

Aus der Augenklinik des  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. H. Foerster

**Immunhistochemische Befunde zum Einfluß immunsuppressiver Therapie  
nach perforierender Keratoplastik am Rattenauge**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Anne-Christine Karow  
aus Berlin

**INHALT**

<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1. HORNHAUTTRANSPLANTATION	6
1.1 Kurzer geschichtlicher Überblick	6
1.2 Hornhauttransplantation heute	7
1.2.1 Indikationen zur Keratoplastik	7
1.2.2 Risikofaktoren - Hochrisikokeratoplastik	7
2. DIE PATHOGENESE DER ABSTOßUNGSREAKTION	8
2.1 Grundlegendes	8
2.1.1 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)	8
2.1.2 Antigen-präsentierende Zellen (APC)	10
2.1.3 Minore Histokompatibilitätsantigene	11
2.1.4 Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion	11
2.2 Das okuläre Immunsystem - Besonderheiten der Immunologie des Auges	12
2.2.1 Immunkompetente Zellen in der Hornhaut	12
2.2.2 Histokompatibilitätsantigene in der Hornhaut	13
2.2.3 Das Immunprivileg des Auges - ACAID	15
3. MAKROPATHOLOGIE UND HISTOLOGIE DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	16
4. PRÄVENTION UND BEHANDLUNG DER ABSTOßUNG IN DER KLINIK	17
5. TIERMODELLE – KANINCHEN, RATTE, MAUS	18
6. EXPERIMENTELLE THERAPIEFORMEN	20
6.1 Verschiedene Prinzipien der Immunsuppression	21
6.2 Kleinmolekulare Immunsuppressiva	22
6.2.1 Cyclosporin A	22
6.2.2 Tacrolimus (FK 506), Sirolimus (Rapamycin)	24
6.2.3 Leflunomid	24
6.3 Monoklonale Antikörper	26
6.3.1 Allgemeines zu Wirkung und Anwendung	26
6.3.2 Anti-CD4-Antikörper	27
7. FRAGESTELLUNG	28

---

<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
1. TIERE	29
2. MEDIKAMENTE	29
3. OPERATIONS-METHODE	29
4. EINTEILUNG DER BEHANDLUNGSGRUPPEN	30
5. POSTOPERATIVE UNTERSUCHUNG DER AUGEN	31
6. ERSTELLUNG EINER KINETIK DER ALLOGRAFTREAKTION	32
7. AUFARBEITUNG DER AUGEN	32
8. APAAP UND ANDERE IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN	33
9. DARSTELLUNG DER DAS TRANSPLANTAT INFILTRIERENDEN ZELLPOPULATIONEN MIT DER APAAP-METHODE	35
10. KONTROLLEN	36
11. AUSWERTUNG DER GEWEBSSCHNITTE	36
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
1. AUS DER STUDIE AUSGESCHLOSSENE TIERE	38
2. NORMALE (NICHT OPERIERTE) RATTENAUGEN	38
3. HORNHAUTTRANSPLANTIERTE AUGEN	38
3.1 Allgemeine Beobachtungen	38
3.2 Syngene Transplantation	39
3.3 Allogene Transplantation	41
3.3.1 Unbehandelte Tiere	41
3.3.2 Allogene Transplantation - Behandlung mit Cyclosporin A	44
3.3.3 Allogene Transplantation - Behandlung mit Leflunomid	46
3.3.4 Allogene Transplantation - Behandlung mit RIB 5/2 + Cyclosporin A	49
<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>

## **ERGEBNISSE**

### **1. Aus der Studie ausgeschlossene Tiere**

Insgesamt mußten sechs Tiere von der Studie wegen Infektion oder Nahtdehiszenz ausgeschlossen werden.

### **2. Normale (nicht operierte) Rattenaugen**

In der Hornhaut gesunder Rattenaugen finden sich nur vereinzelte Zellen, die die hier untersuchten Marker tragen.

CD4-positive (CD4<sup>+</sup>) Zellen finden sich um die Gefäße am Limbus und auch in der Hornhaut unmittelbar am Limbus, im übrigen Hornhaut-Stroma jedoch nur ganz vereinzelt bis gar nicht.

CD8<sup>+</sup> Zellen sind ähnlich den CD4<sup>+</sup> Zellen verteilt.

CD11<sup>+</sup> Zellen finden sich in recht großer Zahl um die Gefäße am Limbus und auch im Hornhaut-Stroma unmittelbar am Limbus und vereinzelt im übrigen Stroma (s. Abb. 1).

Für RT1B-exprimierende Zellen gilt das gleiche wie für CD11<sup>+</sup> Zellen, sie sind aber regelmäßig im Hornhaut-Stroma zu finden.

Auch in der Iris finden sich CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup> und RT1B<sup>+</sup> Zellen.

### **3. Hornhauttransplantierte Augen**

#### **3.1 Allgemeine Beobachtungen**

**Gemeinsam ist der Abstoßungsreaktion bei allen untersuchten Tieren eine zu Beginn überwiegende Infiltration mit CD11<sup>+</sup> Zellen, die über den Limbus und die Empfängerhornhaut das Transplantat erreicht. Der Nahtbereich ist stets besonders stark infiltriert. Vorderkammer und Iris sind in den Entzündungsprozeß einbezogen.**

In den verschiedenen Behandlungsgruppen sind hinsichtlich des Verlaufes der Abstoßungsreaktion einige Gemeinsamkeiten festzustellen, die der Beschreibung des Verlaufes in den einzelnen Gruppen vorangestellt werden soll.

Zwischen dem 3. und 5. Tag post operationem (post op) finden sich infiltrierende Zellen mit den untersuchten Markern stets in recht großer Zahl um die Gefäße am Limbus und in der Empfängerhornhaut, das Transplantat ist erst geringfügig infiltriert.

Es überwiegen am 3.-5. Tag in allen Gruppen die CD11<sup>+</sup> Zellen in Empfängerhornhaut und Transplantat. Auch am 8./9. Tag machen diese noch die größte Gruppe aus. RT1B wird of-

fenbar nicht auf allen CD11<sup>+</sup> Zellen exprimiert (s. Grafiken 1,2), so daß vermutlich ein Teil dieser Zellen aus polymorphkernigen Granulozyten besteht, die neben den RT1B-exprimierenden Makrophagen ebenfalls diesen Marker tragen.

Im Transplantat ist ein deutlicher Unterschied in der Infiltrationsdichte zwischen einem relativ großen peripheren Bereich und dem Zentrum des Transplantats bemerkenswert.

Die Nähte sind bereits zwischen dem 3. und 5. Tag deutlich stärker infiltriert als ihre Umgebung. Es finden sich einige CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>, vor allem aber CD11<sup>+</sup> Zellen. RT1B wird von vielen dieser Zellen exprimiert. Zu späteren Zeitpunkten sind Stroma und besonders Epithel in diesem Bereich auch verdickt. Ab dem 12. Tag post op finden sich Granulome mit mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen in unmittelbarer Nähe der Fäden.

Auch Vorderkammer und Iris sind dem histologischen Bild zufolge in den Entzündungsprozeß einbezogen. Die Iris ist stets mehr oder weniger stark verdickt und voll von Entzündungszellen. Von der Vorderkammer aus lagern sich im Laufe der Abstoßungsreaktion Zellen an das Spenderendothel an.

### 3.2 Syngene Transplantation

**Bei den Tieren, die ein syngenes Transplantat erhielten, findet sich nach einigen Tagen eine Infiltration mit ganz überwiegend CD11<sup>+</sup> Zellen, die am 13. Tag post op fast vollständig zurückgegangen ist.**

#### 8. Tag post op

Im Transplantat findet sich am 8. Tag post operationem (post op) ein leicht bis mäßig ausgeprägtes Infiltrat. Es ist auch ein mäßiges Ödem vorhanden. CD11<sup>+</sup> Zellen überwiegen im Infiltrat deutlich gegenüber CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen. Die Ratio CD4:CD8:CD11 beträgt 1 : 1,5 : 8,1. RT1B wird nicht von allen CD11<sup>+</sup> Zellen exprimiert (s. Grafik 1).

