

7.3. Kopien der wissenschaftlichen Publikationen auf Basis dieser Dissertation

- **Khairuddin R, Wachtlin J, Hoffmann F.**
Prognostischer Einfluss des HLA-Matchings auf die langfristige Transparenz von Korneatransplantaten.
100. Jahrestagung der DOG, Vortrag DO.02.07; Berlin, 26.-29.9.2002
[Ophthalmologe. 2002 Sep; 99(Suppl 1): 9-10.]
- **Khairuddin R, Wachtlin J, Hopfenmüller W, Hoffmann F.**
HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection.
[Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003 Dec; 241(12): 1020-1028. Epub 2003 Aug 29.]
- Wachtlin J, **Khairuddin R**, Hoffmann F.
Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik.
[Ophthalmologe. 2003 Dec; 100(12): 1021-1030. Epub 2003 Nov 14.]

mechanischer Keratoplastik (PK) in Abhängigkeit von der Diagnose und simultanen Linseneingriffen mit einem Regressionsmodell untersucht.

Methode: Bei 589 Augen wurde nach PK (273 Keratokonus (D1); 187 Fuchssche Dystrophie (D2), 129 bullöse pseudophake Keratopathie (D3)) im Rahmen einer prospektiven Studie die Hornhautendothelzeldichte mittels Spiegelmikroskopie (EM-1100, Tomey, Erlangen) analysiert. Weiter wurde im Längsschnitt (Beobachtungsdauer von 6 Monaten bis 10 (2,9±1,9) Jahre das Zeitverhalten von mindestens 3 validen Endothelbefunden durch ein logarithmisches Regressionsmodell im Sinne einer Minimierung der Residuen (Distanz zwischen gemessenen und prädierten Werten) analysiert. Als prädiktive Spenderparameter wurden untersucht: Spenderalter (SA), post-mortem (PM) und Medium-Zeit (MED) sowie der Trepanationsdurchmesser. **Ergebnisse:** Im logarithmischen Regressionsmodell reduzierte sich in D1/D2/D3 die Zelldichte jährlich um 2,9±28%/11,2±22%/19,3±29%, (D1-D2: p=0,001; D1-D3 und D2-D3: p<0,0001). Im Modell korrelierte in D1/D2/D3 MED (p=0,04/p=0,05/p=0,02) und invers der Trepanationsdurchmesser (p=0,02/p=0,04/p=0,01) mit dem Zellverlust, nicht jedoch PM (p=0,16/p=0,08/p=0,25) und SA (p=0,4/p=0,12/p=0,16). **Schlussfolgerungen:** Eine lange Lagerungsdauer sowie ein kleiner Trepanationsdurchmesser wirken sich nachteilig auf die Endothelzellentwicklung nach Keratoplastik aus. Dagegen scheinen das Spenderalter und die Präparationszeit hierauf keinen signifikanten Einfluss zu haben.

DO.02.05

Wachstumsfaktoren als Adjuvans zu serumfreien Kulturmedien für die Organkultur der Spenderhornhaut – eine experimentelle Studie
Rieck P., Gigon M., Jaeckel C., Metzner S., Hart K., Hartmann C.
Humboldt-Universität zu Berlin, Charité Campus Virchow-Klinikum, Augenklinik (Berlin); Service d'Ophthalmologie, CHU Genève (Genf)

Hintergrund: Die BSE-Problematik hat auch den z.Zt. noch in allen Hornhautbanken üblichen Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) zu Organkulturmedien in Frage gestellt. Serumfreie Kulturmedien stehen derzeit noch nicht zur Verfügung. Die Erprobung geeigneter Zusammensetzungen unter Erhalt einer zum Serum vergleichbaren Endothelprotektion ist deshalb Gegenstand aktueller Forschung. Wir testeten den Effekt eines Wachstumsfaktors – FGF-2 – auf den Verlauf der Endothelschädigung unter serumfreien Organkulturbedingungen.

Methode: Schweine- bzw. humane Korneae wurden für 9 bzw. 22 Tage bei 32°C in serumfreien MEM-Medium kultiviert. Das Medium von je 10 Hornhäuten wurde mit 10 ng/ml FGF-2 supplementiert, die Kontrollgruppen erhielten keinen Zusatz. Bei den humanen Korneae erfolgte die Untersuchung im Paarvergleich. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurde die endotheliale Schädigungsrate quantitativ mit Hilfe der Janusgrün-Photometrietechnik bestimmt. Eine licht- und elektronenmikroskopische Beurteilung sowie ein BrDU-Assay zum Nachweis eines evt. proliferationsfördernden Effekts von FGF-2 erfolgte ebenfalls.

Ergebnisse: Die endotheliale Schädigung der Schweinehornhäute belief sich nach 9 Tagen Organkultur auf 15,1±8,7% in der Kontrollgruppe und auf 6,4±2,0% in der FGF-2-supplementierten Gruppe. Nach 22 Tagen lag die Schädigungsrate bei 25,3±10,2% (Kontrolle) und bei 15,6±4,2% (FGF-2-Zusatz). Bei den humanen Korneae lag der Endothelschaden nach 22 Tagen Kultivierung im Kontrollmedium bei 19,3±6,3%. Die FGF-2-Zugabe reduzierte die Schädigungsrate auf im Mittel 11,8±3,2% (p<0,01). Eine endotheliale Proliferationsaktivität wurde durch den Wachstumsfaktor nicht induziert.

Schlussfolgerungen: Diese experimentelle Studie zeigt eine signifikant reduzierte Endothelschädigung durch FGF-2-Zusatz zu einem serumfreien Kulturmedium. Der Effekt ist tatsächlich protektiv, ein Hinweis für eine Zellerneuerung durch verstärkte Proliferation ergab sich nicht. Ein FGF-2-Zusatz könnte zur Etablierung serumfreier Medien für die Organkultur der Spenderhornhaut beitragen.

DO.02.06

Funktionelle Ergebnisse nach nichtmechanischer perforierender Excimerlaser-Keratoplastik – Prospektive Studie über die ersten 1000 konsekutiven elektiven Eingriffe

Seitz B., Langenbacher A., Nguyen N.X., Kühle M., Naumann G.O.H.
Friedrich-Alexander-Universität, Augenklinik (Erlangen)

Hintergrund: Die nichtmechanische Hornhauttrepanation ist seit 1998 in Erlangen das Standardverfahren bei der perforierenden Keratoplastik (PK) zur Therapie avaskulärer Hornhautprozesse. Ziel der Studie war eine Darstellung des Spektrums der Diagnosen und Eingriffe sowie der funktionellen Ergebnisse der ersten 1000 konsekutiven, elektiven, runden PKs.

Methode: In diese prospektive klinische Querschnittstudie gingen 362 Augen mit Keratokonus (medianes Alter 38 Jahre (a)), 203 mit Fuchsscher Dystrophie (67a), 178 mit bullöser Keratopathie (73a), 94 mit Narben (65a), 38 mit stromalen Dystrophien (45a), 25 mit hohem Astigmatismus nach PK (54a) und 100 sonstige (56a) ein. Von 6 Operateuren wurde 718× eine reine PK, 222× eine Triple-Prozedur und 60× ein zusätzliches Kunstlinsenmanöver durchgeführt (90% doppelt fortlaufende Kreuzstichnaht; 11% Re-PKs). Die Empfänger – (90% 7,0 bis 8,0 mm Durchmesser) und Spendertrepanation (0,1 mm Überdimensionierung, „Erlanger Orientierungszähnen“) wurde mittels 193 nm Excimerlasern von epithelial durchgeführt. Die Fäden waren bei 79% nach 1,0a (Median) teilweise, bei 50% nach 1,5a komplett entfernt worden. Primäre Zielgrößen waren der keratometrische Astigmatismus (KA), der refraktive Zylinder (ZYL) und der cc-Visus vor und nach vollständiger Fadenentfernung.

Ergebnisse: Bei einer medianen Beobachtungsdauer von 1,2 bis 2,0a traten 4,7% immunologische Transplantatreaktionen auf, in 1,8% wurde eine Re-PK nötig. Vor/nach Fadenentfernung betrug im Median KA, ZYL, Visus bei Keratokonus 3,0/3,0D, 2,5/2,5D, 0,7/0,7; bei Fuchs 3,5/3,0D, 2,0/1,5D, 0,5/0,5; bei bullöser Keratopathie 3,3/3,0D, 0,0/0,0D, 0,3/0,3; bei Narben 2,5/3,5D, 1,5/1,0D, 0,4/0,4; bei stromalen Dystrophien 2,5/2,0D, 2,0/1,5D, 0,7/0,7; bei hohem Astigmatismus 3,8/6,5D, 1,5/2,0D, 0,6/0,6; bei sonstigen 2,3/3,2D, 1,0/1,5D, 0,4/0,5.

Schlussfolgerungen: Zu dem gefürchteten Astigmatismusanstieg nach Fadenentfernung kommt es bei Lasertrepanation unter standardisierten Operationsbedingungen nur bei Re-PKs wegen vorbestehendem hohem Astigmatismus. Die günstigste Visusprognose ist bei Keratokonus und stromalen Dystrophien, die schlechteste bei bullösen Keratopathien zu erwarten.

DO.02.07

Prognostischer Einfluss des HLA-Matchings auf die langfristige Transparenz von Korneatransplantaten

Khairuddin R., Wachtlin J., Hoffmann F.

Freie Universität Berlin, Klinikum Benjamin Franklin, Augenklinik (Berlin)

Hintergrund: Obwohl das HLA Typisieren und -Matchen in der Transplantationsmedizin seit über 30 Jahren angewendet werden, ist ihr Einsatz bei der Korneatransplantation immer noch umstritten.

Methode: In den Jahren von 1983 bis 2001 wurden an unserem Standort 492 Patienten mit einer perforierenden Keratoplastik mit Kreuzstichnaht versorgt, von denen 330 Patienten nachuntersucht wurden. Bei allen Transplantationen wurde bei den Spendern und Empfängern eine HLA-Typisierung für den A, B und DR Lokus durchgeführt. Die Patienten wurden in Abhängigkeit zur präoperativen Diagnose in zwei Prognosegruppen unterteilt.

Ergebnisse: Von 329 postoperativ klaren Transplantaten, trat in der guten Prognosegruppe bei 30 von 221 Patienten (13,6%) und in der schlechten Prognosegruppe bei 53 von 108 Patienten (48,6%) eine Immunreaktion auf. Vor allem bei den Patienten der schlechten Prognose

segruppe liess sich anhand von Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,0009$) zwischen der Anzahl der HLA mismatches und der Häufigkeit einer Immunreaktion nachweisen. Bei den Patienten mit guter Prognose ist dieser Zusammenhang nur tendenziell nachweisbar ($p=0,1763$). Unterteilt nach den HLA Klassen ergab sich wiederum vor allem in der schlechten Prognosegruppe, dass die Anzahl der HLA B mismatches ein signifikanter Prognosefaktor ist ($p=0,0007$). Diese Tendenz zeigte sich auch für die Anzahl der HLA DR mismatches: Bei Zusammenfassung der HLA B und DR mismatches zu einem gemeinsamen Prognosefaktor ergab sich in der schlechten Prognosegruppe nahezu eine statistische Signifikanz mit $p=0,0689$.

Schlussfolgerungen: Die klinischen Ergebnisse stimmen mit den theoretischen Erkenntnissen über die Funktion des HLA bzw. MHC-Rezeptors überein. Eine möglichst weitgehende Übereinstimmung der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger verbessert prognostisch die langfristige Transparenz des Hornhauttransplantates.

DO.02.08

Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung limbalen kornealer Epithelzellen von Spenderhornhäuten

Kakkassery V., Feucht M., Engelmann K., Bednarz J.
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (Hamburg)

Hintergrund: Korneale Oberflächendefekte infolge von Limbusinsuffizienz werden durch Limbustransplantation behandelt. Alternativ besteht die Möglichkeit, isolierte limbale epitheliale Stammzellen zu isolieren, auf Amnionmembran zu transplantieren und diese anschließend auf die Hornhaut zu übertragen. In dieser Untersuchung soll geprüft werden, ob Spenderhornhäute als Quelle für die Stammzellisolierung geeignet sind.

Methode: Limbale Epithelzellen wurden von organkultivierten Spenderhornhäuten isoliert die nicht zur Keratoplastik freigegeben wurden bzw. von den Skleralringen von Spenderhornhäuten nach deren Trepanation. Die Spenderhornhäute/Skleralringe wurden in eine 24-Loch-Schale mit etwa 0,5 ml Kulturmedium (Pellegrini et al. 1997 Lancet 349:990-993) gelegt und das Epithel der Limbusregion mit Hilfe eines Hockey-Messers entfernt. Die Hornhäute wurden aus dem Medium entfernt und die Epithelzellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte durch mikroskopische Befundung sowie immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Tenascin C, Kollagen IV, Laminin, Vimentin und Cytokeratin 18.

Ergebnisse: Die isolierten Epithelzellen wiesen eine hexagonale Form auf und bildeten innerhalb einer Woche einen geschlossenen Monolayer. Durch immunhistochemischen Färbungen konnten in den kultivierten Zellen Tenascin C, Laminin, Cytokeratin 18 und Vimentin nachgewiesen werden. Kollagen IV konnte in den Kulturen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassung: Proliferationsfähige, limbale Epithelzellen konnten von Spenderhornhäuten und Skleralringen isoliert werden. Die Zellen wiesen ein für limbale Epithelzellen typisches Expressionsmuster auf. Damit steht ein umfangreicher Pool teilweise HLA-gematchten Gewebes für die Isolierung und anschließende therapeutische Anwendung dieser Zellen zur Verfügung.

DO.02.09

Systemisches Mycophenolatmofetil (MMF) als Immunprophylaxe nach allogener Hochrisiko-Keratoplastik: Erste Ergebnisse einer randomisierten Multicenter-Studie

¹Mayweg S., ¹Sokolowska Y., ²Seitz B., ³Engelmann K., ⁴Mittelviehhaus H., ¹Reinhard T.

¹Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitäts-Augenklinik (Düsseldorf); ²Augenklinik mit Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg (Erlangen); ³Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (Hamburg); ⁴Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Augenklinik (Freiburg)

Hintergrund: Nach ermutigenden Ergebnissen einer randomisierten monozentrischen Pilotstudie können jetzt erste Daten einer multizentrischen Studie zur Überprüfung der Effektivität und Sicherheit von MMF vorgelegt werden.

Patienten: Bislang wurden 71 von insgesamt 140 vorgesehenen Hochrisiko-Keratoplastikpatienten in die Studie aufgenommen. Davon wurden 39 Patienten in die MMF-Gruppe und 32 Patienten in die Kontrollgruppe randomisiert. Alle 71 Patienten erhielten Fluocortolon 1mg/kg KG/Tag über die ersten 3 postoperativen Wochen ausschleichend und lokales Prednisolonacetat 5x/Tag für 6 Monate. In der MMF-Gruppe wurde zusätzlich für 6 Monate systemisches MMF 2x1000 mg/d appliziert.

