

Aus der Franz Volhard Klinik und dem Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung der Alloantigen-
unabhängigen Faktoren in der
Frühphase nach tierexperimenteller
Nierentransplantation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von
Uwe Hoff
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Professor Dr. med. Duska Dragun
 2. Professor Dr. med. Karl F. Hilgers
 3. PD Dr. rer. nat. Dominik Müller

Datum der Promotion: 18.04.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Ischämie-/Reperfusionsschaden und immunologische Antwort nach Nierentransplantation	6
1.1.1	Pathophysiologie des Ischämie-/Reperfusionsschaden	7
1.1.2	Folgereaktionen nach Ischämie-/Reperfusionsschaden in der experimentellen und klinischen allogenen Nierentransplantation	8
1.2	Mechanismen der Leukozytenadhäsion nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden	10
1.2.1	Die Adhäsionskaskade	11
1.2.2	Annäherung („Tethering“) und „Rollen“ („Rolling“)	12
1.2.3	Aktivierung („Triggering“) und feste Bindung („Arrest“) der Leukozyten an das Endothel	13
1.2.4	Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand	15
1.3	Bedeutung von Tissue Factor (TF) nach Ischämie-/ Reperfusion und Transplantation	15
1.4	T-Zell-vermittelte spezifische Abstoßungsmechanismen	16
1.5	Einflußfaktoren auf die chronische Abstoßungsreaktion	18
1.5.1	Delayed Graft Function	18
1.5.2	Chronische Allograft Nephropathie	18
2	HYPOTHESE	21
3	METHODEN	23
3.1	Tiermodell	23
3.1.1	Transplantationsmodell	23
3.1.2	Gruppeneinteilung	25
3.1.3	Bestimmung der Nierenfunktion	26
3.1.4	Organentnahme	26
3.2	Immunhistologie	26
3.2.1	Semiquantitative Analyse der immunhistologischen Präparate	28
3.3	Histologie	29
3.4	Statistische Methoden	29

4	MATERIAL	30
4.1	Antikörper	30
4.2	Puffer und Lösungen	30
4.3	Chemikalien, Reagenzien	32
4.4	Geräte und Instrumente	33
5	ERGEBNISSE	35
5.1	Organfunktion	35
5.1.1	Nierenfunktionswerte im Serum bei konstanter kalter Ischämiezeit von 4 Stunden in isogen und allogenen transplantierten Tieren (Teil A)	35
5.1.2	Nierenfunktionswerte bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)	36
5.2	Immunhistochemie	37
5.2.1	Immunhistochemische Ergebnisse bei konstanter kalter Ischämiezeit in isogen und allogenen transplantierten Tieren (Teil A)	37
5.2.1.1	Nachweis von Selektinen	37
5.2.1.2	Nachweis der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1	40
5.2.1.3	Nachweis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie der Integrine VLA-4 und LFA-1	42
5.2.1.4	Nachweis von ED-1- und ED-2-positiven Zellen in allogenen transplantierten Tieren 10 Tage nach Transplantation ohne versus 1,5 mg/kg bzw. 5 mg/kg immunsuppressiver Behandlung mit Cyclosporin-A (CsA)	47
5.2.2	Immunhistochemische Ergebnisse bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)	48
5.2.2.1	Nachweis der Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und VCAM-1	48
5.2.2.2	Nachweis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie der Integrine LFA-1 und VLA-4	51
5.2.2.3	Nachweis von MHC-II-positiven Zellen, dendritischen Zellen (OX-62) und ED-2-positiven Zellen	54
5.2.2.4	Nachweis von Tissue Factor (TF)	56
5.3	Pathohistologische Analyse	57
5.3.1	Morphologische Veränderungen bei konstanter kalter Ischämiezeit in isogen und allogenen transplantierten Tieren innerhalb der ersten 10 Tage nach Transplantation (Teil A)	58
5.3.2	Morphologische Veränderungen bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)	59

6	DISKUSSION	61
6.1	Bedeutung von Allogenität und Ischämie-/Reperfusionsschaden für die entzündlichen Vorgänge in der Frühphase nach der Transplantation	61
6.1.1	Spezifische Mechanismen und Kinetik der Adhäsionskaskade nach IR und Transplantation	61
6.1.2	Mögliche Einflüsse der vorherrschenden Entzündungszellen auf morphologische und funktionelle Veränderungen des Transplantats	65
6.2	Auswirkungen der Dauer der kalten Ischämiezeit auf Gewebeschädigung, Immunogenität und Adhäsions-mechanismen	66
6.3	Vaskuläre Schädigung im Kontext der „Response to injury“-Hypothese	71
6.4	Perspektiven und mögliche therapeutische Konsequenzen	74
7	ZUSAMMENFASSUNG	77
8	LITERATURVERZEICHNIS	79
9	ANHANG	94
9.1	Abkürzungsverzeichnis	94
9.2	Danksagung	96
9.3	Lebenslauf	97
9.4	Veröffentlichungen	98
9.5	Eidesstattliche Erklärung	99

1 Einleitung

1.1 Ischämie-/Reperfusionsschaden und immunologische Antwort nach Nierentransplantation

Die Abstoßung des Transplantats stellt das zentrale Problem nach einer Organtransplantation dar. Diese kann hyperakut, akut, subakut oder chronisch verlaufen. In den Anfängen der experimentellen und klinischen Organtransplantation wurden sämtliche auftretenden Rejektionsereignisse auf spezifische Immunreaktionen, die entweder zellulär oder über Antikörper abliefen, zurückgeführt. Entsprechend konzentrierten sich Theorien und Studienprotokolle in erster Linie auf die Mechanismen der Transplantatabstoßung als Hauptursache für den Organverlust. Dabei bildeten den Kern des immunologischen Verständnisses der Rejektion Phänomene der spezifischen Immunabwehr wie T-T-Zell-Interaktion, T-B-Zell-Interaktion, Antigenpräsentation über den T-Zell-Rezeptor und Lymphozytenaktivierung, welche sich gegen Fremdantigene - den „major histocompatibility complex“ (MHC) - auf den Zellen des Spenderorgans richten.

Nach der Einführung potenter immunsuppressiver Medikamente wie Cyclosporin A (CsA) und Muromonab-CD3 (OKT3) zu Beginn der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts konnten die Ein-Jahres-Überlebensraten nach allogenen Nierentransplantationen von bisher 60 % auf 80 – 90 % erheblich gesteigert werden (1, 2, 3). Durch verbesserte immunsuppressive Regime in den neunziger Jahren konnte zwar das Auftreten akuter Rejektionsereignisse verringert werden (4), aber trotz dieser Fortschritte konnte das Langzeitüberleben der allogenen Spenderorgane nicht wesentlich verlängert werden. Die chronische Rejektion bildet dabei die Hauptursache für den späten Verlust der transplantierten Niere mit einer Inzidenz von 3 – 5 % per anno (5, 6).

Neben immunologischen Faktoren haben unspezifische Mechanismen eine entscheidende Bedeutung für das Transplantatüberleben. Dies konnte erstmals 1995 in einer bahnbrechenden klinischen Studie gezeigt werden. Verglichen wurden die 3-Jahres-Überlebensraten von Transplantaten bei 497 nicht verwandten, 3368 verwandten Lebendspenden und über 43000 kadaverischen Organspenden (7). Überraschenderweise zeigte sich nach Lebendspende trotz

niedrigerer HLA-Kompatibilität ein höheres Transplantatüberleben (> 80%) als nach Leichenspende (ca. 70%). Als Hauptursache für das schlechtere Abschneiden der kadaverischen Organe wurde eine Verringerung der Nephronzahl durch Schädigung der Nieren bereits vor der Implantation diskutiert. In den darauf folgenden Jahren konnte in vielen Studien der Einfluß unspezifischer Faktoren auf den Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion gezeigt werden (8, 9). Dabei spielt neben der Vorbelastung des Organs (Alter, Geschlecht, Diskrepanz zwischen Spender- und Empfängergröße, Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertension und Hyperlipidämie, Infektionen, Hirntod bzw. Trauma bei kadaverischen Spendern und Medikamententoxizität) vor allem auch die Schädigung des Organs durch Ischämie und Reperfusion während des Transports zum Empfänger und der anschließenden Implantation eine wichtige Rolle (10, 11, 12).

1.1.1 Pathophysiologie des Ischämie-/Reperfusionsschaden

Jedes vaskularisierte solide Organtransplantat ist per definitionem ein mehr oder weniger ischämisch geschädigtes und reperfundiertes Organ. Die Gesamtischämiezeit für das Transplantat ergibt sich aus der Summe der initialen warmen Ischämie, der anschließenden kalten Ischämie während der Perfusion des Organs mit Aufbewahrungslösung und des Transports und schließlich der für Revaskularisierung und Reperfusion benötigten Zeit.

Die Veränderungen im Gewebe durch Ischämie sind weitgehend bekannt. Unter Hypoxie kommt es zum Verbrauch der energiereichen Adenosintriphosphate (ATP). Es folgen der Zusammenbruch des aktiven transmembranösen Ionentransports und der Einstrom von Ionen und Wasser in die Zellen. Verlagerung von Wasser aus dem intravasalen Kompartiment nach intrazellulär führt zu Hämokonzentration, erhöhter Blutviskosität und Zellschwellung. Erhöhte Durchlässigkeit des kapillären Endothels („capillary leakage“) bedingt den Ausstrom von Makromolekülen und Plasma ins umliegende Gewebe verbunden mit interstitiellem Ödem und Gewebedruckerhöhung. Azidose führt zu schlechterer Viskoelastizität insbesondere der Leukozyten. Die Schwellung der Endothelzellen führt zusätzlich zu Lumeneinengung und damit kapillärer Obstruktion. Der Schweregrad der resultierenden Reperfusionstörung, das sogenannte „no reflow“-Phänomen, ist abhängig von der Dauer der vorausgegangenen Ischämie

(13). Bei der anschließenden Reperfusion des Gewebes kommt es zur Verstärkung der Schädigung, weil der wieder einströmende molekulare Sauerstoff insbesondere in Endothelzellen zur Bildung freier Radikale führt, welche Leukozyten aktivieren. Bereits 30 Minuten nach Ischämie/Reperfusion (IR) ist die Adhärenz der Leukozyten deutlich erhöht (13). Aktivierte Leukozyten und geschädigtes Endothel bilden wiederum freie Radikale, so dass ein Circulus vitiosus entsteht (siehe **Abbildung 1**).