In der Empfängerhornhaut ist ebenfalls ein mäßiges Infiltrat zusammen mit einem leichten Ödem vorhanden. Die zelluläre Zusammensetzung ist ähnlich wie im Transplantat. RT1B wird von infiltrierenden Zellen und einzelnen Keratozyten exprimiert.

Es zeigt sich eine unspezifische Entzündung mit im wesentlichen Makrophagen und Granulozyten, aber kaum lymphozytären Anteilen.

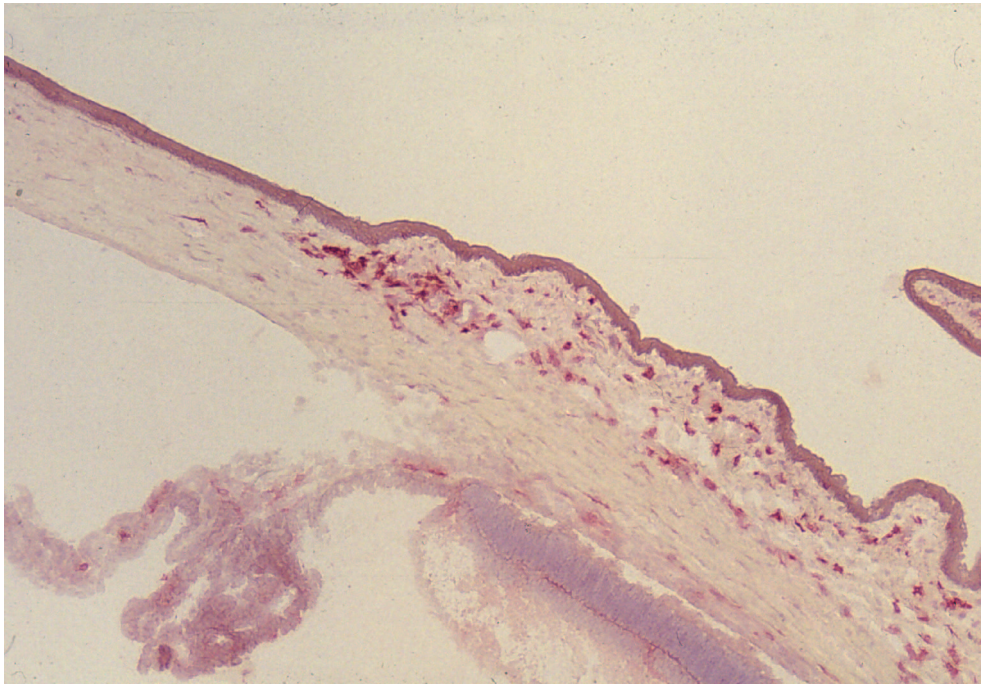


Abb. 1: Limbus und Hornhaut des gesunden Rattenauges, APAAP-Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach, einige CD11<sup>+</sup> Zellen am Limbus, kaum im peripheren Hornhautstroma

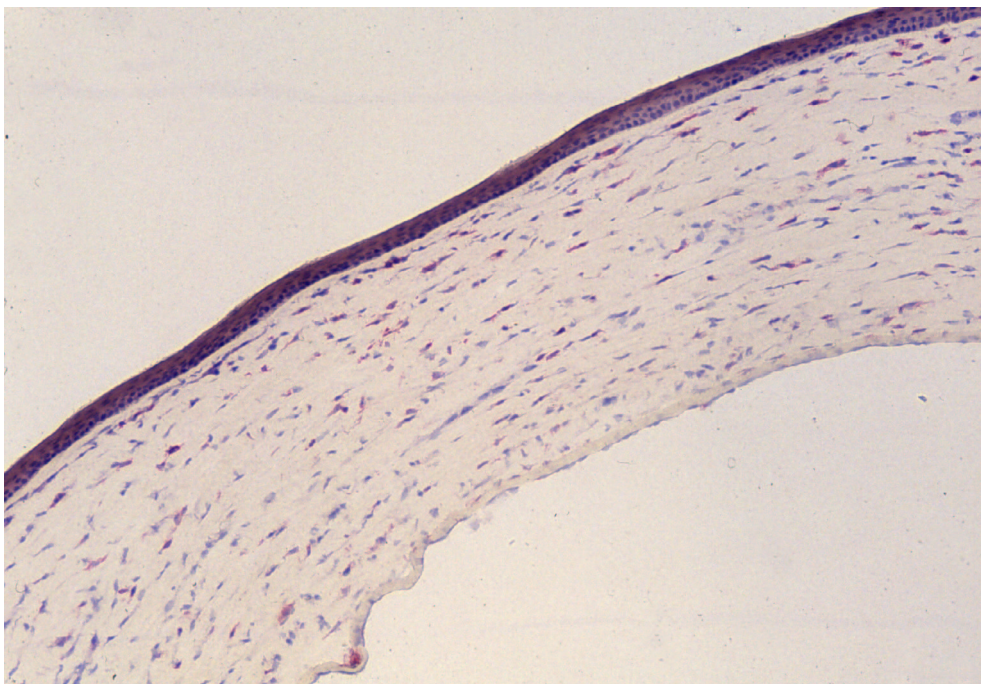
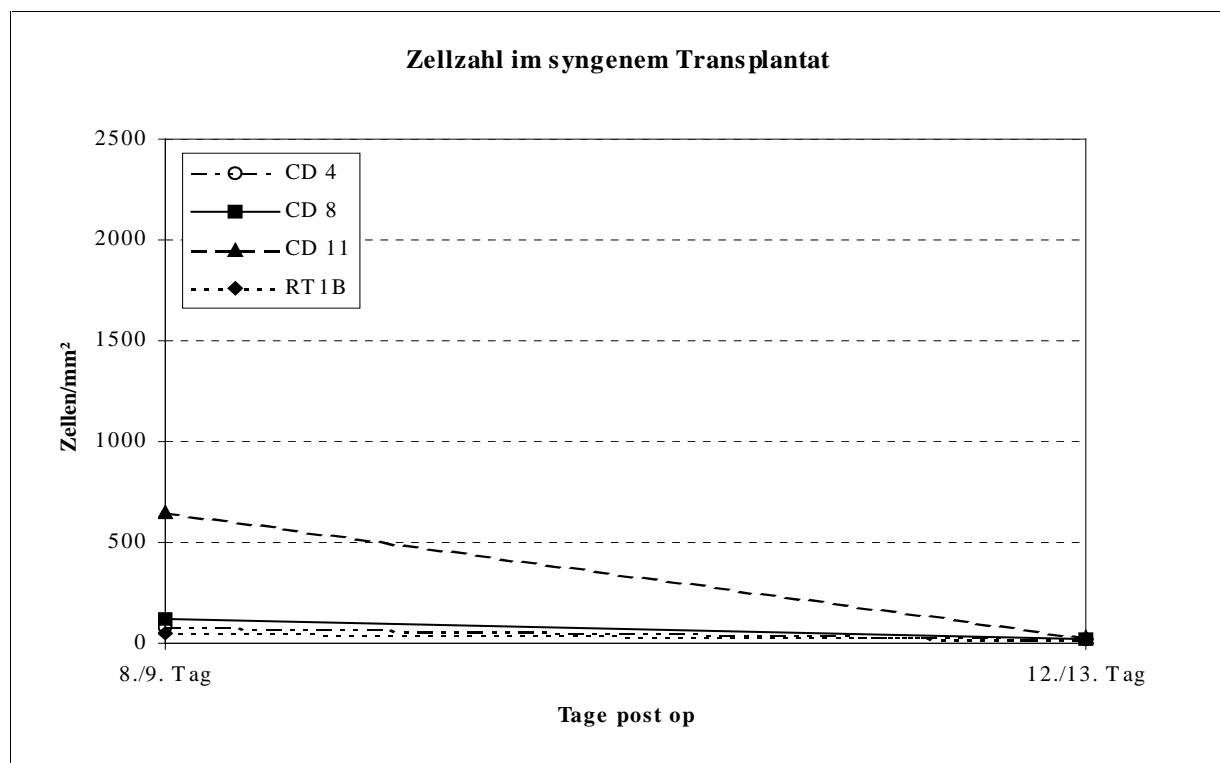


Abb. 2: Syngenes Transplantat, 13. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Das Transplantat ist noch von einigen CD11<sup>+</sup> Zellen infiltriert, aber im wesentlichen völlig intakt.