Ergebnisse: Innerhalb der Nachbeobachtungszeit von derzeit durchschnittlich 8,2±6,6 Monaten entwickelten in der MMF-Gruppe 2 Patienten reversible Immunreaktionen nach Absetzen des MMF im Vergleich zu 3 reversiblen und 3 irreversiblen Immunreaktionen in der Kontrollgruppe. In der Kalkulation nach Kaplan und Meier sind 1 Jahr postoperativ in der MMF-Gruppe 95% der Transplantate frei von Abstoßungen im Vergleich zu nur 73% in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist allerdings (noch) nicht statistisch signifikant ($p=0,1$; Log-rank-test). Alle bislang aufgetretenen Nebenwirkungen waren reversibel.

Schlussfolgerungen: Die bislang vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß systemisches MMF dazu beitragen kann, die eingeschränkte Prognose von Hochrisiko-Keratoplastikpatienten zu verbessern.

DO.02.10

Parameter- und Ablationsmusterbestimmung für die nicht-mechanische Trepanation mit einer neuen Faser-Optikeinheit für den 308nm Excimer Laser

Specht H., Völcker H.E., Kruse F.E.

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Universitäts-Augenklinik (Heidelberg)

Hintergrund: Die nichtmechanische Excimer Laser Trepanation mit der von uns vorgestellten neuen Faser-Optikeinheit hat, verglichen mit herkömmlichen Methoden, eindeutige Vorteile bei der perforierenden Keratoplastik. Hier beschreiben wir die optimierten Parameter für die Anwendung dieser einfachen Trepan, der in Verbindung mit einer kleinen, beweglichen Lasereinheit benutzt werden kann.

Methode: Ein Motor angetriebener Trepan wurde entwickelt, der mittels Saugring zentriert werden kann. Er wird in Verbindung mit einer Lichtleitfaser an einen kleinen, beweglichen im Handel erhältlichen 308nm Excimer Laser angeschlossen. In einer vorklinischen Studie wurden frisch enukleierte Augen vom Schwein und von Menschen verwendet. An diesen wurden die folgenden Parameter untersucht: Energiedichte (5 mJ/mm²-20 mJ/mm²), Repetitionsrate (10 Hz-100 Hz), Faserdurchmesser (100 µm, 200 µm, 300 µm), Overlap (0%, 25%, 50%, 75%). Anschließend wurden histologische Untersuchungen der Hornhäute durchgeführt.

Ergebnisse: Der Lasertrepan ist einfach zu verwenden und ermöglicht das genaue Schneiden von Hornhäuten. Die histologischen Schnitte

Riad Khaireddin
Joachim Wachtlin
Werner Hopfenmüller
Friedrich Hoffmann

HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection

Published online: 29 August 2003
© Springer-Verlag 2003

This work was presented in part at the 100th meeting of the German Society of Ophthalmology, Berlin, 26–29 September 2002

R. Khaireddin (✉) · J. Wachtlin
F. Hoffmann
Department of Ophthalmology,
Charité University Medicine, Berlin,
Benjamin Franklin Campus,
Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin,
Germany
e-mail: riad.khaireddin@gmx.com
Tel.: +49-30-80906545
Fax: +49-30-80906545

W. Hopfenmüller
Department of Biostatistics,
Charité University Medicine, Berlin,
Benjamin Franklin Campus,
Berlin, Germany

Abstract Purpose: The purpose of this study is to determine the effectiveness of HLA typing in preventing corneal allograft rejection.

Methods: This retrospective single-center study analyzed 459 consecutive HLA-typed patients who underwent perforating keratoplasty (PKP) between 1983 and 2001. Grafts were postoperatively transparent after donor-recipient selection by HLA-A, -B and -DR typing. Patients were divided into a low- and a high-risk group based on their preoperative diagnosis. **Results:** The estimated 1-, 5- and 10-year graft survival (Kaplan-Meier) was 93, 88 and 67% in low-risk patients and 73, 43 and 38% in high-risk patients. We found a significant correlation between the number of HLA mismatches and the rate of allograft rejections: a donor-recipient match of two or more alleles in HLA-A, -B or -DR reduces the rejection rate by at least 10% in

low-risk (10 years after PKP; $P<0.04$) and 40% in high-risk patients (3 years after PKP; $P<0.0001$). Especially HLA-B mismatches are important prognostic factors for both low- ($P<0.008$) and high-risk patients ($P<0.003$). Considering both HLA-B and -DR mismatches significantly reduces the rate of allograft rejection, particularly in high-risk patients ($P<0.0001$). Matching on a split typing level offers no significant advantage over broad level matching. **Conclusion:** Clinical results confirm theories developed to explain the function of the HLA (MHC) receptor. The closest possible donor-recipient match of HLA antigens based on broad level typing significantly reduces the rate of allograft rejection and thus improves the prognosis for long-term transparency of corneal grafts in both high- and low-risk patients.

Introduction

Corneal allografting was first performed in humans nearly a century ago, and the cornea is now the most commonly transplanted tissue. Low-risk patients have very favorable overall 1-year graft survival rates of 85–95% [42]. Unfortunately, however, their long-term graft survival rates drop to 74% after 5 years and to 62% after 10 years [44]. In high-risk patients with substantial corneal vascularization or a history of corneal graft rejection, the situation is even worse, with a 10-year graft survival rate of less than 35% [44].

Corneal allografting differs from other transplantation procedures, e.g., bone marrow transplantation [32], in that HLA matching is not part of the routine, since many surgeons still regard the cornea as an immune-privileged site because of its lack of vessels and lymphatics. However, immune-mediated allograft rejection is the main cause of corneal graft failure in all risk groups [40, 44]. Reducing the risk of immunologic allograft rejections is thus of vital importance in corneal transplantation.

Major histocompatibility complex (MHC) antigens, permanently expressed by all nucleated cells (HLA class I) or only by antigen-presenting cells (HLA class

Table 1 Total dose of systemic and local therapy given after keratoplasty

Period	Systemic therapy		Local therapy		
	Methyl-prednisolone (mg)	Cyclosporin A (g)	Dexamethasone 0.1% (mg)	Cyclosporin A 2% (mg)	Indomethacin 1% (mg)
1983–1986	–	–	7–11	450–500	10–15
1986–1987	–	–	10–20	–	10–15
1988–1991	400	5–10	10–20	–	10–15
1991–2001	–	–	10–15	–	–

II) are clinically important because of the role they play in graft rejection. If mismatched for HLA-A and/or HLA-B, donor cells with HLA class I antigens may be targets for host CD8+ cytotoxic T lymphocytes [10, 34, 36]. If mismatched for HLA-DR, donor cells with HLA class II antigens may cause a delayed hypersensitivity reaction mediated by host CD4+ T helper lymphocytes.

Studies dealing for many years with the possible beneficial effects of HLA matching on corneal graft outcome have yielded conflicting results [2, 9, 26, 27, 38]. Since we have allocated donor cornea to patients with the highest HLA compatibility on our waiting list for nearly 20 years, this retrospective study was designed to evaluate prospective donor-recipient histocompatibility matching of the HLA-A, -B and -DR loci for its effect on the immune response of corneal allografts in low- and high-risk patients.

Subjects and methods

Patients

Between November 1983 and November 2001, 492 consecutive patients received mostly matched corneal allografts by perforating keratoplasty (PKP) at the University Medical Center Benjamin Franklin of the Free University of Berlin, Germany. All grafts were fixed with a cross-stitch suture [16]. This retrospective single-center study discusses 459 postoperatively transparent grafts. Thirty-three patients were excluded because either donor or recipient HLA data were lacking. Patients were divided into two prognostic groups according to their preoperative diagnosis: 308 of 459 patients (67%) were considered to be at low risk and 151 of 459 (33%) at high risk. High-risk criteria were: previous corneal ulcer, thermal or chemical burn, previous immune-mediated allograft failure or any other diagnosis combined with two or more corneal quadrants of deep stromal vascularization [13]. A recurrence-free period of 3 months was required for patients with herpes simplex virus (HSV) keratitis to be accepted for transplantation.

Storage and quality control of donor corneas

Donor corneas were obtained from tissue-typed multiorgan donors from the Transplant Center Berlin-Steglitz, Germany, and from the Bio Implant Service (BIS) Foundation Leiden, The Netherlands. The donor corneas from Berlin were either transplanted directly or after short-term preservation [11] or after preservation in tissue culture medium as described by Pels et al. [33].

HLA typing, HLA matching and quality control

We performed prospective HLA typing for the HLA-A, -B and -DR loci, which were used for donor-recipient selection. Since 1990, we have only transplanted allografts with at least two donor-recipient matches at the HLA-B and/or HLA-DR loci. The donor and recipient HLA class I and class II serological typing was performed in a single reference laboratory in Berlin or by Eurotransplant (BIS) in Leiden, The Netherlands. HLA antigens were determined by the microcytotoxicity test designed by Terasaki and McClelland [39] to detect lymphocyte surface markers by a cytotoxic antigen/antibody reaction. Analysis was performed on both the broad HLA typing level (A1, A2, A3, A9, A10, A11, A19, A28, A36, A43, B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B21, B22, B27, B35, B37, B40, B41, B42, B46, B47, B48, B53, B59, B67, B70, B73, DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7, DR8, DR9, DR10) and the split typing level (splits from A9, A10, A19, A28, B5, B12, B14, B15, B16, B17, B21, B22, B40, B70, DR2, DR3, DR5, DR6).

Diagnosis of rejection

The time between PKP and the first rejection event (reversible or irreversible immunological rejection) was used to analyze graft outcome. The diagnosis of an immune-mediated allograft rejection episode was based on generally accepted criteria [23]. All corneal grafts had to become clear after surgery, and a diagnosis of rejection was not made before the 10th postoperative day. The presence of a "Khodadoust line" was regarded as a pathognomonic sign of graft rejection. In the absence of a Khodadoust line, allograft rejection was diagnosed if keratic precipitates restricted to the graft were detected in combination with (partially) increased corneal thickness.

Postoperative follow-up and therapy

After surgery, patients returned for follow-up after 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 24 months and then annually. They were instructed to return immediately if problems arose. At follow-up, patients were examined by one of five ophthalmic surgeons using similar surgical techniques for PKP. They regularly underwent visual acuity and astigmatism check-ups, slit lamp examinations, binocular funduscopy and intraocular pressure measurements.

Different drugs were used for postoperative treatment, and the total dosage of systemic and local therapy changed over the years as shown in Table 1. However, postoperative immunosuppressive therapy was generally low and never dependent on the compatibility of the HLA antigens or the prognosis. As previously published [17], a randomized clinical trial comparing topical dexamethasone therapy with combined topical dexamethasone and cyclosporin A treatment showed no significant beneficial effect with regard to reducing the risk of corneal allograft rejection. Moreover, halving the total 0.1% dexamethasone dose from the usual 20 mg to 10 mg

did not increase the allograft rejection rate [17]. Cyclosporin A was therefore discontinued, and topical low-dose dexamethasone was assessed as adequate.

Analysis and statistics

Recipients with missing HLA-A, -B or -DR data were only excluded from an analysis dealing with that specific locus. This explains the variation in the total number of recipients. Unadjusted survival probabilities for the low- and high-risk group were estimated using the life table method (Kaplan-Meier). Any rejection episode (reversible or irreversible immunologic rejection) was regarded as the censoring indicator variable, since the absence of reversible or irreversible immunologic rejection is a more sensitive and suitable indicator of the immune competence of allograft recipients than the time to irreversible immunological failure. The latter can rather be used to evaluate the efficacy of follow-up procedures performed by transplantation centers, especially their immunosuppressive therapy protocols [43]. Differences were assessed using the log-rank test, and a P value of less than 0.05 was taken as statistically significant. All survival analyses were first performed without considering HLA splits. In other words, differences in HLA-A, -B and -DR subtype specificities (splits) were not regarded as mismatches. In a second step, all survival analyses dealt with HLA splits, and differences in HLA splits were assessed as mismatches. Considering split specificities raised the number of calculated mismatches in some transplants. These transplants changed from a 0 to a 1 mismatch or from a 1 to a 2 mismatch. Others had the same number of mismatches whether the calculation was based on broad or split specificities. In a third step, our analyses excluded cases in which the donor and recipient were similar but not identical. These patients were assessed as having mismatched alleles in analyses with HLA splits, but not in those without them.

Results

The median follow-up period was 31.3 months (range 2.3–158.6 months) in the low-risk group and 45.4 months (range 1.5–182.1 months) in the high-risk group.

As shown in Fig. 1, the estimated 1-, 2-, 5- and 10-year graft survival (Kaplan-Meier life table) was 93, 88, 81 and 67% in low-risk and 73, 52, 43 and 38% in high-risk patients.

All survival analyses were first performed without considering HLA splits (Tables 2a; 3a; 4a). As shown in Table 2a, we analyzed the effect of matching for HLA class I (HLA-A and -B) and class II (HLA-DR) antigens together. This revealed that the incidence of allograft rejection was significantly higher with a mismatch of five or six alleles in HLA-A, -B and -DR than with less than five mismatched alleles (0;1;2;3;4 alleles mismatched) regardless of whether the patients were at low ($P<0.04$) or high risk ($P<0.0001$). In other words, a donor-recipient match of two or more alleles in HLA-A, -B or -DR reduces the immunologic rejection rate by at least 10% in low-risk (10 years after PKP; $P<0.04$) and 40% in high-risk patients (3 years after PKP; $P<0.0001$) (Fig. 2).