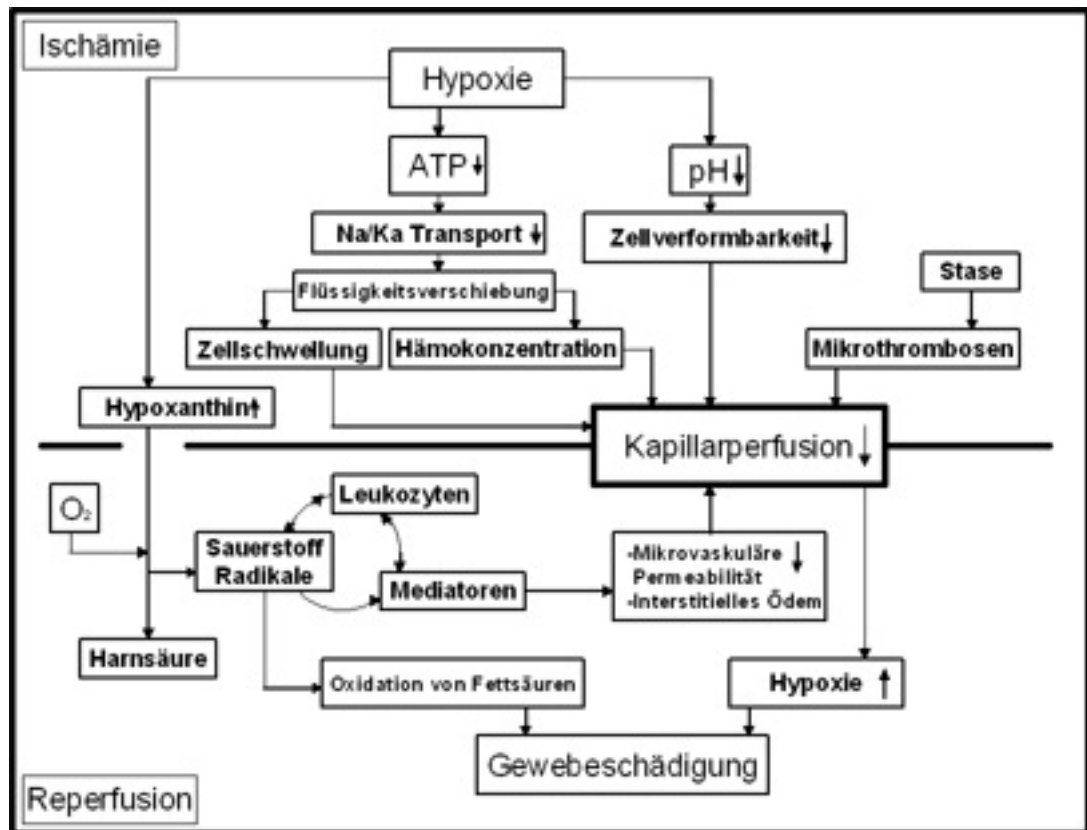


Abb. 1: Pathophysiologische Vorgänge bei der Entstehung des mikrovaskulären Ischämie-/Reperfusionsschaden. Modifiziert übernommen aus Menger MD, Vollmar B, Glasz J et al.: Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia/ reperfusion injury. Prog Appl Microc 1993, 19: 106. Karger, Basel. Switzerland.

1.1.2 Folgereaktionen nach Ischämie-/Reperfusionsschaden in der experimentellen und klinischen allogenen Nierentransplantation

Die wichtigsten Reaktionen auf den initialen Schaden durch Ischämie und Reperfusion sind die Bildung freier Radikale, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die Aktivierung der Leukozytenadhäsion.

Zahlreiche experimentelle Studien haben gezeigt, dass an der postischämischen

Schädigung nach allogener Nierentransplantation freie Radikale beteiligt sind (14, 15). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften (wie z. B. Superoxiddismutase oder Allopurinol) die Schädigung durch IR minimieren konnten (15). In klinischen Studien gestaltet sich allerdings der Nachweis der kurzlebigen freien Radikale schwierig. Erhöhte Aktivität freier Radikale konnte jedoch über den Metaboliten Malondialdehyd (MDA), der bei der Fettsäureoxidation durch Radikale entsteht, nach allogener Nierentransplantation nachgewiesen werden (16).

Proinflammatorische Zytokine, die von aktivierten Endothelzellen und Leukozyten freigesetzt werden, spielen eine bedeutende Rolle im Circulus vitiosus nach IR und beim Ablauf schädigender Interaktionen des immunologischen Netzwerks. Die wichtigsten sind Tumornekrosefaktor α (TNF- α), verschiedene Interleukine sowie Interferon γ . TNF- α wird in erster Linie von aktivierten Makrophagen/Monozyten, aber auch von T-Zellen sezerniert und stimuliert autokrin und parakrin Leukozyten und Endothel. Dadurch werden weitere Zytokine - vor allem Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) - ausgeschüttet und MHC- und Adhäsionsmoleküle hochreguliert (17, 18). Interferon γ (IFN- γ) steigert ebenfalls die MHC-Expression nach Schädigung durch IR (18). In einem IR-Modell bei syngen transplantierten Ratten konnten erhöhte Werte für TNF- α und IL-1 bereits 15 Minuten nach Reperfusion festgestellt werden. Ebenfalls erhöht waren IL-6 und IL-10 (19).

Eine zentrale Bedeutung sowohl für die Gewebeschädigung unmittelbar nach IR wie auch für die alloantigenabhängige Immunantwort nach Transplantation besitzen die Adhäsionsmoleküle. Dabei handelt es sich um transmembranäre Proteine an der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen, die sich in die drei Gruppen der Selektine, der Immunglobulinsuperfamilie und der Integrine gliedern. Entsprechend einer in mehreren Schritten ablaufenden Kaskade, auf die im folgenden Kapitel noch näher eingegangen wird, vermitteln sie Kontakt, Bindung und Transmigration zwischen Leukozyten und Endothel. Viele experimentelle und klinische Studien der vergangenen Jahre haben die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle nach IR unterstrichen (20, 21, 22). Durch Selektinblockade mittels des Moleküls TBC-1269 konnten im Tiermodell protektive Effekte vor der Schädigung durch IR erzielt werden (23). Ebenfalls zu einer

Milderung der Schäden nach Transplantation führte der Einsatz von Antikörpern gegen Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) in Tierstudien an Primaten (24). Sehr gute Ergebnisse in Bezug auf strukturelle Schädigung, Nierenfunktion und Langzeitüberleben nach IR konnten im syngenem Transplantationsmodell bei Ratten mit Antisense-Oligonukleotiden gegen ICAM-1 erzielt werden, welche die Expression auf mRNA-Ebene blockieren (25, 26). Neben tierexperimentellen Erkenntnissen zeigte sich auch in Untersuchungen an humanen Biopsien eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle nach Transplantation und IR in der Niere. Beim Vergleich von Biopsien aus Transplantatnieren verwandter Lebendspender mit kadaverischen Spendern vor und nach Reperfusion des Organs, konnte ein Anstieg der Adhäsionsparameter und der Zellinfiltration in Abhängigkeit von der Dauer der kalten Ischämiezeit festgestellt werden (27). In einer weiteren Biopsiestudie fanden sich in Organen nach langen kalten Ischämiezeiten vermehrt neutrophile Granulozyten, was ebenfalls auf eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle hindeutet (28). Therapeutische Intervention mit monoklonalen Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle zeigte sich in klinischen Studien allerdings nur teilweise erfolgreich. Bei einer komparativen Multizenterstudie konnte durch Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) bei Nierentransplantierten eine signifikante Reduktion akuter Rejektionsereignisse sowie ein leicht protektiver Effekt vor verzögert einsetzender Transplantatfunktion erzielt werden (29). Entgegen erfolgreichen tierexperimentellen Studien konnte in einer Placebo-kontrollierten klinischen Multizenterstudie nach Gabe von anti-ICAM-1 kein geringeres Auftreten akuter Rejektionen und verzögerter Organfunktion in den ersten drei Monaten nach Transplantation ermittelt werden (30).

1.2 Mechanismen der Leukozytenadhäsion nach Ischämie-/Reperfusionsschaden

Die Gewebeschädigung nach IR in der Niere führt zu Aktivierung der Endothelzellen, die daraufhin Kontakt zu den im Blut zirkulierenden Leukozyten aufnehmen. Die Mechanismen der Zell-Zell-Interaktion zwischen Endothel, Leukozyten und dem darunter liegenden Gewebe gehören zu den am intensivsten untersuchten Vorgängen innerhalb des Immunsystems (18, 22, 31, 32).