### 13. Tag post op

Das Infiltrat im Transplantat ist am 13. Tag post op ebenso wie das Ödem deutlich rückläufig. Die Zellzahl ist stark zurückgegangen (CD4:CD8:CD11 = 1:1:1,5; s. Grafik 1, Abb. 2). Auch die RT1B-Expression hat abgenommen. Lediglich an den Nähten ist das Infiltrat noch betont. Auch in der Empfängerhornhaut ist das Infiltrat zurückgegangen, obwohl noch eine Infiltration durch CD11<sup>+</sup>-Zellen besteht .



Grafik 1: Bei den syngen transplantierten Tieren zeigt sich am 8. Tag post op. eine Infiltration mit überwiegend CD11<sup>+</sup> Zellen, die nur z.T. RT1B exprimieren. Diese geht zum 13. Tag fast vollständig zurück. Es handelt sich um eine unspezifische Entzündungsreaktion.

## 3.3 Allogene Transplantation

### 3.3.1 Unbehandelte Tiere

Bei den Tieren, die ohne immunsuppressive Behandlung ein allogenes Transplantat erhielten, infiltrieren nach den CD11<sup>+</sup> Zellen bald auch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen das Transplantat, die Zellzahl steigt massiv an und letztlich wird das Transplantat völlig zerstört.

### 3. Tag post op

Es findet sich bereits am 3. Tag post op ein lichtetes Infiltrat im Transplantat, das von einem leichten Ödem begleitet wird. Sowohl Infiltrat als auch Ödem sind im Zentrum des Transplantats weniger ausgeprägt als zu den Nähten hin. Die CD11<sup>+</sup> Zellen überwiegen im Infiltrat deutlich, und nur wenige CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen sind vorhanden (CD4:CD8:CD11 = 1 : 4 : 33). RT1B wird auf wenigen infiltrierende Zellen exprimiert (s. Grafik 2).

In der Empfängerhornhaut ist das Infiltrat stärker ausgeprägt als im Transplantat und wird von einem starken Ödem begleitet. Die CD11<sup>+</sup> Zellen sind auch in der Empfängerhornhaut am stärksten vertreten. RT1B wird stärker exprimiert als im Transplantat (s. Grafik 3).

### 8. Tag post op

Das Infiltrat im Transplantat ist kaum dichter geworden, wird jetzt aber von einem sehr starken Ödem begleitet. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Infiltrat hat sich deutlich vermehrt (CD4:CD8:CD11 = 1 : 3,1 : 4,4). Die RT1B-Expression hat hingegen nicht zugenommen und ist immernoch sehr gering (s. Grafik 2).

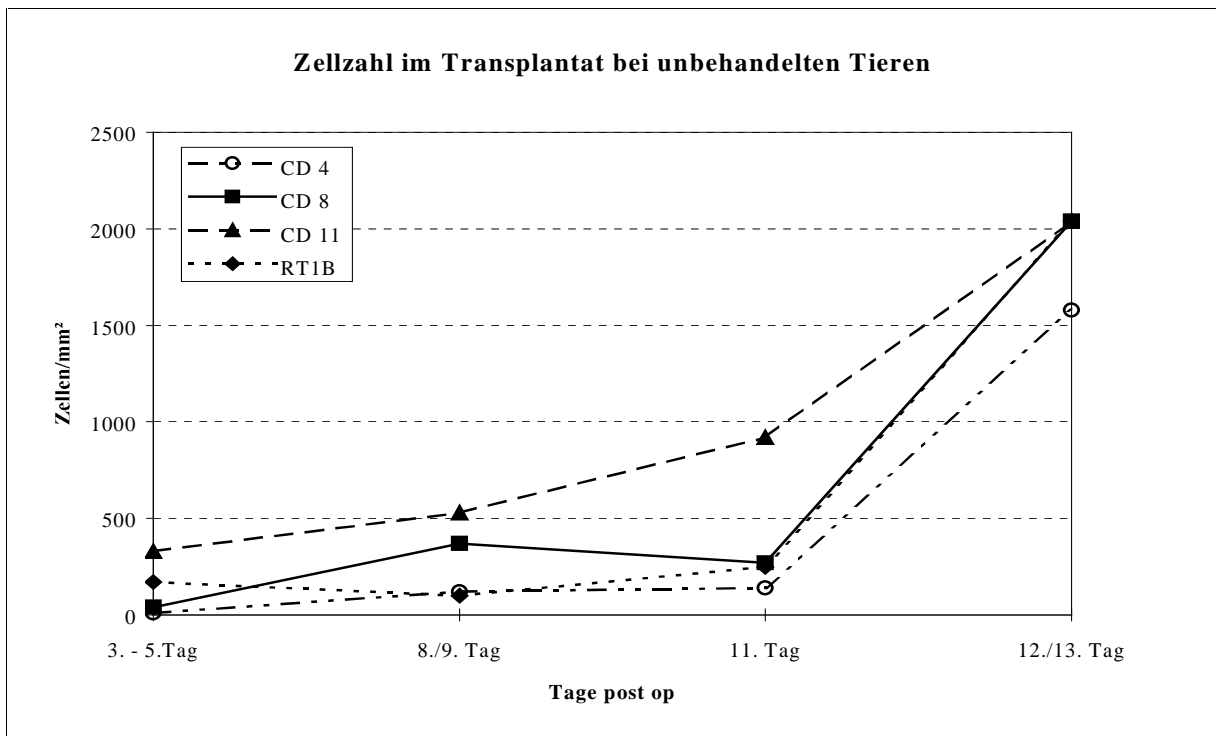
Das Infiltrat in der Empfängerhornhaut hat weiterzugenommen. Auch hier ist der Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen größer geworden. Von beiden Populationen finden sich etwa doppelt so viele Zellen in der Empfängerhornhaut wie im Transplantat. Hier hat die Expression von RT1B, die sich jetzt auch auf einigen Keratozyten findet, leicht zugenommen (s. Grafik 3).