We then analyzed matching for each HLA-A, -B and -DR locus separately. As shown in Table 3a, high-risk transplant recipients had far fewer rejection episodes

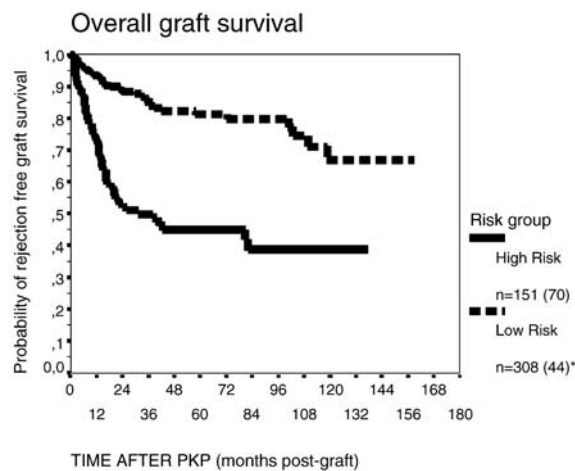


Fig. 1 Kaplan-Meier curves indicating significantly better rejection-free survival for low-risk than for high-risk corneal graft recipients [log rank test, $P<0.0001$]. * $[n=308 (44)]$: for 44 of 308 cases in this risk group an immunologic rejection was reported

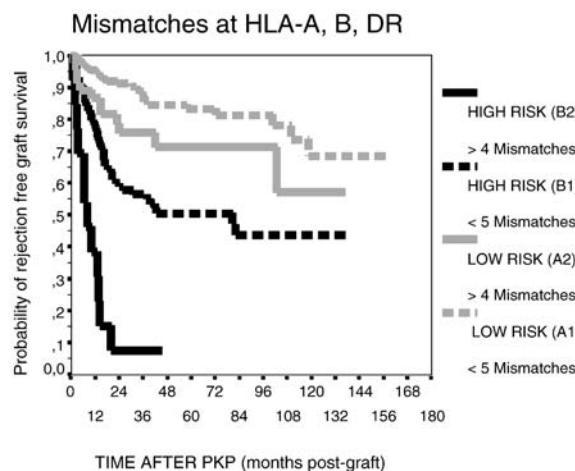


Fig. 2 Kaplan-Meier survival curves (without considering HLA splits) for patients at low (A1; A2) and high risk (B1; B2), indicating significantly better rejection-free survival for corneal graft recipients with less than five mismatches (A1; B1) than with five or six mismatches (A2; B2) at the HLA-A, -B and -DR locus [log rank test; for high risk: $P<0.0001$; for low risk: $P<0.04$]; A1: low risk with less than five (0;1;2;3;4) mismatches at HLA-A, -B and -DR [$n=249 (30)$]^a, A2: low risk with five or six mismatches at HLA-A, -B and -DR [$n=46 (12)$]. B1: high risk with less than five (0;1;2;3;4) mismatches at HLA-A, -B and -DR [$n=130 (53)$], B2: high risk with five or six mismatches at HLA-A, -B and -DR [$n=13 (12)$]; [$n=249 (30)$]^a: for 30 of 249 cases in this risk group an immunologic rejection was reported

with no mismatched alleles in HLA-A than with one or two ($P<0.01$). For the HLA-B locus, we found the immunologic rejection rate to be markedly lower in both the low- ($P<0.01$) and high-risk group ($P<0.001$) with a mismatch of less than two alleles (0 or 1 allele mismatched) than with two mismatched alleles. For the

Table 2 Results of univariate analyses with the actuarial life table method (Kaplan-Meier)^a: (a) without reference to HLA splits; (b) with reference to HLA splits and (c) without HLA split different cases

	Survival analysis without reference to HLA splits		Survival analysis with reference to HLA splits		Survival analysis without split-different cases	
	Low risk	High risk	Low risk	High risk	Low risk	High risk
HLA-A, -B, -DR	[295 (42)] ^b <i>P</i> _c =0.04	[143 (65)] <i>P</i> =0.0004	[295 (42)] psp ^d =0.08	[143 (65)] psp=0.03		
Subset mismatches 0 vs. 1;2;3;4;5;6	[4 (2) vs. 291 (40)] ^e <i>P</i> =0.007	[3 (1) vs. 140 (64)] <i>P</i> =0.76	[4 (2) vs. 291 (40)] psp=0.007	[2 (0) vs. 141 (65)] psp=0.28	[4 (2) vs. 291 (40)] psp=0.007	[2 (0) vs. 140 (64)] psp=0.28
Subset mismatches 0;1 vs. 2;3;4;5;6	[26 (4) vs. 269 (38)] <i>P</i> =0.26	[16 (4) vs. 127 (61)] <i>P</i> =0.18	[15 (3) vs. 280 (39)] psp=0.22	[9 (3) vs. 134 (62)] psp=0.57	[15 (3) vs. 269 (38)] <i>P</i> =0.21	[9 (3) vs. 127 (61)] <i>P</i> =0.53
Subset mismatches 0;1;2 vs. 3;4;5;6	[80 (10) vs. 215 (32)] <i>P</i> =0.88	[55 (21) vs. 88 (44)] <i>P</i> =0.22	[42 (4) vs. 253 (38)] psp=0.66	[35 (11) vs. 108 (54)] psp=0.06	[42 (4) vs. 215 (32)] <i>P</i> =0.73	[35 (11) vs. 88 (44)] <i>P</i> =0.07
Subset mismatches 0;1;2;3 vs. 4;5;6	[167 (20) vs. 128 (22)] <i>P</i> =0.56	[106 (44) vs. 37 (21)] <i>P</i> =0.05	[109 (12) vs. 186 (30)] psp=0.43	[79 (35) vs. 64 (30)] psp=0.70	[109 (12) vs. 128 (22)] <i>P</i> =0.45	[79 (35) vs. 37 (21)] <i>P</i> =0.12
Subset mismatches 0;1;2;3;4 vs. 5;6	[249 (30) vs. 46 (12)] <i>P</i> =0.04	[130 (53) vs. 13 (12)] <i>P</i> =0.0001	[202 (24) vs. 93 (18)] psp=0.14	[118 (49) vs. 25 (16)] psp=0.05	[202 (24) vs. 46 (12)] <i>P</i> =0.04	[118 (49) vs. 13 (12)] <i>P</i> =0.0001
Subset mismatches 0;1;2;3;4;5 vs. 6	[285 (40) vs. 10 (2)] <i>P</i> =0.85	[137 (59) vs. 6 (6)] <i>P</i> =0.0001	[277 (39) vs. 18 (3)] psp=0.93	[136 (59) vs. 7 (6)] psp=0.01	[277 (39) vs. 10 (2)] <i>P</i> =0.85	[136 (59) vs. 6 (6)] <i>P</i> =0.0001
	a		b		c	

^a Censoring indicator variable is any rejection event (reversible or irreversible immunologic rejection); 308 observations in low-risk group, 151 in high-risk group. ^b [295 (42)]: for 42 of 295 cases in this risk group an immunologic rejection was reported. ^c *P*=0.04: *P* value of survival analysis without reference to HLA splits;

^d psp=0.08: *P* value of survival analysis with reference to HLA splits; ^e [4 (2) vs. 291 (40)]: an immunologic rejection was reported for two of four cases in the first subset group (e.g., 0 mismatches), but for 40 of 291 cases in the second subset group (e.g., 1;2;3;4;5;6 mismatches)

HLA-DR locus, our analysis revealed that a mismatch of less than two alleles (0 or 1 allele mismatched) significantly reduces the likelihood of immunologic rejection only in the high-risk group (*P*<0.0001).

We subsequently analyzed the effect of matching only for HLA class I (HLA-AB) and for a combination of HLA class I and class II (HLA-A/DR or HLA-B/DR) (Table 4a). Although matching only for HLA class I (HLA-AB) did not significantly affect the incidence of immunologic rejections for low-risk patients, it certainly did for those at high risk. High-risk patients with no mismatched alleles in HLA-A or -B had more rejection events than those with one to four mismatched alleles (*P*<0.05). Our results for the combination of HLA-A/DR and HLA-B/DR were as follows. High-risk transplant recipients had a markedly lower incidence of allograft rejection episodes with less than three than with three or four mismatched alleles in HLA-A and HLA-DR (*P*<0.05). We found similar results for the combination of HLA-B and -DR. High-risk patients had longer rejection-free graft survival with less than three than with three or four mismatched alleles in HLA-B and HLA-DR (*P*<0.0001). Moreover, the incidence of allograft rejection was also significantly reduced in low-risk patients

who had no alleles mismatched at the HLA-B and HLA-DR loci (*P*<0.04).

As illustrated in Tables 2b, 3b and 4b, a second step involved performing all survival analyses with reference to HLA splits. In other words, differences in HLA-A, -B and -DR subtype specificities (splits) were regarded as mismatches. These findings were less significant or even contrary to those we obtained when performing all analyses without considering HLA splits.

Finally, we performed our analyses eliminating those cases in which recipient and donor were similar but not identical. In other words, they had the same HLA alleles in HLA broad level typing but were not identical with regard to HLA splits (Tables 2c and 3c). These results closely corresponded to those we obtained when performing all survival analyses without reference to HLA splits.

Discussion

Our results disclose a significant correlation between the number of HLA mismatches and the rate of allograft rejections. A donor-recipient match of only two or more

Table 3 Results of univariate analyses with the actuarial life table method (Kaplan-Meier)^a: (a) without reference to HLA-splits, (b) with reference to HLA-splits and (c) without HLA split-different cases

	Survival analysis without reference to HLA splits		Survival analysis with reference to HLA splits		Survival analysis without split-different cases	
	Low risk	High risk	Low risk	High risk	Low risk	High risk
HLA-A	[307 (43)] ^b <i>P</i> ^c =0.86	[149 (68)] <i>P</i> =0.02	[307 (43)] psp ^d =0.91	[149 (68)] psp=0.09		
Subset mismatches 0 vs. 1;2	[63 (8) vs. 244 (35)] ^e <i>P</i> =0.62	[33 (7) vs. 116 (61)] <i>P</i> =0.01	[54 (6) vs. 253 (37)] psp=0.96	[27 (7) vs. 122 (61)] psp=0.04	[54 (6) vs. 244 (35)] <i>P</i> =0.92	[27 (7) vs. 116 (61)] <i>P</i> =0.03
Subset mismatches 0;1 vs. 2	[225 (33) vs. 82 (10)] <i>P</i> =0.71	[112 (50) vs. 37 (18)] <i>P</i> =0.82	[188 (25) vs. 119 (18)] psp=0.70	[100 (44) vs. 49 (24)] psp=0.89	[188 (25) vs. 82 (10)] <i>P</i> =0.92	[100 (44) vs. 37 (18)] <i>P</i> =0.91
HLA-B	[305 (43)] <i>P</i> =0.008	[148 (68)] <i>P</i> =0.003	[305 (43)] psp=0.02	[148 (68)] psp=0.54		
Subset mismatches 0 vs. 1;2	[46 (7) vs. 259 (36)] <i>P</i> =0.36	[33 (13) vs. 115 (55)] <i>P</i> =0.64	[43 (7) vs. 262 (36)] psp=0.29	[29 (10) vs. 119 (58)] psp=0.34	[43 (7) vs. 259 (36)] <i>P</i> =0.30	[29 (10) vs. 115 (55)] <i>P</i> =0.39
Subset mismatches 0;1 vs. 2	[200 (18) vs. 105 (25)] <i>P</i> =0.01	[119 (49) vs. 29 (19)] <i>P</i> =0.001	[140 (12) vs. 165 (31)] psp=0.06	[90 (38) vs. 58 (30)] psp=0.36	[140 (12) vs. 105 (25)] <i>P</i> =0.02	[90 (38) vs. 29 (19)] <i>P</i> =0.005
HLA-DR	[298 (43)] <i>P</i> =0.85	[146 (67)] <i>P</i> =0.0001	[298 (43)] psp=0.53	[146 (67)] psp=0.01		
Subset mismatches 0 vs. 1;2	[61 (10) vs. 237 (33)] <i>P</i> =0.58	[43 (21) vs. 103 (46)] <i>P</i> =0.82	[51 (9) vs. 247 (34)] psp=0.47	[36 (17) vs. 110 (50)] psp=0.74	[51 (9) vs. 237 (33)] <i>P</i> =0.49	[36 (17) vs. 103 (46)] <i>P</i> =0.76
Subset mismatches 0;1 vs. 2	[245 (34) vs. 53 (9)] <i>P</i> =0.99	[127 (52) vs. 19 (15)] <i>P</i> =0.0001	[195 (27) vs. 103 (16)] psp=0.55	[115 (50) vs. 31 (17)] psp=0.01	[195 (27) vs. 53 (9)] <i>P</i> =0.86	[115 (50) vs. 19 (15)] <i>P</i> =0.0001
	a		b		c	

^a Censoring indicator variable is any rejection event (reversible or irreversible immunologic rejection); 308 observations in low-risk group, 151 observations in high-risk group. ^b [307 (43)]: for 43 of 307 cases in this risk group an immunologic rejection was reported; ^c *P*=0.86: *P* value of survival analysis without reference to

HLA splits; ^d psp=0.91: *P* value of survival analysis with reference to HLA splits; ^e [63 (8) vs. 244 (35)]: an immunologic rejection was reported for 8 of 63 cases in the first subset group (e.g., 0 mismatches), but for 35 of 244 cases in the second subset group (e.g., 1:2 mismatches)

alleles in HLA-A, -B or -DR markedly reduces the immunologic rejection rate in both low and high risk patients. HLA-B mismatches are particularly important prognostic factors for patients at low and high risk. When we considered only high-risk patients for rejection, a relevant effect was also found for HLA-A and -DR mismatches.

HLA class I antigens, especially HLA-A and -B, have been identified on corneal endothelium, corneal epithelium and stromal keratocytes [24, 34]. In the process of graft rejection, donor HLA class I antigens are targets for host CD8+ cytotoxic T lymphocytes, if they are mismatched for HLA-A and/or HLA-B [10, 34, 36]. The reason could be that T cells cannot differentiate a foreign MHC protein from a complex composed of a self-MHC protein and an antigen [18]. Thus matching for HLA class I (HLA-A and -B) would theoretically reduce the number of target antigens and lower the rate of rejection episodes.