1.2.1 Die Adhäsionskaskade

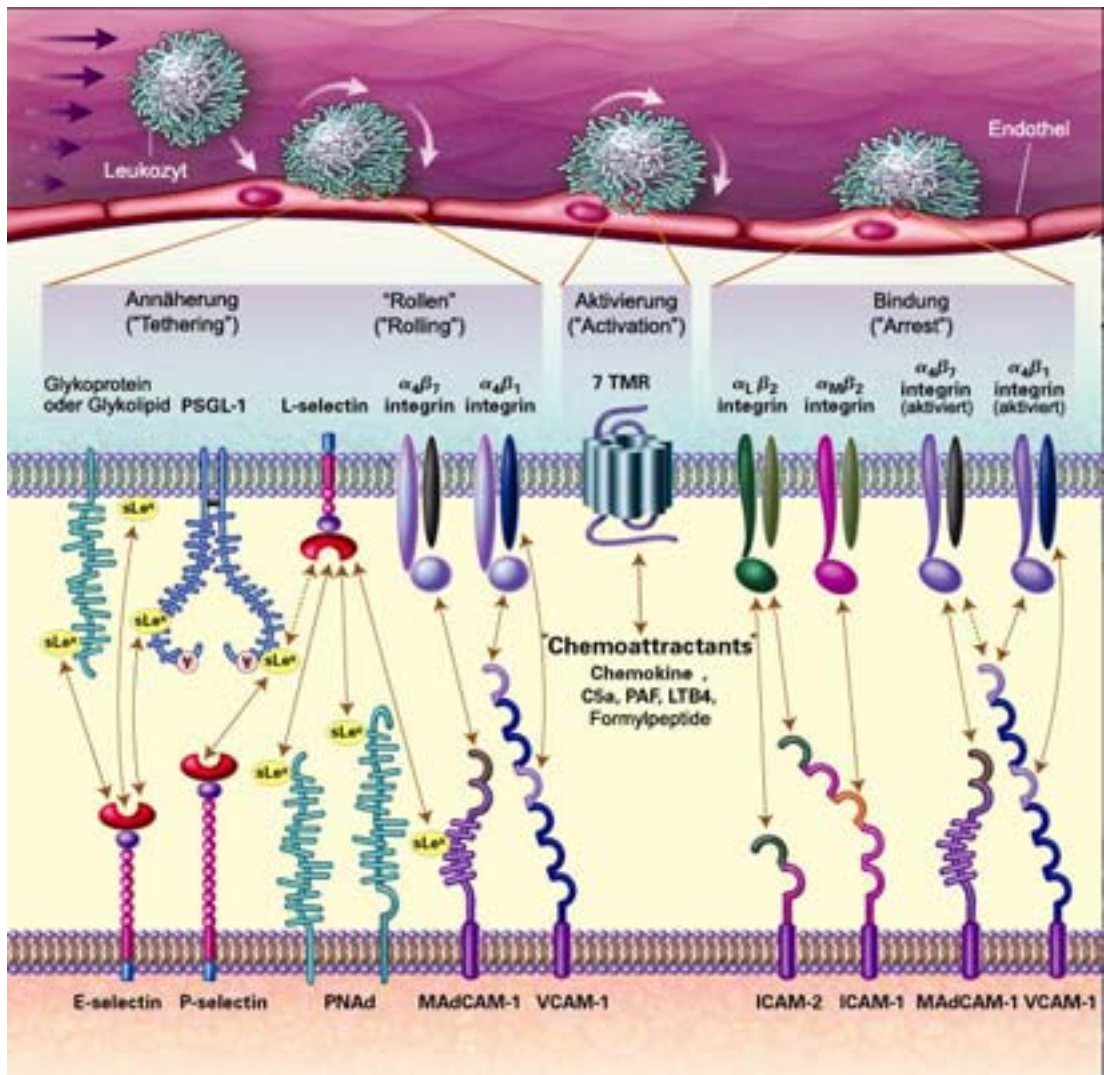


Abb. 2: Wichtige Adhäsionsmoleküle und „Chemoattractants“ beim Ablauf der Adhäsionskaskade. Modifiziert übernommen aus Andrian UH, Mackay CR: T-Cell Function and Migration. N Engl J Med 2000; 343: 1020-34.

Der biologische Hintergrund für die Kommunikation zwischen Endothel und Leukozyten besteht in der Notwendigkeit, die zirkulierenden Abwehrzellen spezifisch und effektiv an den Ort einer Gewebeschädigung zu leiten. Dabei müssen die Endothelzellen innerhalb von Sekundenbruchteilen Informationen an die passierenden Leukozyten weiterleiten und einen Erstkontakt mit diesen herstellen. Die Migration der Leukozyten aus der Blutbahn ins Gewebe erfolgt in einer Abfolge bestimmter Schritte, bei denen Adhäsionsmoleküle aus drei großen Gruppen (Selektine, Integrine und Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie) zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Zelloberfläche zum Tragen kommen

(siehe **Abbildung 2**).

1.2.2 Annäherung („Tethering“) und „Rollen“ („Rolling“)

Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothel – das sogenannte „Tethering“ - erfolgt über die Selektine (33). Die Selektinbindung kann charakteristischerweise innerhalb kürzester Zeit aktiviert und wieder deaktiviert werden, was zum einen den Zell-Zell-Kontakt unter Strömungsbedingungen überhaupt erst ermöglicht und andererseits zum typischen Phänomen des „Rolling“ der Leukozyten auf der Gefäßoberfläche führt. Drei unterschiedliche Selektine sind an der Adhäsion der Leukozyten ans Endothel beteiligt. L-Selektin (CD62L) findet sich auf der Oberfläche aller Leukozyten, E-Selektin (CD62E) ist nur auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen vorhanden und P-Selektin (CD62P) befindet sich in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen sowie in den α -Granula der Thrombozyten. In Nierenbiopsien nach Transplantation fand sich interessanterweise ausschließlich P-Selektin thrombozytären Ursprungs (27). Allerdings ist bekannt, dass auch an der Gefäßoberfläche anhaftende Thrombozyten die Adhäsion von Leukozyten unterstützen (34). Die Liganden der Selektine sind alle mit dem fucosilierten Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X (sLeX) ausgestattet (33). Der Rezeptor P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) findet sich auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie einigen Lymphozyten und ist Ligand für P- und E-Selektin. Ein weiterer Ligand für P-Selektin, der mit den sogenannten „high endothelial venules“ der lymphatischen Gewebe, einem speziellen System postkapillärer Venolen, assoziiert wird, ist Glycosilation dependent cell adhesion molecule 1 (GlyCAM-1). Das Glykoprotein E selectin ligand 1 (ESL-1) dient dagegen in erster Linie neutrophilen Granulozyten zur Bindung an E-Selektin (35). An Doppel-Knockout-Mäusen für P- und E-Selektin konnte einerseits die Bedeutung der Selektine für die Leukozytenadhäsion gezeigt werden und andererseits auch eine Redundanz zwischen beiden Rezeptoren, da in Knockouts für nur eines der beiden Selektine keine signifikante Reduktion der Migration von neutrophilen Granulozyten erreicht wurde (36).

1.2.3 Aktivierung („Triggering“) und feste Bindung („Arrest“) der Leukozyten an das Endothel

Nach der initialen durch Selektine vermittelten Interaktion mit dem Endothel werden die Leukozyten durch „Chemoattractants“, die im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzt werden (Chemokine, Komplementfaktoren, IL-6, IL-8, Platelet activating factor (PAF), freie Radikale u. a.), aktiviert („Triggering“). Hierbei spielen die Integrine an der Zelloberfläche der Leukozyten eine wichtige Rolle. Integrine gehören zur Familie der heterodimeren Membranproteine und sind auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Sie bestehen immer aus einer α - und einer β -Kette. Durch ihre Interaktion mit Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) kommt ihnen eine zentrale Bedeutung bei der Ausbildung einer festen Bindung der Leukozyten ans Endothel („Arrest“), bei der Migration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem und bei der Adhäsion an Zellen der extrazellulären Matrix zu (37). Durch das „Triggering“ ändern die Integrine ihre Konformation und erhöhen so ihre Bindungsaffinität für die divalent kationische Bindung an die IgSF-Rezeptoren der Endothelzellen. Es kommt zur festen Bindung der Leukozyten an das Endothel. Die für die Leukozytenadhäsion und Migration ins Gewebe wichtigen Integrine gehören im Wesentlichen zu den Gruppen der β 1- und der β 2-Integrine (38, 39). Die Gruppe der β 1-Integrine beinhaltet Very late antigen 1 bis 6 (VLA-1 bis -6). Unter Ihnen ist insbesondere VLA-4 (α 4 β 1) einerseits beim „Arrest“ der Leukozyten, andererseits aber auch schon beim „Rolling“ involviert (40). Außerdem ist VLA-4 Ligand für Strukturen der extrazellulären Matrix wie z.B. Fibronectin und unterstützt somit auch den Austritt der Abwehrzellen ins Gewebe (41). Zu den für den „Arrest“ und die Migration wichtigen β 2-Integrinen gehören Leukocyte function-associated molecule 1 (LFA-1, CD11a/CD18, α L β 2) und Membrane attach complex 1 (Mac-1, CD11b/CD18, α M β 2). LFA-1 findet sich auf nahezu allen Leukozyten (42), während Mac-1 hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird (43). Die entsprechenden Bindungspartner der Leukozytenintegrine bilden Rezeptoren der sogenannten Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) auf Endothelzellen und im Gewebe. Diese Adhäsionsmoleküle weisen eine ähnliche Struktur wie die Immunglobuline auf. Sie sind aus 90 bis 100 Aminosäuren aufgebaut, die in zwei Lagen antiparalleler β -Stränge angeordnet sind, welche durch Disulfidbrücken

stabilisiert werden (44). Die wichtigsten Vertreter der IgSF-Rezeptoren in Bezug auf die Adhäsionskaskade sind Intercellular cell adhesion molecule 1 bis 3 (ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Ähnlich aufgebaut wie Immunglobuline sind außerdem der T-Zell-Rezeptor (TCR), die T-Zell-spezifischen Membranproteine CD4 und CD8 sowie der major histocompatibility complex (MHC-I und MHC-II).

ICAM-1 ist ein 90-110 kDa großes transmembranäres Membranprotein. Im Rahmen der Leukozytenadhäsion bildet es den Liganden auf der Endotheloberfläche für die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1; außerdem kann es Fibrinogen binden und so die Adhäsion der Abwehrzellen begünstigen (43, 45). Außer vom Endothel wird ICAM-1 auch von zahlreichen anderen Zelltypen wie zum Beispiel Epithelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert (46). Bereits in ungeschädigtem Gewebe humaner Nieren findet sich eine deutliche Expression vor allem auf dem Endothel und in geringerem Maß auch auf der luminalen Seite der Tubuluszellen und auf Interstitialzellen; bei Ratten wird ICAM-1 zusätzlich noch in den Glomeruli exprimiert (Kapillaren, Podozyten, Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel) (47). Durch entzündliche Stimuli, beispielsweise bei der Gewebeschädigung nach IR, wird ICAM-1 auf Endothelzellen – aber auch auf Monozyten, dendritischen Zellen und Fibroblasten - vermehrt exprimiert (46). ICAM-2 ist ein 55 kDa großes Membranprotein, das ähnlich wie ICAM-1 von Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert wird aber durch inflammatorische Zytokine nicht hochreguliert wird (48). Auch für diesen Rezeptor sind die Liganden LFA-1 und Mac-1. In vitro konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 und ICAM-2 teilweise redundant wirken und nur durch Blockade beider Rezeptoren die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten signifikant gesenkt wurde (49). ICAM-3 hat eine Größe von 124 kDa und hat nur LFA-1 als Liganden; es wird anders als die beiden anderen ICAM-Moleküle nur von Leukozyten exprimiert - vornehmlich wenn diese bereits am Endothel adhären sind (50).

