.2 T-Helferzellen

Der Anteil der T-Helferzellen (CD3+/CD4+) an der Gesamtlymphozytenzahl war sowohl an Tag 0 (Kontrolle 44,36% ± 1,84%; n=24; vs. Steroide 45,85% ± 2,77%; n=15) als auch an Tag 7 (Kontrolle 45,30% ± 2,58%; n=20; vs. Steroide 44,95% ± 3,50%; n=15) nicht unterschiedlich. Auch bei den Mittelwerten der CD62L+-T-Helferzellen (CD4+/CD62L+) fanden sich weder an Tag 0 (Kontrolle 31,49% ± 3,55%; n=10; vs. Steroide 36,20% ± 2,54%; n=15) noch an Tag 7 (Kontrolle 37,76% ± 3,64%; n=9; vs. Steroide 40,63% ± 3,48%; n=12) statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 3.12).

Zwischen den Patientengruppen mit vergleichbarer Immunsuppression lag an Tag 7 ebenfalls weder bei den Mittelwerten der T-Helferzellen (Kontrolle 45,29% ± 2,77%; n=17; vs. Steroide 46,11% ± 3,54%; n=14) noch bei den Mittelwerten der CD62L+-T-Helferzellen (Kontrolle 37,76% ± 3,64%; n=9; vs. Steroide 42,95% ± 2,83%; n=11) ein signifikanter Unterschied vor.

T-Helferzellen, ETKAS-Patienten

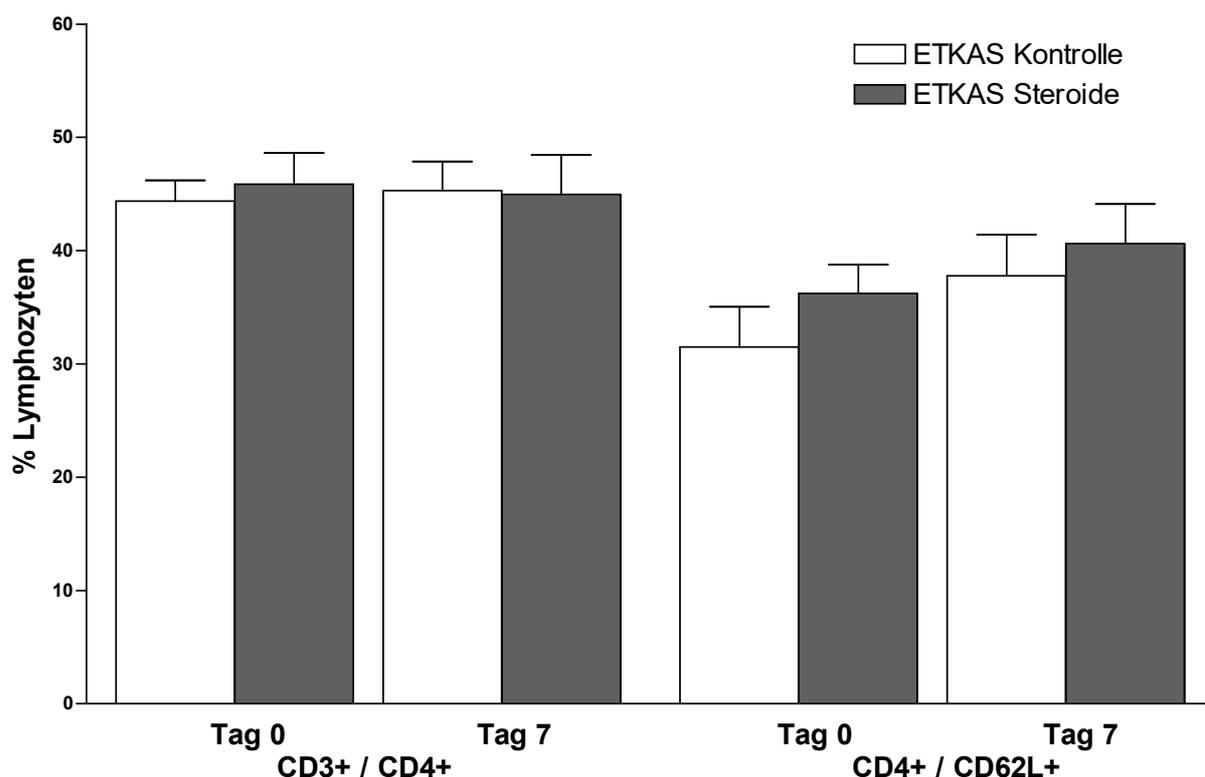


Abbildung 3.12: FACS-Analyse der T-Helferzellen, ETKAS-Patienten.

3.3.3.3 Zytotoxische T-Lymphozyten

Der Anteil der zytotoxischen T-Lymphozyten (CD3+/CD8+) an der Lymphozytenfraktion zeigte sowohl an Tag 0 (Kontrolle 27,15% ± 2,04%; n=24; vs. Steroide 25,03% ± 2,35%; n=15) als auch an Tag 7 (Kontrolle 24,83% ± 2,27%; n=19; vs. Steroide 21,19% ± 1,97%; n=15) keine signifikanten Unterschiede. Auch die Mittelwerte der aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+/HLA-DR+) waren weder an Tag 0 (Kontrolle 4,12% ± 0,59%; n=22; vs. Steroide 4,40% ± 0,72%; n=17) noch an Tag 7 (Kontrolle 3,29% ± 0,39%; n=22; vs. Steroide 3,80% ± 0,77%; n=15) statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 3.13).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression lag an Tag 7 ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten der zytotoxischen T-Lymphozyten (Kontrolle 24,12% ± 2,61%; n=16; vs. Steroide 21,92% ± 1,97%; n=14) noch zwischen den Mittelwerten der aktivierten T-Lymphozyten (Kontrolle 3,29% ± 0,37%; n=19; vs. Steroide 3,76% ± 0,83%; n=14) ein signifikanter Unterschied vor.

Zytotoxische T-Lymphozyten, ETKAS-Patienten

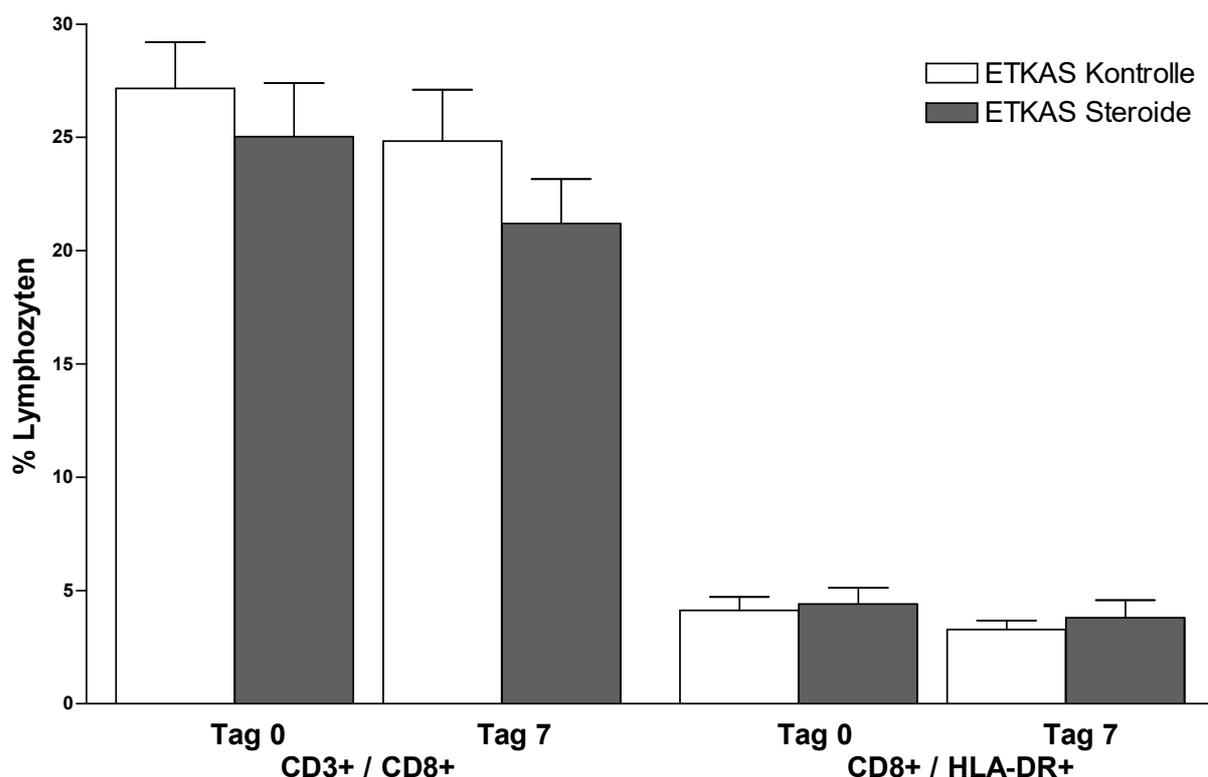


Abbildung 3.13: FACS-Analyse der zytotoxischen T-Lymphozyten, ETKAS-Patienten.

3.3.3.4 Regulatorische T-Lymphozyten

Der Anteil der regulatorischen T-Helferzellen (CD4+/CD25+) an der Lymphozytenfraktion war sowohl an Tag 0 (Kontrolle 23,30% ± 2,12%; n=24; vs. Steroide 27,44% ± 2,14%; n=17) als auch an Tag 7 (Kontrolle 7,57% ± 2,35%; n=21; vs. Steroide 6,27% ± 2,76%; n=15) nicht unterschiedlich. Auch bei den Mittelwerten der regulatorischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+/CD25+) fanden sich weder an Tag 0 (Kontrolle 4,30% ± 0,71%; n=24; vs. Steroide 4,32% ± 0,54%; n=17) noch an Tag 7 (Kontrolle 1,45% ± 0,48%; n=21; vs. Steroide 2,56% ± 1,99%; n=15) statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 3.14).

Innerhalb der Patientengruppen mit vergleichbarer Immunsuppression lag an Tag 7 ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten der regulatorischen T-Helferzellen (Kontrolle 5,69% ± 2,05%; n=18; vs. Steroide 5,46% ± 2,83%; n=14) noch zwischen den Mittelwerten der regulatorischen zytotoxischen T-Lymphozyten (Kontrolle 0,93% ± 0,37%; n=18; vs. Steroide 2,63% ± 2,13%; n=14) ein signifikanter Unterschied vor. Auch nach Ausschluss der Patienten, die mit Basiliximab behandelt wurden, waren sowohl zwischen den Werten der regulatorischen T-Helferzellen (Kontrolle 9,73% ± 3,69%; n=9;

vs. Steroide $6,62\% \pm 3,96\%$; $n=10$) als auch zwischen den Werten der regulatorischen zytotoxischen T-Lymphozyten (Kontrolle $1,81\% \pm 0,65\%$; $n=9$; vs. Steroide $3,60\% \pm 2,97\%$; $n=10$) keine Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen.

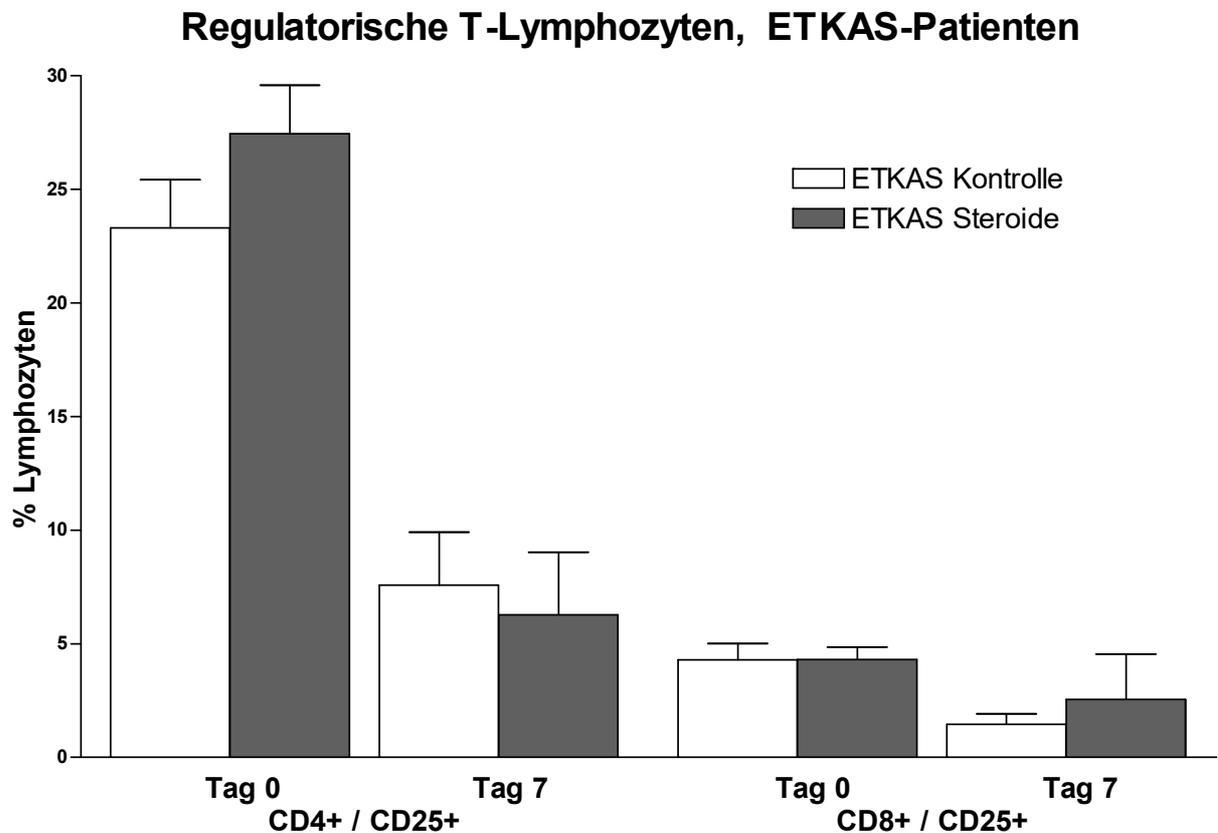


Abbildung 3.14: FACS-Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten, ETKAS-Patienten.