Various studies suggest that matching for HLA-A and -B reduces the incidence of corneal allograft rejection in high-risk recipients [13, 25, 28, 38, 41, 43]. These data on HLA-A and -B matching are in keeping with the results from our study. However, our findings clearly differ from those obtained in other studies, particularly the large multicenter Collaborative Corneal Transplantation Study (CCTS), which failed to demonstrate a correlation between HLA matches and graft survival [9, 12, 15]. The CCTS authors drew the conclusion that neither HLA-A and -B nor HLA-DR antigen matching significantly reduces the incidence of corneal graft failure in high-risk patients under local immunosuppressive therapy. A possible explanation of the CCTS results was published by their own study group [19] after investigating the reproducibility of HLA-A, -B and -DR typing results. They were prompted to do so by the fact that the observed percentage of homozygosity was more than twice as high as expected. After retyping 129 patients with fewer than two DR antigens, the level of agreement between the original

Table 4 Results of monivariate analyses with the actuarial life table method (Kaplan-Meier)^a: (a) without reference to HLA splits and (b) with reference to HLA splits

	Survival analysis without reference to HLA splits		Survival analysis with reference to HLA splits	
	Low risk	High risk	Low risk	High risk
HLA-A, -B	[305 (43)] ^b <i>P</i> ^c =0.41	[148 (68)] <i>P</i> =0.14	[305 (43)] psp ^d =0.72	[148 (68)] psp=0.41
Subset mismatches 0 vs. 1;2;3;4	[17 (3) vs. 288 (40)] ^e <i>P</i> =0.28	[9 (1) vs. 139 (67)] <i>P</i> =0.07	[15 (2) vs. 290 (41)] psp=0.50	[7 (1) vs. 141 (67)] psp=0.11
Subset mismatches 0;1 vs. 2;3;4	[76 (9) vs. 229 (34)] <i>P</i> =0.76	[49 (16) vs. 99 (52)] <i>P</i> =0.13	[53 (6) vs. 252 (37)] psp=0.97	[37 (11) vs. 111 (57)] psp=0.10
Subset mismatches 0;1;2 vs. 3;4	[179 (21) vs. 126 (22)] <i>P</i> =0.41	[102 (43) vs. 46 (25)] <i>P</i> =0.16	[133(15) vs. 172 (28)] psp=0.48	[75 (30) vs. 73 (38)] psp=0.20
Subset mismatches 0;1;2;3 vs. 4	[261 (33) vs. 44 (10)] <i>P</i> =0.13	[135 (59) vs. 13 (9)] <i>P</i> =0.05	[223 (27) vs. 82(16)] psp=0.25	[126 (57) vs. 22 (11)] psp=0.93
HLA-A, -DR	[297 (42)] <i>P</i> =0.78	[144 (65)] <i>P</i> =0.001	[297 (42)] psp=0.69	[144 (65)] psp=0.10
Subset mismatches 0 vs. 1;2;3;4	[13 (3) vs. 284 (39)] <i>P</i> =0.19	[8 (3) vs. 136 (62)] <i>P</i> =0.85	[10 (2) vs. 287 (40)] psp=0.45	[6 (2) vs. 138 (63)] psp=0.88
Subset mismatches 0;1 vs. 2;3;4	[80 (10) vs. 217 (32)] <i>P</i> =0.81	[49 (17) vs. 95 (48)] <i>P</i> =0.11	[45 (6) vs. 252 (36)] psp=0.76	[35 (15) vs. 109 (50)] psp=0.67
Subset mismatches 0;1;2 vs. 3;4	[203(29) vs. 94 (13)] <i>P</i> =0.87	[110 (45) vs. 34 (20)] <i>P</i> =0.05	[154 (19) vs. 143 (23)] psp=0.32	[92 (37) vs. 52 (28)] psp=0.03
Subset mismatches 0;1;2;3 vs. 4	[285 (40) vs. 12 (2)] <i>P</i> =0.99	[138 (59) vs. 6 (6)] <i>P</i> =0.0001	[268 (38) vs. 29 (4)] psp=0.90	[135 (58) vs. 9 (7)] psp=0.03
HLA-B, -DR	[295 (42)] <i>P</i> =0.08	[143 (65)] <i>P</i> =0.0001	[295 (42)] psp=0.07	[143 (65)] psp=0.01
Subset mismatches 0 vs. 1;2;3;4	[11 (3) vs. 284 (39)] <i>P</i> =0.04	[8 (3) vs. 135 (62)] <i>P</i> =0.47	[10 (3) vs. 285 (39)] psp=0.03	[5 (1) vs. 138 (64)] psp=0.25
Subset mismatches 0;1 vs. 2;3;4	[63 (8) vs. 232 (34)] <i>P</i> =0.95	[51 (23) vs. 92 (42)] <i>P</i> =0.77	[34 (5) vs. 261 (37)] psp=0.66	[32 (13) vs. 111 (52)] psp=0.38
Subset mismatches 0;1;2 vs. 3;4	[190 (20) vs. 105 (22)] <i>P</i> =0.11	119 (46) vs. 24 (19)] <i>P</i> =0.0001	[128(14) vs.167(28)] psp=0.24	[96 (41) vs. 47 (24)] psp=0.57
Subset mismatches 0;1;2;3 vs. 4	[271 (35) vs. 24 (7)] <i>P</i> =0.17	[132 (55) vs. 11 (10)] <i>P</i> =0.0001	[245 (31) vs. 50 (11)] psp=0.13	[126 (53) vs. 17 (12)] psp=0.001

^a Censoring indicator variable is any rejection event (reversible or irreversible immunologic rejection); 308 observations in low-risk group, 151 in high-risk group. ^b [305 (43)]: for 43 of 305 cases in this risk group an immunologic rejection was reported. ^c *P*=0.41: *P* value of survival analysis without reference to HLA splits.

^d psp=0.72: *P* value of survival analysis with reference to HLA splits. ^e [17 (3) vs. 288 (40)] an immunologic rejection was reported for 3 of 17 cases in the first subset group (e.g., 0 mismatches), but for 40 of 288 cases in the second subset group (e.g., 1;2;3;4 mismatches)

and the retyping was 55% for HLA-DR and improved to 59% when considering only readily identifiable antigens. The most common error was failing to identify a second DR locus antigen. Unfortunately, it is impossible to determine the total amount of false typing, since only the remaining patients and none of the donors were retyped. As demonstrated by Volker-Dieben et al. in simulation studies [43], even moderate amounts of HLA-DR typing inaccuracy can abrogate the beneficial effect of HLA-DR matching on the outcome of corneal transplantation, as seen in the CCTS study. Moreover, larger amounts of imprecise or even incorrect typing can lead to an apparent adverse effect of HLA-DR matching, as published in studies from the UK reporting negative effects of HLA-DR matching on corneal rejection [7, 14, 42].

Unlike the findings reported in the multicenter CCTS study, our HLA tissue typing results are obtained from a single experienced reference laboratory in Berlin or from Eurotransplant (BIS) in Leiden, The Netherlands. The reference laboratory in Berlin works in compliance with the standards of the European Federation of Immunogenetics (EFI) [21]. Furthermore, retrospective restriction fragment length polymorphism (RFLP) DNA control typing by the Collaborative Transplant Study (CTS) DNA project using polymerase chain reaction (PCR)-based DNA methods showed this laboratory to have a constant low overall discrepancy rate of less than 11% [20].

Even though HLA-DR matching plays an important role in renal transplantation [29], its beneficial effect in

corneal transplantation is still a matter of ongoing debate [14, 41]. Using DNA typing techniques, one study found significant beneficial effects of HLA-DR matching in high-risk recipients [1], whereas Japanese authors reported a definite beneficial effect of HLA-DP, but not HLA-DR matching [25, 26, 27]. These discrepancies may be due to the small number of patients discussed by the Japanese group.

Thus, it is not surprising that our results demonstrating a favorable effect of HLA-DR matching on corneal allograft outcome in high-risk patients are in line with Volker-Dieben et al. [43] and other studies [3, 15] as well as the experimental findings on HLA class II receptor function. HLA-DR-positive Langerhans cells have been found in normal corneal epithelium and stromal layers [24, 34], but only in the limbus of healthy corneas [35]. However, these cells can be caused to migrate and accumulate by vascularization and inflammation [22]. Moreover, corneal endothelium may also be induced to express HLA class II molecules by inflammation due to infection or rejection and even the transplantation procedure itself [8]. In addition, Boisjoly et al. [6] have suggested that a loose suture, intraocular inflammation or infection could promote the expression of HLA-A, -B and -DR antigens. Thus, there would be a huge amount of potent immunogens if the donor and recipient were mismatched for HLA-DR. In other words, donor-host HLA-DR mismatches may lead to a delayed hypersensitivity-type immunologic rejection mediated by the activation of host regulatory CD4+ T helper lymphocytes.

The literature on corneal transplantation has thus far given little attention to the influence of matching based on the HLA split typing level compared to the conventional broad typing level. It is more laborious and more expensive, and there are fewer chances for a good match when donor-recipient selection is based on HLA subtype specificities (splits) rather than on the conventional broad typing level. However, our knowledge regarding MHC receptor function would lead us to expect a clear-cut beneficial effect of matching for HLA splits. Contrary to our expectations, we were not able to demonstrate this. Our survival analyses considering HLA splits (Tables 2b, 3b and 4b), i.e., assessing differences in HLA-A, -B and -DR splits as mismatches, yielded less significant results than those obtained when performing all analyses without reference to HLA splits (Tables 2a, 3a and 4a).

A possible explanation is provided by Beekhuis et al. [4], who retrospectively reevaluated 303 high-risk patients according to their broad or split matching levels. They found clear-cut advantages of split level over broad level matching especially at follow-up periods of more than 3–4 years (up to 12 years).

Similar data on kidney retransplantation were published by the authors of the Collaborative Transplant Study [31], who investigated the influence of HLA split matching among cadaver kidney transplants and retrans-

plants. They demonstrated a strong correlation between split specificity mismatches and graft outcome among cadaver kidney retransplants. When differences in HLA splits were considered as mismatches, transplants that changed from a 0 to a 1 mismatch had a significantly lower graft survival than those with no mismatch by either the broad or the split definition. Likewise, transplants that changed from a 1 to a 2 mismatch had a lower survival rate than those with 1 mismatch by both definitions. These results suggest that the prospective matching of retransplant recipients and donors in kidney transplantation should be based on HLA-DR split antigens.

Our failure to demonstrate a beneficial effect of split level matching may be due to a lack of split level data, since serological typing methods were mostly used in transplantations before the early 1990s. It is widely accepted that serological typing techniques generally yield accurate broad but not split typing results.

However, we obtained results comparable to our significant findings from the analysis without considering HLA splits when we eliminated those cases in which recipient and donor HLA antigens were similar but not identical, i.e., they had the same HLA alleles in broad level typing but differed with regard to HLA splits (Tables 2c and 3c).

From a clinical point of view, our results seem to indicate that a split *mismatch* is almost as successful in preventing allograft rejection as a split *match*. Thus, a mismatch of any broad-level HLA antigen is worse than a split mismatch.

However, our findings and those published by Beekhuis et al. [4] suggest that donor-recipient selection based on broad as well as on split level matching significantly improves the prognosis of corneal allografts. Thus, larger studies should be initiated also to assess prospectively the influence of HLA split matching on corneal retransplants.

The CCTS study [9] demonstrated that aggressive local immunosuppressive therapy reduces the incidence of graft rejections after transplantation and thus masks HLA matching effects. However, it may increase the risk of complications such as cataracts, glaucoma and infections. High doses of corticosteroids may prevent irreversible graft rejection in some cases, but each rejection episode accelerates the postoperative loss of endothelial cells that leads to earlier graft failure [30].

HLA matching cannot replace immunosuppressive therapy, since higher matches are difficult to achieve, especially in heterogeneous populations [5], and other factors like minor transplantation antigens are also important [37]. Nevertheless, it can definitely reduce the dose and thus the negative side effects of immunosuppressive therapy [17].

Therefore, HLA matching should be routinely used in keratoplasty, since it is the only known method that can prevent immunoreactions without side effects.

Though the nominal costs of HLA typing and the prolonged waiting time for a compatible allograft, especially in a heterogeneous population, may seem inappropriate in some cases, HLA matching is still more cost-effective than retransplantation with its therapeutic consequences. Reducing the number of retransplantations will in turn reduce the number of patients waiting for a transplant and lead to better utilization of the still inadequate number of available corneal graft donors.

Furthermore, establishing HLA matching as a routine procedure in keratoplasty will increase the number of HLA-typed allografts available and thus enhance the chances of achieving greater allograft compatibility while reducing the waiting time for matched allografts.

Acknowledgements We are grateful to Ulrike Geidner, Suzanne Hoppe, Baerbel Kirschbaum and Nora Wendt for expert technical assistance.

References

1. Baggesen K, Ehlers N, Lamm LU (1991) HLA-DR/RFLP compatible corneal grafts. *Acta Ophthalmol* (Copenhagen) 69:229–233
2. Baggesen K, Lamm LU, Ehlers N (1996) Significant effect of high-resolution HLA-DRB1 matching in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 62:1273–1277
3. Bartels MC, Otten HG, van Gelderen BE, Van der Lelij A (2001) Influence of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matching on rejection of random corneal grafts using corneal tissue for retrospective DNA HLA typing. *Br J Ophthalmol* 85:1341–1346
4. Beekhuis WH, Bartels M, Doxiadis, II, van Rij G (2003) Degree of compatibility for HLA-A and -B affects outcome in high-risk corneal transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:12–21
5. Bohringer D, Reinhard T, Bohringer S, Enczmann J, Godehard E, Sundmacher R (2002) Predicting time on the waiting list for HLA matched corneal grafts. *Tissue Antigens* 59:407–411
6. Boisjoly HM, Roy R, Dube I, Laughrea PA, Michaud R, Douville P, Heebert J (1986) HLA-A,B and DR matching in corneal transplantation. *Ophthalmology* 93:1290–1297
7. Bradley BA, Vail A, Gore SM, Rogers CA, Armitage WJ, Nicholls S, Easty DL (1995) Negative effect of HLA-DR matching on corneal transplant rejection. *Transplant Proc* 27:1392–1394
8. Claas FHJ, Roelen DL, D'Amato J, Völker-Dieben HJ (1994) The role of HLA in corneal transplantation. In: Zierhut M (ed) *Immunology of corneal transplantation*. Aeolus Press Scientific Publishers, Buren, The Netherlands, p 47
9. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group (1992) The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. *Arch Ophthalmol* 110:1392–1403
10. Creemers PC, Kahn D, Hill JC (1999) HLA-A and -B alleles in cornea donors as risk factors for graft rejection. *Transplant Immunol* 7:15–18
11. Dikstein S, Maurice DM (1972) The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 221:29–41
12. Ducrey NM, Glauser MP, Frei PC (1980) Corneal transplantation: ABO blood groups and HLA compatibility. *Ann Ophthalmol* 7:880–884
13. Foulks GN, Sanfilippo F (1982) Beneficial effects of histocompatibility in high-risk corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 94:622–629
14. Gore SM, Vail A, Bradley BA, Rogers CA, Easty DL, Armitage WJ (1995) HLA-DR matching in corneal transplantation. Systematic review of published evidence. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Transplantation* 60:1033–1039
15. Hill JC, Creemers PC (1997) An adverse matching effect for the HLA-B locus in corneal transplantation. *Transplant Int* 10:145–149
16. Hoffmann F (1976) Suture technique for perforating keratoplasty (author's transl). *Klin Monatsbl Augenheilkd* 169:584–590
17. Hoffmann F (1994) Topical cyclosporin A in corneal transplantation. In: Zierhut M, Pleyer U, Thiel HJ (eds) *Immunology of corneal transplantation*. Aeolus Press, Science Publishers, Buren, The Netherlands, pp 253–262
18. Hoffmann F, Tregel M, Noske W, Bunte S (1994) HLA-B and -DR match reduces the allograft reaction after keratoplasty. *Ger J Ophthalmol* 3:100–104
19. Hopkins KA, Maguire MG, Fink NE, Bias WB (1992) Reproducibility of HLA-A, -B, and -DR typing using peripheral blood samples: results of retyping in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Group (corrected). *Hum Immunol* 33:122–128
20. <http://www.ctstransplant.org>
21. <http://www.efiweb.org/standards.html>
22. Jager MJ (1992) Corneal Langerhans cells and ocular immunology. *Reg Immunol* 4:186–195
23. Jones BR (1973) Criteria of a diagnosis of a corneal allograft rejection. In: *Corneal graft failure*. Ciba Foundation Symposium 15. Elsevier, Amsterdam, pp 340–347
24. Li Q, He Y (1993) An immunohistochemical study of Langerhans cells, T-cells and the HLA antigen in human cornea. *Yan Ke Xue Bao* 9:121–125
25. Morita N, Munkhbat B, Gansuvd B, Kanai N, Hagihara M, Shimazaki J, Tsubota K, Tsuji K (1998) Effect of HLA-A and -DPB1 matching in corneal transplantation. *Transplant Proc* 30:3491–3492
26. Munkhbat B, Hagihara M, Sato T, Tsuchida F, Sato K, Shimazaki J, Tsubota K, Tsuji K (1997) Association between HLA-DPB1 matching and 1-year rejection-free graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 63:1011–1016
27. Munkhbat B, Hagihara M, Sato T, Tsuchida F, Shimazaki J, Tsubota K, Tsuji K (1996) HLA class II DNA typing using ocular tissue and its usefulness in corneal transplantation. *Transplant Proc* 28:1257–1258
28. Munkhbat B, Hagihara M, Shimazaki J, Kanai N, Morita N, Gansuvd B, Kato S, Tsubota K, Tsuji K (1999) The impact of HLA-A matching in corneal transplantation. *Tokai J Exp Clin Med* 24:63–71
29. Mytilineos J, Scherer S, Hansen B, Gaweco A, Opelz G (1990) RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing of 200 kidney recipients and 1,000 controls. *Transplant Proc* 22:1911–1912
30. Nishimura JK, Hodge DO, Bourne WM (1999) Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology* 106:1962–1965