VCAM-1 ist ein 110 kDa großes Glykoprotein, dessen korrespondierende Liganden die α 4-Integrine VLA-4 (α 4 β 1) und α 4 β 7 sind. Im Gegensatz zu ICAM-1 wird VCAM-1 in der gesunden Niere kaum exprimiert (vereinzelt an der

basolateralen Seite von Tubuluszellen und auf Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel). Unter dem Einfluß von Zytokinen wird es jedoch insbesondere von Endothelzellen vermehrt exprimiert (51). In erster Linie T-Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen benutzen VCAM-1/VLA-4-Interaktion sowohl für die feste Bindung ans Endothel (52), aber auch schon während des „Rolling“ alternativ bzw. additiv zu den Selektinen (53).

1.2.4 Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand

Auch für die Migration der adhärennten Leukozyten durch die Endothelbarriere spielen Integrine und IgsF-Rezeptoren eine wichtige Rolle (32). In vitro konnte gezeigt werden, dass wiederum die oben beschriebenen Ligandenpaare ICAM-1/LFA-1 und VCAM-1/VLA-4 für den Durchtritt von Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten wichtig sind (54, 55, 56). Neben diesen ist vor allem PECAM-1 – ein weiteres 130 kDa großes Mitglied der Ig-Superfamilie - von Bedeutung. Unter anderem ist PECAM-1 an der Zell-Zell-Verbindung der Endothelzellen beteiligt und wird deshalb bereits von allen gesunden Gefäßen stark exprimiert. Außerdem findet es sich an der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten. Bei der Transmigration interagiert vermutlich PECAM-1 auf Leukozyten mit endothelialelem PECAM-1. In vitro und im Tiermodell mit intravitale Mikroskopietechnik konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen PECAM-1 dessen wichtiger Einfluss für die Transmigration von Leukozyten gezeigt werden (57, 58).

1.3 Bedeutung von Tissue Factor (TF) nach Ischämie-/Reperfusion und Transplantation

Neben der gesteigerten Leukozytenadhäsion hat auch eine erhöhte Gerinnungsaktivität wichtigen Einfluss auf die Pathogenese des IR-Schadens und das Auftreten akuter und chronischer Rejektion nach Nierentransplantation (59). Eine wichtige zentrale Aufgabe übernimmt dabei das transmembranäre, 47 kDa große Protein Tissue Factor (TF) (60). In gesundem Nierengewebe wird TF von Fibroblasten und Zellen der Adventitia von Blutgefäßen exprimiert, aber nicht von Endothel oder zirkulierenden Blutzellen (61). Nach entzündlicher Stimulation, z. B. durch Endothelschädigung, TNF- α oder IL-1, kommt es jedoch zur Induktion von

TF auf Endothelzellen, Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen (62). Über Komplexbildung mit dem Gerinnungsfaktor VII / Faktor VIIa löst TF den extrinsischen Weg der Blutgerinnungskaskade aus. So kommt es zur schnellen Aktivierung der Koagulation, wenn die Integrität der Intima zerstört ist oder stimulierte Endothelzellen TF exprimieren (63).

In vitro konnte gezeigt werden, dass TF auch in die Adhäsion und Transmigration von Monozyten an Endothel involviert ist (64). Die Bindung von Monozyten an Endothelzellen über VLA-4 kann dabei eine direkte Induktion von TF an der Oberfläche der Monozyten bewirken (65). Tierexperimentelle Studien konnten die Bedeutung von TF nach IR in Ratten nachweisen (66, 67). Untersuchungen an Biopsien aus normalen Nieren und nach Transplantation konnten ebenfalls einen Einfluss von TF aufzeigen (68).

1.4 T-Zell-vermittelte spezifische Abstoßungsmechanismen

Wie bedeutend spezifische alloreaktive Abstoßungsvorgänge sind, zeigen klinische Daten zum Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom HLA-Matching („human leukocyte antigen“). Dabei steigt die Rate an Organversagen mit abnehmender HLA-Kompatibilität sowohl bei kadaverischer wie auch bei lebendverwandter Organspende (6). Untersuchungen an Gen-Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass CD4⁺-T-Helferzellen bei Auslösung und Ablauf der spezifischen Abstoßungsreaktion eine zentrale Stellung einnehmen (69).

Entscheidend für die Auslösung der alloreaktiven Rejektion ist die Erkennung allogener Fremdantigene – MHC-Oberflächenmoleküle der Klasse I und II - auf Zellen des Transplantats. Bisher sind im Wesentlichen zwei unterschiedliche Wege der Alloantigen-Erkennung bekannt: der „direkte“ und der „indirekte Weg“ der Antigenpräsentation (70). Bei beiden Formen der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen haben die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie z. B. dendritische Zellen oder aktivierte Makrophagen eine wichtige Funktion (71). Beim „direkten Weg“ migrieren APCs des Spenders, die vor der Organentnahme in das Transplantat eingewandert waren, unmittelbar nach der Reperfusion in Milz und benachbarte Lymphknoten, wo sie über den fremden MHC-II-Komplex CD4⁺-T-Lymphozyten des Empfängers direkt stimulieren. Beim „indirekten Weg“ wandern zunächst APCs des Empfängers in das Transplantat ein (72). Dort phagozytieren

sie fremdes Antigen im beispielsweise durch IR geschädigten, entzündlich stimulierten Transplantat. Anschließend rezirkulieren diese Zellen in benachbarte Lymphknotenstationen und die Milz, wo sie prozessierte Anteile fremder MHC-Moleküle an der Zelloberfläche zusammen mit eigenem MHC-II und kostimulatorischen Signalen wie dem B7-Molekül den CD4+-T-Zellen präsentieren. Dabei erkennen die CD4+-T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TcR) den MHC-II-Antigen-Komplex und über CD28 interagieren sie mit B7 auf APCs (73). Aktivierte CD4+-T-Zellen wandern in das Transplantat ein und sind in der Lage, die Rejektion über Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8+, CTL) und Makrophagen bzw. Stimulation von B-Lymphozyten zur Produktion alloreaktiver Antikörper gegen HLA-Antigene der Klassen I und II voranzutreiben (74, 75).

Wann direkte bzw. indirekte Mechanismen der Antigenpräsentation in den Phasen der akuten und chronischen allogenen Abstoßung vorherrschen ist noch nicht ausreichend geklärt. Vermutlich herrscht in der frühen Phase nach der Transplantation der direkte Weg vor, weil zu diesem Zeitpunkt noch ausreichend APCs des Spenders im Transplantat vorhanden sind, die eine hohe Dichte an MHC-Molekülen an der Zelloberfläche exprimieren und mit den nötigen kostimulatorischen Signalen zur T-Zell-Aktivierung ausgestattet sind. Im weiteren Verlauf nimmt die Zahl der vom Spender stammenden APCs ab, so dass im Rahmen der chronischen Abstoßung zunehmend indirekte Mechanismen der T-Zellaktivierung in den Vordergrund treten (70). Unterstützt wird diese Theorie durch Untersuchungen an Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit chronischer Rejektion nach Nierentransplantation und mindestens einem HLA-Mismatch für einen der drei DR-Loci (76). 82% der T-Zellen dieser Patienten proliferierten spezifisch bei Kokultivierung mit den nicht übereinstimmenden HLA-DR-Peptiden im Vergleich zu 6 % bei Kontrollpatienten. Diese Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass T-Zellen bei Patienten mit chronischer Abstoßung durch Alloantigenpräsentation aktiviert wurden und spezifisch auf die MHC-Moleküle des Spenders reagieren.

1.5 Einflußfaktoren auf die chronische Abstoßungsreaktion

Die akute Abstoßung des Nierentransplantats ist dank immunologischer Vordiagnostik und potenter immunsuppressiver Regime heutzutage beherrschbar. Die chronische Rejektion ist hingegen medikamentös kaum beeinflussbar. Dabei wirken sich Prozesse vor und in den ersten Wochen nach der Transplantation auf den Verlauf der chronischen Abstoßung aus.

1.5.1 Delayed Graft Function

Eine häufige Komplikation in den ersten Tagen postoperativ ist das Auftreten von verzögerter Transplantatfunktion (= „delayed graft function“, DGF) (9, 77, 78). DGF ist definiert über einen verzögerten Abfall des Serumkreatinins bis hin zur Oligurie/Anurie und der Notwendigkeit von Dialysemaßnahmen bis zu 10 Tage nach der Transplantation. Die Inzidenz liegt bei etwa 20-30 % (77). Zu den Hauptursachen für das Auftreten einer DGF zählen die Schädigung durch Ischämie/Reperfusion und der Hirntod des Spenders. In der Mehrzahl der Fälle zeigt sich histologisch das Bild der akuten Tubulusnekrose (ATN) (78). DGF wird mit einer erhöhten Inzidenz akuter Rejektionsereignisse assoziiert. Das kombinierte Auftreten von DGF und akuter Rejektion impliziert deutlich schlechtere Überlebensraten des Transplantats (9, 77).

1.5.2 Chronische Allograft Nephropathie

Das histologische und klinische Bild der chronischen Rejektion zeigt deutliche Ähnlichkeiten mit den physiologischen Alterungsprozessen in der Niere. Dabei stehen die fortschreitende tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose sowie die Verdickung und Fibrosierung der Intima in den Arterien entsprechend den Kriterien der Banff-Klassifikation (Banff, Kanada, August 1991) im Vordergrund (79) (siehe auch <http://tpis.upmc.edu/tpis/schema/index.html>). Weil der Begriff „Rejektion“ diesen Vorgängen nur unzureichend gerecht wird und die Vorgänge bei der chronischen Abstoßung eher einem beschleunigten Alterungsprozess ähneln, löst zunehmend der Begriff „chronic allograft nephropathy“ (CAN) den Terminus „chronische Rejektion“ ab (10). Wie groß der Anteil unspezifischer Schädigung im Vergleich zu spezifischer immunologischer Abstoßung bei der Progression von CAN ist, lässt sich nur schwer abschätzen. Im Tierexperiment ist es jedoch

möglich, mittels syngener und allogener Transplantationsmodelle Aussagen über den Einfluss immunologischer Faktoren zu treffen (80). In einer neueren Studie konnte beim Vergleich von syngen und allogenen transplantierten Ratten gezeigt werden, dass IR und immunologische Faktoren zu unterschiedlichen Läsionen im Transplantat führen und bei gemeinsamem Auftreten Progression und Schweregrad von CAN verstärken (81). Ebenfalls im Tiermodell konnte ein deutlicher Einfluss des Hirntods beim Spender auf die Entwicklung von CAN nach Nierentransplantation gezeigt werden (82). Unter den unspezifischen Faktoren für die Entstehung der chronischen Transplantatnephropathie ist insbesondere das Alter des Spenders von zunehmender Bedeutung. Wegen des hohen Bedarfs und der geringen Verfügbarkeit an Organen ist das Durchschnittsalter der Spender in den letzten Jahren deutlich angestiegen (83). Viele der Organe älterer Spender weisen schon zum Zeitpunkt der Organübertragung histologische Merkmale von CAN auf (84). Zahlreiche klinische Studien konnten zeigen, dass sowohl immunologische wie auch unspezifische Faktoren das Langzeitüberleben des Transplantats entscheidend beeinflussen. Dabei gelten unter den immunologischen Parametern an erster Stelle das Auftreten akuter Rejektionen, und das Vorhandensein hochreaktiver lymphozytotoxischer Antikörper (= „panel reactive antibodies“, PRA) als prognostisch ungünstig (85, 86). Außerdem beeinflusst eine schlechte HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger die Prognose negativ (87). Unter den nicht immunologischen Faktoren führen lange kalte Ischämiezeiten und hohes Spenderalter zu deutlich schlechteren Langzeitprognosen (88, 89).