### 11. Tag post op

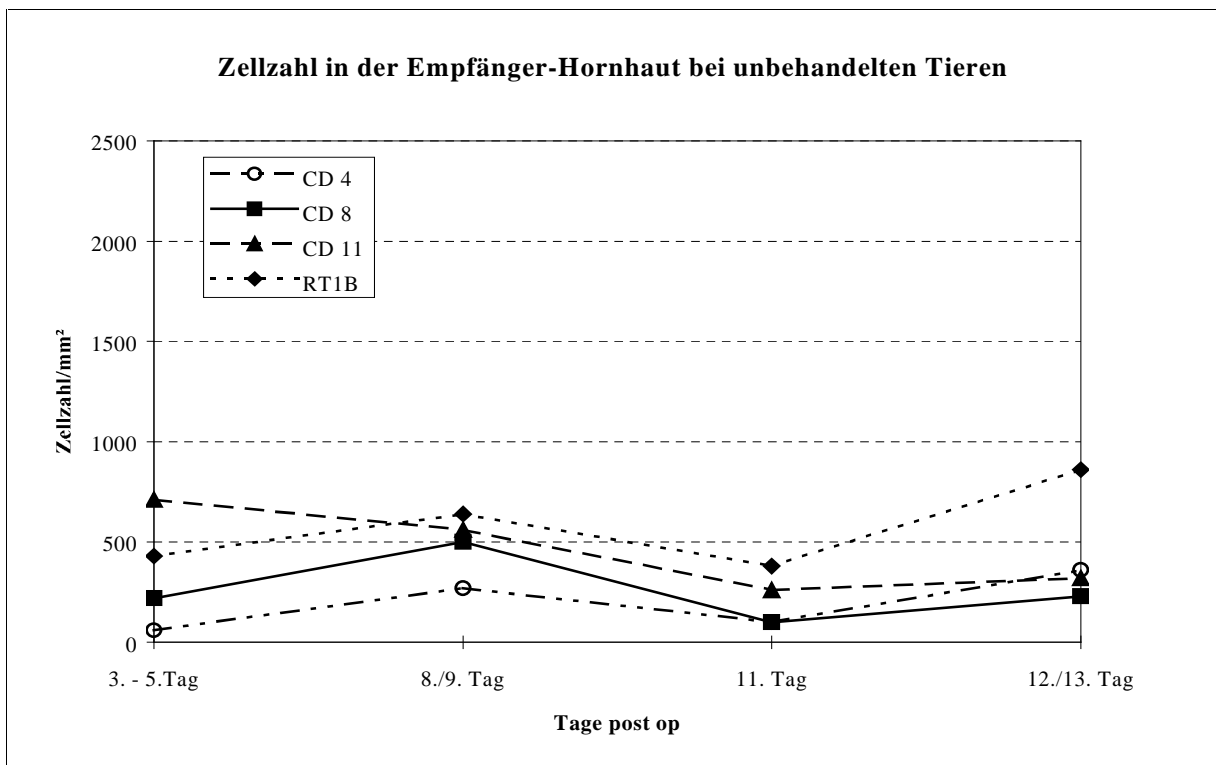
Im Transplantat hat sich bis auf die weiterhin zunehmende Zahl an CD11<sup>+</sup> Zellen kaum etwas verändert (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,9 : 6,6). RT1B wird jetzt auf den infiltrierenden Zellen und auch auf den Spenderkeratozyten vermehrt exprimiert (s. Grafik 2). Am Spenderendothel haben sich viele Entzündungszellen aus der Vorderkammer angelagert und es weitgehend zerstört. Die Zellen sind CD11<sup>+</sup> und zu einem Teil RT1B<sup>+</sup> und zum anderen RT1B<sup>-</sup>. Das Epithel ist von einigen CD8<sup>+</sup> Zellen infiltriert und hat sich über weite Strecken abgelöst.

In der Empfängerhornhaut geht die Entzündungsreaktion im Ganzen zurück. Das Ödem geht zurück, das Infiltrat ist hinsichtlich aller untersuchten Marker leicht rückläufig (s. Grafik 3). Das Empfängerendothel ist intakt, exprimiert aber im Gegensatz zu den Keratozyten kein RT1B. An den Nähten finden sich einzelne Fremdkörperriesenzellen.





Grafik 2: Bei den allogenen transplantierten, unbehandelten Tieren steigt im Gegensatz zu den syngentransplantierten Tieren die Zellzahl zwischen dem 8./9. und dem 12./13. Tag stark an, wobei neben den anfänglich vorhandenen CD11<sup>+</sup> Zellen auch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen das Transplantat massiv infiltrieren.



Grafik 3: In der Empfänger-Hornhaut der allogenen transplantierten, unbehandelten Tiere ist das Infiltrat zu Beginn stärker ausgeprägt, geht dann zunächst zurück, um bei maximaler Entzündung im Transplantat ebenfalls wieder etwas zuzunehmen.

### 13. Tag post op

Innerhalb von zwei Tagen hat die Infiltrationsdichte im Transplantat massiv zugenommen. Das stark verdickte Hornhautstroma ist angefüllt mit inflammatorischen Zellen. Die Zellzahl hat sich insgesamt etwa verfünffacht ( $CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,3 : 1,3$ ). Ebenfalls wird RT1B jetzt sehr stark exprimiert (s. Grafik 2, Abb. 3). Das Endothel ist nicht mehr auszumachen, die Descemet-Membran ist fragmentiert, in der Vorderkammer haben sich am ehemaligen Endothel Zellmassen angelagert, die auch mit der Iris verbacken sind.

In der Empfängerhornhaut hat sich im Vergleich zum 11. Tag post op wenig verändert. Von den Nähten scheint her der Entzündungsprozeß wieder auf sie überzugreifen (s. Grafik 3).

Es zeigt sich das Bild der Transplantatabstoßung.

### **3.3.2 Allogene Transplantation - Behandlung mit Cyclosporin A**

**Nach Behandlung allogener transplantierte Tiere mit Cyclosporin A (CyA) zeigt sich im wesentlichen das gleiche Bild wie bei den unbehandelten Tieren. Es kommt auch in dieser Gruppe bereits am 13. Tag post op zu einer völligen Zerstörung des Transplantats durch die infiltrierenden Zellen.**

### 5. Tag post op

Im Transplantat findet sich ein nahtnah deutliches, zentral leichtes Ödem und ein gering ausgeprägtes Infiltrat. Dabei überwiegen die  $CD11^+$  Zellen auch in dieser Gruppe zu diesem Zeitpunkt stark ( $CD4:CD8:CD11 = 1 : 9 : 76$ ). RT1B wird auf einigen wenigen Entzündungszellen im Transplantat exprimiert (s. Grafik 4).

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem stark ausgeprägt. Auch das Infiltrat ist dichter als im Transplantat. RT1B wird etwas stärker exprimiert als im Transplantat.

### 9. Tag post op

Das Transplantat ist jetzt stark verdickt und von einem massiven Ödem erfaßt. Die Dichte des Infiltrates dagegen hat kaum zugenommen.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen haben jetzt einen größeren Anteil am Infiltrat ( $CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,1 : 3,9$ ; s. Grafik 4). Das Spenderendothel weist Lücken auf, und es haben sich Entzündungszellen aus der Vorderkammer angelagert, die  $CD11^+$  und zu einem Teil  $RT1B^+$  und zum anderen  $RT1B^-$  sind. Die RT1B-Expression ist im Transplantat noch äußerst gering ausgeprägt und betrifft nur einzelne infiltrierende Zellen.