31. Opelz G, Scherer S, Mytilineos J (1997) Analysis of HLA-DR split-specificity matching in cadaver kidney transplantation: a report of the Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 63:57–59
32. Parham P (1991) Bone marrow transplantation. Making just the right match. *Nature* 350:111–113
33. Pels E, Schuchard Y (1983) Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol* 56:147–153
34. Pels E, van der Gaag R (1984) HLA-A, B, C and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 3:231–239
35. PePOSE JS, Gardner KM, Nestor MS, Foos RY, Pettit TH (1985) Detection of HLA class I and II antigens in rejected human corneal allografts. *Ophthalmology* 92:1480–1484
36. Roelen DL, van Beelen E, van Bree SP, van Rood JJ, Volker-Dieben HJ, Claas FH (1995) The presence of activated donor HLA class I-reactive T lymphocytes is associated with rejection of corneal grafts. *Transplantation* 59:1039–1042
37. Roy R, Des Marchais B, Bazin R, Boisjoly HM, Dube I, Laughrea PA (1997) Role of ABO and Lewis blood group antigens in donor-recipient compatibility of corneal transplantation rejection. *Ophthalmology* 104:508–512
38. Sanfilippo F, MacQueen JM, Vaughn WK, Foulks GN (1986) Reduced graft rejection with good HLA-A and B matching in high-risk corneal transplantation. *N Engl J Med* 315:29–35
39. Terasaki PI, McCurdy B, McClelland J (1973) Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Nippon Rinsho* 31:3314–3320
40. Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA (1994) Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Ophthalmology* 101:120–127
41. Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA, Armitage WJ (1994) Influence of donor and histocompatibility factors on corneal graft outcome. *Transplantation* 58:1210–1216
42. Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA, Armitage WJ (1997) Conclusions of the corneal transplant follow-up study. Collaborating Surgeons. *Br J Ophthalmol* 81:631–636
43. Volker-Dieben HJ, Claas FH, Schreuder GM, Schipper RF, Pels E, Persijn GG, Smits J, D'Amato J (2000) Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal allografts. *Transplantation* 70:640–648
44. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF (1997) The Australian corneal graft registry 1996 report. Adelaide, Australia

Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik

Die irreversible Immunreaktion, die je nach Risikofaktoren in bis zu 30–40% auftreten kann [57,77], ist die häufigste Ursache für ein Transplantatversagen nach perforierender Keratoplastik [51, 72, 80]. Als Risikofaktor für eine Immunreaktion gilt neben verschiedenen Faktoren, wie z. B. der Transplantatgröße und dem Vaskularisierungsgrad der Empfängerkernea [58], im besonderen Maße auch der Grad der Übereinstimmung der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger [34, 76, 80].

Bezüglich der Bedeutung der Verwendung von sog. „HLA-gematchten“ Korneatransplantaten zur Vermeidung einer Immunreaktion bestand eine stetige kontroverse Diskussion, die sich in den widersprüchlichen Ergebnissen in der Literatur begründet. In den letzten Jahren ist die Nachfrage nach gematchten Transplantaten jedoch sprunghaft angestiegen [18]. Grund für die veränderte Beurteilung des Stellenwerts der HLA-Typisierung bei der perforierenden Keratoplastik sind Publikationen der letzten Jahre, die den Vorteil des HLA-Matches klar belegen.

In dieser Übersicht wird der Stand der Diskussion zusammengefasst, und verschiedene Strategien, Möglichkeiten und Grenzen sowohl der HLA- wie auch der sonstigen Gewebetypisierung werden erläutert.

HLA-System

Das HLA-System („human leucocyte antigen“) umfasst verschiedene Antigene,

die eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von Fremdantigenen, der Differenzierung von „selbst“ und „fremd“ und somit bei der Immunreaktion spielen. Diese auf der Zelloberfläche lokalisierten Proteine werden von einer Gruppe von Genen kodiert, die im sog. „major histocompatibility complex“ (MHC) auf dem Chromosom 6 zusammengefasst sind. Je nach Genort (Locus), werden die HLA-Antigene der Klasse I (HLA-A, HLA-B und HLA-C) und der Klasse II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) unterschieden (■ Abb. 1).

Klasse-I-Antigene werden auf allen kernhaltigen Zellen (in der Kornea im Endothel, Stroma und Epithel) exprimiert [29, 70, 79], während Klasse-II-Antigene nur von immunkompetenten antigenpräsentierenden Zellen, wie z. B. B-Lymphozyten, Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten [22, 79], exprimiert werden. In der Kornea finden sich Klasse-II-Antigene in den antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen des Epithels und nach der Transplantationsoperation [15] oder bei Entzündungszuständen [19] im Epithel und auch im Endothel.

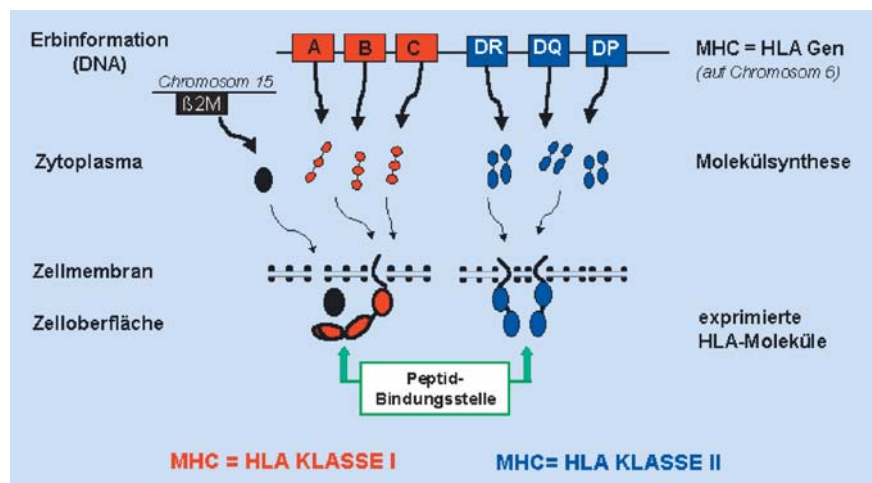


Abb. 1 ▲ Schematische Darstellung der Gene des HLA-Komplexes und der strukturellen Unterschiede der HLA-Klassen I und II. Die auf dem Chromosom 6 lokalisierten HLA-Gene kodieren u. a. für die Moleküle der HLA-Klassen 1 (A, B, C) und 2 (DR, DQ, DP). Eine Ausnahme bildet das sog. β2-Mikroglobulin (β2 M), das als integraler Bestandteil der HLA-Klasse-1-Moleküle von Genen kodiert wird, die auf dem Chromosom 15 lokalisiert sind. Nach der Molekülsynthese werden die verschiedenen HLA-Moleküle durch die Zellmembran geschleust und auf der Zelloberfläche exprimiert. Dort haben sie die Funktion, antigene Peptidfragmente den für die jeweilige HLA-Klasse spezifischen T-Lymphozyten zu präsentieren

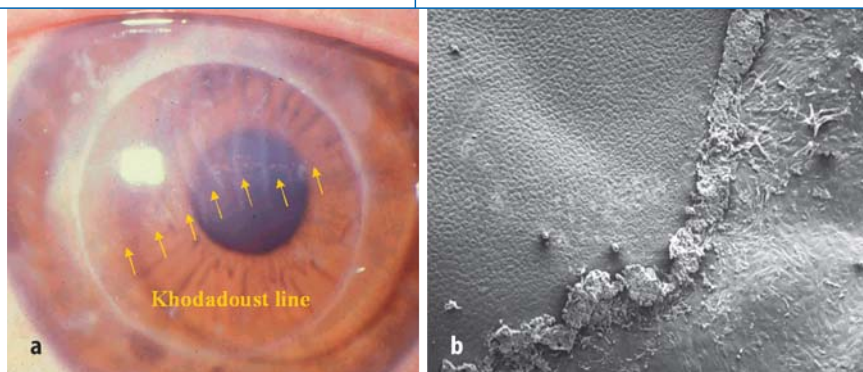


Abb. 2a, b ▲ Immunreaktion der Hornhaut mit Khodadoust-Linie nach Keratoplastik: a Klinisches Bild einer endothelialen Immunreaktion mit Khodadoust-Linie nach Keratoplastik beim Patienten. b Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Immunreaktion an der Kaninchenhornhaut. Es sind Makrophagen am kornealen Endothel zu sehen, die den Bereich der bereits zerstörten Endothelzellen von den noch vitalen Zellen demarkieren

Immunreaktion

Unterscheiden sich die Gewebeantigene von Spender und Empfänger, so kann dies zu einer endothelialen Immunreaktion mit Ausprägung einer Khodadoust-Linie führen (■ Abb. 2), die aus Makrophagen und zerstörtem Endothel besteht.

Es bleiben jedoch auch bei nicht vorhandener Gewebeübereinstimmung im Vergleich zu anderen Organen viele Korneatransplantate klar, und es tritt auch bei vollständigem Mismatch nicht unbedingt eine Immunreaktion auf. Ursache hierfür ist die besondere immunologische Situation der Kornea.

Es gibt 2 wesentliche Gründe für diese Sonderstellung. Zum einen ist dies der Mangel an Blut- und Lymphgefäßen, der zu einer verminderten Präsentation des Fremdartigens und einer ausbleibenden Immunreaktion durch fehlende Sensibilisierung des Immunsystems führt.

Zum anderen ist dies das sog. ACAID- („anterior chamber associated immun deviation“-)Phänomen, d. h. die mit der Vorderkammer assoziierte Abweichung der Immunantwort. Hierbei sind die Vorderkammer und die Kornea insofern immunologisch privilegiert, indem z. B. Fremdartigen, das in die Vorderkammer eingebracht wurde, über den Blutweg zur Milz gelangt und dort zu einer Supprimierung der zellulären Immunantwort bzw. zur Toleranz führt [48, 49, 50].

Verschiedene Faktoren wie Operationstrauma, postoperativer Reizzustand, Transplantatgröße, Vaskularisationsgrad der Empfängerkornea, Entzündungen etc.

können diese protektiven Faktoren eliminieren [19, 51, 55, 56, 58]. Erst dann kann das durch das Spendergewebe eingebrachte Fremdartigen über Blut- und lokale Lymphgefäße den afferenten Schenkel des Immunsystem aktivieren und eine Immunreaktion auslösen [41].

Es ist theoretisch einleuchtend, dass eine möglichst große Gewebe- bzw. Antigenübereinstimmung von Spender und Empfänger von besonderem Vorteil hinsichtlich der Vermeidung einer Immunreaktion ist.

Ergebnisse HLA-Match

Studienlage

Die klinischen Ergebnisse zum HLA-Match bei der perforierenden Keratoplastik sind jedoch zum Teil recht widersprüchlich (■ Tabelle 1). Zunächst wurde ein positiver Effekt der HLA-Typisierung bei den Hochrisikokeratoplastiken festgestellt [11, 26, 33, 65]. Auch bei Normalrisikokeratoplastik zeigen diverse Studien einen positiven Effekt des HLA-A-, -B- und -DR-Match [11, 35, 62]. Weitere Untersuchungen stellten diesen Effekt teilweise in Frage bzw. postulierten sogar einen negativen Effekt der HLA-Übereinstimmung auf das Transplantatüberleben bzw. das Auftreten der Immunreaktion [12, 13, 32, 73].

Sehr unterschiedlich wurde auch die Wertigkeit der Übereinstimmung von Klasse-I- (A, B) oder -II- (DR) Antigenen beurteilt. Selbst innerhalb der Klasse-I-Antigene wurde der Übereinstimmung von A- oder B-Antigenen ein unterschied-

lich starker Einfluss hinsichtlich des Auftretens einer Immunreaktion zugeschrieben [32, 35, 44]. Insbesondere die große prospektive randomisierte doppelblinde CCT-Studie („collaborative corneal transplantation study“) [16] hat mit dem Ergebnis, dass kein signifikanter Effekt durch das HLA-Match bezüglich der Immunreaktion als auch des Transplantatüberlebens besteht, zu einiger Diskussion geführt.

Fehlerquellen

Mehrere Ursachen tragen zu diesen sehr differierenden Ergebnissen bei.

Multicenterstudien. Sie haben das Problem des sehr unterschiedlichen Erfahrungsstandes der Operateure und der Unterschiede bei den Operationstechniken.

Wahl des „falschen“ Zielkriteriums. Die irreversible Immunreaktion oder das Transplantatversagen ist nicht nur durch immunologische Faktoren wie die HLA-Übereinstimmung bestimmt, sondern wird ebenso von anderen Faktoren, wie z. B. Stammzellinsuffizienz, Vorhandensein eines Glaukoms, postoperativen Entzündungen oder der Art und dem Ausmaß der immunmodulatorischen Therapie etc., beeinflusst. Um den Effekt des HLA-Match zu beurteilen, ist somit das Auftreten einer Immunreaktion, egal ob reversibel oder irreversibel, ein wesentlich empfindlicheres Zielkriterium der statistischen Analysen als das Transplantatversagen an sich.