3.3.3.5 B-Lymphozyten

An Tag 0 zeigte der Anteil der B-Lymphozyten (CD19+) an der Lymphozytenfraktion keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen (Kontrolle $8,70\% \pm 1,15\%$; $n=24$; vs. Steroide $7,83\% \pm 1,06\%$; $n=15$). Dasselbe galt auch für die Mittelwerte an Tag 7 (Kontrolle $17,03\% \pm 2,95\%$; $n=20$; vs. Steroide $20,26\% \pm 4,36\%$; $n=16$). Der Anteil der aktivierten B-Lymphozyten (CD19+/HLA-DR+) war weder an Tag 0 (Kontrolle $8,53\% \pm 1,18\%$; $n=24$; vs. Steroide $7,24\% \pm 1,14\%$; $n=15$) noch an Tag 7 (Kontrolle $16,37\% \pm 2,99\%$; $n=20$; vs. Steroide $20,10\% \pm 4,35\%$; $n=16$) statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 3.15).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression lag an Tag 7 ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten aller B-Lymphozyten (Kontrolle $16,42\% \pm 3,17\%$; $n=18$; vs. Steroide $18,76\% \pm 4,38\%$; $n=15$) noch zwischen den

Mittelwerten der aktivierten B-Lymphozyten (Kontrolle $15,68\% \pm 3,22\%$; $n=18$; vs. Steroide $18,62\% \pm 4,38\%$; $n=15$) ein signifikanter Unterschied vor.

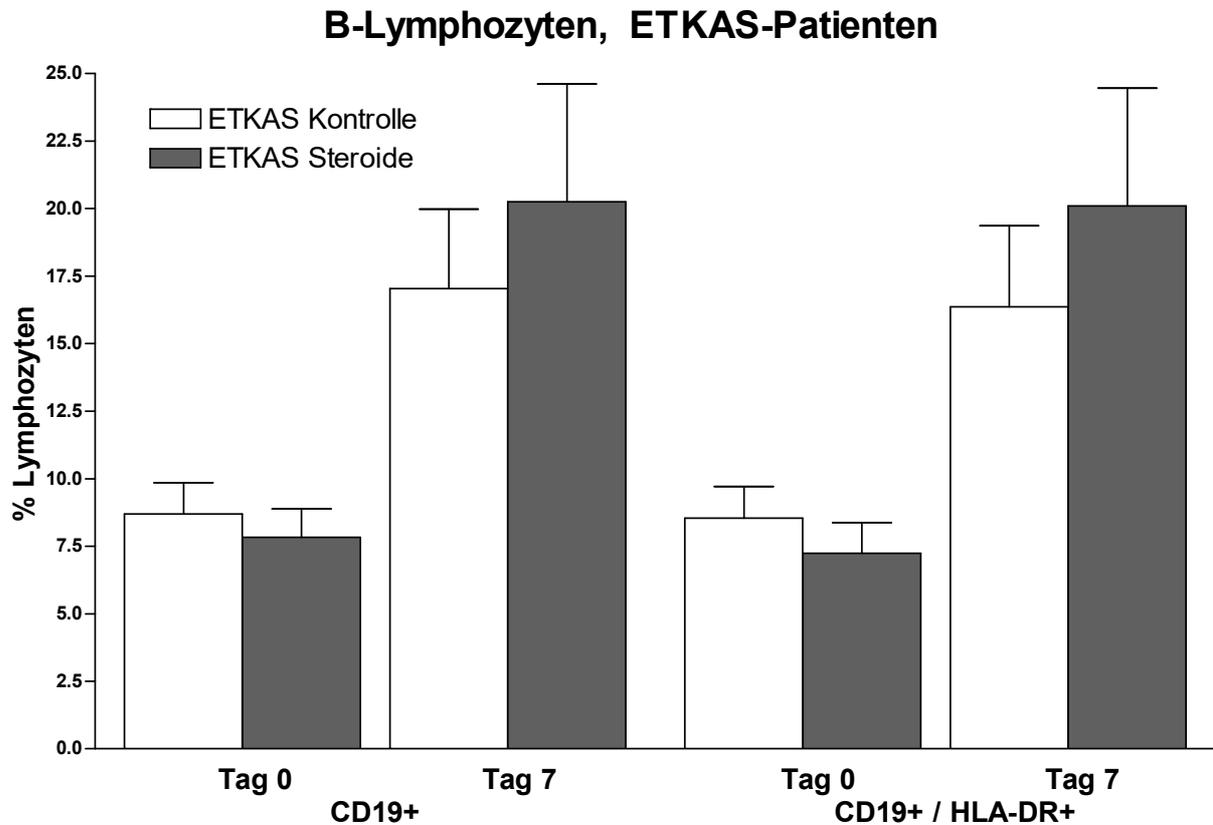


Abbildung 3.15: FACS-Analyse der B-Lymphozyten, ETKAS-Patienten.

3.3.3.6 Natürliche Killerzellen

Der Anteil der natürlichen Killerzellen (CD56+) an der Lymphozytenfraktion war an Tag 0 statistisch in der Gruppe nach Spendervorbehandlung nicht signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, der p-Wert war jedoch grenzwertig (Kontrolle $18,59\% \pm 1,62\%$; $n=24$; vs. Steroide $14,02\% \pm 2,26\%$; $n=15$; $p=0,0550$; Mann-Whitney-Test). An Tag 7 (Kontrolle $11,12\% \pm 1,53\%$; $n=22$; vs. Steroide $8,32\% \pm 1,26\%$; $n=16$) war diese Tendenz nicht mehr zu erkennen. Bei den Mittelwerten der aktivierten natürlichen Killerzellen (CD56+/CD16+) fanden sich weder an Tag 0 (Kontrolle $13,42\% \pm 1,38\%$; $n=24$; vs. Steroide $11,98\% \pm 2,07\%$; $n=15$) noch an Tag 7 (Kontrolle $8,27\% \pm 1,23\%$; $n=21$; vs. Steroide $6,75\% \pm 1,10\%$; $n=16$) statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 3.16).

Die Patientengruppen mit vergleichbarer Immunsuppression wiesen an Tag 7 ebenfalls keine unterschiedlichen Mittelwerte auf, weder zwischen den Mittelwerten aller natürlichen Killerzellen (Kontrolle $11,42\% \pm 1,63\%$; $n=19$; vs. Steroide $8,54\% \pm 1,32\%$;

n=15) noch zwischen den Mittelwerten der aktivierten natürlichen Killerzellen (Kontrolle $9,25\% \pm 1,29\%$; n=18; vs. Steroide $7,00\% \pm 1,15\%$; n=15).

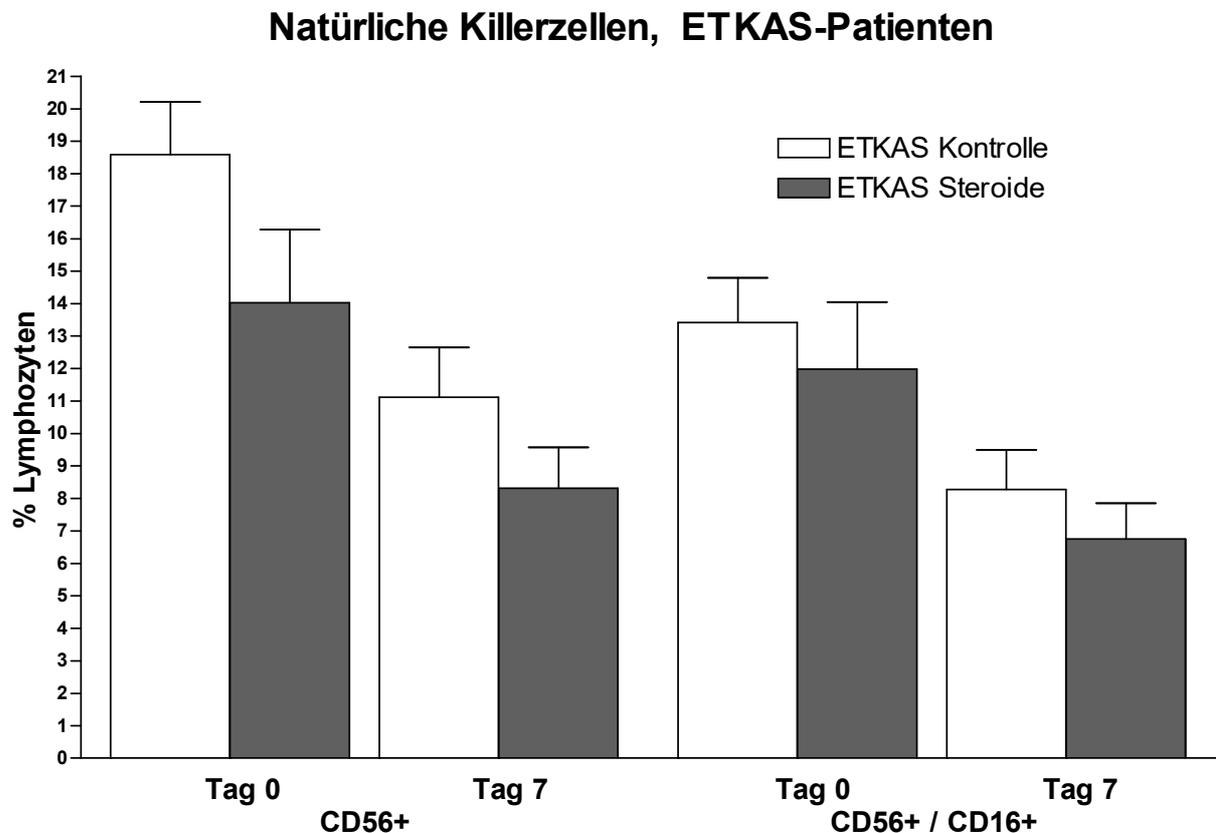


Abbildung 3.16: FACS-Analyse der natürlichen Killerzellen, ETKAS-Patienten.

3.3.4 ESP-Patienten

3.3.4.1 Dendritische Zellen

Die Mittelwerte aller dendritischen Zellen pro 100000 Leukozyten waren sowohl an Tag 0 (Kontrolle $337,6 \pm 94,2$; n=5; vs. Steroide $219,1 \pm 35,1$; n=11) und an Tag 7 (Kontrolle $68,2 \pm 35,3$; n=5; vs. Steroide $105,9 \pm 24,5$; n=11) nicht unterschiedlich. Bei den aktivierten dendritischen Zellen (CD11c+/CD86+) lag ebenso weder an Tag 0 (Kontrolle $210,4 \pm 49,0$; n=5; vs. Steroide $121,6 \pm 25,6$; n=11) noch an Tag 7 (Kontrolle $42,8 \pm 26,9$; n=5; vs. Steroide $50,64 \pm 14,47$; n=11) ein signifikanter Unterschied vor (Abb. 3.17).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression lagen an Tag 7 ebenso weder bei den Mittelwerten aller dendritischen Zellen (Kontrolle $68,2 \pm 35,3$; n=5; vs. Steroide $111,2 \pm 26,5$; n=10) noch bei den Mittelwerten der aktivierten dendritischen Zellen (Kontrolle $42,8 \pm 26,9$; n=5; vs. Steroide $55,3 \pm 15,2$; n=10) statistisch signifikante Unterschiede vor.

Dendritische Zellen, ESP-Patienten

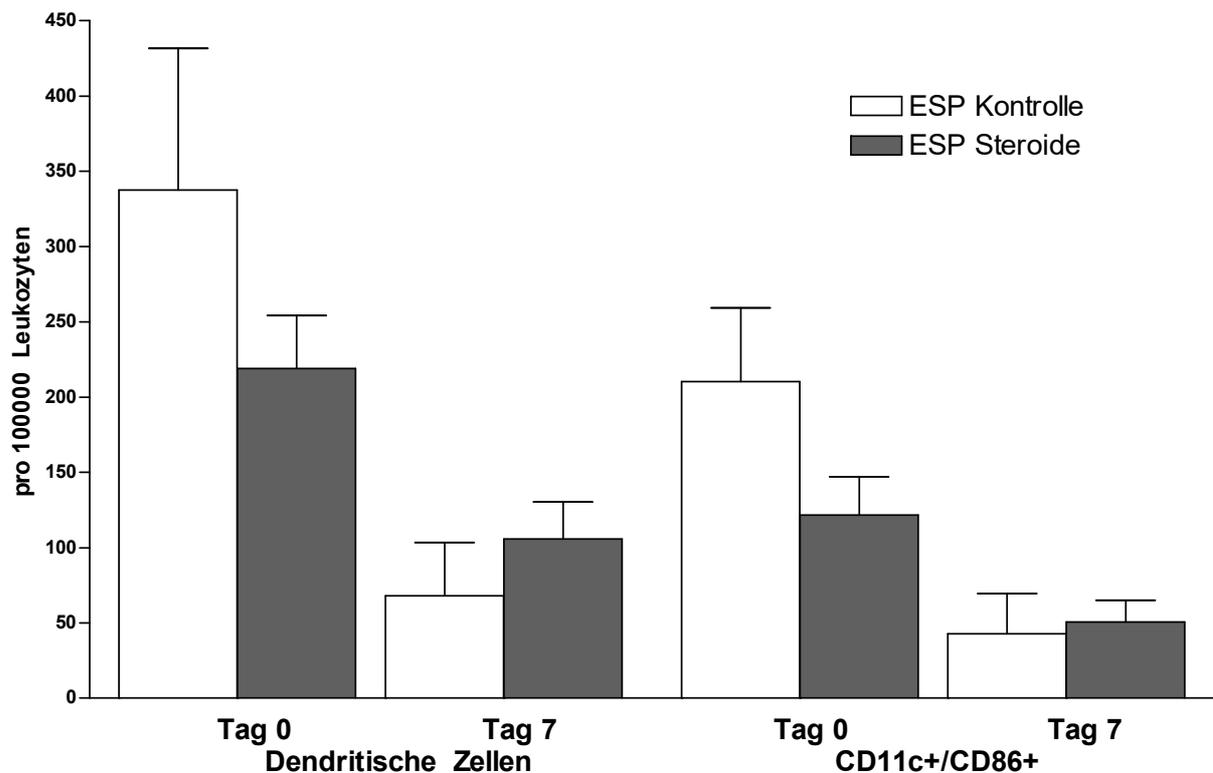


Abbildung 3.17: FACS-Analyse der dendritischen Zellen, ESP-Patienten.