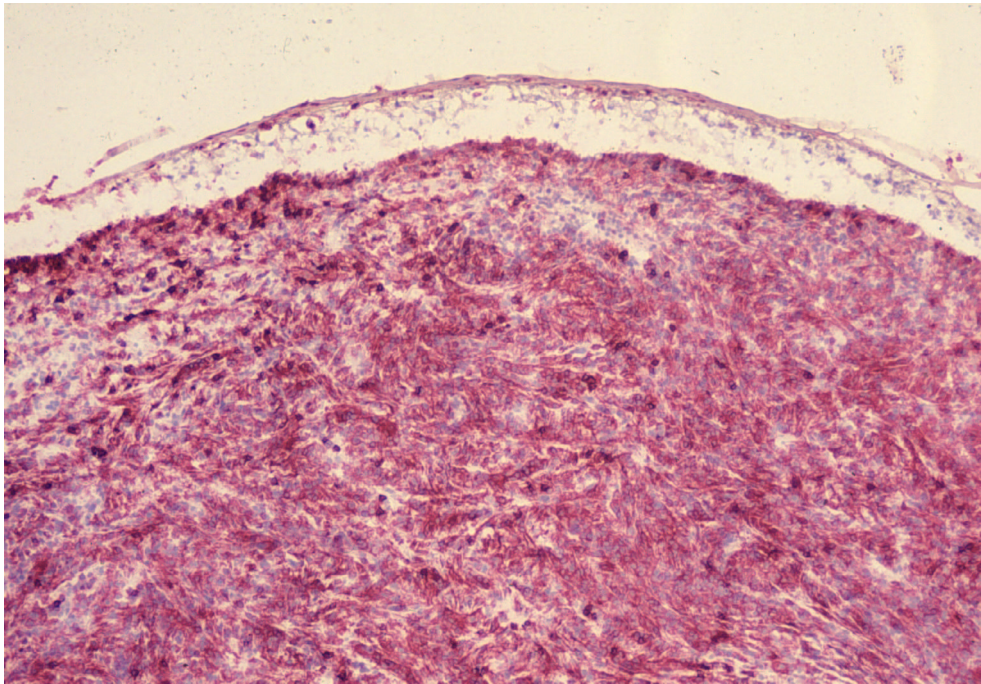


Abb. 3: Allogene Transplantation, unbehandelt, 13. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Das Transplantat ist stark angeschwollen und dicht von CD11<sup>+</sup> Zellen infiltriert, das Epithel weitgehend zerstört.

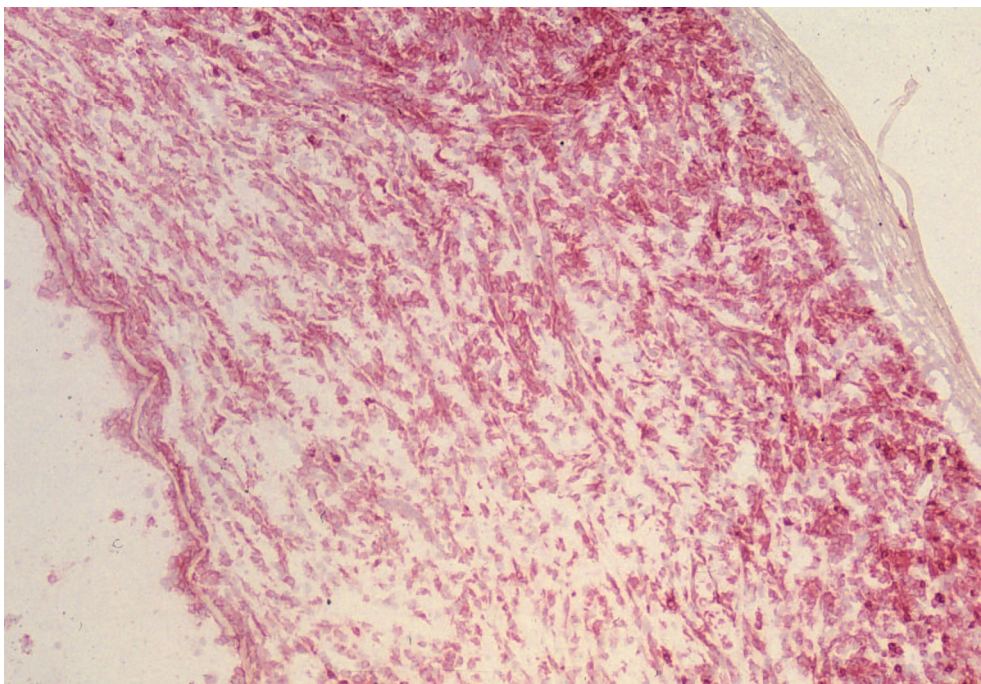


Abb. 4: Allogene Transplantation, behandelt mit Cyclosporin A 10 mg/kg, 13. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Das Bild ist sehr ähnlich dem bei unbehandelten Tieren mit starker Schwellung und dichter Infiltration des Transplantats.

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem zurückgegangen ebenso wie auch das Infiltrat, das aber immernoch etwas dichter ist als im Transplantat. Das Empfängerendothel ist intakt, es finden sich hier auch keine angelagerten Zellen. RT1B wird auf Zellen des Infiltrates, auf einigen Spenderkeratozyten und vereinzelt auch auf dem Spenderendothel exprimiert.

### 13. Tag post op

Die entzündliche Reaktion im Transplantat hat sehr stark zugenommen. Es ist stark verdickt, jedoch jetzt massiv mit inflammatorischen Zellen durchsetzt. Es sind alle Populationen etwa gleich stark vertreten (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1 : 1). Auch RT1B wird massiv exprimiert (s. Grafik 4). Die Keratozyten sind durch die massive Infiltration nicht mehr auszumachen, das Endothel jedoch, wo noch vorhanden, exprimiert ebenfalls RT1B. Häufig ist allerdings das Endothel zerstört, und auch die Descemetmembran fragmentiert. Das Epithel ist ebenfalls, hauptsächlich durch CD8<sup>+</sup> Zellen, infiltriert und z.T. abgelöst.

In der Empfängerhornhaut hat sich gegenüber dem 9. Tag nichts Wesentliches verändert. Es bietet sich hier histologisch bereits das Bild der Transplantatabstoßung (s. Abb. 4).

### 16. Tag post op

Wie bereits am dreizehnten Tag ist das Transplantat stark verdickt und voll mit infiltrierenden Zellen. Es besteht kein erkennbaren Unterschied zum 13. Tag post op (s. Grafik 4).

Lediglich in der Empfänger-Hornhaut hat das Infiltrat wieder zugenommen (s.o., 3.1.).

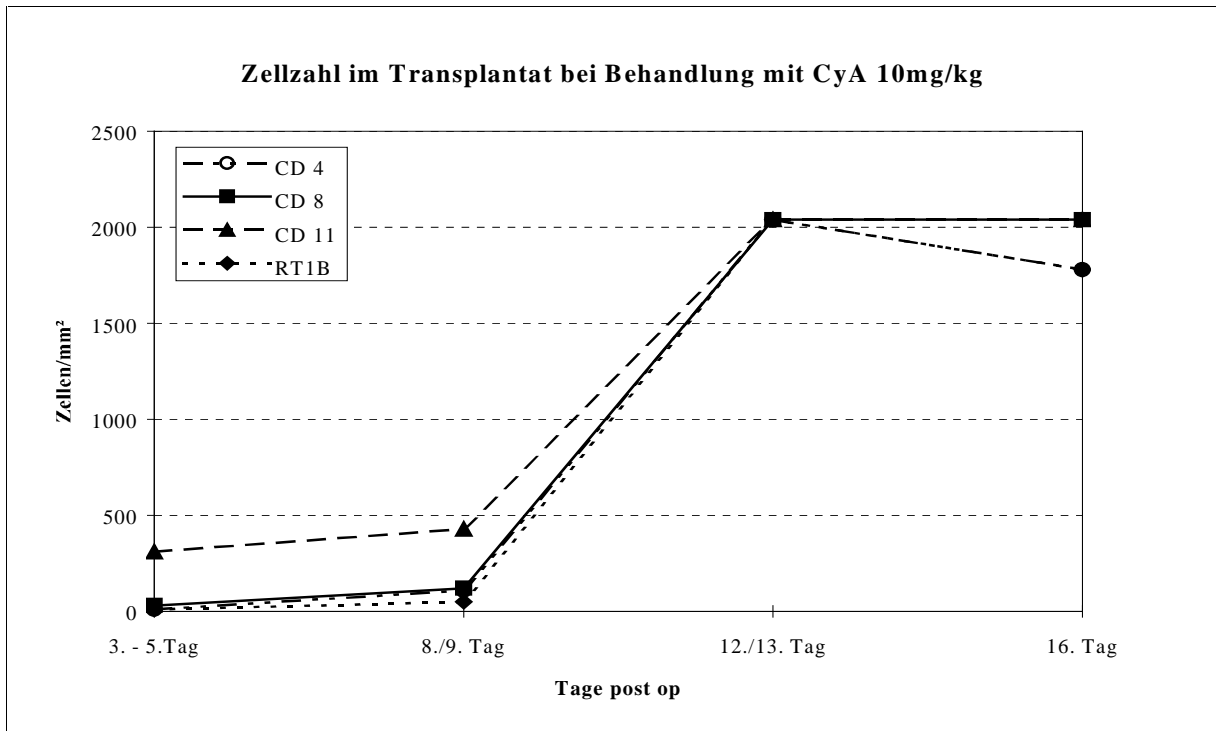
### **3.3.3 Allogene Transplantation - Behandlung mit Leflunomid**