Die große Bedeutung unspezifischer Faktoren für die Langzeitprognose des transplantierten Organs wird besonders an der bereits erwähnten klinischen Vergleichsstudie zwischen unverwandter Lebendspende und kadaverischer Nierenspende deutlich (7): Trotz schlechterer HLA-Kompatibilität war das Transplantatüberleben nach Lebendspende höher im Vergleich zu kadaverischer Organspende. Diese Unterschiede lassen sich nur durch Auswirkungen unspezifischer Schädigung des Organs nach kadaverischer Spende infolge längerer kalter Ischämiezeiten bzw. durch Auswirkungen des Hirntods beim Spender erklären.

Ausmaß und Wechselwirkung von Alloantigen-abhängigen und –unabhängigen Einflüssen in der akuten Phase nach der Transplantation sind bisher allerdings

noch weitgehend ungeklärt, weil Protokollbiopsien während der ersten Woche nicht standardmäßig durchgeführt werden, um das Organ und den Empfänger nicht zu gefährden. Die bislang im Tierexperiment gewonnenen Daten sind für eine genaue Einschätzung der beteiligten Faktoren während der Frühphase nach dem Eingriff nicht ausreichend.

2 Hypothese

Ziel dieser Studie war es, die Frage zu klären, ob die initiale Immunantwort in der Frühphase nach der Transplantation und die Aktivierung der Adhäsionskaskade ausschließlich auf unspezifische Organschäden wie den Ischämie-/Reperfusionsschaden zurückzuführen sind oder ob Alloantigen-abhängige Mechanismen während dieser Phase ebenfalls entscheidend beteiligt sind. Außerdem wurde untersucht, ob eine längere kalte Ischämiezeit vor der Reimplantation die akute Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung nach Reperfusion amplifiziert und die Immunogenität des transplantierten Organs erhöht.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein etabliertes tierexperimentelles Transplantationsmodell gewählt (80). Der Einfluss Alloantigen-abhängiger Faktoren auf die entstehenden Schäden wurde durch den Vergleich von syngen transplantierten Tieren (Spender und Empfänger Lewis-Ratten) mit allogenen transplantierten Tieren ohne immunsuppressive Behandlung (Spender Fischer-Ratten, Empfänger Lewis-Ratten) bestimmt. Es wurden Nierenfunktionswerte und morphologische Veränderungen zwischen den Gruppen verglichen. Außerdem wurde die Infiltrationsstärke verschiedener wichtiger inflammatorischer Zellpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) an 8 aufeinander folgenden Zeitpunkten innerhalb der ersten 10 Tage nach der Transplantation bestimmt. Daneben wurde ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Infiltrationsmaximum dieser Zellen und der Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle (L-Selektin, P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, LFA-1 und VLA-4) überprüft. Zusätzlich wurde durch niedrig dosierte (1,5 mg/kg/Tag) und normal dosierte (5 mg/kg/Tag) Gabe von Cyclosporin A (90) die Wirkung immunsuppressiver Therapie auf die Infiltration von Entzündungszellen nach 7 und 10 Tagen in weiteren Gruppen ermittelt. Der Einfluss der Dauer der kalten Ischämiezeit wurde in 6 weiteren isogenen Gruppen bestimmt, deren Organe zwischen 2 und 48 Stunden bei 4° Celsius aufbewahrt wurden. Auch bei diesen Tieren wurde neben Veränderungen der Nierenfunktion und der Morphologie das Ausmaß zellulärer Infiltration in Bezug zu wichtigen Adhäsionsmolekülen ermittelt. Um festzustellen, inwieweit lange kalte Lagerung die Immunogenität des Transplantats erhöht, wurde in diesen Gruppen zusätzlich überprüft, ob vermehrt

Antigen-präsentierende Zellen (dendritische Zellen, aktivierte Makrophagen, MHC-II-positive Zellen) in das Organ einwandern und MHC-II-Moleküle auf Strukturen des Nierenparenchyms verstärkt exprimiert werden. Schließlich wurde über den Nachweis von Tissue Factor getestet, ob längere Aufbewahrung zu erhöhter Thrombogenität und alternativen Adhäsionsmechanismen führt.

3 Methoden

3.1 Tiermodell

3.1.1 Transplantationsmodell

Es wurden ein sygenes und ein niedrig allogenes Transplantationsmodell verwendet (80). Im allogenen Modell dienten Fischerratten (F344) als Spendertiere und durch Inzucht erzeugte Lewisratten (Lew) als Empfängertiere; im sygenen Modell waren Lewisratten sowohl Spender als auch Empfänger. Insgesamt benötigten wir für die Experimente ca. 170 Lewisratten (Harlan-Winkelmann, Sulzbach / Germany) und ca. 60 Fischerratten (Harlan-Winkelmann, Sulzbach / Germany). Alle Tiere waren männlichen Geschlechts und hatten ein Gewicht zwischen 150 und 200 Gramm. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden bei einer konstanten Temperatur von 24 Grad Celsius sowie gleichbleibenden Lichtverhältnissen (Licht an 6 Uhr morgens, Licht aus 18 Uhr abends) gehalten. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörden (Erlaubnis G 0406/95) und entsprechend den Richtlinien der American Physiological Society durchgeführt.

Die Transplantation wurde nach einem modifizierten Protokoll von Tullius et al. durchgeführt. In der Nacht vor der Operation blieben die Tiere nüchtern. Die Spendertiere wurden mittels einer 4%igen Chloralhydratlösung (0,01ml/g Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurde die Bauchseite rasiert und die Haut nach Desinfektion mit Betaisodonalösung in der abdominalen Mittellinie per Längslaparatomie mit dem Skalpell inzidiert; dann wurde die Rektusscheide vorsichtig mit der Schere durchtrennt. Das Intestinum wurde in mit isotoner NaCl-Lösung eingeweichten Kompressen eingehüllt auf dem Thorax plaziert und die linke ventrolaterale Abdominalwand mit einem Haken zur Seite gehalten, um freien Zugang zu den Nierengefäßen und deren Abgang aus Aorta bzw. Vena cava inferior zu erlangen. Für die Nephrektomie wurden nun die linke Nierenarterie und die linke Nierenvene vorsichtig mit Mikropinzetten unter Zuhilfenahme von Wattetupferstäbchen freipräpariert und voneinander getrennt. Die kollateralen Gefäße, die Nebennierenarterien und die Arteriae spermaticae wurden mit 7-0 Seide doppelt legiert und mittels Mikroelektrocauter durchtrennt.

Es folgte die Mobilisation des Ureters einschließlich periurteralen Fettgewebes und Durchtrennen desselben auf halber Strecke zwischen Niere und Blase. Die Niere wurde aus dem perirenal Fettgewebe herausgelöst. Anschließend wurde der Ureter durchtrennt und dem Spendertier via Vena dorsalis penis 0,2 ml Natrium-Heparin (Liquemin) in einer Dosis von 10 U/ml injiziert. Die freipräparierten Nierengefäße wurden möglichst nahe ihres Abgangs von Aorta bzw. Vena cava durchtrennt, die Spenderniere wurde entnommen und auf Eis gelegt. Sofort im Anschluß wurde die Nierenarterie vorsichtig über die Spitze eines Venenverweilkatheters (20G1020, Ethicon) gestülpt und mit Seide 7-0 fixiert. Durch den Katheter erfolgte eine Perfusion der Niere mit insgesamt 5 ml University of Wisconsin Lösung (UW) in pulsartigen Gaben. Schließlich wurde der Katheter wieder entfernt und die Niere bis zur Implantation in UW-Lösung bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. Je nach Zugehörigkeit zur entsprechenden Gruppe dauerte die Aufbewahrung in der Lösung – entsprechend der kalten Ischämiezeit – 2, 4, 6, 12, 24 oder 48 Stunden.

Die Empfänger wurden in gleicher Weise wie die Spender narkotisiert und das Abdomen ebenso per Längslaparatomie eröffnet. Zunächst wurde wieder der Ureter mobilisiert, und nachfolgend wurden die oft paarig angelegten Arteriae testiculares mit 7-0 Prolene ligiert, um größere Blutungen zu verhindern. Arteria und Vena renalis wurden behutsam voneinander getrennt und vom umgebenden Binde- und Fettgewebe befreit. Daraufhin wurden beide Gefäße soweit wie möglich proximal zu Aorta und Vena cava mit Mikraneurysmaclips geklippt und möglichst weit distal ihres Abgangs mit der Schere durchtrennt. Anschließend erfolgte die Entnahme der linken Niere nach Durchtrennen des Ureters und der dazugehörigen Gefäße. Die entnommenen nativen Organe wurden zum späteren Vergleich konserviert, wie in einem der folgenden Abschnitte noch beschrieben wird. Nach Spülung der verbleibenden Gefäßstümpfe mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde die zuvor in UW-Lösung aufbewahrte Spenderniere in der anatomisch angestammten Lage im Empfängertier plziert. Anschließend wurden die Spendergefäße nach Umspülung mit NaCl-Lösung an die Empfängergefäße approximiert. Es erfolgte zunächst mit 10-0 Prolene eine End-zu-End-Anastomose der Nierenarterien durch zehn Einzelkopfnähte und dann der Nierenvenen mit zwei fortlaufenden Nähten. Im Durchschnitt wurden 30 bis 40 Minuten für die Anastomosierung benötigt, was der warmen Ischämiezeit des

Organs entspricht. Es folgte die Verknüpfung der Ureterenden End-zu-End durch vier bis sechs Einzelknopfnähte ebenfalls mit 10-0 Prolene. Nach Entfernung der Clips wurde das transplantierte Organ während der Reperfusionphase genau beobachtet. Auftreten von groben Störungen - beispielsweise makroskopisch sichtbare große ischämische Areale – wurden notiert, und die Tiere wurden später nicht in die Studie einbezogen. Währenddessen erfolgte die Nephrektomie der rechten Niere nach doppelter Ligatur der Nierengefäße mit 4-0 Seide und Durchtrennen des Gefäßstranges. Auch diese Organe wurden als native Kontrollen zum Vergleich konserviert. Abschließend wurde das Intestinum wieder ins Abdomen reponiert und die Bauchdecke mit 4-0 Seide durch Naht von Muskeln und Haut verschlossen.