3.3.4.2 T-Helferzellen

An Tag 0 bestand zwischen den Anteilen der T-Helferzellen (CD3+/CD4+) an der Lymphozytenfraktion kein Unterschied zwischen den Patientengruppen (Kontrolle $47,65\% \pm 4,35\%$; $n=5$; vs. Steroide $38,67\% \pm 4,03\%$; $n=10$). Auch an Tag 7 war dies der Fall (Kontrolle $43,87\% \pm 5,19\%$; $n=5$; vs. Steroide $43,44\% \pm 4,53\%$; $n=11$).

Bei den Mittelwerten der CD62L+-T-Helferzellen (CD4+/CD62L+) fanden sich an Tag 0 (Kontrolle $29,15\% \pm 5,15\%$; $n=5$; vs. Steroide $32,39\% \pm 3,28\%$; $n=6$) und an Tag 7 (Kontrolle $27,13\% \pm 4,09\%$; $n=5$; vs. Steroide $37,33\% \pm 5,79\%$; $n=6$) auch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.18).

Der Vergleich der Mittelwerte bei Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an war an Tag 7 genauso weder bei allen T-Helferzellen (Kontrolle $44,86\% \pm 4,35\%$; $n=6$; vs. Steroide $44,63\% \pm 5,16\%$; $n=9$) noch bei den CD62L+-T-Helferzellen (Kontrolle $27,13\% \pm 4,09\%$; $n=5$; vs. Steroide $39,68\% \pm 6,47\%$; $n=5$) statistisch signifikant unterschiedlich.

T-Helferzellen, ESP-Patienten

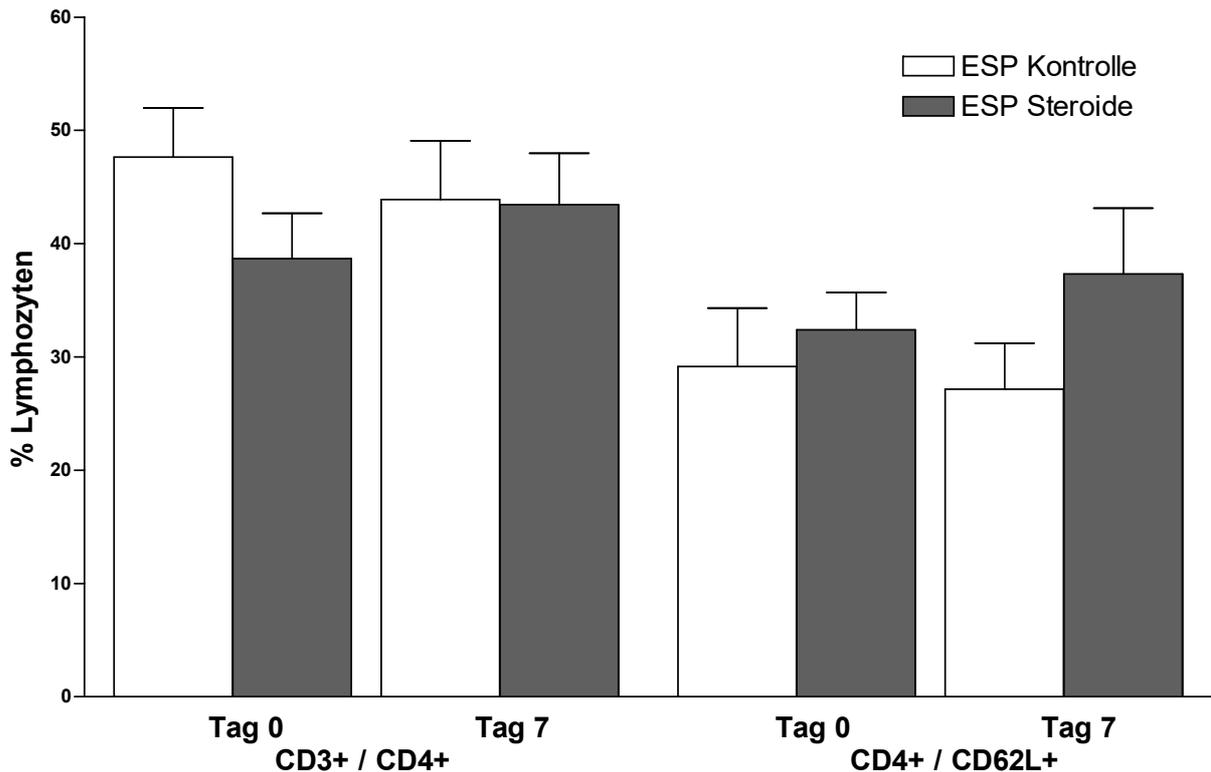


Abbildung 3.18: FACS-Analyse der T-Helferzellen, ESP-Patienten.

3.3.4.3 Zytotoxische T-Lymphozyten

Der Anteil zytotoxischer T-Lymphozyten (CD3+/CD8+) an der Lymphozytenfraktion war sowohl an Tag 0 (Kontrolle 32,97% ± 7,76%; n=5; vs. Steroide 25,60% ± 3,60%; n=9) nicht signifikant. An Tag 7 war eine Tendenz zu erkennen (Kontrolle 33,04% ± 5,03%; n=5; vs. Steroide 22,66% ± 2,83%; n=11; p=0,0700; Mann-Whitney-Test) nicht signifikant. Die aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+/HLA-DR+) der Kontrollgruppe hatten an Tag 0 einen statistisch signifikant geringeren Anteil an der Lymphozytenfraktion (Kontrolle 3,77% ± 0,94%; n=4; vs. Steroide 8,55% ± 1,20%; n=11; p=0,0431; Mann-Whitney-Test). An Tag 7 wurde die Signifikanzschwelle nicht erreicht (Kontrolle 3,27% ± 0,92%; n=5; vs. Steroide 6,83% ± 1,12%; n=11; p=0,0542; Mann-Whitney-Test) (Abb. 3.19). Hierbei ist insbesondere an Tag 0 die geringe Patientenzahl in der Kontrollgruppe zu berücksichtigen.

Innerhalb der Patientengruppen mit vergleichbarer Immunsuppression war die Fraktion der zytotoxischen T-Lymphozyten an Tag 7 in der Gruppe nach Spendervorbehandlung tendenziell niedriger als in der Kontrollgruppe, die statistische Signifikanz wurde jedoch

nicht erreicht (Kontrolle $33,04\% \pm 5,03\%$; $n=5$; vs. Steroide $22,38\% \pm 3,12\%$; $n=10$; $p=0,0753$; Mann-Whitney-Test). Die Mittelwerte der aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten an Tag 7 zeigten bei den Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression ein ähnliches Ergebnis (Kontrolle $3,27\% \pm 0,92\%$; $n=5$; vs. Steroide $6,90\% \pm 1,24\%$; $n=11$; $p=0,0753$; Mann-Whitney-Test).

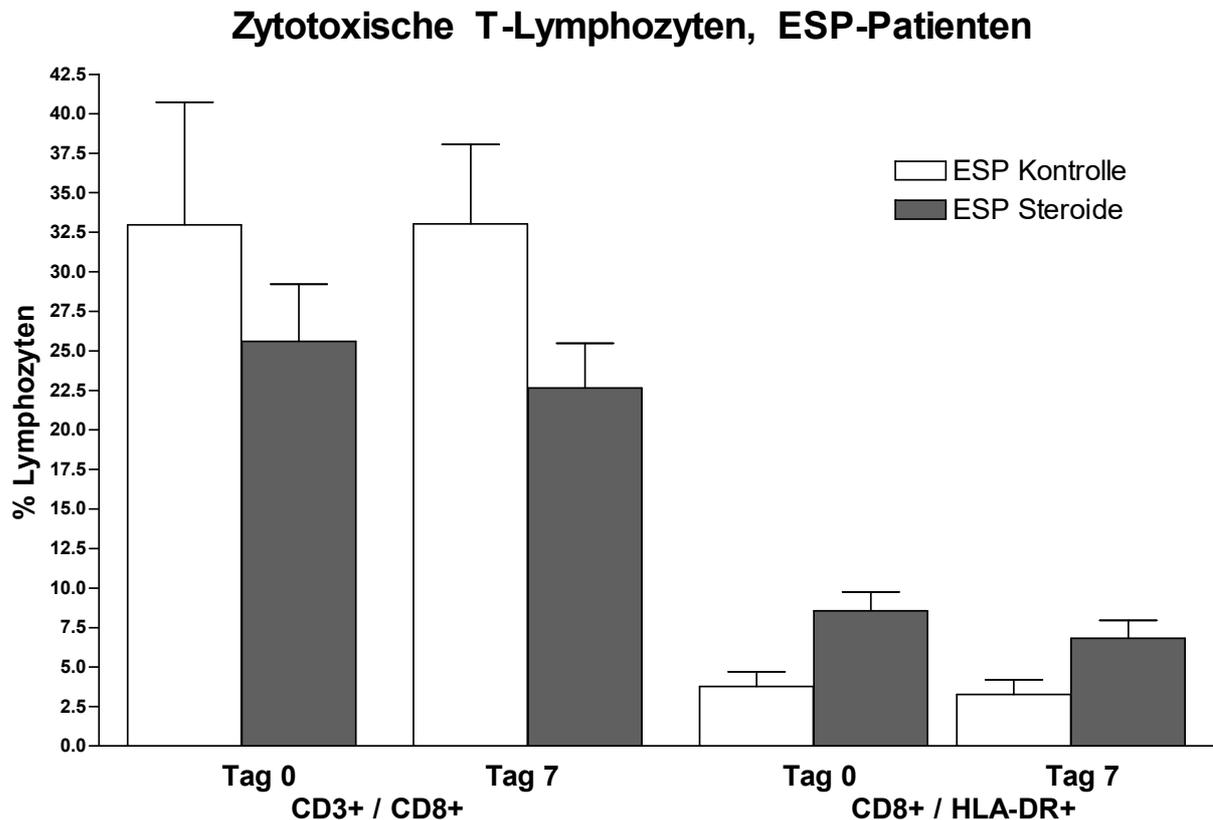


Abbildung 3.19: FACS-Analyse der zytotoxischen T-Lymphozyten, ESP-Patienten.

3.3.4.4 Regulatorische T-Lymphozyten

Die Mittelwerte der regulatorischen T-Helferzellen (CD4+/CD25+) waren sowohl an Tag 0 (Kontrolle $23,50\% \pm 2,91\%$; $n=5$; vs. Steroide $28,30\% \pm 2,53\%$; $n=9$) und an Tag 7 (Kontrolle $0,77\% \pm 0,44\%$; $n=5$; vs. Steroide $2,10\% \pm 0,65\%$; $n=11$) nicht signifikant unterschiedlich. Der Anteil regulatorischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8+/CD25+) an Tag 0 (Kontrolle $3,47\% \pm 0,62\%$; $n=5$; vs. Steroide $4,82\% \pm 1,06\%$; $n=9$) und an Tag 7 (Kontrolle $0,14\% \pm 0,08\%$; $n=5$; vs. Steroide $0,22\% \pm 0,08\%$; $n=11$) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (Abb. 3.20).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression lag an Tag 7 ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten der regulatorischen T-Helferzellen (Kontrolle $0,77\% \pm 0,44\%$; $n=5$; vs. Steroide $2,27\% \pm 0,70\%$; $n=10$) noch zwischen den

Mittelwerten der regulatorischen zytotoxischen T-Lymphozyten (Kontrolle $0,14\% \pm 0,08\%$; $n=5$; vs. Steroide $0,24\% \pm 0,03\%$; $n=10$) ein signifikanter Unterschied vor. Nach Ausschluss von Patienten, die eine Basiliximab-Therapie erhielten, war der

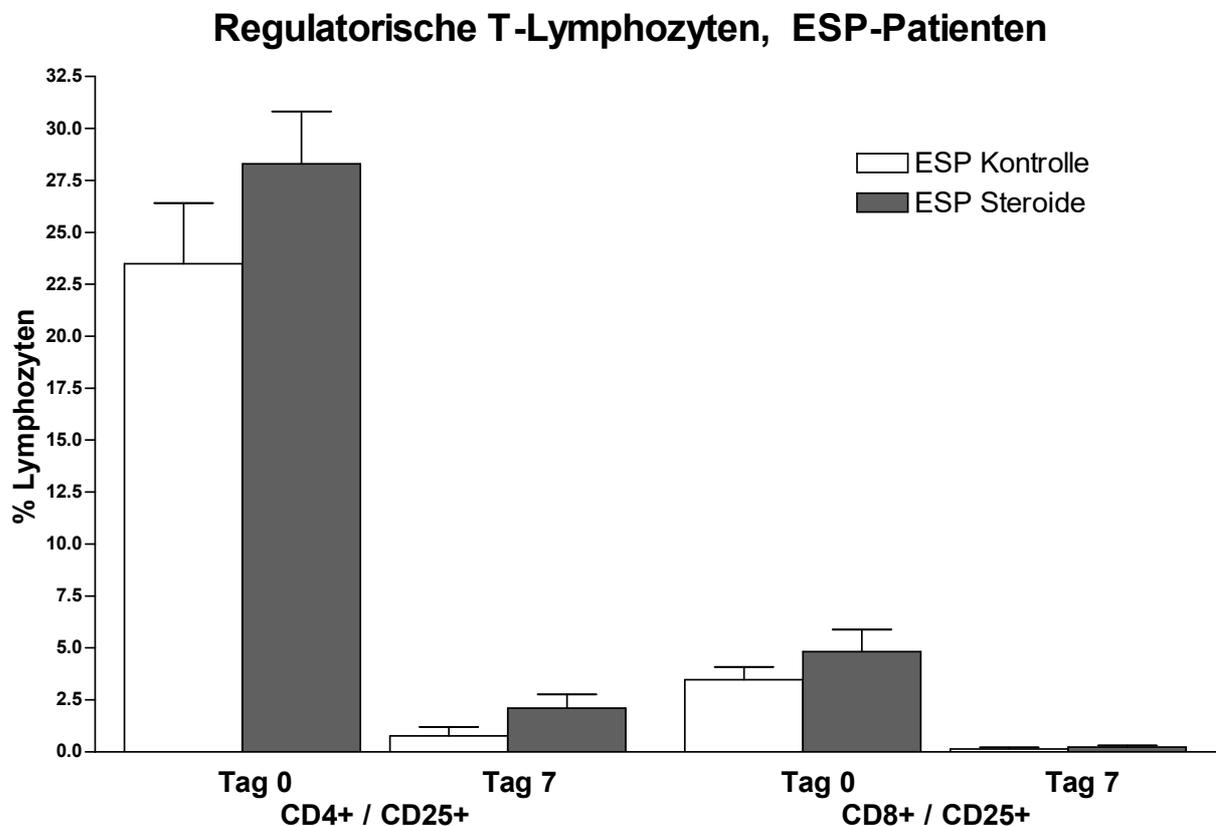


Abbildung 3.20: FACS-Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten, ESP-Patienten.