**Auch durch die Behandlung mit LF konnte in dieser Arbeit histologisch keine Verzögerung der Abstoßungsreaktion erreicht werden, wenn auch die Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen in dieser Gruppe etwas verzögert zunimmt.**

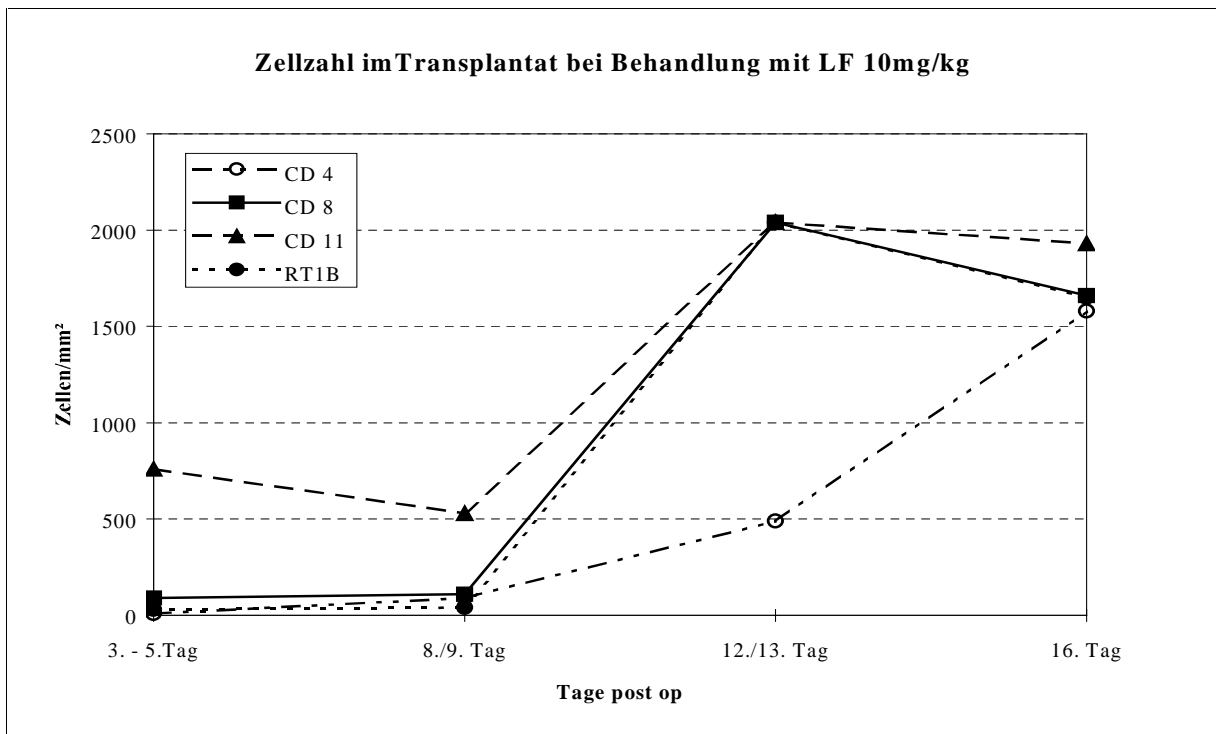
### 5. Tag post op

Im Transplantat besteht nahe den Nähten ein ausgeprägtes, im Zentrum jedoch nur ein leichtes Ödem und spärliches Infiltrat. Nur die CD11<sup>+</sup> Zellen sind relativ stark vertreten (CD4:CD8:CD11 = 1 : 9 : 76). RT1B wird auf einzelnen der Zellen exprimiert (s. Grafik 5).

Die Empfängerhornhaut ist bereits von einem starken Ödem erfaßt und auch stärker infiltriert als das Transplantat. Auch RT1B wird von mehr Zellen exprimiert.



Grafik 4: bei den mit CyA behandelten Tieren steigt die Zellzahl aller untersuchten Populationen bereits am 12./13. Tag stark an, so daß eine Verzögerung der Abstoßung gegenüber den unbehandelten Tieren nicht nachzuweisen ist.



Grafik 5: Auch bei den mit LF behandelten Tieren steigt die Zellzahl in den meisten Zellpopulationen bereits zum 12./13. Tag post op. auf maximale Werte an. Obwohl der Anstieg der CD4<sup>+</sup> Zellen verzögert erfolgt, ergibt sich lichtmikroskopisch bereits das Bild der Transplantatabstoßung, so daß auch hier keine Verzögerung der Abstoßung gezeigt werden kann.

### 8. Tag post op

Das Transplantat ist jetzt von einem sehr starken Ödem erfaßt, allerdings nur geringfügig stärker infiltriert. Das Verhältnis zwischen den infiltrierenden Zellpopulationen hat sich zugunsten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen verschoben (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,2 : 5,8). Die RT1B-Expression hat nicht wesentlich zugenommen, findet sich jetzt aber auch auf einigen Spenderkeratozyten (s. Grafik 5). Das Spenderendothel ist bereits lückenhaft und mäßig ausgeprägt sind Zellen angelagert.

Auch in der Empfängerhornhaut hat das Ödem noch zugenommen. Die Infiltrationsdichte ist aber etwa gleichgeblieben. Die RT1B-Expression hat sich auf einige Empfängerkeratozyten und z.T. auf das intakte Empfängerendothel ausgedehnt.

### 12. Tag post op

Auch in dieser Gruppe hat bereits zum 12. Tag post op die Entzündung sehr stark zugenommen. Das stark verdickte Transplantat ist dicht infiltriert. Nur die Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen ist in dieser Gruppe zu diesem Zeitpunkt erst leicht angestiegen (CD4:CD8:CD11 = 1 : 4,2 : 4,2). Die RT1B-Expression hat ebenfalls sehr stark zugenommen (s. Grafik 5). Das z.T. noch intakte Spenderendothel exprimiert RT1B nicht durchgängig. Das Spenderepithel ist deutlich von überwiegend CD8<sup>+</sup> Zellen infiltriert und stellenweise abgelöst.

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem deutlich zurückgegangen. Die Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen ist etwa gleichgeblieben, jedoch haben die Zahl der CD11<sup>+</sup> Zellen und die RT1B-Expression deutlich zugenommen. Das Empfängerendothel ist weitgehend intakt, das Epithel ist leicht infiltriert. RT1B wird auf infiltrierenden Zellen, Empfängerkeratozyten und z.T. auf dem Endothel exprimiert.

Es bietet sich histologisch wie bei den CyA-behandelten Tieren bereits jetzt das Bild der Transplantatabstoßung.

### 16. Tag post op

Das immernoch stark verdickte Transplantat ist, ähnlich wie am 12. Tag post op, angefüllt mit inflammatorischen Zellen. Jetzt ist auch die Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen stark angestiegen (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,1 : 1,2; s. Grafik 5).