3.1.2 Gruppeneinteilung

Um den Einfluss von Ischämiezeit, Immunreaktion bzw. Immunsuppression auf die zelluläre Infiltration und die entzündliche Gewebsreaktion zu ermitteln, wurden die Tiere in insgesamt 23 Gruppen mit je vier bis sechs Ratten unterteilt. Dabei unterschieden sich die Gruppen in Dauer der Ischämiezeit, Zeitpunkt der Organentnahme, Immunogenität des Transplantats und gegebenenfalls Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA).

Im ersten Teil der Studie (Teil A) war die kalte Ischämiezeit des Organs in allen Gruppen mit vier Stunden gleich lang. Die Organe bei den isogen transplantierten Tieren wurden an sieben Zeitpunkten nach 2, 4, 6, 12, 24, 48 Stunden bzw. nach sieben Tagen entnommen; entsprechend gab es noch sieben weitere Gruppen mit allogenen Transplantaten zu diesen Zeitpunkten der Organentnahme. Vier weitere allogene Gruppen wurden zusätzlich entweder niedrig dosiert mit 1,5 mg/kg/Tag CsA oder mit Standarddosis für Ratten von 5 mg/kg/Tag CsA durch subkutane Injektion behandelt (90); die Organentnahme bei diesen Gruppen erfolgte nach sieben bzw. zehn Tagen.

Im zweiten Teil der Studie (Teil B) wurden allen Tieren nach 24 Stunden die Nieren entnommen und nur isogene Organe übertragen. Unterschiedlich war in diesen Gruppen nur die ansteigende Dauer der kalten Ischämiezeit mit 2, 6, 12, 24 bzw. 48 Stunden.

3.1.3 Bestimmung der Nierenfunktion

Kurz vor Entnahme der Organe wurde den Tieren ca. 1ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Unmittelbar danach wurde dieses in ein heparinisiertes Eppendorfgefäß gefüllt und zur Gewinnung des Serums zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Werte für Kreatinin und Harnstoff mit automatisierten Methoden.

3.1.4 Organentnahme

Zum entsprechenden Zeitpunkt der Organentnahme wurden die Tiere erneut mit 4%igem Chloralhydrat narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens entlang der Linea Alba wurde die transplantierte Niere entnommen, von umgebendem Fett und Bindegewebe befreit und gewogen. Anschließend wurde das Organ in drei Teile geteilt. Eine Hälfte wurde in - 40 Grad Celsius kaltem Methylbutan für die Immunhistologie, ein Viertel in 4%iger gepufferter Paraformaldehydlösung für die konventionelle Histologie und ein Viertel in flüssigem Stickstoff für eventuelle weitere molekularbiologische Methoden konserviert. Die Lagerung des tiefgefrorenen Materials erfolgte bei – 80 Grad Celsius.

3.2 Immunhistologie

Das bei – 40 Grad Celsius in Methylbutan tiefgefrorene Gewebe aus den Tierversuchen wurde immunhistologisch untersucht.

Es wurde die Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase Methode (APAAP) nach Cordell (1984) angewandt, die ursprünglich Mason und Sammons (1978) entwickelt hatten. Bei diesem Verfahren werden sogenannte Brückenantikörper als sekundäre Antikörper verwendet. Dabei bindet eines der Fab-Fragmente des Brückenantikörpers an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Das andere verbindet sich mit dem Fc-Fragment eines Immunkomplexes aus monoklonalem Antikörper und alkalischer Phosphatase. Dieser lösliche Immunkomplex wird anschließend durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht.

Zunächst wurde das Gewebe in einem Kryostaten (Leica CM 3000) bei einer Gewebetemperatur von – 18 Grad Celsius in 6 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom geschnitten. Diese Schnitte wurden vom Mikrotommesser direkt auf

zimmerwarme Objektträger übertragen, die zuvor mit 2%igem 3-Aminopropyltriethoxysilane (APES) beschichtet worden waren, um eine bessere Gewebefixierung zu erreichen. Anschließend wurden die Kryoschnitte über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Daraufhin folgte die Fixation in – 20 Grad kaltem Aceton. Danach wurden die Schnitte für die weitere Lagerung erst bei – 80 Grad tiefgefroren und dann bei – 20 Grad aufbewahrt. Bei Bedarf wurden sie wieder aufgetaut und erneut für zehn Minuten mit Aceton fixiert und luftgetrocknet. Pro Organ wurden mindestens fünfzehn Schnitte pro Region aus verschiedenen Bereichen der Nieren immunhistologisch untersucht.

Die Färbungen nach der APAAP-Methode erfolgten in einer Feuchtkammer auf einer Färbekammer. Zuerst wurden die Präparate über dreißig Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert, um Bindungen von unspezifischen Proteinen an das Gewebe zu verhindern. Nach Entfernen des überschüssigen Serums wurden die Gewebeschnitte mit 100 µl der in RPMI-Verdünnungsmedium gelösten Primärantikörper eine Stunde lang bei RT inkubiert. Die optimale Antikörperkonzentration war zuvor durch zahlreiche Vorversuche ermittelt worden. In **Tabelle 1** sind die verwendeten Antikörper und ihre optimale Konzentration aufgelistet. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper folgte erst eine dreißigminütige Inkubation mit einem Kaninchen-anti-Maus IgG Brückenantikörper und im Anschluß wiederum dreißig Minuten Inkubation mit dem APAAP-Komplex bei RT. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Präparate jeweils dreimal über fünf Minuten mit TBS-Pufferlösung gespült. Für ein besseres Färbeergebnis wurde die Inkubation mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex jeweils über eine Dauer von zehn Minuten wiederholt. Abschließend wurden die Präparate zur enzymatischen Darstellung der alkalischen Phosphatase mit einer Neufuchsin-Naphtol-Substratlösung in vertikalen Küvetten (Hellendahl) auf einem Schüttler dreißig Minuten bei RT inkubiert. Nach vorsichtiger Spülung mit TBS wurden sie mit Hämalaun gegengefärbt und schließlich unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die fertig gefärbten Präparate wurden mit einem vorgewärmten Einschlußmedium (Kaiser's Glycerin Gelatine) eingedeckt. Bei jeder Färbung wurden obligatorisch sowohl Positivkontrollen (Primärantikörper gegen α -Aktin) als auch Negativkontrollen (Waschpuffer oder RPMI-Medium ohne Primärantikörper) mitgeführt, um falsch negative bzw. falsch positive Reaktionen auszuschließen.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Verdünnung	Konzentration	Hersteller
Anti-Ratte ICAM -1	1A29	1 : 1000	1 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte PECAM - 1	TLD-4E8	1 : 1000	1 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte L-Selectin	OX-85	1 : 100	10 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte LFA-1	WT.1	1 : 100	10 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte α 4-Integrin	TA-2	1 : 50	20 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte Granulozyten	His 48	1 : 100	10 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte Monozyten/ Makrophagen	ED-1	1 : 1000	1 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte aktivierte Makrophagen	ED-2	1 : 1000	1 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte dendrit. Zellen	OX-62	1 : 100	10 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte MHC Klasse II	OX-18	1 : 100	10 µg/ml	Serotec
Anti-Ratte VCAM 1	51 bis 1069	1 : 100	10 µg/ml	Pharmingen
Anti-Ratte P-Selectin	Polyklonal	1 : 100	10 µg/ml	Pharmingen
Anti-Ratte Tissue Factor (TF)		1 : 50	20 µg/ml	Dr. Dominik Müller, FVK
Anti-Ratte α -Aktin / glatte Muskulatur	asm-1	1 : 10	5 µg/ml	Boeringer M.
Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin G		1 : 50	3,2 µg/ml	DAKO
Anti-Alkalische- Phosphatase	AP7/6/7	1 : 40	2,25 µg/ml	DAKO

3.2.1 Semiquantitative Analyse der immunhistologischen Präparate

Das Ausmaß der Zellinfiltration in den unterschiedlichen Gruppen wurde für

Granulozyten, LFA-1-positive Zellen, VLA-4-positive Zellen, Monozyten/Makrophagen, aktivierte Makrophagen, dendritische Zellen und MHC-Klasse-II positive Zellen semiquantitativ analysiert. Hierzu wurden mittels eines Axioplan-2-Mikroskops (Zeiss, Jena, BRD), einer Farbvideokamera (Sony 3 CCD, Tokyo, Japan) und der Auswertungssoftware KS 300 3.0 Imaging System (Zeiss, Jena, BRD) die entsprechenden Präparate bearbeitet. In den gefärbten Gewebeschnitten aus unterschiedlichen Regionen der Organe wurden die positiv markierten Zellen in fünfzehn zufällig gewählten Gesichtsfeldern (Fläche: 75274 μm^2) ausgezählt. Anschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung für alle Ratten aus einer Gruppe gebildet.