Anteil an regulatorischen T-Helferzellen in der Gruppe nach Spendervorbehandlung an Tag 7 statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Kontrolle $0,77\% \pm 0,44\%$; $n=5$; vs. Steroide $3,94\% \pm 1,36\%$; $n=4$; $p=0,0317$; Mann-Whitney-Test). Die Werte für regulatorische zytotoxische T-Lymphozyten waren in dieser Konstellation nur tendenziell bei Patienten nach Spendervorbehandlung höher als in der Kontrollgruppe (Kontrolle $0,14\% \pm 0,08\%$; $n=5$; vs. Steroide $0,49\% \pm 0,16\%$; $n=4$; $p=0,0635$; Mann-Whitney-Test).

3.3.4.5 B-Lymphozyten

Der Anteil der B-Lymphozyten (CD19+) an der Lymphozytenfraktion war sowohl an Tag 0 (Kontrolle $6,35\% \pm 1,63\%$; $n=5$; vs. Steroide $7,51\% \pm 1,16\%$; $n=11$) als auch an Tag 7 (Kontrolle $12,05\% \pm 3,48\%$; $n=5$; vs. Steroide $15,97\% \pm 3,08\%$; $n=10$) nicht signifikant unterschiedlich. Die aktivierten B-Lymphozyten (CD19+/HLA-DR+) waren an Tag 0

(Kontrolle $6,19\% \pm 1,65\%$; $n=5$; vs. Steroide $7,31\% \pm 1,12\%$; $n=11$) und an Tag 7 (Kontrolle $11,83\% \pm 3,35\%$; $n=5$; vs. Steroide $15,66\% \pm 3,01\%$; $n=10$) ebenfalls statistisch gesehen in gleichen Anteilen vorhanden (Abb. 3.21).

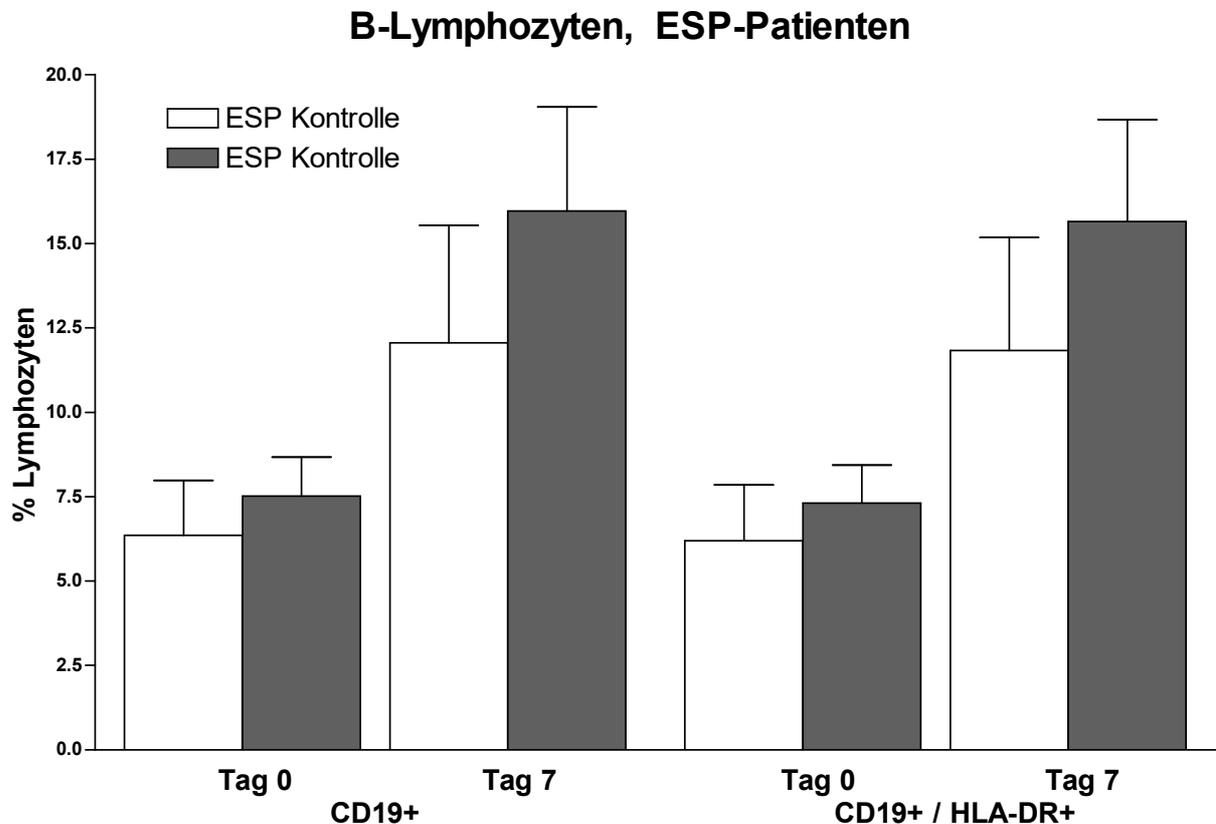


Abbildung 3.21: FACS-Analyse der B-Lymphozyten, ESP-Patienten.

Der Vergleich zwischen den Patientengruppen mit ähnlicher Immunsuppression lieferte an Tag 7 ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten aller B-Lymphozyten (Kontrolle $12,05\% \pm 3,48\%$; $n=5$; vs. Steroide $15,15\% \pm 3,32\%$; $n=9$) noch zwischen den Mittelwerten der aktivierten B-Lymphozyten ((Kontrolle $11,83\% \pm 3,35\%$; $n=5$; vs. Steroide $14,83\% \pm 3,23\%$; $n=9$) statistisch signifikante Unterschiede.

3.3.4.6 Natürliche Killerzellen

An Tag 0 waren die Mittelwerte der natürlichen Killerzellen (CD56+) nicht signifikant unterschiedlich (Kontrolle $15,13\% \pm 3,43\%$; $n=5$; vs. Steroide $22,15\% \pm 3,14\%$; $n=11$). Dies galt auch für die Ergebnisse an Tag 7 (Kontrolle $10,96\% \pm 2,49\%$; $n=5$; vs. Steroide $15,91\% \pm 2,83\%$; $n=10$) Der Anteil aktivierter natürlicher Killerzellen (CD56+/CD16+) an der Lymphozytenfraktion war an Tag 0 (Kontrolle $11,80\% \pm 2,80\%$; $n=5$; vs. Steroide

19,02% ± 3,08%; n=10) und an Tag 7 (Kontrolle 8,52% ± 2,18%; n=5; vs. Steroide 12,89% ± 2,71%; n=9) ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3.22).

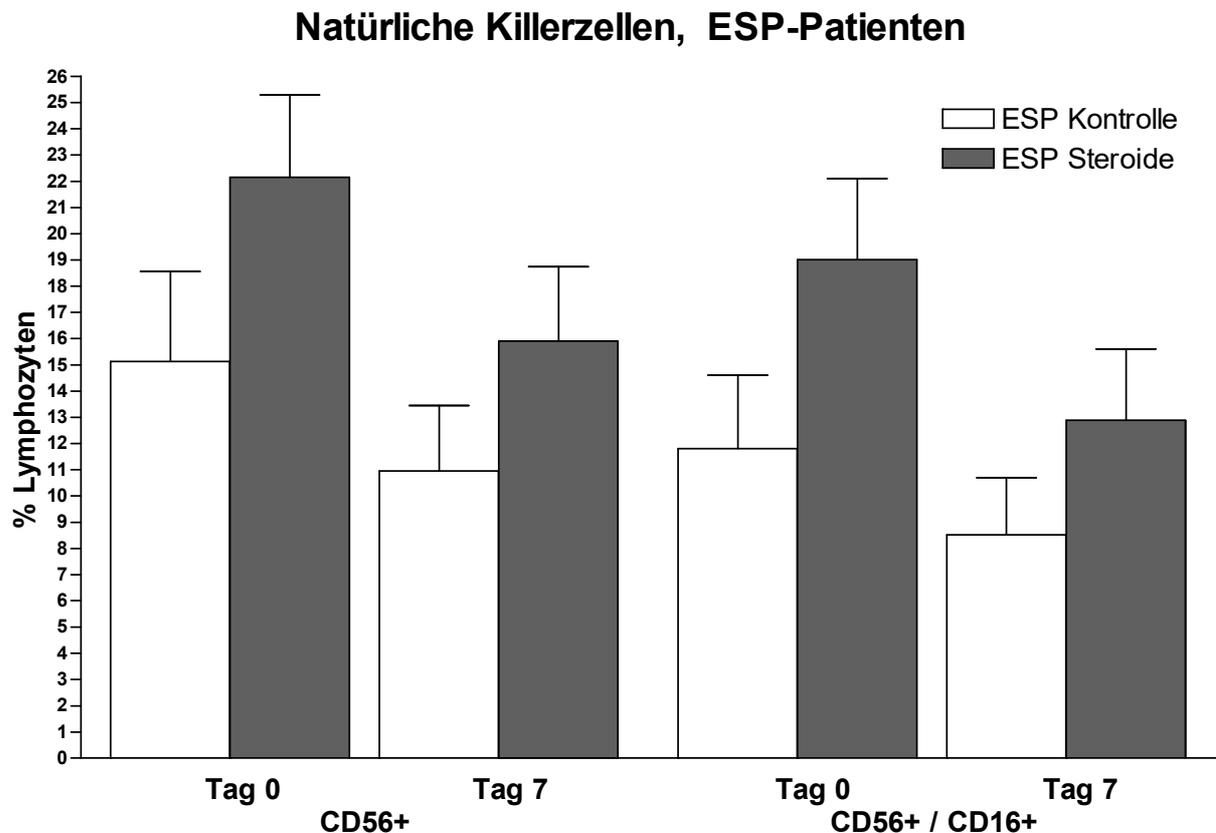


Abbildung 3.22: FACS-Analyse der natürlichen Killerzellen, ESP-Patienten.

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression an Tag 7 lag ebenfalls weder zwischen den Mittelwerten aller natürlichen Killerzellen (Kontrolle 10,96% ± 2,49%; n=5; vs. Steroide 16,51% ± 3,09%; n=9) noch zwischen den Mittelwerten der aktivierten natürlichen Killerzellen (Kontrolle 8,52% ± 2,18%; n=5; vs. Steroide 13,33% ± 3,03%; n=8) ein signifikanter Unterschied vor.

3.4 Akute Rejektionen

3.4.1 Alle Patienten

Nach Spendervorbehandlung erlitten 28,6% der Patienten eine akute Rejektion, in der Kontrollgruppe waren es 44,8% der Patienten. Im exakten Test nach Fisher war der Unterschied zwischen den Gruppen jedoch nicht statistisch signifikant (Kontrolle 13 Rejektionen; n=29; vs. Steroide 8 Rejektionen; n=28).

Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression erlitten 25,0% der Patienten nach Spendervorbehandlung eine akute Rejektion, im Gegensatz zu 53,8% der Patienten aus der Kontrollgruppe, die statistische Signifikanz wurde nicht erreicht (Kontrolle 14 Rejektionen; n=26; vs. Steroide 6 Rejektionen; n=24; p=0,0792).

Bei der ausschließlichen Betrachtung von Patienten, bei denen ein erfolgreicher ELISPOT an Tag 0 durchgeführt wurde, fanden sich 7 Patienten mit akuter Rejektion von 23 (30,4%) Patienten nach Spendervorbehandlung und 11 Patienten mit akuter Rejektion von 22 (50,0%) Patienten in der Kontrollgruppe. Bei einem zusätzlichen Ausschluss der Patienten mit nicht vergleichbarer Immunsuppression von dieser Patientenselektion, war die niedrigere Rejektionsrate nach Spendervorbehandlung annähernd statistisch signifikant (Kontrolle 11 Rejektionen, entspricht 57,9%; n=19; vs. Steroide 5 Rejektionen, entspricht 25%; n=20; p=0,0536).

Der Unterschied zwischen den Gruppen im klinischen Teil der Studie war mit 17 Rejektionen bei 64 (26,6%) Patienten nach Spendervorbehandlung im Vergleich zu 30 Rejektionen bei 70 (42,9%) Patienten in der Kontrollgruppe nahe an der statistischen Signifikanzschwelle (p=0,0695).

3.4.2 ETKAS-Patienten

In der Gruppe der ETKAS-Patienten erlitten 23,5% der Patienten nach Spendervorbehandlung und 45,8% der Patienten aus der Kontrollgruppe eine akute Rejektion. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Kontrolle 11 Rejektionen; n=24; vs. Steroide 4 Rejektionen; n=17). Innerhalb der Patientengruppe mit vergleichbarer Immunsuppression wiesen die Patienten aus der Kontrollgruppe mit 55% eine statistisch signifikant größere Anzahl akuter Rejektionen auf als die Patienten nach Spendervorbehandlung mit nur 20% (Kontrolle 11 Rejektionen; n=20; vs. Steroide 3 Rejektionen; n=15; p=0,0461).

Bei der ausschließlichen Betrachtung von Patienten mit erfolgreich durchgeführtem ELISPOT an Tag 0 war kein signifikanter Unterschied im exakten Test nach Fisher festzustellen (Kontrolle 9 Rejektionen; n=18; vs. Steroide 3 Rejektionen; n=12). Nach einem zusätzlichen Ausschluss der Patienten mit nicht vergleichbarer Immunsuppression, war das Ergebnis jedoch nahe an der statistischen Signifikanzschwelle (Kontrolle 9 Rejektionen; n=15; vs. Steroide 2 Rejektionen; n=10; p=0,0992).