Fehlerhafte HLA-Typisierung. Die Bestimmung von Spenderantigenen in Post-mortem-Blut stellt ein Problem dar. Die Bestimmung von Klasse-I-Antigenen kann serologisch oder molekulargenetisch von einem qualitätskontrollierten Labor erfolgen. Bei Klasse-II-Antigenen sind aber molekulargenetische Methoden zu bevorzugen, damit eine vollständige und reproduzierbare Typisierung gewährleistet werden kann. In qualitätskontrollierten Referenzlaboren können bei der serologischen Bestimmung von HLA-Klasse-II-Antigenen Fehlerraten von weniger als 11% erreicht werden [37], mit molekulargenetischen Bestimmungsverfahren kann

diese Rate auf bis zu 3% gesenkt werden [22]. So zeigte sich bei einer molekular-genetisch durchgeführten Retypisierung der CCT-Studie eine Fehlerquote von 12% beim HLA-A-, von 21% beim HLA-B- und 45% beim HLA-DR-Antigen [36]. Bei vielen „älteren“ Studien konnte dieser Qualitätsanspruch der HLA-Typisierung nicht erfüllt werden, was Fehlbestimmungen von HLA-Antigenen zur Folge hat. Durch Simulationsstudien wurde belegt, dass diese Bestimmungsfehler die Studienergebnisse signifikant beeinflussen [76]. Möglicherweise kann dies eine Erklärung für den in manchen Studien beschriebenen adversiven Effekt der HLA-Typisierung darstellen.

Neuere Studien

In den letzten Jahren wurden einige methodisch gut durchgeführte Studien publiziert, die die oben ausgeführten möglichen Fehlerquellen weitestgehend eliminiert haben und bei denen eine adäquate HLA-Typisierung durchgeführt wurde.

■ **Tabelle 2** zeigt eine Zusammenfassung dieser Arbeiten.

In diesen Studien zeigt sich eindeutig der Vorteil des HLA-Match, sowohl bei der Normalrisiko- [40, 60] als auch bei der Hochrisikokeratoplastik [2, 3, 6, 40, 76]. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Risikogruppen sowohl die Übereinstimmung der HLA-Klasse-I- und der -Klasse-II-Antigene für sich alleine wie auch die Übereinstimmungen in beiden Klassen zusammen zu einer deutlich verringerten Rate von Immunreaktionen führt.

Weitere Einflüsse

Auch wenn der Effekt der Übereinstimmung von HLA-Klasse-I- und -II-Antigenen bezüglich der Prävention einer Immunreaktion belegt ist, gibt es noch weitere immunologische Faktoren, die einen noch wenig bekannten Einfluss auf die Entstehung und den Ablauf einer Immunreaktion haben.

Non MHC Antigene

Neben den bekannten bereits erläuterten HLA- oder Major-Antigenen gibt es noch

Ophthalmologe 2003 · 100:1021–1030
DOI 10.1007/s00347-003-0934-8
© Springer-Verlag 2003

J. Wachtlin · R. Khaireddin · F. Hoffmann

Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik

Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist aufgrund einer veränderten Beurteilung des Stellenwerts der HLA-Typisierung bei der perforierenden Keratoplastik die Nachfrage nach gematchten Spenderhornhäuten stark angestiegen. Neben den HLA- oder Major-Antigenen gibt es weitere immunologisch bedeutsame Gewebeoberflächenmoleküle, zu denen vor allem die Blutgruppen- und die Minor-Antigene zählen. Im Hinblick auf eine effektive Kosten-Nutzen- bzw. Wartezeit-Nutzen-Kalkulation sind differenzierte Matching-Strategien erforderlich, um eine optimale Nutzung und Verteilung der immer noch in ungenügender Zahl vorhandenen Korneatransplantate zu gewährleisten. Mit speziellen Matching-Strategien wie der Berechnung der individuellen Wartezeit, der Berücksichtigung von Split-, Non-MHC- und HLA-Antigenen, zusätzlichen HLA-Loci sowie

„permissible“- und „taboo“-Mismatches wird in Zukunft mehr als nur die zahlenmäßige Übereinstimmung von HLA-Antigenen bei der Gewebetypisierung zu berücksichtigen sein. Dies wird es ermöglichen, von einer rein numerischen zu einer funktionellen Match-Strategie überzugehen. In dieser Übersicht wird der Stand der Diskussion zusammengefasst, und es werden verschiedene Strategien, Möglichkeiten und Grenzen sowohl der HLA- als auch der sonstigen Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik erläutert.

Schlüsselwörter

Perforierende Keratoplastik · Gewebetypisierung · Matching-Strategien · Spenderhornhaut · HLA-Antigene

Tissue typing by perforating corneal transplantation

Abstract

The demand for matched corneal grafts has risen rapidly over the last years. One reason for this is the change in the judgement of the value of tissue and especially HLA typing for prevention of an immune reaction in perforating corneal transplantation. Besides HLA or major antigens, there are other immunologically relevant tissue surface molecules such as the non-MHC antigens of which blood groups and minor antigens are the most important. With regard to effective cost-benefit and waiting time-benefit analyses, differentiated matching strategies are needed to assure optimized utilization and allocation of the still unsatisfactory number of available corneal grafts. With special matching strategies, such as the calculation of the individual waiting time, the

consideration of split, non-MHC and HLA antigens, additional HLA loci as well as so-called “permissible” and “taboo” mismatches, much more has to be taken into account in the future than just the numerical correspondence of HLA antigens. This will make it possible to turn from a pure numerical approach to a functional matching strategy. This review summarizes the discussion and different matching strategies, possibilities and limitations of HLA and tissue typing in perforating corneal transplantation.

Keywords

Perforating corneal transplantation · Tissue typing · Matching strategies · Cornea donor · HLA-antigens

Tabelle 1

„Ältere“ klinische Studien zum HLA-Matching

Autoren	Mono-/Multi-zentrisch	Fallzahl	Zeitmedian (Jahre)	Prognose	Untersuchte Antigene		Zielkriterien	Art der HLA-Typisierung	Ergebnisse/Kommentare
					HLA-Klasse 1	HLA-Klasse 2			
Munkhbat et al. [46], 1997; Morita et al. [44], 1998	Mono	81	3	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B	DRB1 DQB1 DPB1	IR	DNA (retrospektiv)	Signifikant günstiger Einfluss des HLA-A- und HLA-DPB1-Matching nur bei Hochrisiko; kein signifikanter Einfluss von HLA-B-, -DRB1- und -DQB1-Matching
Baggesen et al. [2], 1996	Mono	74	3	Hochrisiko		DRB1 DQ	Versagen	DNA	Signifikant günstiger Einfluss des HLA-DRB1-Matching auf das Langzeittransplantatüberleben
Hoffmann et al. [35] 1994	Mono	248	2	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B	DR	IR	kontroll-sero	2 und mehr Mismatches in HLA-B und -DR erhöhen die Immunreaktionsrate in beiden Risikogruppen; kein signifikanter Einfluss von HLA-A-Mismatches
Corneal Transplant Follow up Study, CTFS: Bradley et al. [12], 1993; Vail et al. [73], 1997	Multi	602	2	Normal- und Hochrisiko zusammen	A, B	DR	IR Versagen	n. d.	Matching für HLA-A und HLA-B verringerte die Inzidenz einer Immunreaktion, Matching für HLA-DR vergrößerte sie
The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS) [16], 1992	Multi	419	3	Hochrisiko	A, B	DR	IR irrev IR Versagen	sero	Prospektive Doppelblindstudie; hoch dosierte lokale Steroidtherapie; kein signifikanter Effekt von HLA-A-, HLA-B- oder HLA-DR-Matching nachweisbar; positiver Effekt der ABO-Blutgruppenübereinstimmung
Beekhuis et al. [5], 1991	Mono	107	3	Hochrisiko	A, B		irrev. IR	kontroll-sero	Transplantation erfolgte nur bei <2 Mismatches (0 oder 1) in HLA-A und HLA-B; nach 3 Jahren 76,3% Transplantatüberleben (d. h. ohne irrev. IR)
Boisjoly et al. [11], 1990	Mono	438	2	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B		IR	sero	2 Mismatches in HLA-A oder HLA-B erhöhten signifikant das Risiko für Immunreaktionen in beiden Risikogruppen
Hoffmann et al. [33], 1986	Mono	20	2	Hochrisiko	A, B	DR	IR	kontroll-sero	Signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl von Mismatches in HLA-B und HLA-DR und der Immunreaktionsrate; HLA-A kein signifikanter Effekt

Zeitmedian: Median der Nachbeobachtungsdauer aller Patienten (volle Jahre).

Prognose: Untersuchte Prognosegruppen: Normal- oder Hochrisikopatienten.

Zielkriterien: Zielkriterien der statistischen Analysen: IR jede erstmalige (reversible oder irreversible) Immunreaktion; irrev. IR nur irreversible Immunreaktionen, d. h. immunologisch bedingtes Transplantatversagen; Versagen jedes (immunologisch und nichtimmunologisch bedingte) Transplantatversagen; n. d. Zielkriterium nicht definiert.

HLA-Typisierung: Qualität der HLA-Typisierung: kontroll-sero serologische Typisierung durch qualitativ kontrolliertes (Referenz-)Labor; sero serologisch durch nicht qualitativ kontrolliertes Labor. DNA molekularbiologische (DNA-basierte) Typisierung, n. d. HLA-Typisierungsmethode nicht definiert

Tabelle 2

„Neuere“ klinische Studien zum HLA-Matching

Autoren	Mono-/Multi-zentrisch	Fallzahl	Zeitmedian (Jahre)	Prognose	Untersuchte Antigene			Zielkriterien	Art der HLA-Typisierung	Ergebnisse/Kommentare
					HLA-Klasse 1	HLA-Klasse 2	Andere			
Beekhuis et al. [6], 2003	Mono	303	4	Hochrisiko	A, B		irrev IR	kontroll-sero	Retrospektive Studie; signifikant günstiger Einfluss des HLA-A- und -B-Matching auf die Rate der irreversiblen Immunreaktion; HLA-Split-Matching ist bei Follow-up-Zeiten von 3–12 Jahren überlegen	
Reinhard et al. [60], 2003	Mono	398	3	Normalrisiko	A, B	DR	IR Versagen	kontroll-sero (HLA-Klasse 1) DNA (HLA-Klasse 2)	Retrospektive Studie; umfangreiche Standardisierung der Vergleichsgruppen; HLA-Matching für HLA-A-, -B-, -DR gemeinsam verringert die Immunreaktionsrate und verbessert die Überlebensprognose signifikant	
Khairuddin et al. [40], 2003	Mono	459	3	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B	DR	IR	kontroll-sero	Retrospektive Studie; HLA-Matching für HLA-A-, -B-, -DR verringert die Immunreaktionsrate signifikant für Hoch- und Normalrisikopatienten; kein signifikanter Vorteil des Matching für HLA-Splits	
Bartels et al. [3], 2001	Mono	64	3	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B	DR	IR	DNA	Fall-Kontroll-Studie; signifikant günstiger Einfluss des HLA-A- und HLA-DR-Matching auf die Immunreaktionsrate für Hochrisikopatienten	
Völker-Dieben et al. [76] 2000	Mono	1.681	5	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B	DR	IR irrev. IR	kontroll-sero (retrospektiv)	Signifikant günstiger Einfluss des HLA-A- und HLA-B-Matching auf die Immunreaktionsraten beider Risikogruppen	
Roy et al. [62], 1997	Mono	693	3	Normal- und Hochrisiko getrennt	A, B		Lewis-Antigene	n. d.	Signifikant günstiger Einfluss des Matching für HLA-A-, -B- und Lewis-Antigene auf die Immunreaktionsrate für Normalrisikopatienten	

Zeitmedian: Median der Nachbeobachtungsdauer aller Patienten (volle Jahre).

Prognose: Untersuchte Prognosegruppen: Normal- oder Hochrisikopatienten.

Zielkriterien: Zielkriterien der statistischen Analysen: IR jede erstmalige (reversible oder irreversible) Immunreaktion; irrev. IR nur irreversible Immunreaktionen, d. h. immunologisch bedingtes Transplantatversagen; Versagen jedes (immunologisch und nichtimmunologisch bedingte) Transplantatversagen; n. d. Zielkriterium nicht definiert.

HLA-Typisierung: Qualität der HLA-Typisierung: kontroll-sero serologische Typisierung durch qualitätskontrolliertes (Referenz-)Labor; sero serologisch durch nicht qualitätskontrolliertes Labor. DNA molekularbiologische (DNA-basierte) Typisierung. n. d. HLA-Typisierungsmethode nicht definiert

weitere immunologisch bedeutsame Gewebeerflächenmoleküle, die sog. Non-MHC-Antigene, zu denen vor allem die Blutgruppen- und die Minor-Antigene zählen.

ABO- und Lewis-Blutgruppenantigene

Sowohl die ABO- als auch die Lewis-Antigene werden als Blutgruppenantigene bezeichnet und auf der Oberfläche von Erythrozyten exprimiert. Aus biochemischer Sicht sind sie sich relativ ähnlich, da sie beide von den gleichen Vorläufermolekülen abstammen [62]. Die Lewis-Antigene konnten bisher in der Bindehaut nachgewiesen werden [28], die ABO-Antigene sowohl im Hornhautepithel [25, 71] als auch im Endothel [23, 63].

Im Gegensatz zur Nierentransplantation [45] scheint der Einfluss der ABO-Inkompatibilität auf die Immunreaktion bei der Keratoplastik eher nachrangig zu sein [4, 11, 62, 76], wenngleich auch hier einzelne Studien mit anderen Ergebnissen vorliegen [16, 75].

Wenige Arbeiten befassen sich mit der Rolle der Lewis-Antigene bei der Keratoplastik. Möglicherweise beeinflusst auch die Übereinstimmung dieses Antigens [62] den Transplantatüberlebensverlauf nach Hornhauttransplantation. Im Rahmen der Transplantation solider Organe wird den Lewis-Antigenen jedoch eine eher geringe Immunogenität zugeschrieben [62]. Prinzipiell ist die Bestimmung dieser Antigene vergleichsweise einfach und kostengünstig und kann problemlos durchgeführt werden.