3.3 Histologie

Die in 4%iger Paraformaldehydlösung konservierten Organe wurden schrittweise dehydriert. Hierfür wurden sie nacheinander jeweils zwei Stunden erst in 70 prozentigen und dann 90 prozentigen Ethylalkohol gelegt. Anschließend kamen sie über Nacht in 96 prozentigen und dann dreimal für zwei Stunden in 100 prozentigen Ethylalkohol. Abschließend wurden sie noch zweimal für 20 Minuten in Xylol gegeben. Das dehydrierte Gewebe wurde zweimal über zwei Stunden zunächst in weiches Paraffin und anschließend über Nacht in hartes Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Leitz 1512) wurde das Material dann zwei bis vier μm dick geschnitten und die Präparate mit Hematoxylin / Eosin und PAS gefärbt.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde auf einem G3 Macintosh Computer (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA) mit einem entsprechenden Computerprogramm (Statview; Cricket Software Inc., Philadelphia, PA, USA) durchgeführt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte einschließlich des Standardfehlers (SEM = „Standard Error of Means“). Die Mittelwerte der entsprechenden Gruppen untereinander wurden auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des parameterfreien Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Die statistisch signifikante Grenze wurde bei $P = 0,001$ festgesetzt.

4 Material

4.1 Antikörper

Maus-Anti-Ratte ICAM - 1 (CD 54), Klon 1A29	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte PECAM - 1 (CD 31), Klon TLD-4E8	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte L-Selectin (CD62L), Klon OX-85	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte leukocyte function associated molecule 1 (LFA-1, CD11a)	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte α 4-Integrin (CD49d), Klon TA-2	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte neutrophile Granulozyten, Klon His 48	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte Monozyten/Makrophagen, Klon ED-1	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte aktivierte Makrophagen, Klon ED-2	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte dendritische Zellen, Klon OX-62	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte MHC KlasseII, Klon OX-18	Serotec (Oxford, UK)
Maus-Anti-Ratte VCAM 1 (CD106), Klon 51 bis 1069	Pharmingen (San Diego, Ca, USA)
Maus-Anti-Ratte P-Selectin (CD62L), polyklonal	Pharmingen (San Diego, Ca, USA)
Maus-Anti-Ratte Tissue Factor (TF)	Dr. D. N. Müller, FVK, Berlin, BRD
Maus-Anti-Ratte α -Aktin / glatte Muskulatur, Klon asm-1	Boehringer-Mannheim
Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin G	DAKO (Glostrup, Dänemark)
Komplex aus intestinaler alkalischer Phosphatase vom Kalb und Maus-Anti-Alkalische-Phosphatase IgG, Klon AP7/6/7	DAKO (Glostrup, Dänemark)

4.2 Puffer und Lösungen

TBS – Lösung (pH 7,6):

0,05 M Tris-Puffer: 1,5g Tris-HCl, 4,9g Tris-Base, 1l Aqua bidest
0,15 m NaCl

Neufuchsin-Substrat-Entwicklungslösung:

Lösung 1:

25 ml 0,2 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiollösung

75 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 9,7

675 mg NaCl

40 mg Levamisol

Lösung 2:

50 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat

600 ml N,n-Dimethylformamid (DMF)

Lösung 3:

200 ml 5% Neufuchsinlösung

500 ml 4% Natriumnitritlösung

APES/Aceton – Lösung:

2% 3-Aminopropyltriethoxysilane in Aceton

Lösungsmittel:

Aceton	MERCK, Darmstadt, BRD
Chloroform	MERCK, Darmstadt, BRD
Corbit Balsam	I. Hecht, Kiel-Hassee
Eosin G	MERCK, Darmstadt, BRD
Essigsäure 100%	MERCK, Darmstadt, BRD
Ethanol abs.	MERCK, Darmstadt, BRD
Hämatoxylin	MERCK, Darmstadt, BRD
Isopentan (2-Methylbutan)	MERCK, Darmstadt, BRD
RPML, Zellkulturmedium	SEROMED, Berlin, BRD
Salzsäure 32%	MERCK, Darmstadt, BRD
Silicone Solution	SERVA, Heidelberg, BRD
Xylol	MERCK, Darmstadt, BRD

4.3 Chemikalien, Reagenzien

3-Aminopropyltriethoxysilane	SIGMA, Deisenhofen, BRD
Ammoniumacetat	MERCK, Darmstadt, BRD
Bovines Serumalbumin Gentax Frak. V	SIGMA, Deisenhofen, BRD
Calciumchlorid gekörnt	MERCK, Darmstadt, BRD
Chloralhydrat	MERCK, Darmstadt, BRD
Citronensäure-Monohydrat	MERCK, Darmstadt, BRD
N,n-Dimethylformamid	MERCK, Darmstadt, BRD
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	MERCK, Darmstadt, BRD
Kaiser's Glyceringelatine	MERCK, Darmstadt, BRD
Levamisol	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumacetat	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumazid	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumcarbonat	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumhydrogencarbonat	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumhydroxid Plätzchen	MERCK, Darmstadt, BRD
Natriumnitrit	MERCK, Darmstadt, BRD
Neufuchsin	MERCK, Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	MERCK, Darmstadt, BRD
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	MERCK, Darmstadt, BRD
Trinatriumcitrat-Dihydrat	MERCK, Darmstadt, BRD
Trizma Base	SIGMA, Deisenhofen, BRD
Trizma Hydrochlorid	SIGMA, Deisenhofen, BRD
Tissue TEK OCT Compound	Miles Inc., Ca, USA
Embedding medium for frozen specimen	Bayer Corporation Elkhart, Pennsylvania, USA

4.4 Geräte und Instrumente

Analysewaage, MC 1Analytic AC210S	Satorius AG, Göttingen, BRD
Brutschrank, B 6120	Hereaus Instruments, Hanau, BRD
Computer, G3 Power Macintosh	Apple Inc., Cupertino, Ca, USA
Dampfsterilisator (Autoklav), HA.240 III C	Wolf Med.-Pharm. Geräte, Geislingen / Steige, BRD
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA
Farbvideokamera Sony 3CCD	Sony Inc. Tokio, Japan
Feinwaage, BA 610-OD2	Satorius AG, Göttingen, BRD
Gefrierkombination (+4°C,-20°C)	Bosch, Berlin, BRD
Glaswaren: Küvetten (80ml, 250ml), Küvetteneinsätze, Bechergläser, Kolben, Meßzylinder, Trichter, Flaschen	Schott Glas GmbH, Mitterteich, BRD
Glycerin	MERCK, Darmstadt, BRD
Horizontalschüttler IKA, KS 501 digital	IKA Labortechnik, Junke & Kunkel GmbH & CO. KG, Staufen, BRD
Hybridisierungskammer IBAS 2,5 System	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz Kontron Elektronik GmbH, Eching München, BRD
Inverses Mikroskop, TMS-F KS 300 3.0 imaging system	Nikon Corporation, Kawasaki, Japan Carl Zeiss Inc., Jena, BRD
Laboruhr	Junghans Uhren GmbH, Schramberg, BRD
Laborzentrifuge, SIGMA, 3K12	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode, BRD
Leica CM 3000, Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nußloch, BRD
Magnetrührer IKA, MAG RCT basic	IKA Labortechnik, Junke & Kunkel GmbH & CO. KG, Staufen, BRD
Mikrochirurgische Instrumente: Scheren, Klammern, Nadelhalter, Klemmen, Mikro-Clips, Pinzetten	Codman, Hamburg, BRD Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen, BRD

Mikroskop für die Mikrochirurgie M691 MS-C	Leica, Bensheim, BRD
Nahtmaterial: Prolene 10-0, 7-0, Silk 4-0	Ethicon, Norderstedt, BRD
Objektträger (76x26 mm), Deckgläser (24x32 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
pH-Meter, Beckmann 32	Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca, USA
Sterilisatoren ST 6060	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, BRD
Universalmikroskop, Axioplan 2	Carl Zeiss Inc., Jena, BRD
Vibro-Fix VF1 - Electronic	IKA Labor Technik, Junke & Kunkel GmbH & CO. KG, Staufen, BRD
Vortex, Genie 2TM, „524“	
Zentrifuge, 5415 C	Eppendorf, Hamburg, BRD

5 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zu Organfunktion, Morphologie und immunhistochemischen Färbungen dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Untersuchungsergebnisse entsprechend der Gruppeneinteilung der Tiere in zwei Teilen aufgeführt. In Teil A werden isogene und allogene Transplantation verglichen. Die kalte Ischämiezeit vor der Transplantation war konstant, und die Organentnahme erfolgte zu variablen Zeitpunkten postoperativ. In Teil B hingegen wurde der Einfluß ansteigender kalter Ischämiezeiten untersucht. Die Organentnahme erfolgte bei allen Tieren 24 Stunden postoperativ (siehe hierzu auch **Kapitel 1.1.2**).

5.1 Organfunktion

5.1.1 Nierenfunktionswerte im Serum bei konstanter kalter Ischämiezeit von 4 Stunden in isogen und allogenen transplantierten Tieren (Teil A)

Die Werte für Kreatinin und Harnstoff im Serum sind in **Abbildung 3** im Vergleich von allogenen und isogen transplantierten Tieren je nach Zeitpunkt der Organentnahme im Verlauf dargestellt.

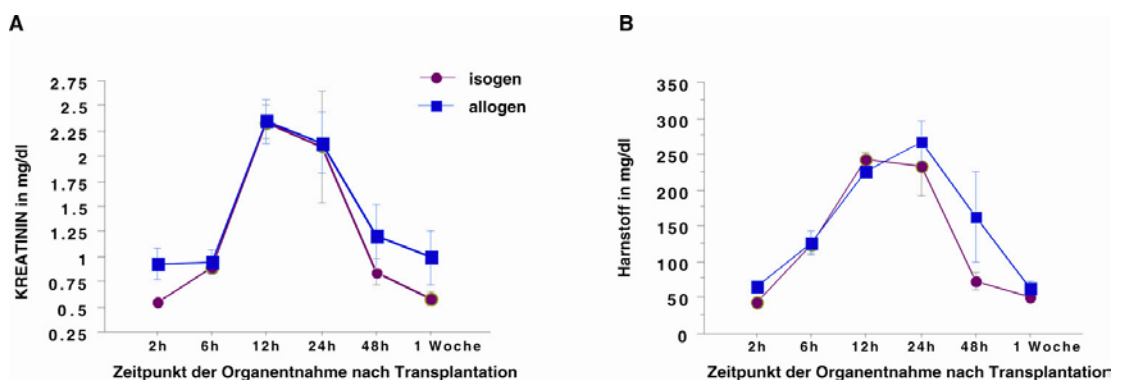


Abb. 3: Nierenfunktionsparameter von allogenen und isogen transplantierten Tieren zum Zeitpunkt der Organentnahme. (A) Kreatinin-Konzentration im Serum. (B) Harnstoff-Konzentration im Serum. Zeichen: (■) allogenen; (●) isogenen. Beide Parameter sind in mg/dl als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Sowohl in den allogenen als auch in den isogenen Gruppen stiegen die Werte für beide Parameter zunächst an und erreichten ihr Maximum für Kreatinin (bei

2,25mg/dl) 12h nach der Transplantation und für Harnstoff (bei 250-260 mg/dl) zwischen 12 und 24h nach der Organübertragung. Anschließend fielen sie parallel wieder bis auf das Niveau zum Zeitpunkt 2h nach Transplantation (Kreatinin: 0,5-0,9 mg/dl; Harnstoff: 50-60 mg/dl) ab, welches etwa am siebten Tag erreicht wurde. Weder bei den Werten für Kreatinin noch für Harnstoff traten signifikante Unterschiede zwischen isogen und allogenen transplantierten Tieren auf.