Im klinischen Teil der Studie war die Zahl akuter Rejektionen in der ETKAS-Gruppe nach Spendervorbehandlung niedriger als in der Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Kontrolle 25 Rejektionen, entspricht 43,1%; n=58; vs. Steroide 11 Rejektionen, entspricht 25,6%; n=43; p=0,093).

3.4.3 ESP-Patienten

Bei den Patienten aus dem ESP waren keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl akuter Rejektionen zu beobachten. 36,4% der Patienten nach Spendervorbehandlung und 40% der Kontrollgruppe erlitten eine akute Rejektion (Kontrolle 2 Rejektionen; n=5; vs. Steroide 4 Rejektionen; n=11). Nach vergleichbarer Immunsuppression reduzierte sich der Anteil der Patienten mit akuten Rejektionen nach Spendervorbehandlung auf 30,0% (Kontrolle 2 Rejektionen; n=5; vs. Steroide 3 Rejektionen; n=10).

Bei ausschließlicher Miteinbeziehung von Patienten mit erfolgreich durchgeführtem ELISPOT an Tag 0 blieben die Verhältnisse innerhalb der Gruppen gleich (Kontrolle 2 Rejektionen; n=4; vs. Steroide 4 Rejektionen; n=10). Nach Ausschluss von Patienten mit nicht vergleichbarer Immunsuppression aus dieser Wertung lag der Anteil von Patienten mit akuter Rejektion nach Spendervorbehandlung wieder bei 33,3% (Kontrolle 2 Rejektionen; n=4; vs. Steroide 3 Rejektionen; n=9).

Im klinischen Teil der Studie fand sich bei den Patienten des ESP keine unterschiedliche Häufigkeit akuter Rejektionen (Kontrolle 5 Rejektionen, entspricht 41,7%; n=12; vs. Steroide 6 Rejektionen, entspricht 28,6%; n=21).

4. Diskussion

Der Hirntod ist ein eigenständiger Risikofaktor für das Outcome bei Nierentransplantationen. Es besteht ein erhöhtes Risiko für Transplantatdysfunktion und schlechteres Transplantatüberleben, das unabhängig vom HLA-Mismatch ist (19–22). Aus pathophysiologischer Sicht kommt es zu Entgleisungen verschiedener Systeme. Unter anderem führt der Hirntod zur vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (32,42,43) sowie zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und HLA-DR-Antigenen (30). Diese in Zusammenhang mit dem Hirntod stattfindende unspezifische „immunologische Aktivierung“ der Nieren bedingt eine verstärkte initiale Immunantwort des Empfängers und führt dann zu schlechteren Kurzzeit- und Langzeitergebnissen. (22,25).

Verschiedene Therapieansätze wurden entwickelt, um die immunologische Aktivierung der Spenderorgane abzuschwächen. Experimentelle Studien aus unserer Arbeitsgruppe zeigten bei der Verwendung hirntoter Spenderorgane positive Effekte einer Steroidvorbehandlung des Spenders auf das Transplantationsoutcome (47,49). Eine parallel zu der vorliegenden Studie durchgeführte klinische Studie belegte eine Senkung der proinflammatorischen Zytokine, geringere Reperfusionsschäden und bessere postoperative klinische Verläufe bei Lebertransplantatempfängern nach einer Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon (52).

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob eine Vorbehandlung hirntoter Nierenspender mit Methylprednisolon positive Effekte auf das Transplantationsoutcome hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden einerseits die in dieser Arbeit vorwiegend behandelten experimentellen Methoden, andererseits klinische Parameter herangezogen. Die Fragestellung dieser Arbeit bezog sich auf die Effekte der Spendervorbehandlung auf die spenderspezifische Alloreaktivität der Organempfänger, welche mit dem IFN- γ -ELISPOT-assay gemessen wurde. Außerdem wurde mit Hilfe der FACS-Analyse eine Charakterisierung der zellulären Immunantwort vorgenommen. Die Zahl akuter Rejektionen wurde als klinisches Korrelat der spenderspezifischen Alloreaktivität zwischen den Gruppen verglichen und in Zusammenhang mit den ELISPOT-Ergebnissen interpretiert.

4.1 Patienten

Zwischen der Vorbehandlungs- und Kontrollgruppe lagen bezüglich Geschlecht, vorausgegangener Nierentransplantationen, dem Vorliegen von panelreaktiver

Antikörper (PRA) und Spenderalter keine Unterschiede vor, sowohl bei Betrachtung aller Patienten, als auch innerhalb der ETKAS- und ESP-Gruppen.

Auffällig ist eine Diskrepanz des Mittelwerts des HLA-Mismatches bei Betrachtung aller Patienten: die Kontrollgruppe hatte im Durchschnitt ein signifikant niedrigeres HLA-Mismatch (Kontrolle $2,31 \pm 0,32$ vs. Steroide $3,68 \pm 0,28$; $p=0,0061$). Dieses angesichts der Randomisierung auf den ersten Blick verwunderliche Ergebnis wurde durch den größeren Anteil von ESP-Patienten in der Gruppe nach Spendervorbehandlung hervorgerufen. Da im ESP auf das HLA-Matching verzichtet wird, weisen die ESP-Patienten generell ein höheres HLA-Mismatch auf, was sich in unserer Studie auch deutlich bei den ESP-Patienten widerspiegelt. In der Gruppe der ETKAS-Patienten war die Diskrepanz bezüglich des HLA-Mismatches nicht statistisch signifikant, allerdings war sie in der Gruppe nach Spendervorbehandlung weiterhin erhöht (Kontrolle $2,00 \pm 0,29$ vs. Steroide $2,82 \pm 0,26$; $p=0,0536$; t-Test). Auch die kürzere kalte Ischämiezeit der ESP-Patienten im Vergleich zu den ETKAS-Patienten ist durch das spezielle Allokationsverfahren des ESP bedingt, in dem durch Zuweisung von Spenderorganen zu geographisch nahegelegenen Empfängern gezielt die kalte Ischämiezeit verkürzt wird. Innerhalb der ETKAS-Gruppen war das Empfängeralter der Kontrollgruppe signifikant höher als das der Gruppe nach Spendervorbehandlung (Kontrolle $50,79 \pm 2,22$ ($n=24$) vs. Steroide $44,18 \pm 2,30$ ($n=17$); $p=0,03$; t-Test). Ein eindeutiger Grund konnte nicht herausgearbeitet werden. Bei Betrachtung aller Patienten sowie innerhalb der ESP-Gruppe lagen keine Unterschiede bezüglich des Empfängeralters vor.

4.2 Spenderspezifische T-Zell-Alloreaktivität

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer Nierenspendervorbehandlung mit Methylprednisolon auf die Immunantwort des Organempfängers. Mit Hilfe des IFN- γ -ELISPOT-Assays wurde die Alloreaktivität der für die akuten Rejektionen zu einem großen Teil verantwortlichen T-Lymphozyten des Empfängers nach spezifischer Stimulation mit Leukozyten des Spenders ermittelt. Hohe präoperative ELISPOT-Werte korrelieren mit dem Auftreten akuter Rejektionen (103,104). Ein Vorteil gegenüber dem einfachen Vergleich von Abstoßungsraten ist die Tatsache, dass das Ergebnis eines präoperativ durchgeführten ELISPOTs nicht von der postoperativen Immunsuppression beeinflusst wird. Deshalb ist der ELISPOT eine geeignete Methode, die Stärke der Immunantwort direkt nach der Organtransplantation zu messen.

Die Erwartung vor Beginn der Studie war, dass die Steroidvorbehandlung die unspezifische immunologische Aktivierung der Spenderniere abschwächt und so die Aktivierung der Empfänger-T-Lymphozyten reduziert wird. Diese Wirkung sollte sich in der Folge auch in einer geringeren Anzahl akuter Rejektionen widerspiegeln. Zusätzlich zum präoperativ durchgeführten ELISPOT wurde auch an Tag 7 ein ELISPOT durchgeführt, um die T-Zell-Alloreaktivität im postoperativen Verlauf zu untersuchen. Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen neben den unterschiedlichen Voraussetzungen der ETKAS- und ESP-Patienten auch die unterschiedlichen immunsuppressiven Therapien in Bezug auf den Messzeitpunkt an Tag 7 berücksichtigt werden.

Die statistische Analyse beim Vergleich aller in die Studie eingeschlossenen Patienten erbrachte kein eindeutiges Ergebnis: an Tag 0 war der Mittelwert der spenderspezifischen Alloreaktivität in der Gruppe nach Spendervorbehandlung niedriger als in der Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Am 7. postoperativen Tag war die Empfänger-Alloreaktivität nach Spendervorbehandlung statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,0110$), nach Ausschluss von Patienten mit einer besonderen immunsuppressiven Therapie jedoch nicht mehr signifikant ($p=0,0584$). Die Bedeutung dieser auf den ersten Blick inkonklusiven Ergebnisse wird bei getrennter Betrachtung der ETKAS- und ESP-Patienten klarer. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bei Einschluss aller Patienten sind nämlich ausschließlich auf die Ergebnisse der ETKAS-Gruppe zurückzuführen. Bei den ETKAS-Patienten war die Alloreaktivität sowohl an Tag 0 ($p=0,0021$) als auch an Tag 7 ($p=0,0049$) nach Spendervorbehandlung statistisch signifikant reduziert. An Tag 7 blieb der Unterschied auch bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression statistisch signifikant ($p=0,0203$). In der ESP-Gruppe fand sich hingegen kein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen, auch bei Ausschluss der Patienten mit nicht vergleichbarer Immunsuppression. In diesem Fall waren die ELISPOT-Werte der Kontrollgruppe zu beiden Zeitpunkten niedriger, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Angesichts der geringen Fallzahl in der ESP-Kontrollgruppe haben diese Werte jedoch nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

Die Ergebnisse der ETKAS-Patienten entsprechen den Erwartungen vor Beginn der Studie. Die Steroidvorbehandlung der hirntoten Organspender senkt bei diesen Patienten die Alloreaktivität im ELISPOT deutlich. Damit stehen die Ergebnisse in Einklang mit den Ergebnissen verschiedener vorausgegangener, vorwiegend experimenteller Studien. Die Hypothese, die nach Hirntod erhöhten Spiegel proinflammatorischer Zytokine mit einer

Steroidvorbehandlung des Spenderorganismus senken zu können, konnte in einer klinischen Studie bestätigt werden (50). Nach Transplantation konnte in einer weiteren experimentellen Studie eine verzögerte und weniger intensive Zellinfiltration sowie eine verminderte MHC-II-Expression auf infiltrierenden Monozyten und auf Endothelzellen nach Steroidvorbehandlung beobachtet werden (49). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon durch diese bereits nachgewiesene Abschwächung der immunologischen Aktivierung von Spenderorganen die alloreaktive T-Zell-Antwort bei Patienten des ETKAS signifikant abschwächt. In einer parallel zu der vorliegenden Studie durchgeführten klinischen Lebertransplantationsstudie waren inflammatorische Zytokine im Leberbiopsat sowie im Blut nach Methylprednisolon-Vorbehandlung der hirntoten Spender signifikant reduziert (52). Diese neueren Ergebnisse widersprechen klinischen Nierentransplantationsstudien aus den 70er Jahren, in denen hochdosierte Spendervorbehandlungen mit Steroiden und Cyclophosphamid keine Vorteile unter anderem bezüglich Transplantatfunktion und – überleben erbrachten (44–46).

Mögliche Faktoren, die das eigene Ergebnis potenziell beeinflusst haben könnten, sind Unterschiede der ETKAS-Gruppen in Bezug auf das Empfängeralter und das HLA-Mismatch. Das um ungefähr 6 Jahre statistisch signifikant höhere Empfängeralter der Kontrollgruppe innerhalb der ETKAS-Patienten ist keine ausreichende Erklärung für die reduzierte Alloreaktivität in der Gruppe nach Spendervorbehandlung. Zwar werden im Alter vermehrt T- und NK-Zellen nachgewiesen (91,93,94), zwischen den ETKAS-Vergleichsgruppen konnten bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten diesbezüglich jedoch keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Kap. 3.3.3, Kap. 4.3). Ebenso ist bekannt, dass ein hohes Empfängeralter ein Risikofaktor für die CAN ist (87) und die Ergebnisse von „age-matching“-Programmen wie dem ESP auch in Hinblick auf die Rate akuter Rejektionen erhöhte Zahlen aufweisen (99). Studien, in denen der Einfluss des Empfängeralters auf die frühe Immunantwort nach Organtransplantation unabhängig von anderen Risikofaktoren untersucht wurde, zeigen jedoch ein mit dem Empfängeralter sinkendes Risiko für akute Abstoßungen (85,86). Insofern kann kein klarer Zusammenhang zwischen dem erhöhten Empfängeralter in der Kontrollgruppe und den ELISPOT-Ergebnissen hergestellt werden. Neben einem niedrigeren Empfängeralter hatte die ETKAS-Patientengruppe nach Spendervorbehandlung im Mittel auch ein um ca. 0,8 größeres HLA-Mismatch als die Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,0536$). In einer Studie zur Etablierung der ELISPOT-Methode als potenzieller

Prädiktor im Rahmen von Nierentransplantationen wurde bei präoperativen ELISPOTs keine Korrelation zu HLA-Mismatches festgestellt, in den ersten postoperativen Wochen korrelierten die Spotzahlen jedoch mit den HLA-Mismatches (103). Eine solche Korrelation konnte in einer Kovarianzanalyse nach Spearman in beiden ETKAS-Gruppen an Tag 7 nicht festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Patienten mit höherem HLA-Mismatch besonders von einer Steroidvorbehandlung der Spender profitieren.