Minor-Antigene (Minor-Ag)

Bei diesen Antigenen handelt es sich um sog. „schwache“ Transplantationsantigene, deren Einfluss auf die Entstehung einer Immunreaktion bisher als eher gering eingestuft und folglich auch nur selten berücksichtigt wurde. Die Minor-Ag sind ursprünglich zytosolische Proteine, die auf der Zelloberfläche, gebunden an HLA-Klasse-I-Antigene, präsentiert werden können [29, 47, 51]. Das bekannteste Beispiel eines Minor-Ag ist das männliche H-Y-Antigen, das im Mäusemodell zu einer vermehrten Abstoßung von Hauttransplantaten von männlichen Spendern auf weibliche Empfänger führt [24]. Bei der menschlichen Hornhaut scheint jedoch

der Geschlechtsunterschied von Spender und Empfänger keinen Einfluss auf das Transplantatüberleben zu haben [81].

Bei der Keratoplastik im Mäusemodell [31] konnte gezeigt werden, dass bei sonst vollständiger Übereinstimmung im HLA-System durch ein einziges Mismatch, in diesem Fall beim H-3-Minor-Ag, die Abstoßungsrate auf 29–50% je nach Allelkombination gegenüber 0% bei der Kontrollgruppe ansteigt. Weiterhin wurde ebenfalls im Mäusemodell demonstriert [67], dass bei Spenderhornhäuten, die nur Mismatches in den Minor-Ag aufwiesen, wesentlich häufiger (50%) eine Transplantatabstoßung auftrat als bei Transplantaten mit Mismatches nur in den MHC-Antigenen (20%). Möglicherweise sind Minor-Ag im Vergleich zu MHC-Molekülen in größerer Zahl auf der Oberfläche von Spenderzellen vorhanden und können somit leichter über antigenpräsentierende Zellen das Immunsystem des Empfängers aktivieren [65].

Trotz dieser tierexperimentellen Ergebnisse ist noch wenig über die Rolle von Minor-Ag bei der Immunreaktion nach Keratoplastik beim Menschen bekannt. So konnte zwar nachgewiesen werden, dass die Minor-Ag H-Y und HA-3 in der menschlichen Kornea exprimiert werden [29], die Identifizierung und Typisierung von Minor-Ag ist generell jedoch nur teilweise möglich und zudem schwierig und kostenintensiv [69] und wird aus diesen Gründen zurzeit nicht klinisch angewendet. Es müssen weitere Ergebnisse abgewartet werden, bevor ein Urteil über die Bedeutung des „Minor-Matching“ gefällt werden kann.

Splits und andere HLA-Loci

Die HLA-Typisierung erfolgte ursprünglich rein serologisch, und die Antigene wurden in verschiedene Obergruppen, dem „broad typ“, und in Untergruppen, die so genannten Splits, unterteilt. So lässt sich beispielsweise das HLA-Obergruppen-Antigen B15 in die Splitantigene HLA-B62, 63, 75, 76 und 77 als Untergruppen des Antigens HLA-B15 unterteilen. Im genannten Fall konnten durch DNA-basierte Methoden bisher weitere ca. 80 verschiedene Allele, die sich teilweise nur durch einzelne DNA-Sequenzen unter-

scheiden, differenziert werden. Die Unterscheidung dieser Allele ist weitaus aufwändiger und kostenintensiver als die Typisierung nur der Obergruppen [8, 43].

Aus theoretischer Sicht wäre eine Übereinstimmung auf Splitebene wegen der geringeren HLA-Inkompatibilität hinsichtlich des Auftretens einer Immunreaktion von Vorteil. Dieser positive Effekt auf das Transplantatüberleben wurde bei der Nierentransplantation bereits teilweise belegt [53, 54]. Bei der Keratoplastik existieren hierzu nur wenige klinische Studien. So wurde beispielsweise bei der Hochrisikokeratoplastik ein signifikant positiver Effekt der HLA-Übereinstimmung auf Splitebene bei den HLA-A- und -B-Antigenen festgestellt [6]. In einer anderen Arbeit konnte sowohl bei der Hoch- wie auch Normalrisikokeratoplastik kein signifikanter Unterschied des Split-Matchings für HLA A, HLA B und HLA DR im Vergleich zum „broad-typ“-Matching gezeigt werden [40].

Durch verfeinerte molekulargenetische Typisierungstechniken lassen sich Splits und Untergruppen, die sich teilweise in nur wenigen Aminosäuresequenzen unterscheiden, weiter differenzieren und andere, bisher nicht berücksichtigte HLA-Loci, wie z. B. HLA C und HLA DQ, DP, zuverlässiger und genauer bestimmen. Somit eröffnet sich die Möglichkeit, in Zukunft durch Berücksichtigung dieser Antigene eine noch genauere Übereinstimmung von Transplantat und Empfänger zu erzielen.

HLA-Antikörper

Für die Keratoplastik konnte gezeigt werden, dass vom Empfänger gebildete Alloantikörper einen signifikanten Einfluss auf das Überleben des Transplantats haben können [30, 61]. Dabei kann zwischen bereits schon präoperativ vorhandenen Antikörpern und in Folge einer Sensibilisierung durch Fremdartigen (Korneatransplantat) entstandenen Antikörpern unterschieden werden. Für die tägliche Routine ergibt sich hieraus die Konsequenz zumindest bei einer Rekeratoplastik, besser aber bei jeder Keratoplastik, ein Antikörperscreening durchzuführen und beim Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte HLA-Allele eine Spenderhornhaut, die genau diese Antigene auf sich trägt, nicht zu transplantieren.

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement



Springer

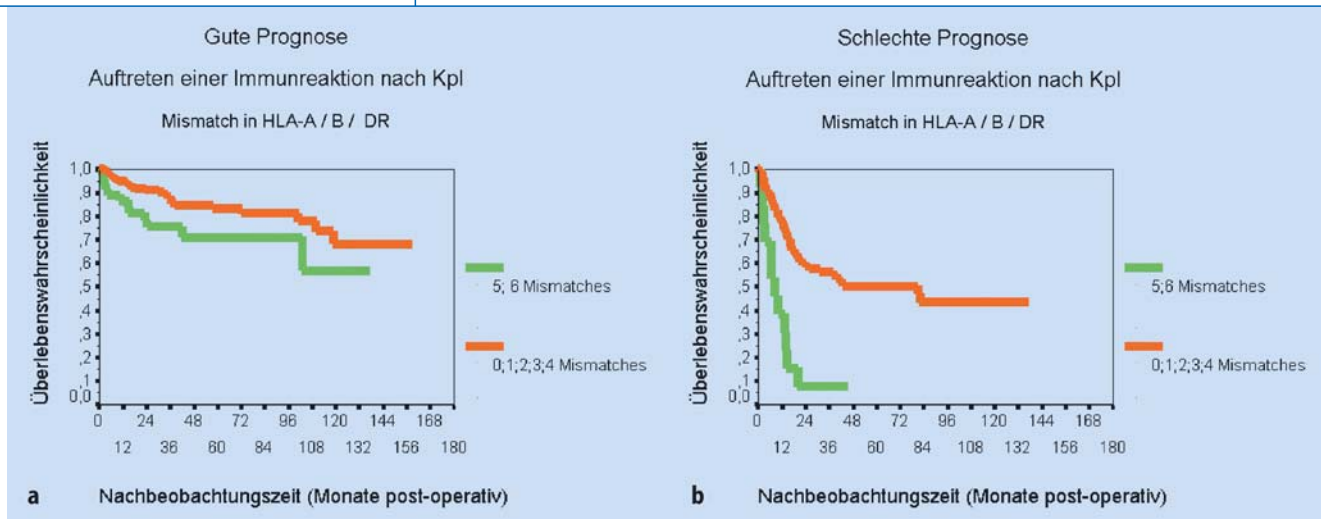


Abb. 3a,b ▲ **Kaplan-Meier-Analyse: Auftreten einer Immunreaktion nach Keratoplastik.** a signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Immunreaktion beim Vergleich von Patienten mit guter Prognose und 0;1;2;3;4-Mismatches in HLA A/B/DR (n=249 (30)) und Patienten mit guter Prognose und 5;6-Mismatches in HLA A/B/DR (n=46 (12)); log-rank-Test: $p < 0,04$. b signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Immunreaktion beim Vergleich von Patienten mit schlechter Prognose und 0;1;2;3;4-Mismatches in HLA A/B/DR (n=130 (53)) und Patienten mit schlechter Prognose und 5;6-Mismatches in HLA A/B/DR (n=13 (12)); log-rank-Test: $p < 0,0001$

Unterschiedliche Konservierung des Spendermaterials

Es gibt Hinweise dafür, dass das Transplantatüberleben durch die Art bzw. Dauer der Konservierung des Transplantates beeinflusst werden kann. Im Mäusemodell wurde bei sowohl MHC- wie auch Minor-Ag-differenten Spendern und Empfängern gezeigt, dass nach einer Konservierung von mindestens 7 bzw. 14 Tagen Dauer die Immunreaktionsrate 44 bzw. 30% betrug, wogegen bei nicht konservierten Hornhäuten eine Immunreaktion in 90% der Fälle auftrat [39]. Ursache hierfür könnte eine verminderte Immunogenität der konservierten Hornhäute [39] sein.

Im Tiermodell kommt es durch die Konservierung zu einer verminderten Expression der Klasse-I- und Minor-Antigene [39], bei menschlichen Spenderhornhäuten konnte eine verminderte Expression von HLA-Klasse-II-Antigenen, bedingt durch den Verlust der antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen, im kornealen Epithel gefunden werden [1].

Diskussion/Ausblick

Auch wenn mittlerweile weitestgehend Übereinstimmung darüber herrscht, dass das HLA-Matching für alle Keratoplastik-

patienten – unabhängig ob mit normalem oder hohem Risiko – von Vorteil ist, ermöglicht es das zurzeit vorhandene Angebot an typisierten Korneatransplantaten nicht, für jeden Patient ein vollständig HLA-identisches Transplantat zu erhalten. Da jedoch alleine schon die Minimierung der HLA-Inkompatibilität um 2 Mismatches zu einer signifikant geringeren Rate von Immunreaktionen führt (Abb. 3a, b), ist es unter Abwägung der persönlichen Situation des Patienten durchaus legitim, mit weniger Übereinstimmungen zu transplantieren.

Dies ist in bestimmten Fällen, bei denen eine seltene Allelkombination auf den Loci A, B und DR oder spezifische HLA-Antikörper nach vorausgegangener Immunreaktion vorliegen [18], notwendig, um unrealistische Wartezeiten von mehreren Jahren zu vermeiden.

Im Hinblick auf eine effektive Kosten-Nutzen- bzw. Wartezeit-Nutzen-Kalkulation sind differenzierte Matching-Strategien erforderlich, um eine optimale Nutzung und Verteilung der immer noch in ungenügender Zahl vorhandenen Korneatransplantate zu gewährleisten.

Die nachfolgend aufgeführten Matching-Strategien sind denkbar:

Berechnung der Wartezeit für ein gematchtes Transplantat. In der Arbeitsgruppe der Lions Hornhautbank und der Universitätsaugenklinik in Düsseldorf wurde hierzu ein mathematisches Modell erstellt, mit dem es möglich ist, die potenzielle Wartezeit für jeden Patienten individuell zu berechnen [9, 10]. Die berechneten Ergebnisse zeigten eine sehr gute Korrelation mit den tatsächlichen Wartezeiten. So ist es möglich, bei seltenen Allelen eine geringere Anzahl von Übereinstimmungen zu akzeptieren.

Funktionelle Typisierung durch Berücksichtigung von „permissible“- und „taboo“-Mismatches. Nicht jedes Antigen wirkt auf gleiche Weise immunogen. Bei der Nierentransplantation fiel erstmals auf, dass nicht alle Mismatches unweigerlich zu einer Immunreaktion führen. Es lassen sich weitere Anhaltspunkte dafür finden, dass nicht nur die Anzahl der HLA-Übereinstimmungen für die Vermeidung einer Immunreaktion ausschlaggebend ist. So finden sich bei abgestoßenen Nierentransplantaten bestimmte HLA-Antigene besonders häufig. Weiterhin wurde festgestellt, dass bestimmte HLA-Klasse-I-Antigene bei Patienten mit bestimmten HLA-Phänotypen besonders immunogen erscheinen, während sie bei anderen Patienten, die diesen Phänotyp nicht aufwei-

sen, unauffällig bleiben [20]. So konnten sowohl für HLA-Klasse I wie auch für Klasse II bestimmte HLA-Mismatches identifiziert werden, die die Transplantatprognose signifikant verschlechterten, und andere, die keinen Einfluss hatten [20, 21, 74]. Dies führte zu dem Konzept der sog. akzeptablen oder „permissible“- und den inakzeptablen oder „taboo“-Mismatches [20]. Dieses Konzept wurde von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen ähnlich beschrieben [42, 74]. Erste Hinweise auf die mögliche Relevanz solcher „taboo“-Mismatches auch bei der Keratoplastik lieferte eine Arbeit, die die Spender-HLA-Antigene A26, B35 und B44 als besonders schädlich einstufte [17].

Es existieren verschiedene Erklärungsmodelle des „taboo“-Phänomens. Postuliert werden unter anderem Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Pathogenen und HLA-Antigenen [20] oder eine mögliche Kopplung von bestimmten Empfänger-HLA-Phänotypen mit einer erhöhten Aktivität des Immunsystems [68]. So wurde, assoziiert zum Vorhandensein von bestimmten HLA-DR-Allelen (unter anderem DR1, DR3, DR4 und DR7), eine erhöhte Sekretion von TNF- α nachgewiesen [7, 38, 59, 66, 78].

Grundsätzlich scheinen aber in verschiedenen Organsystemen verschiedene „taboo“- und „permissible“-Mismatches aufzutreten. Die Erkenntnisse können somit nicht ohne weiteres von einem Organsystem auf ein anderes übertragen werden [17]. Ebenso scheint der Kontext, in dem ein bestimmtes Antigen steht – also der HLA-Phänotyp des Empfängers – eine wesentliche Rolle zu spielen [20].

Trotz dieser momentanen Schwierigkeiten könnte die Identifizierung und klinische Überprüfung von „permissible“- und „taboo“-Mismatches ein denkbare und sinnvolles Konzept für zukünftige Matching-Strategien sein. Somit könnte auch die zurzeit praktizierte numerische Matching-Strategie durch eine funktionelle ersetzt werden und der Grundsatz, dass Spender und Empfänger möglichst identische HLA-Moleküle aufweisen sollten, durch die Forderung abgelöst werden, dass das Immunsystem des Empfängers durch die Auswahl akzeptabler Mismatches so wenig als möglich sensibilisiert werden sollte [14].

Abschließende Bemerkung

Wie bereits erläutert, wird bei der Gewebetypisierung bei der perforierenden Keratoplastik mit der Berücksichtigung von Split-, Non-MHC- und HLA-Antigenen, zusätzlichen HLA-Loci sowie „permissible“- und „taboo“-Mismatches in der Zukunft weitaus mehr als nur die zahlenmäßige Übereinstimmung von HLA-Antigenen zu berücksichtigen sein. Diese sollte allerdings heutzutage als Standardverfahren sowohl für die Normal- als auch die Hochrisikokeratoplastik gelten.