Im übrigen hat sich das Bild im Vergleich zum 12. Tag post op weder im Transplantat noch in der Empfängerhornhaut wesentlich verändert.

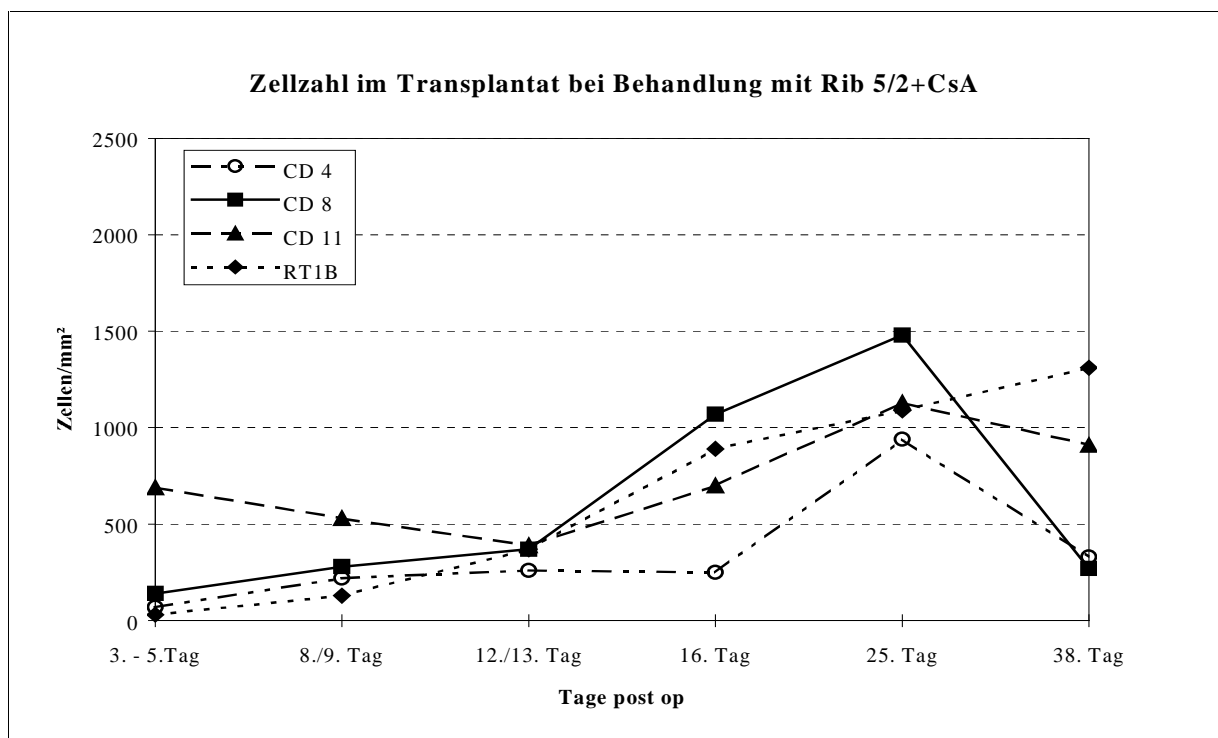
### 3.3.4 Allogene Transplantation - Behandlung mit RIB 5/2 + Cycosporin A

In der mit RIB 5/2 und CyA behandelten Gruppe bleibt die Zellzahl in allen untersuchten Zellpopulationen deutlich hinter der der anderen Gruppen zurück. Besonders deutlich ist der Unterschied am 12./13. Tag post op, an dem in den anderen Gruppen bereits maximale Zellzahlen erreicht werden. Im Mittel erreichen die Zellzahlen in dieser Gruppe nicht die Maximalwerte bei Abstoßung.

#### 5. Tag post op

Das Transplantat ist, vor allem epithelnah, von einem leichten Ödem erfaßt. Es findet sich ein leichtes Infiltrat, in dem die CD11<sup>+</sup> Zellen überwiegen (CD4:CD8:CD11 = 1 : 2 : 10). Die RT1B-Expression beschränkt sich auf einzelne infiltrierende Zellen (s. Grafik 6).

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem stark ausgeprägt. Auch das Infiltrat ist etwas dichter als im Transplantat. RT1B wird stärker exprimiert als im Transplantat.



Grafik 6: Der Anstieg der Zellzahl in der mit RIB 5/2 behandelten Gruppe erfolgt deutlich später und in wesentlich geringerem Maße als in den anderen Behandlungsgruppen. Am 12./13. Tag post op, an dem in allen anderen Gruppen die Abstoßung bereits erreicht ist, ist hier noch kaum ein Anstieg gegenüber der initialen, unspezifischen Entzündung zu bemerken. Im weiteren Verlauf bleiben die Zellzahlen dieser Gruppe insgesamt deutlich unter denen der anderen Gruppen. Ein Anstieg ist am Tag 16 (zeitlich nach Absetzen der Antikörpertherapie) zu verzeichnen.

### 8. Tag post op

Im Transplantat hat das Ödem kaum zugenommen und ist weiterhin im Randbereich deutlich stärker ausgeprägt als im Zentrum. Die Zusammensetzung des Infiltrates hat sich zugunsten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen verändert, es ist aber insgesamt kaum dichter geworden (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,3 : 2,4). Die RT1B-Expression hat kaum zugenommen (s. Grafik 6), findet sich jetzt außer auf infiltrierenden Zellen aber auch auf einzelnen Spenderkeratozyten. Das Spenderendothel ist bis auf kleine Lücken intakt, und es sind nur wenige Zellen angelagert, das Endothel exprimiert kein RT1B.

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem rückläufig. Die Infiltrationsdichte hat sich kaum verändert. Die RT1B Expression hat leicht zugenommen, RT1B findet sich jetzt auch auf relativ vielen Empfängerkeratozyten, das Endothel ist RT1B-negativ.

### 12. Tag post op

Nach wie vor ist das Ödem im Transplantat nur mäßig ausgeprägt. Auch die Dichte des Infiltrates hat kaum zugenommen. Eher ist ein leichter Rückgang der CD11<sup>+</sup> Zellen zu beobachten (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,4 : 1,5). Die RT1B-Expression dagegen steigt leicht an (s. Grafik 6). RT1B wird auf infiltrierenden Zellen und Spenderkeratozyten exprimiert. Das Spenderendothel ist intakt, es finden sich fast keine angelagerten inflammatorischen Zellen, RT1B wird nicht exprimiert. Das Epithel ist von einigen, insbesondere CD8<sup>+</sup>, Zellen infiltriert, aber sonst intakt (s. Abb. 5).

In der Empfängerhornhaut sind Ödem und Infiltrat rückläufig. Die RT1B-Expression ist praktisch unverändert, das Endothel ist nach wie vor RT1B-negativ. Auch das Empfänger-epithel ist von CD8<sup>+</sup> Zellen infiltriert.

Die Zellzahl in den anderen Behandlungsgruppen war zu diesem Zeitpunkt schon fast überall auf maximale Werte angestiegen (s. Grafik 7 u. 8, Diskussion).