Bei den Patienten des ESP fehlen wider Erwarten Anzeichen für eine ähnliche protektive Wirkung der Spendervorbehandlung. Die geringe Patientenzahl, speziell in der ESP-Kontrollgruppe, lässt wie bereits erwähnt keine endgültige Aussage diesbezüglich zu. Die experimentelle Beobachtung, dass speziell Empfänger marginaler Organe älterer Spender von der Vorbehandlung profitieren könnten (47), kann durch die vorliegende Studie also nicht bestätigt werden. Unterschiede zwischen der ESP-Steroidgruppe und der ESP-Kontrollgruppe bezüglich der präoperativen Daten konnten nicht festgestellt werden. Deshalb müssen allgemeine Unterschiede zwischen ESP- und ETKAS-Patienten als mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse in Betracht gezogen werden. Die ESP-Patientengruppe unterscheidet sich von der ETKAS-Patientengruppe einerseits in Bezug auf die individuellen Patienteneigenschaften und andererseits in Bezug auf die verschiedenen Allokationsalgorithmen. Spender- und Empfängeralter und die damit einhergehenden Veränderungen des Immunsystems sowie die Prävalenz allgemeiner, vor allem vaskulärer Risikofaktoren sind als wichtigste Unterscheidungsmerkmale zwischen ETKAS- und ESP-Patienten hinsichtlich der individuellen Patienteneigenschaften zu nennen. Unterschiede bezüglich des Allokationsalgorithmus beziehen sich vorwiegend auf das HLA-Matching und die durchschnittliche Dauer der kalten Ischämiezeit.

Der primäre Wirkungsort der in dieser Studie untersuchten Steroidtherapie ist der Spenderorganismus. Daher sind zunächst bei den Spendern potentielle Ursachen für eine fehlende Wirkung der Steroide zu suchen. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Immunogenität der zu transplantierenden Nieren bei älteren Spendern durch die antiinflammatorische Wirkung der Steroidtherapie nur unzureichend beeinflusst werden kann. Für diese Hypothese lassen sich durchaus mit dem Alter der Spender verknüpfte mögliche Ursachen finden. Der entscheidende Punkt könnte das vermehrte Vorliegen vaskulärer Risikofaktoren und chronischer Entzündungsprozesse bei älteren Nierenspendern sein, die periphere Organe über einen langen Zeitraum hinweg

immunologisch aktivieren und morphologisch vorschädigen können (26,71,80–82). Eine durch solche chronische Noxen verursachte Vorschädigung kann nicht durch die angewandte Vorbehandlung mit Methylprednisolon rückgängig gemacht werden, auch wenn pathophysiologische Vorgänge, die in Zusammenhang mit dem Hirntod stehen, dadurch eventuell abgeschwächt werden. Obwohl eine Spendervorbehandlung in vorangegangenen experimentellen Studien durchaus positive Ergebnisse erbrachte, kann eine Spendervorbehandlung nach langjähriger chronischer Schädigung im Menschen nicht ausreichend sein und möglicherweise nicht hinreichend im Tiermodell simuliert werden (47,48). Andere Ursachen für einen ausbleibenden Effekt der Vorbehandlung könnten mit immunologischen Veränderungen im Alter zusammenhängen. Während diese Veränderungen, wie z.B. eine Imbalance der Zytokinsekretion mit vermehrter Produktion z.B. von IFN- γ und IL-4, Unterschiede des Immunsystems gegenüber jüngeren Patienten verdeutlichen, lassen sie keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der in dieser Studie durchgeführten Steroidvorbehandlung zu (107). Es wäre allerdings denkbar, dass in älteren Spenderorganismen die mit dem Hirntod in Zusammenhang stehenden Vorgänge im Zusammenspiel mit bereits vorbestehenden chronischen Entzündungsprozessen eine höhere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ oder IL-6 begünstigen (33). Um eine signifikante Reduktion der Alloreaktivität zu erreichen, könnte dann eventuell eine höhere Steroiddosis notwendig sein.

Sucht man die Ursache für eine ausbleibende Wirkung der Vorbehandlung auf der Seite des Empfängers, müsste man eine erhöhte Alloreaktivität des Empfängerorganismus unabhängig von der Immunogenität des Spenderorgans annehmen. Wie bereits erwähnt, ist die Rejektionsrate mit steigendem Alter reduziert, wenn man andere Faktoren, die zu schlechteren Überlebensraten führen, ausschließt (86). Im Gegensatz hierzu wurde in einer klinischen Studie bei ESP-Patienten nach Nierentransplantation eine verstärkte frühe Immunantwort mit einer höheren Zahl zytotoxischer T-Zellen, dendritischen Zellen und erhöhtem TNF-alpha beobachtet, die nicht mit der Rejektionsrate korrelierte und unabhängig vom höheren HLA-Mismatch der ESP-Patienten war (108). Insofern ist eine von der jeweiligen Immunogenität des Spenderorgans unabhängige stärkere frühe Immunantwort der ESP-Patienten eine mögliche Ursache einer fehlenden Wirkung der Steroid-Vorbehandlung.

Die Unterschiede zwischen den Allokationsalgorithmen des ETKAS und des ESP bestehen vorwiegend im fehlenden HLA-Matching und einer kürzeren kalten Ischämiezeit

im ESP-Kollektiv (99). Folgerichtig weisen die eingeschlossenen ESP-Patienten im Schnitt auch höhere HLA-Mismatches und eine kürzere Ischämiezeit im Vergleich zu den ETKAS-Patienten auf. Zwischen der kürzeren kalten Ischämiezeit und der fehlenden Steroidwirkung lässt sich kein kausaler Zusammenhang herstellen. Die höheren HLA-Mismatches könnten ein Grund für eine erhöhte T-Zell-Alloreaktivität im ESP-Kollektiv sein. Eine weitere mögliche Ursache für die fehlenden Anzeichen einer protektiven Wirkung der Vorbehandlung bei den ESP-Patienten ist die durch chronische Noxen verursachte Vorschädigung der Spendernieren. Der zusätzlich immunologisch aktivierende Effekt durch pathophysiologische Vorgänge, die in Zusammenhang mit dem Hirntod stehen, mag durch die Steroidtherapie abgeschwächt sein. Die Bedeutung dieser Prozesse für eine gesteigerte Immunogenität von Organen älterer Spender könnte im Vergleich zu den durch chronische Noxen verursachten morphologischen Schäden jedoch in den Hintergrund treten, so dass keine messbare Reduzierung der Alloreaktivität im Empfängerorganismus resultiert.

Der IFN- γ -ELISPOT-Assay wies in der Praxis einige Schwächen auf. So konnte die Zytokinproduktion der Stimulatorzellen nicht immer ausreichend durch die Bestrahlung gehemmt werden, was sich in positiven Werten der Negativkontrollen äußerte. Alternativ zur Bestrahlung kann hier in eventuell folgenden Studien zum Beispiel die T-Zell-Depletierung der Spender-PBMC durch CD2 Hapten-Antikörper und MACS Anti-Hapten MicroBeads erfolgen, was in späteren Untersuchungen bereits angewandt wurde (104). Desweiteren war die Rate an nicht auswertbaren ELISPOTS nicht unbedeutend. In einigen Fällen war hierfür eine bei manchen Patienten im Rahmen der postoperativen immunsuppressiven Therapie notwendige Muromonab-CD3-Therapie, die zu einer T-Zell-Depletion im peripheren Blut führt. In anderen Fällen wurde ein Zelluntergang in Zusammenhang mit dem für den ELISPOT an Tag 7 zwingend erforderlichen Einfrieren und Wiederauftauen der Spenderzellen beobachtet. In Einzelfällen konnte keine spezifische Ursache zugeordnet werden. Diese Probleme führten zu einer geringeren Zahl an verwertbaren ELISPOT-Daten als ursprünglich geplant waren. Schließlich wurde eine relativ hohe Variabilität der Spotzahlen auch innerhalb eines ELISPOTS mit drei Messungen beobachtet.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der ELISPOTs die Schlussfolgerung zu, dass in der Gruppe der ETKAS-Patienten die durchgeführte Steroidvorbehandlung des Spenders zu einer abgeschwächten Immunantwort führt. Ein ähnlicher Effekt bei den Patienten des ESP konnte nicht gezeigt werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse sind in erster Linie

die geringe Fallzahl in der ESP-Gruppe sowie die Schwächen der Methode zu berücksichtigen. Um die fehlende Wirkung der Vorbehandlung bei älteren Patienten eindeutig zu bestätigen, müsste eine klinische Studie mit deutlich höheren Fallzahlen als in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden. Weiterhin könnte eine Steroidvorbehandlung mit erhöhter Dosis untersucht werden. Sollte sich die ausbleibende Wirkung der Vorbehandlung in dieser Altersklasse bestätigen, sollten mögliche Ursachen wie z.B. das Vorliegen vaskulärer Risikofaktoren oder anderer Vorerkrankungen auf Seiten der Spender untersucht und bei der Auswertung berücksichtigt werden.

4.3 Leukozytotypisierung

Die Leukozytotypisierung mittels FACS-Analyse wurde durchgeführt, um den Zustand des zellulären Immunsystems prä- und postoperativ zu charakterisieren. Allgemein ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass es sich um relative Werte handelt bezogen auf die Gesamtlmphozytenzahl oder wie im Fall dendritischer Zellen auf die Gesamtleukozytenzahl. Verglichen wurden die Werte der Steroid- und Kontrollgruppen mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Die präoperativen Daten sind hier im Gegensatz zu den ELISPOT-Werten als Ausgangswerte, ähnlich den präoperativen klinischen Daten, zu sehen, da zu diesem Zeitpunkt keinerlei Kontakt mit Spenderzellen stattgefunden hat. Vor Beginn der Studie wurden in Bezug auf diese Daten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen erwartet. Die Ergebnisse am 7. postoperativen Tag spiegeln den zellulären Immunstatus der Empfänger nach in vivo-Kontakt mit Spenderzellen, jedoch auch nach immunsuppressiver Therapie wider. Sie können in Zusammenhang mit den ELISPOT-Ergebnissen interpretiert werden. Eine durch die Spendervorbehandlung herabgesetzte Immunogenität des Transplantats könnte hier z.B. zu einer kleineren Fraktion von für die Transplantatabstoßung bedeutsamen Leukozyten führen, so die Vorstellung vor Studienbeginn. Schließlich wurden Varianzanalysen (two-way-ANOVA) durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die postoperativen Werte der Vergleichsgruppen unterscheiden, wenn man sie in Bezug zu den präoperativen Ausgangswerten setzt.

Präoperativ lagen keine Unterschiede in der Leukozytenzusammensetzung zwischen den jeweiligen Kontroll- und Steroidgruppen vor. Diese Ergebnisse sprechen für vergleichbare Zustände des zellulären Immunsystems vor dem Kontakt mit Spenderzellen, was die Aussagekraft der ELISPOT-Ergebnisse verstärkt. Diese

Ergebnisse entsprechen so auch den Erwartungen vor Studienbeginn. Der Mittelwert der regulatorischen T-Helferzellen (CD4+/CD25+) war in der Kontrollgruppe (alle Patienten) präoperativ tendenziell niedriger ($p=0,0778$). Die Ergebnisse des Gesamtkollektivs können auf höhere Werte in der ESP-Gruppe und eine höhere Anzahl an ESP-Patienten in der Steroidgruppe zurückgeführt werden. Im Alter sind regulatorische T-Zellen erhöht (109).

Die Analyse am 7. postoperativen Tag lieferte tendenzielle Ergebnisse, welche die These einer verminderten Immunantwort nach der Spendervorbehandlung unterstützen könnten. So fiel bei der Untersuchung der natürlichen Killerzellen (CD56+) in der Gruppe der ETKAS-Patienten nach Spendervorbehandlung eine deutlich erniedrigte Anzahl natürlicher Killerzellen auf ($p=0,0550$). Natürlichen Killerzellen wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Transplantatabstoßung zugesprochen, insofern kann diese Tendenz ein zusätzlicher Hinweis auf eine herabgesetzte Immunogenität des Transplantats nach Spendervorbehandlung sein. Diese Tendenz ist bei vergleichbarer Immunsuppression oder beim Vergleich aktivierter natürlicher Killerzellen (CD56+/CD16+) nicht zu erkennen. Die Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten war bei Betrachtung aller Patienten in der Gruppe nach Spendervorbehandlung vermindert ($p=0,0757$), was einer reduzierten Immunantwort entsprechen würde. Auch in der ESP-Gruppe mit vergleichbarer Immunsuppression lagen die Werte für die zytotoxischen T-Zellen nach Vorbehandlung unter denen der Kontrollgruppe ($p=0,0663$), während in der ETKAS-Gruppe keine deutlichen Unterschiede zu erkennen waren. Somit ist das Ergebnis des Gesamtkollektivs (Betrachtung aller Patienten) vor allem durch die Werte der ESP-Patienten bedingt, was eher in Widerspruch zu den im ELISPOT gemessenen T-Zell-Alloreaktivitäten steht. Die Anzahl aktivierter zytotoxischer T-Lymphozyten erbrachte beim Vergleich in allen gewählten Untergruppen keine signifikanten Unterschiede. Weitere tendenzielle Unterschiede waren bezüglich CD62L+-T-Helferzellen im Gesamtkollektiv bei vergleichbarer Immunsuppression festzustellen, so war der Wert in der Gruppe nach Spendervorbehandlung deutlich erhöht ($p=0,0584$). Dies könnte als eine reduzierte Umwandlung von naiven T-Helferzellen in Effektor-Gedächtniszellen nach Antigenkontakt interpretiert werden (16). Allerdings war dieser Trend bei separater Betrachtung von ETKAS- und ESP-Patienten nicht mehr zu erkennen, was wiederum den ELISPOT-Ergebnissen widerspricht. Die Werte für dendritische Zellen insgesamt und für aktivierte dendritische Zellen waren in allen Vergleichen nicht unterschiedlich. Als antigenpräsentierende Zellen nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Auslösung der

Immunantwort nach Transplantation ein. Vor diesem Hintergrund hätte man bei einer herabgesetzten Immunogenität des Transplantats niedrigere Zahlen aktivierter dendritischer Zellen erwarten können. Die Analyse der regulatorischen T-Helferzellen zeigte einen signifikant niedrigeren Wert in der ESP-Kontrollgruppe bei vergleichbarer Immunsuppression und bei Ausschluss aller mit Basiliximab behandelten Patienten ($p=0,0317$). Die geringen Fallzahlen in dieser Untergruppe machen dieses Ergebnis jedoch weitgehend irrelevant (Kontrolle $n=5$ vs. Steroide $n=4$). Dasselbe gilt für ein grenzwertiges Ergebnis ($p=0,0635$) in derselben Gruppe für regulatorische zytotoxische T-Lymphozyten. Alle anderen Vergleiche der regulatorischen T-Lymphozyten zeigten keine signifikanten oder tendenziellen Unterschiede. Auch bei den B-Lymphozyten konnten keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen gefunden werden. Auffällig war ein signifikanter Anstieg der Fraktionen an Tag 7 (im Ergebnisteil nicht aufgeführt). Dies könnte durch die vor allem auf T-Lymphozyten ausgerichtete immunsuppressive Therapie bedingt sein, welche einen relativen Anstieg der B-Lymphozyten verursacht, ohne einen tatsächlichen Anstieg der absoluten Anzahl von B-Lymphozyten widerzuspiegeln.