Eine adäquate Typisierung kann das Risiko einer Immunreaktion vermindern, aber möglicherweise nicht eliminieren. Tritt trotzdem eine Immunreaktion auf, ist nach wie vor eine potente medikamentöse Immunmodulation gefordert. Die Gewebetypisierung kann auch die prophylaktische medikamentöse Therapie nach Keratoplastik nicht ersetzen, jedoch ist hier eine Reduktion möglich, wodurch die Nebenwirkungen reduziert bzw. teilweise vermieden werden können. Dies sollte bei der Kosten-Nutzen-Analyse ebenso berücksichtigt werden wie die Tatsache, dass jede auftretende (auch reversible) Immunreaktion zum Verlust von Endothelzellen und somit zu einem potenziell verkürzten Transplantatüberleben führen kann [52]. Die Rate an Transplantatversagen durch Immunreaktion bei der Verwendung von nicht typisiertem Spendermaterial ist höher als bei gematchten Hornhäuten, folglich ist die Zahl der erforderlichen Retransplantationen ebenfalls höher. Dies hat wiederum ein erhöhtes Abstoßungsrisiko und eine zusätzliche Verknappung der Zahl zur Verfügung stehender Hornhauttransplantate zur Folge. Durch die Verwendung von typisierten Korneatransplantaten sowohl bei der Normal- als auch bei der Hochrisikokeratoplastik können diese Probleme minimiert werden. Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Gewebe- und HLA-Typisierung mit weiter verbesserten Typisierungstechniken und -strategien zunimmt.

Korrespondierender Autor

Dr. J. Wachtlin

Augenklinik, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin
E-Mail: wachtlin@ukbf.fu-berlin.de

Literatur

1. Ardjomand N, Berghold A, Reich ME (1998) Loss of corneal Langerhans cells during storage in organ culture medium, Optisol and McCarey-Kaufman medium. *Eye* 12:134–138
2. Baggesen K, Lamm LU, Ehlers N (1996) Significant effect of high-resolution HLA-DRB1 matching in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 62:1273–1277
3. Bartels MC, Otten HG, van Gelderen BE et al. (2001) Influence of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matching on rejection of random corneal grafts using corneal tissue for retrospective DNA HLA typing. *Br J Ophthalmol* 85:1341–1346
4. Batchelor JR, Casey TA, Werb A et al. (1976) HLA matching and corneal grafting. *Lancet* 1:551–554
5. Beekhuis WH, van Rij G, Renardel de Lavalette JG et al. (1991) Corneal graft survival in HLA-A- and HLA-B-matched transplantations in high-risk cases with retrospective review of HLA-DR compatibility. *Cornea* 10:9–12
6. Beekhuis WH, Bartels M, Doxiadis II et al. (2003) Degree of compatibility for HLA-A and -B affects outcome in high-risk corneal transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:12–21
7. Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A et al. (1988) Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 28:599–606
8. Bidwell J (1994) Advances in DNA-based HLA-typing methods. *Immunol Today* 15:303–307
9. Bohringer D, Reinhard T, Bohringer S et al. (2002) Predicting time on the waiting list for HLA matched corneal grafts. *Tissue Antigens* 59:407–411
10. Bohringer D, Reinhard T, Enczmann J et al. (2003) Individual analysis of expected time on the waiting list for HLA-matched corneal grafts. *Dev Ophthalmol* 36:50–55
11. Boisjoly HM, Roy R, Bernard PM et al. (1990) Association between corneal allograft reactions and HLA compatibility. *Ophthalmology* 97:1689–1698
12. Bradley BA, Vail A, Gore SM et al. (1993) Penetrating keratoplasty in the United Kingdom: an interim analysis of the corneal transplant follow-up study. *Clin Transpl*: 293–315
13. Bradley BA, Vail A, Gore SM et al. (1995) Negative effect of HLA-DR matching on corneal transplant rejection. *Transplant Proc* 27:1392–1394
14. Claas FHJ, Roelen DL, Oudshoorn M et al. (2003) Future HLA matching strategies in clinical transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:62–73
15. Claas FHJ, Roelen DL, D'Amaro J et al. (1994) The role of HLA in corneal transplantation. In: Zierhut M (ed) *Immunology of corneal transplantation*. Aeolus Press Scientific Publishers, Buren, p 47
16. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group A (1992) The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol* 110:1392–1403
17. Creemers PC, Kahn D, Hill JC (1999) HLA-A and -B alleles in cornea donors as risk factors for graft rejection. *Transpl Immunol* 7:15–18
18. de By TM (2003) Shortage in the face of plenty: improving the allocation of corneas for transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:56–61
19. Donnelly JJ, Li WY, Rockey JH et al. (1985) Induction of class II (Ia) alloantigen expression on corneal endothelium in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:575–580

20. Doxiadis II, Smits JM, Schreuder GM et al. (1996) Association between specific HLA combinations and probability of kidney allograft loss: the taboo concept. *Lancet* 348:850–853
21. Doxiadis II, Smits JM, Stobbe I et al. (1996) Taboo HLA mismatches in cadaveric renal transplantation: definition, analysis, and possible implications. *Transplant Proc* 28:224
22. Doxiadis II, Claas FH (2003) The short story of HLA and its methods. *Dev Ophthalmol* 36:5–11
23. Dua HS, Shidham VB (1979) Application of specific red blood cell adherence test to the human cornea and conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 88:1067–1071
24. Eichwald EJ, Silmscr CR (1955) Skin. *Transplant Bull* 2:148–149
25. Foster CS, Allansmith MR (1979) Lack of blood group antigen A on human corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 87:165–170
26. Foulks GN, Sanfilippo FP, Locascio JA 3rd et al. (1983) Histocompatibility testing for keratoplasty in high-risk patients. *Ophthalmology* 90:239–244
27. Fujikawa LS, Colvin RB, Bhan AK et al. (1982) Expression of HLA-A/B/C and -DR locus antigens on epithelial, stromal and endothelial cells of the human cornea. *Cornea* 1:213–222
28. Garcher C, Bara J, Bron A et al. (1994) Expression of mucin peptide and blood group ABH- and Lewis-related carbohydrate antigens in normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:1184–1191
29. Goulmy E, Pool J, Van Lochem E et al. (1995) The role of human minor histocompatibility antigens in graft failure: a mini-review. *Eye* 9:180–184
30. Hahn AB, Foulks GN, Enger C et al. (1995) The association of lymphocytotoxic antibodies with corneal allograft rejection in high risk patients. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Transplantation* 59:21–27
31. Haskova Z, Sproule TJ, Roopenian DC et al. (2003) An immunodominant minor histocompatibility alloantigen that initiates corneal allograft rejection. *Transplantation* 75:1368–1374
32. Hill JC, Creemers PC (1997) An adverse matching effect for the HLA-B locus in corneal transplantation. *Transpl Int* 10:145–149
33. Hoffmann F, von Keyserlingk HJ, Wiederholt M (1986) Importance of HLA DR matching for corneal transplantation in high-risk cases. *Cornea* 5:139–143
34. Hoffmann F, Pahlitzsch T (1989) Predisposing factors in corneal graft rejection. *Cornea* 8:215–219
35. Hoffmann F, Tregel M, Noske W et al. (1994) HLA-B and -DR match reduces the allograft reaction after keratoplasty. *Ger J Ophthalmol* 3:100–104
36. Hopkins KA, Maguire MG, Fink NE et al. (1992) Reproducibility of HLA-A, B, and DR typing using peripheral blood samples: results of retyping in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Group (corrected). *Hum Immunol* 33:122–128
<http://www.ctstransplant.org>
37. Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD et al. (1990) Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1233–1237
38. Kamiya K, Hori J, Kagaya F et al. (2000) Preservation of donor cornea prevents corneal allograft rejection by inhibiting induction of alloimmunity. *Exp Eye Res* 70:737–743
39. Khaireddin R, Wachtlin J, Hoffmann F (in press) HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* DOI: 10.1007/s00417-003-0759-9
40. Ksander BR, Sano Y, Streilein JW (1996) Role of donor-specific cytotoxic T cells in rejection of corneal allografts in normal and high-risk eyes. *Transpl Immunol* 4:49–52
41. Maruya E, Takemoto S, Terasaki PI (1993) HLA matching: identification of permissible HLA matches. In: Cecka JM (ed) *Clinical transplants*. UCLA Tissue typing Laboratory, Los Angeles, p 511–520
42. Middleton D, Savage DA, Cullen C et al. (1988) Discrepancies in serological tissue typing revealed by DNA techniques. *Transpl Int* 1:161–164
43. Morita N, Munkhbat B, Gansuvd B et al. (1998) Effect of HLA-A and -DPB1 matching in corneal transplantation. *Transplant Proc* 30:3491–3492
44. Morozumi K, Katoh M, Horike K et al. (2001) Pathologic characteristics of acute humoral rejection after ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplant Proc* 33:3299–3300
45. Munkhbat B, Hagihara M, Sato T et al. (1997) Association between HLA-DPB1 matching and 1-year rejection-free graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 63:1011–1016
46. Nicholls SM (1996) Non-HLA antigens and HLA-DR matching in corneal transplantation. *Br J Ophthalmol* 80:780–782
47. Niederkorn JY, Shaddock JA, Streilein JW (1981) Immunogenetic basis for immunologic privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunogenetics* 13:227–236
48. Niederkorn JY, Mellon J (1996) Anterior chamber-associated immune deviation promotes corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2700–2707
49. Niederkorn JY (1999) The immunology of corneal transplantation. *Dev Ophthalmol* 30:129–140
50. Niederkorn JY (2001) Mechanisms of corneal graft rejection: the sixth annual Thygeson Lecture, presented at the Ocular Microbiology and Immunology Group meeting, October 21, 2000. *Cornea* 20:675–679
51. Nishimura JK, Hodge DO, Bourne WM (1999) Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology* 106:1962–1965
52. Opelz G (1988) Importance of HLA antigen splits for kidney transplant matching. *Lancet* 2:61–64
53. Opelz G, Scherer S, Mytilineos J (1997) Analysis of HLA-DR split-specificity matching in cadaver kidney transplantation: a report of the Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 63:57–59
54. Peeler JS, Niederkorn JY (1986) Antigen presentation by Langerhans cells in vivo: donor-derived Ia+ Langerhans cells are required for induction of delayed-type hypersensitivity but not for cytotoxic T lymphocyte responses to alloantigens. *J Immunol* 136:4362–4371
55. Pepose JS, Gardner KM, Nestor MS et al. (1985) Detection of HLA class I and II antigens in rejected human corneal allografts. *Ophthalmology* 92:1480–1484
56. Pleyer U, Weidle EG, Lisch W et al. (1990) Clinical types of immunologic transplant reactions following perforating keratoplasty. *Fortschr Ophthalmol* 87:14–19
57. Pleyer U (1997) Immune reaction after penetrating keratoplasty. *Immunobiology, prevention and therapy*. *Ophthalmologie* 94:933–950
58. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV et al. (1993) Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 23:224–231
59. Reinhard T, Bohringer D, Enczmann J et al. (2003) HLA class I and II matching improves prognosis in penetrating normal-risk keratoplasty. *Dev Ophthalmol* 36:42–49
60. Roy R, Boisjoly HM, Wagner E et al. (1992) Pretransplant and posttransplant antibodies in human corneal transplantation. *Transplantation* 54:463–467
61. Roy R, Des Marchais B, Bazin R et al. (1997) Role of ABO and Lewis blood group antigens in donor-recipient compatibility of corneal transplantation rejection. *Ophthalmology* 104:508–512
62. Salisbury JD, Gebhardt BM (1981) Blood group antigens on human corneal cells demonstrated by immunoperoxidase staining. *Am J Ophthalmol* 91:46–50
63. Sanfilippo F, MacQueen JM, Vaughn WK et al. (1986) Reduced graft rejection with good HLA-A and B matching in high-risk corneal transplantation. *N Engl J Med* 315:29–35
64. Sano Y, Ksander BR, Streilein JW (1996) Minor H, rather than MHC, alloantigens offer the greater barrier to successful orthotopic corneal transplantation in mice. *Transpl Immunol* 4:53–56
65. Santamaria P, Gehr RC, Bryan MK et al. (1989) Involvement of class II MHC molecules in the LPS-induction of IL-1/TNF secretions by human monocytes. Quantitative differences at the polymorphic level. *J Immunol* 143:913–922
66. Sonoda Y, Streilein JW (1992) Orthotopic corneal transplantation in mice – evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply. *Transplantation* 54:694–704
67. Stobbe I, van der Meer-Prins E, Smits JM et al. (1999) In vitro reactivity of allo-specific cytotoxic T lymphocytes does not explain the taboo phenomenon. *Transpl Immunol* 7:215–220
68. Streilein JW, Arancibia-Caracamo C, Osawa H (2003) The role of minor histocompatibility alloantigens in penetrating keratoplasty. *Dev Ophthalmol* 36:74–88
69. Treseler PA, Foulks GN, Sanfilippo F (1984) The expression of HLA antigens by cells in the human cornea. *Am J Ophthalmol* 98:763–772
70. Treseler PA, Foulks GN, Sanfilippo F (1985) Expression of ABO blood group, hematopoietic, and other cell-specific antigens by cells in the human cornea. *Cornea* 4:157–168
71. Vail A, Gore SM, Bradley BA et al. (1994) Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. *Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators*. *Ophthalmology* 101:120–127
72. Vail A, Gore SM, Bradley BA et al. (1997) Conclusions of the corneal transplant follow up study. *Collaborating Surgeons*. *Br J Ophthalmol* 81:631–636
73. Vereerstraeten P, Dupont E, Andrien M et al. (1995) Influence of donor-recipient HLA-DR mismatches and OKT3 prophylaxis on cadaver kidney graft survival. *Transplantation* 60:253–258
74. Volker-Dieben HJ, Kok-van Alphen CC, Lansbergen Q et al. (1982) Different influences on corneal graft survival in 539 transplants. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 60:190–202
75. Volker-Dieben HJ, Claas FH, Schreuder GM et al. (2000) Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal allografts. *Transplantation* 70:640–648
76. Volker-Dieben HJ, Schreuder GM, Claas FH et al. (2003) Histocompatibility and corneal transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:22–41
77. Weissensteiner T, Lanchbury JS (1997) TNF polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. *Immunogenetics* 47:6–16
78. Whitsett CF, Stulting RD (1984) The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:519–524
79. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF (1997) The Australian corneal graft registry 1996 report. *Mercury Press, Adelaide*
80. Williams KA, Muehlberg SM, Bartlett CM et al. (1999) The Australian corneal graft registry 1999 report. *Mercury Press, Adelaide*, p 49