### 16. Tag post op

Im Transplantat hat das Ödem leicht zugenommen. Das Infiltrat ist dichter geworden, wobei die Zahl der CD11<sup>+</sup> und besonders der CD8<sup>+</sup> Zellen angestiegen ist, nicht jedoch die der CD4<sup>+</sup> Zellen (CD4:CD8:CD11 = 1 : 4,3 : 2,8). Auch die RT1B-Expression auf infiltrierenden Zellen und Spenderkeratozyten hat merklich zugenommen (s. Grafik 6). Das Spenderendothel weist



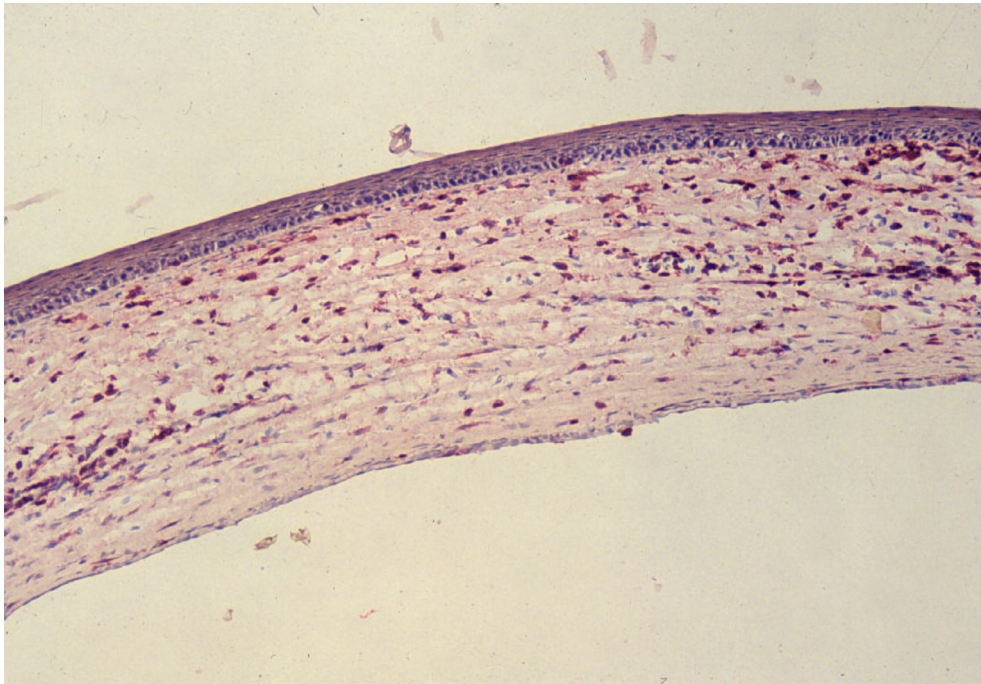


Abb. 5: Allogene Transplantation, Behandlung mit Anti-CD4-Antikörper RIB 5/2 und CyA, 12. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Im Gegensatz zu den anderen allogenen transplantierten Gruppen ist hier am 13. Tag post op das Transplantat nur leicht ödematös und wenig infiltriert, also weitgehend intakt.



Abb. 6: Allogene Transplantation, Behandlung mit RIB 5/2 und CyA, 38. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Auch am 38. Tag post op ist das Transplantat weitgehend intakt, nur wenig infiltriert und wenig ödematös.



Abb. 7: Allogene Transplantation, Behandlung mit RIB 5/2 und CyA, 25. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Nur wenig infiltrierte und geschwollene Transplantat, hier hat die Behandlung mit dem Anti-CD4-Antikörper offenbar Erfolg.

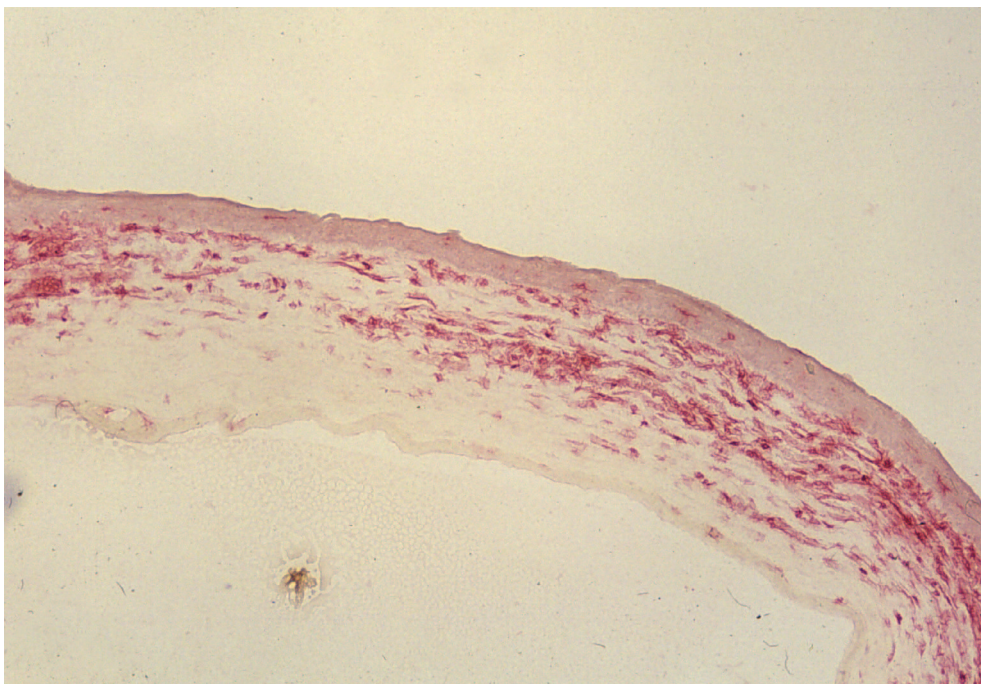


Abb. 8: Allogene Transplantation, Behandlung mit RIB 5/2 und CyA, 25. Tag post op, Färbung mit Anti-CD11-Antikörper, Vergr. 40fach. Deutlich stärker infiltrierte Transplantat, möglicherweise hier lediglich Verzögerung der Abstoßung.

kleine Lücken auf, und es finden sich einzelne dort angelagerte Zellen. Einzelne Endothelzellen exprimieren RT1B. Das Spenderepithel ist intakt und leicht infiltriert.

Auch in der Empfängerhornhaut hat das Ödem leicht zugenommen. Die Infiltrationsdichte ist weitgehend unverändert, die RT1B-Expression leicht rückläufig, und das Endothel weiterhin RT1B-negativ.

#### 25. Tag post op

Im Transplantat hat das Ödem nicht weiter zugenommen, aber das Infiltrat ist erneut dichter geworden. Insbesondere ist jetzt ein deutlicher Anstieg der Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen zu beobachten (CD4:CD8:CD11 = 1 : 1,6 : 1,2). Auch die RT1B-Expression hat weiterhin leicht zugenommen (s. Grafik 6) und findet sich außer auf infiltrierenden Zellen und Spenderkeratozyten auch auf dem z.T. recht lückenhaften Spenderendothel. Das Epithel ist leicht infiltriert und stellenweise abgelöst.

Allerdings sind gerade an diesem wie auch bereits am 16. Tag post op die Ergebnisse der Transplantation interindividuell unterschiedlich (s. Abb. 7 u. 8). Einige Transplantate sind fast nicht ödematös und nur noch leicht infiltriert, andere dagegen stark geschwollen und deutlich infiltriert.

In der Empfängerhornhaut ist das Ödem rückläufig und z.T. nicht mehr vorhanden, Infiltrationsdichte und RT1B-Expression sind unverändert gering, das Empfängerendothel exprimiert weiterhin kein RT1B.

#### 38. Tag post op

Das Ödem im Transplantat ist stark zurückgegangen. Auch das Infiltrat ist rückläufig. Die Zahl der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> Zellen ist stark abgefallen, die Zahl der CD11<sup>+</sup> Zellen leicht zurückgegangen (CD4:CD8:CD11 = 1 : 0,8 : 2,8). Die RT1B-Expression ist allerdings weiter angestiegen (s. Grafik 6) und findet sich auf infiltrierenden Zellen, Spenderkeratozyten und Spenderendothel. Dieses ist bis auf kleinere Lücken intakt (s. Abb. 6).

In der Empfängerhornhaut finden sich im Vergleich zum 25. Tag post op keine wesentlichen Veränderungen.