Die Varianzanalysen mit Hilfe der two-way-ANOVA-Tests zeigten keine Interaktion zwischen den Faktoren Zeit (Tag 0 und Tag 7) und Behandlung (Spendervorbehandlung) auf die relativen Leukozytenzahlen. Das heißt, dass die Spendervorbehandlung auch bei Berücksichtigung der Ausgangswerte an Tag 0 keinen erkennbaren Einfluss auf die Werte an Tag 7 hatte. Dieses Ergebnis steht offensichtlich in Einklang mit den Ergebnissen der t-Tests bzw. der Mann-Whitney-Tests.

Einige Besonderheiten müssen bei der Interpretation der Lymphozytentypisierung mittels FACS-Analyse beachtet werden. Die mögliche Verwendung vieler verschiedener Oberflächenmarker sowie die Erfassung von ungefähr 98% aller Lymphozyten sind Vorteile dieser Methode. Allerdings befinden sich nur 2-3% der Lymphozyten zu einem gegebenen Zeitpunkt im peripheren Blut. Außerdem werden modulierte Oberflächenantikörper durch die FACS-Analyse nicht erfasst. Gerade bei Patienten, die eine immunsuppressive Therapie erhalten, ist dies von Bedeutung. Die in der Transplantationsmedizin verwendeten Immunsuppressiva beeinflussen auf unterschiedliche Weise verschiedene Leukozyten (110). Dabei ist es aufgrund der regelhaften Kombination verschiedener Immunsuppressiva schwierig, die Beeinflussung der FACS-Ergebnisse im Einzelfall bestimmten Medikamenten zuzuordnen. Manche Wirkstoffe haben eine vielfältige Wirkung auf verschiedene Leukozytenpopulationen, was

die Erfassung der Leukozyten in der FACS-Analyse beeinflusst. Mycophenolat-Mofetil beispielsweise vermindert die CD25-Expression auf T-Zellen, beeinträchtigt die T-Zell-Proliferation und behindert die Reifung und damit die Funktion dendritischer Zellen (111,112). Die bei den Patienten der vorliegenden Arbeit mehrfach verwendeten nicht-depletierenden monoklonalen Antikörper Basiliximab (anti-CD25) und OKT3 (anti-CD3) blockieren die jeweiligen Zielmoleküle, was die Erfassung dieser Zellen in der FACS-Analyse verhindert. Der Versuch, diese Beeinflussung der Ergebnisse durch die Bildung von Gruppen mit vergleichbarer Immunsuppression zu verringern, hat wiederum den Nachteil, dass dadurch die Fallzahl der jeweiligen Gruppen sinkt. Schließlich werden mit der FACS-Analyse nur relative Quantitäten ermittelt, was nur Aussagen über die relativen Verhältnisse der einzelnen Leukozytenpopulationen und deren Aktivierungsgrad erlaubt. Zusammenfassend zeigten die präoperativen Untersuchungen vergleichbare relative Quantitäten der einzelnen Leukozytenpopulationen, was eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation der im ELISPOT gemessenen Alloreaktivitäten ist. Die Ergebnisse der FACS-Analyse an Tag 7 entsprachen hingegen nicht den Erwartungen vor Studienbeginn, da kein signifikanter Einfluss der Spendervorbehandlung auf die relative Quantität der wichtigsten an der Abstoßungsreaktion beteiligten Zellpopulationen an Tag 7 gezeigt werden konnte. Die tendenziell niedrigere Anzahl natürlicher Killerzellen an Tag 7 in der ETKAS-Gruppe nach Spendervorbehandlung könnten ein Hinweis auf eine, mit den ELISPOT-Ergebnissen korrelierende reduzierte Proliferation dieser Zellgruppe sein. Schließlich ist der Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die Ergebnisse zu beachten. In den Gruppen mit vergleichbarer Immunsuppression schmälert außerdem die niedrigere Fallzahl die Aussagekraft der Ergebnisse.

4.4 Akute Rejektionen

Insgesamt unterstützt die Analyse der akuten Rejektionsraten die Hypothese der reduzierten Immunogenität der Transplantate nach Spendervorbehandlung. Beim Vergleich der Rejektionsraten sind auf den ersten Blick keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen. Betrachtet man jedoch nur die Patienten mit vergleichbarer Immunsuppression, zeigen sich signifikant reduzierte Rejektionsraten. Dies ist einerseits bei der Betrachtung aller Patienten unabhängig von der Altersklasse (bei vergleichbarer Immunsuppression: $p=0,0475$), andererseits auch bei separater Betrachtung der ETKAS-Patienten (bei vergleichbarer Immunsuppression: $p=0,0461$) der Fall. Die ESP-Patienten weisen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Rejektionsraten auf. Diese

Konstellation entspricht genau den ELISPOT-Ergebnissen und unterstützt somit die Vermutung, dass eine Steroidvorbehandlung bei ETKAS-Patienten Wirkung zeigt, bei den ESP-Patienten jedoch nicht.

Die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Untersuchungen wurden als Teilaspekt im Rahmen einer klinischen Studie mit einer größeren Fallzahl (n=134) durchgeführt. Die Analyse der klinischen Parameter wird ausführlich in der Dissertation „Der Einfluss von Steroidvorbehandlung der Spenderorgane auf die initiale Transplantatfunktion bei allogener Nierentransplantation“ von Sabine Schulz besprochen werden. Hier fanden sich ebenso tendenziell erniedrigte Rejektionsraten, sowohl bei Einschluss aller Patienten (n=64 vs. n=70; p=0,0695) als auch bei separater Betrachtung der ETKAS-Gruppe (n=58 vs. n=43; p=0,0930), wobei hier allerdings keine Gruppen mit vergleichbarer Immunsuppression gebildet wurden. Es ist anzunehmen, dass durch besonders potente Immunsuppressionstherapien akute Rejektionen tatsächlich verhindert wurden und somit die Bedeutung einer Spendertherapie mit Steroiden überdeckt wurde. Insgesamt deuten jedoch auch hier die Ergebnisse darauf hin, dass ETKAS-Patienten von einer Steroidvorbehandlung profitieren, ESP-Patienten jedoch nicht.

4.5 Schlussfolgerung

Die Hauptaussage dieser Arbeit ist, dass die Steroidvorbehandlung der hirntoten Spender die T-Zell-Alloreaktivität im ELISPOT in der Gruppe der ETKAS-Patienten statistisch signifikant reduziert. Damit ist die Nullhypothese dieser Arbeit für diese Patientengruppe widerlegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Rate akuter Rejektionen bei vergleichbarer Immunsuppression bei diesen Patienten statistisch signifikant gesenkt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dieser Arbeit zugrundeliegenden Beobachtungen, dass durch die Vorbehandlung die Immunogenität der Organe hirntoter Spender gesenkt werden kann. Nachdem in diesen Studien durch experimentelle Untersuchungen positive Effekte der Steroidvorbehandlung gezeigt werden konnte (47–49), wurde hier die Wirksamkeit der Spendertherapie in einer klinischen Studie für Nierentransplantationen bestätigt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in einer weiteren klinischen Studie erzielt, in der die Wirkung der Steroidvorbehandlung im Rahmen von Leber- und Herztransplantationen untersucht wurde (52). Die Steroidvorbehandlung hirntoter Nierenspender könnte also ein wichtiges Instrument sein, um die unspezifische Schädigung des Organs und damit die

Immunantwort des Empfängers in der frühen postoperativen Phase abzumildern. Die abgeschwächten Auswirkungen der in Zusammenhang mit dem Hirntod stehenden Prozesse könnten im Sinne des „injury response“-Konzepts auch zu besseren Langzeitergebnissen von Nierentransplantationen führen (22,26).

Die zweite relevante Befund dieser Arbeit ist, dass die Vorbehandlung bei den Patienten des ESP keine Wirkung zeigte. Sowohl die T-Zell-Alloreaktivität, als auch die Rate der akuten Rejektionen wies keine signifikanten Unterschiede nach Spendervorbehandlung auf. Die naheliegendste Erklärung hierfür ist, dass die Prävalenz und das Ausmaß einer unspezifischen Vorschädigung der Nieren bei Patienten dieser Altersklasse durch chronische Entzündungsprozesse und weitere Noxen erhöht ist (26,71,80–82). Die dadurch hervorgerufenen morphologischen und immunologischen Veränderungen können durch die Steroidvorbehandlung nicht beeinflusst werden, eine Reduzierung der Entzündungsprozesse in Zusammenhang mit dem Hirntod würde dann kaum mehr ins Gewicht fallen.

Die explorativ durchgeführte Leukozytentypisierung mittels FACS-Analyse lieferte insgesamt keine eindeutigen Hinweise auf Veränderungen der zellulären Immunantwort. Die präoperative Untersuchung zeigte keine unterschiedlichen Verhältnisse in der Zusammensetzung der für Abstoßungsreaktionen bedeutsamen Leukozytenpopulationen. Postoperativ lieferte die FACS-Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Leukozytenzusammensetzung.

Die Steroidvorbehandlung hirntoter Spender wird bereits von der Deutschen Stiftung Organspende routinemäßig durchgeführt (113). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein weiterer Hinweis auf die Wirksamkeit dieser Vorbehandlung bei Nierentransplantationen. Angesichts der eher geringen Fallzahl der vorliegenden Arbeit wäre eine prospektive, randomisierte Studie mit höheren Fallzahlen und Einbeziehung von Langzeitdaten jedoch sinnvoll, insbesondere um die Frage der Wirksamkeit bei den Patienten des ESP zu überprüfen.

5. Literaturverzeichnis

1. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc.* 1956 Jan 28;160(4):277–82.
2. Eurotransplant International Foundation. Annual Report 2012 [Internet]. [cited 2014 Apr 27]. Available from: <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=AR2012.pdf>
3. Siewert JR, Allgöwer M, Brauer RB. *Chirurgie.* 8., komplett überarb. Aufl. Heidelberg: Springer; 2010.
4. History | Eurotransplant [Internet]. [cited 2014 Apr 27]. Available from: <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=history>
5. Persijn GG, Smits J, De Meester J, Frei U. Three-year experience with the new Eurotransplant kidney allocation system 1996-1999. *Transplant Proc.* 2001 Mar;33(1-2):821–3.
6. Organ match characteristics | Eurotransplant [Internet]. [cited 2011 Nov 14]. Available from: http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=organ_match_char
7. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmodder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997 Apr 15;63(7):968–74.
8. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Aug 11;331(6):365–76.
9. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med.* 1989 Jun 1;169(6):1931–46.
10. Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtekin U, Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation.* 1992 Feb;53(2):323–8.
11. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation.* 1994 Mar 27;57(6):857–9.
12. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation.* 1995 Apr 15;59(7):962–8.

13. Joosten SA, Sijpkens YWJ, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):1–13.
14. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan;10(1):167–81.
15. Janeway CA. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 6. ed. New York, NY: Garland Publ. [u.a.]; 2005.
16. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 2001 Dec 17;194(12):1711–9.
17. Balin SJ, Platt JL, Cascalho M. Noncognate function of B cells in transplantation. *Transpl Int.* 2009 Jun;22(6):593–8.
18. Balin SJ, Platt JL, Cascalho M. New insights into the functions of B cells. *Pediatr Transplant.* 2008 Aug;12(5):510–5.
19. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995 Aug 10;333(6):333–6.
20. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med.* 2000 Mar 2;342(9):605–12.
21. Cecka JM, Terasaki PI. Living donor kidney transplants: superior success rates despite histoincompatibilities. *Transplant Proc.* 1997 Mar;29(1-2):203.
22. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Paz D, Tullius SG, et al. The influence of donor brain death on long-term function of renal allotransplants in rats. *Transplant Proc.* 2001 Mar;33(1-2):693–4.
23. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19):2426–33.
24. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JAB, de Haan A, Ploeg RJ, de Leij LFMH, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation.* 2004 Nov 15;78(9):1251–8.
25. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg.* 2000 Aug;232(2):263–71.

26. Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, et al. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc.* 1997 Mar;29(1-2):79–81.
27. Van der Woude FJ, Schnuelle P, Yard BA. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury. *J Investig Med.* 2004 Jul;52(5):323–9.
28. BÄK Bundesärztekammer. Bundesärztekammer - Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes, 3. Fortschreibung 1997 mit Ergänzungen gemäß Transplantationsgesetz (TPG) [Internet]. 2007 [cited 2011 Sep 19]. Available from: <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3252>
29. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JAB, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HGD, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation.* 2004 Oct 15;78(7):978–86.
30. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1551–9.
31. Schwarz C, Regele H, Steininger R, Hansmann C, Mayer G, Oberbauer R. The contribution of adhesion molecule expression in donor kidney biopsies to early allograft dysfunction. *Transplantation.* 2001 Jun 15;71(11):1666–70.
32. Kim YS, Lim CS, Kim S, Lee JS, Lee S, Kim ST, et al. Cadaveric renal allograft at the time of implantation has the similar immunological features with the rejecting allograft. *Transplantation.* 2000 Oct 15;70(7):1080–5.
33. Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007 Jun;7(6):1584–93.
34. Araki M, Fahmy N, Zhou L, Kumon H, Krishnamurthi V, Goldfarb D, et al. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation.* 2006 Mar 15;81(5):783–8.
35. Birks EJ, Owen VJ, Burton PB, Bishop AE, Banner NR, Khaghani A, et al. Tumor necrosis factor-alpha is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation. *Circulation.* 2000 Jul 18;102(3):326–31.
36. Murugan R, Venkataraman R, Wahed AS, Elder M, Hergenroeder G, Carter M, et al. Increased plasma interleukin-6 in donors is associated with lower recipient hospital-free survival after cadaveric organ transplantation. *Crit Care Med.* 2008 Jun;36(6):1810–6.

37. Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Koefoed-Nielsen J, Bach A, Nyboe R, et al. Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 May;52(5):621–7.
38. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation*. 1996 Aug 15;62(3):330–5.
39. Mertes PM, el Abassi K, Jaboin Y, Burtin P, Pinelli G, Carteaux JP, et al. Changes in hemodynamic and metabolic parameters following induced brain death in the pig. *Transplantation*. 1994 Aug 27;58(4):414–8.
40. Wood KE, Becker BN, McCartney JG, D'Alessandro AM, Coursin DB. Care of the potential organ donor. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2730–9.
41. Smith M. Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Sep;23(9 Suppl):S217–222.
42. McKeating EG, Andrews PJ, Signorini DF, Mascia L. Transcranial cytokine gradients in patients requiring intensive care after acute brain injury. *Br J Anaesth*. 1997 May;78(5):520–3.
43. Kostulas N, Pelidou SH, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke*. 1999 Oct;30(10):2174–9.
44. Chatterjee SN, Terasaki PI, Fine S, Schulman B, Smith R, Fine RN. Pretreatment of cadaver donors with methylprednisolone in human renal allografts. *Surg Gynecol Obstet*. 1977 Nov;145(5):729–32.
45. Jeffery JR, Downs A, Grahame JW, Lye C, Ramsey E, Thomson AE. A randomized prospective study of cadaver donor pretreatment in renal transplantation. *Transplantation*. 1978 Jun;25(6):287–9.
46. Soullillou JP, Baron D, Rouxel A, Guenel J. Steroid-cyclophosphamide pretreatment of kidney allograft donors. A control study. *Nephron*. 1979;24(4):193–7.
47. Reutzel-Selke A, Tullius SG, Zschockelt T, Nieminen-Kelhä M, Bachmann U, Jonas S, et al. Donor pretreatment of grafts from marginal donors improves long-term graft outcome. *Transplant Proc*. 2001 Mar;33(1-2):970–1.
48. Reutzel-Selke A, Zschockelt T, Denecke C, Bachmann U, Jurisch A, Pratschke J, et al. 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*. 2003 Jun 15;75(11):1786–92.

49. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm M, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, et al. Improvements in early behaviour of kidney allografts after donor treatment. *Transplant Proc.* 2002 Sep;34(6):2213–4.
50. Kuecuk O, Mantouvalou L, Klemz R, Kotsch K, Volk HD, Jonas S, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplant Proc.* 2005 Feb;37(1):387–8.
51. McLean KM, Duffy JY, Pandalai PK, Lyons JM, Bulcao CF, Wagner CJ, et al. Glucocorticoids alter the balance between pro- and anti-inflammatory mediators in the myocardium in a porcine model of brain death. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Jan;26(1):78–84.
52. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2008 Dec;248(6):1042–50.
53. Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe JE, Lenhard SM, Laskowski I, Shaw GD, et al. Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1937–45.
54. Gottmann U, Brinkkoetter PT, Bechtler M, Hoeger S, Karle C, Schaub M, et al. Effect of pre-treatment with catecholamines on cold preservation and ischemia/reperfusion-injury in rats. *Kidney Int.* 2006 Jul;70(2):321–8.
55. Kotsch K, Francuski M, Pascher A, Klemz R, Seifert M, Mittler J, et al. Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors. *Am J Transplant.* 2006 Mar;6(3):477–86.
56. Ogawa K, Ito Y, Takahashi T, Onumata O, Sato K, Kakita A. Effects of cortisol administration on hepatic circulation during brain death in rabbits. *Surgery.* 2002 Apr;131(4):450–62.
57. Valentin JF, Bruijn JA, Paul LC. Donor treatment with mycophenolate mofetil: protection against ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation.* 2000 Feb 15;69(3):344–50.
58. Hayashi S, Ito M, Yasutomi M, Namii Y, Yokoyama I, Uchida K, et al. Evidence that donor pretreatment with FK506 has a synergistic effect on graft prolongation in hamster-to-rat heart xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1995 Jun;14(3):579–84.

59. Novitzky D, Cooper DK, Reichart B. Hemodynamic and metabolic responses to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. *Transplantation*. 1987 Jun;43(6):852–4.
60. Salim A, Vassiliu P, Velmahos GC, Sava J, Murray JA, Belzberg H, et al. The role of thyroid hormone administration in potential organ donors. *Arch Surg*. 2001 Dec;136(12):1377–80.
61. Randell TT, Höckerstedt KA. Triiodothyronine treatment in brain-dead multiorgan donors--a controlled study. *Transplantation*. 1992 Oct;54(4):736–8.
62. Goarin JP, Cohen S, Riou B, Jacquens Y, Guesde R, Le Bret F, et al. The effects of triiodothyronine on hemodynamic status and cardiac function in potential heart donors. *Anesth Analg*. 1996 Jul;83(1):41–7.
63. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, et al. Aggressive pharmacologic donor management results in more transplanted organs. *Transplantation*. 2003 Feb 27;75(4):482–7.
64. Martins PNA, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, Attrot K, Pascher A, et al. Induction of carbon monoxide in donor animals prior to organ procurement reduces graft immunogenicity and inhibits chronic allograft dysfunction. *Transplantation*. 2006 Oct 15;82(7):938–44.
65. Nijboer WN, Ottens PJ, van Dijk A, van Goor H, Ploeg RJ, Leuvenink HGD. Donor pretreatment with carbamylated erythropoietin in a brain death model reduces inflammation more effectively than erythropoietin while preserving renal function. *Crit Care Med*. 2010 Apr;38(4):1155–61.
66. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schödel J, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Dec 15;106(50):21276–81.
67. Hariharan S, McBride MA, Bennett LE, Cohen EP. Risk factors for renal allograft survival from older cadaver donors. *Transplantation*. 1997 Dec 27;64(12):1748–54.
68. Cosio FG, Qiu W, Henry ML, Falkenhain ME, Elkhammas EA, Davies EA, et al. Factors related to the donor organ are major determinants of renal allograft function and survival. *Transplantation*. 1996 Dec 15;62(11):1571–6.
69. Smits JM, van Houwelingen HC, De Meester J, le Cessie S, Persijn GG, Claas FH, et al. Permanent detrimental effect of nonimmunological factors on long-term renal graft

survival: a parsimonious model of time-dependency. *Transplantation*. 2000 Jul 27;70(2):317–23.

70. Verran DJ, deLeon C, Chui AK, Chapman JR. Factors in older cadaveric organ donors impacting on renal allograft outcome. *Clin Transplant*. 2001 Feb;15(1):1–5.

71. Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA, et al. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis*. 2000 Jul;36(1):153–9.

72. Sánchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J, Pérez-Contín MJ, Fernández C, Alvarez J, et al. Renal transplantation from non-heart beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Feb;11(2):350–8.

73. Axelrod DA, McCullough KP, Brewer ED, Becker BN, Segev DL, Rao PS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1999-2008: the changing face of living donation. *Am J Transplant*. 2010 Apr;10(4 Pt 2):987–1002.

74. Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, Okechukwu CN, Wolfe RA, Leichtman AB, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Mar;12(3):589–97.

75. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin Transplant*. 1997 Oct;11(5 Pt 1):366–72.

76. Gjertson DW. A multi-factor analysis of kidney graft outcomes at one and five years posttransplantation: 1996 UNOS Update. *Clin Transpl*. 1996;343–60.

77. De Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1538–46.

78. Oppenheimer F, Aljama P, Asensio Peinado C, Bustamante Bustamante J, Crespo Albiach JF, Guirado Perich L. The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jun;19 Suppl 3:iii11–15.

79. Tullius SG, Reutzel-Selke A, Egermann F, Nieminen-Kelhä M, Jonas S, Bechstein WO, et al. Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jul;11(7):1317–24.

80. Perico N, Remuzzi G, Benigni A. Aging and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2011 Feb 23 [cited 2011 Mar 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358327>

81. Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing. *Biogerontology*. 2002;3(6):337–45.
82. Pawelec G, Larbi A, Derhovanessian E. Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol*. 2010 Jan;142 Suppl 1:S39–44.
83. Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, Pascher A, Martins PNA, Kessler H, et al. Donor age intensifies the early immune response after transplantation. *Kidney Int*. 2007 Apr;71(7):629–36.
84. Sidman CL, Luther EA, Marshall JD, Nguyen KA, Roopenian DC, Worthen SM. Increased expression of major histocompatibility complex antigens on lymphocytes from aged mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Nov;84(21):7624–8.
85. Bradley BA. Does the risk of acute rejection really decrease with increasing recipient age? *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S42–44.
86. Bradley BA. Rejection and recipient age. *Transpl Immunol*. 2002 Aug;10(2-3):125–32.
87. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, et al. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation*. 2000 Jul 27;70(2):306–10.
88. Lufft V, Kliem V, Tusch G, Dannenberg B, Brunkhorst R. Renal transplantation in older adults: is graft survival affected by age? A case control study. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):790–4.
89. Kasiske BL, Snyder J. Matching older kidneys with older patients does not improve allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Apr;13(4):1067–72.
90. Roodnat JJ, Zietse R, Mulder PG, Rischen-Vos J, van Gelder T, IJzermans JN, et al. The vanishing importance of age in renal transplantation. *Transplantation*. 1999 Feb 27;67(4):576–80.
91. Pawelec G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech Ageing Dev*. 1999 Apr 1;108(1):1–7.
92. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis*. 2000 Aug;31(2):578–85.
93. Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*. 2000 Oct;21(10):515–21.
94. Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry*. 1997 Apr 1;27(4):297–313.

95. Eurotransplant International Foundation. Annual Report 2009 [Internet]. [cited 2011 Mar 15]. Available from: http://www.eurotransplant.org/files/annual_report/ar_2009.pdf
96. Rao PS, Merion RM, Ashby VB, Port FK, Wolfe RA, Kayler LK. Renal transplantation in elderly patients older than 70 years of age: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients. *Transplantation*. 2007 Apr 27;83(8):1069–74.
97. Büchler M, Halimi J-M, Najjar AA, Giral M, Hiesse C, Giraudeau B, et al. Living with a functioning kidney transplant at 74 yr or older: a national epidemiological study. *Clin Transplant*. 2004 Dec;18(6):681–5.
98. Waiser J, Schreiber M, Budde K, Fritsche L, Böhrer T, Hauser I, et al. Age-matching in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 May;15(5):696–700.
99. Frei U, Noeldeke J, Machold-Fabrizii V, Arbogast H, Margreiter R, Fricke L, et al. Prospective age-matching in elderly kidney transplant recipients--a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program. *Am J Transplant*. 2008 Jan;8(1):50–7.
100. Cohen B, Smits JM, Haase B, Persijn G, Vanrenterghem Y, Frei U. Expanding the donor pool to increase renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jan;20(1):34–41.
101. Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, et al. Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant*. 2002 Oct;2(9):857–66.
102. Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):1971–5.
103. Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schönemann C, Tullius SG, et al. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation*. 2004 Dec 15;78(11):1640–6.
104. Näther BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schönemann C, Pratschke J, et al. Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFNgamma-producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2006 Nov;16(3-4):232–7.

105. Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods*. 2003 Oct;31(2):143–9.
106. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*. 1972 Mar;43(3):404–9.
107. Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *J Biomed Sci*. 2000 Aug;7(4):317–21.
108. Pratschke J, Merk V, Reutzel-Selke A, Pascher A, Denecke C, Lun A, et al. Potent early immune response after kidney transplantation in patients of the European senior transplant program. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):992–1000.
109. Wang L, Xie Y, Zhu L-J, Chang T-T, Mao Y-Q, Li J. An association between immunosenescence and CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci*. 2010 Aug;23(4):327–32.
110. Mueller TF. Phenotypic changes with immunosuppression in human recipients. *Front Biosci*. 2003 Sep 1;8:d1254–1274.
111. Kamar N, Glander P, Nolting J, Böhler T, Hambach P, Liefeldt L, et al. Effect of mycophenolate mofetil monotherapy on T-cell functions and inosine monophosphate dehydrogenase activity in patients undergoing a kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2006 Sep;38(7):2292–4.
112. Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2374–81.
113. DSO_Leitfaden_Organspende_01_2012.pdf [Internet]. [cited 2012 Feb 21]. Available from: http://dso.de/fachinformationen/informationsordner/pdf/DSO_Leitfaden_Organspende_01_2012.pdf

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
ATG	Antithymozytenglobulin
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderalbumin
CD	„cluster of differentiation“
CIT	„cold ischemia time“, kalte Ischämiezeit
CNI	Calcineurin-Inhibitor
DGF	„delayed graft function“, verzögerte Transplantatfunktion
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot
ESP	Eurotransplant Senior Program
ETKAS	Eurotransplant Kidney Allocation System
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	„fetal calf serum“, fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK 506	Tacrolimus
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
Hsp70	70 kilodalton heat shock proteins
ICAM	„Intercellular Adhesion Molecule“
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITK	Isotypenkontrolle
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Myophenolat Mofetil
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHD	Prolylhydroxylase

PRA	Panelreaktive Antikörper (panel reactive antibodies)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	Zellkulturmedium RPMI-1640 (benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDZ RAD	Everolimus
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Schuller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Immunantwort nach Steroidvorbehandlung hirntoter Organspender bei Nierentransplantationen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

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

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Johann Pratschke für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung bedanken.

Besonderer Dank geht an Frau Dr. Anja Reutzel-Selke für ihre ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der letzten Jahre.

Frau Anke Jurisch und Frau Marion Marksteiner möchte ich für die methodische Anleitung, tatkräftige Mitarbeit und Hilfsbereitschaft in allen Situationen danken.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich Sabine Schulz, Anja Zernitzky, Dr. med. Sascha Weiß, Dr. med. Wladimir Faber, Petra Hecker, Frau Dr. Constanze Schönemann, Prof. Dr. Birgit Sawitzki, Christine Brandt, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Pratschke, der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, des HLA-Labors, der Blutbank und des Instituts für medizinische Immunologie der Charité, die mich auf verschiedenste Weise unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung bedanken.