5.1.2 Nierenfunktionswerte bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)

In **Abbildung 4** sind die Werte für Kreatinin und Harnstoff bei Tieren mit isogen transplantierten Organen, die einer kalten Ischämiezeit zwischen 2 und 24h ausgesetzt wurden, dargestellt.

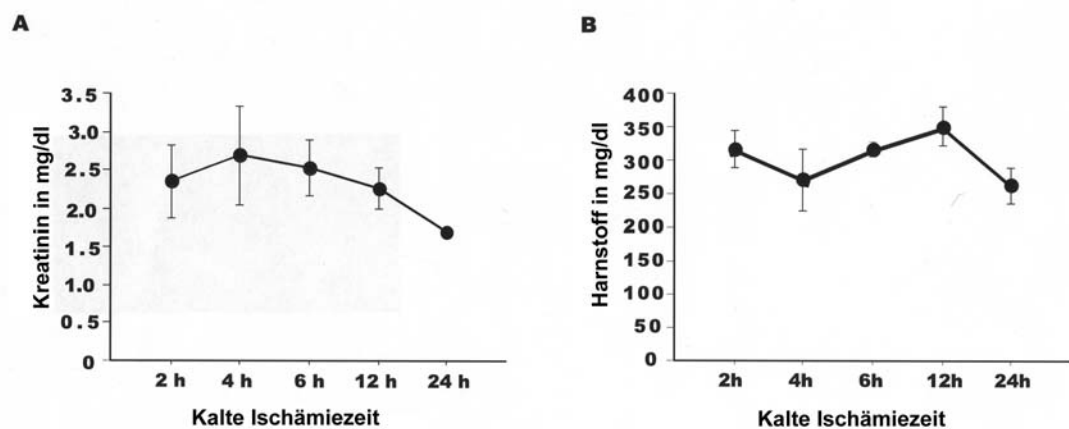


Abb. 4: Nierenfunktionsparameter isogen transplantiertier Tiere 24 h post transplantationem, deren Organe kalten Ischämiezeiten zwischen 2 und 24h ausgesetzt waren. (A) Kreatinin-Konzentration im Serum. (B) Harnstoff-Konzentration im Serum. Beide Parameter sind in mg/dl angegeben als Mittelwert \pm SEM.

Bei allen Tieren lagen zum Zeitpunkt der Organentnahme 24h nach der Transplantation pathologisch erhöhte Serumwerte sowohl für Kreatinin (zwischen 2,0 und 2,5 mg/dl) als auch für Harnstoff (zwischen 250 und 300 mg/dl) vor. Anders als erwartet zeigten sich jedoch in Bezug auf beide Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen – unabhängig davon, ob die Organe kurzen oder langen kalten Ischämiezeiten ausgesetzt worden waren.

5.2 Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte der aus den unterschiedlichen Gruppen gewonnenen Organe wurden mit der APAAP-Methode im Hinblick auf wichtige Adhäsionsmoleküle, Membranrezeptoren und Zellpopulationen der sogenannten „Adhäsionskaskade“ im Rahmen entzündlicher Prozesse gefärbt. Das Gewebe wurde auf folgende Adhäsionsmoleküle untersucht: P- und L-Selektine, ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1. Zusätzlich wurde das Infiltrationsausmaß bestimmter Abwehrzellen ermittelt: dendritische Zellen (OX-62), neutrophile Granulozyten (His 48), Monozyten/Makrophagen (ED-1), aktivierte Makrophagen (ED-2). In Bezug zu diesen Zellpopulationen wurde Verteilung und Expression wichtiger Leukozytenintegrine und Membranproteine bestimmt: LFA-1-, VLA-4- und MHC-II. Außerdem wurde die Expression des Membranrezeptors Tissue-Factor (TF) in den Organen ermittelt.

In den folgenden Abbildungen sind APAAP-positive Farbreaktionen auf die oben angeführten Antigene als rot gefärbte Areale erkennbar, während die Zellkerne blau gefärbt sind.

5.2.1 Immunhistochemische Ergebnisse bei konstanter kalter Ischämiezeit in isogen und allogenen transplantierten Tieren (Teil A)

5.2.1.1 Nachweis von Selektinen

Die Proteine der Selektinfamilie gehören zu den frühesten Mediatoren innerhalb der Adhäsionskaskade, die nach einem entzündlichen Stimulus des Gewebes hochreguliert werden und den ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel vermitteln (33). Entsprechend zeigten sich in den Organen, die schon nach zwei Stunden wieder entnommen wurden, bereits deutliche Farbreaktionen für P-Selektin und für L-Selektin sowohl in allogenen als auch in isogen transplantierten Tieren.

Wie in **Abbildung 5** erkennbar ließ sich P-Selektin am stärksten im Bereich des Endothels glomerulärer und peritubulärer Kapillaren sowie der Intima kortikaler Arteriolen nachweisen, was einem ähnlichen Verteilungsmuster entspricht wie in Biopsien aus humanen allogenen Transplantaten direkt nach Revaskularisation (32). Die maximale Farbintensität war zwischen 2 und 6 Stunden nach der

Transplantation erreicht. Nach 12 bis 24 Stunden wurde die Intensität wieder schwächer, und nach 48 Stunden war P-Selektin in den Organen nicht mehr nachzuweisen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten gab es keinen meßbaren Unterschied zwischen isogenen und allogenen Transplantaten. In Kontrolltieren trat P-Selektin weder im Bereich der Gefäße noch der Glomeruli auf.

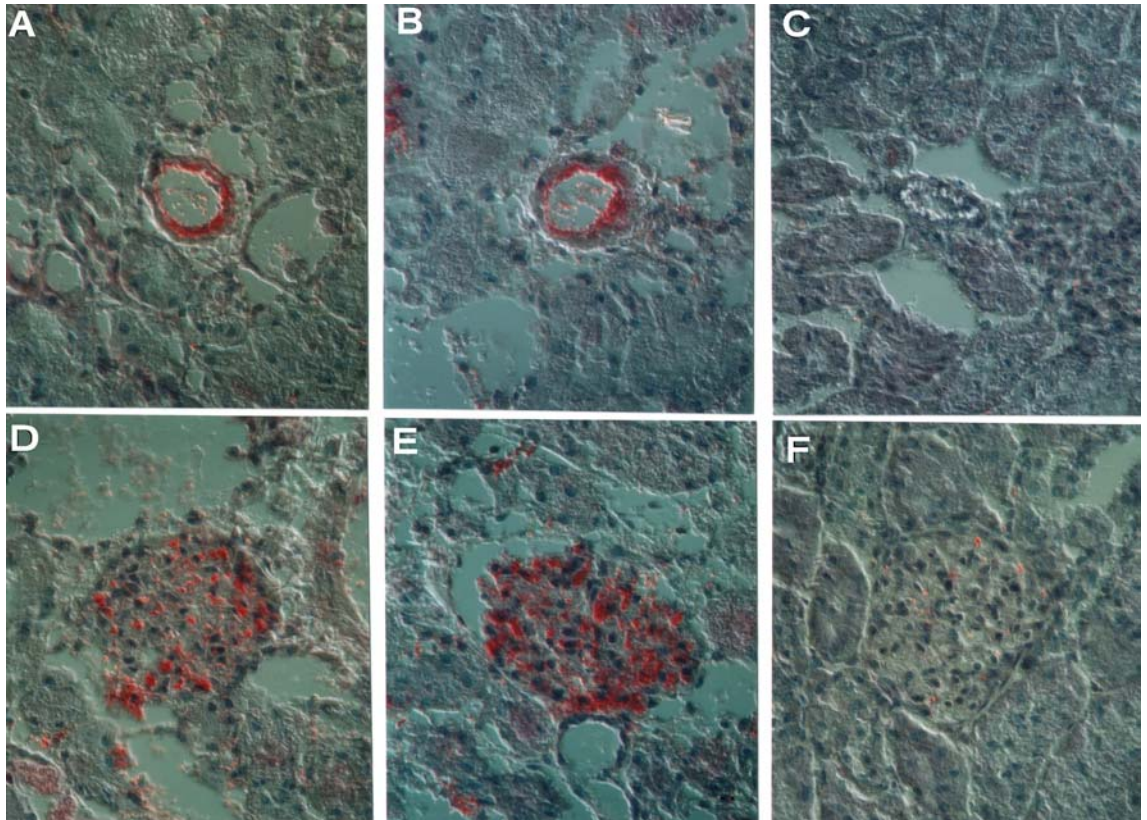


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis für P-Selektin 2 Stunden nach Transplantation. Vaskuläre Expression: (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. Intraglomeruläre Expression: (D) isogenes Transplantat; (E) allogenes Transplantat; (F) native Niere. 400fache Vergrößerung.

Der zeitliche Verlauf von L-Selektin ähnelte dem von P-Selektin. Die maximale Intensität lag hier zwischen 2 und 12 Stunden. Im Gegensatz zur Verteilung von P-Selektin fand sich L-Selektin jedoch nicht im Bereich der Gefäßwände sondern an der Oberfläche entzündlicher Zellen in der Umgebung von peritubulären Kapillaren, Arteriolen und größeren Gefäßen. In **Abbildung 6** sind repräsentativ die Hauptlokalisationen zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums 6h nach der Transplantation im Vergleich zu nativen Organen dargestellt. Verteilungsmuster und Menge dieser L-Selektin-positiven Zellen zeigten keine Unterschiede

zwischen isogenen und allogenen Transplantaten. In unbehandelten Tieren war L-Selektin nicht nachweisbar.

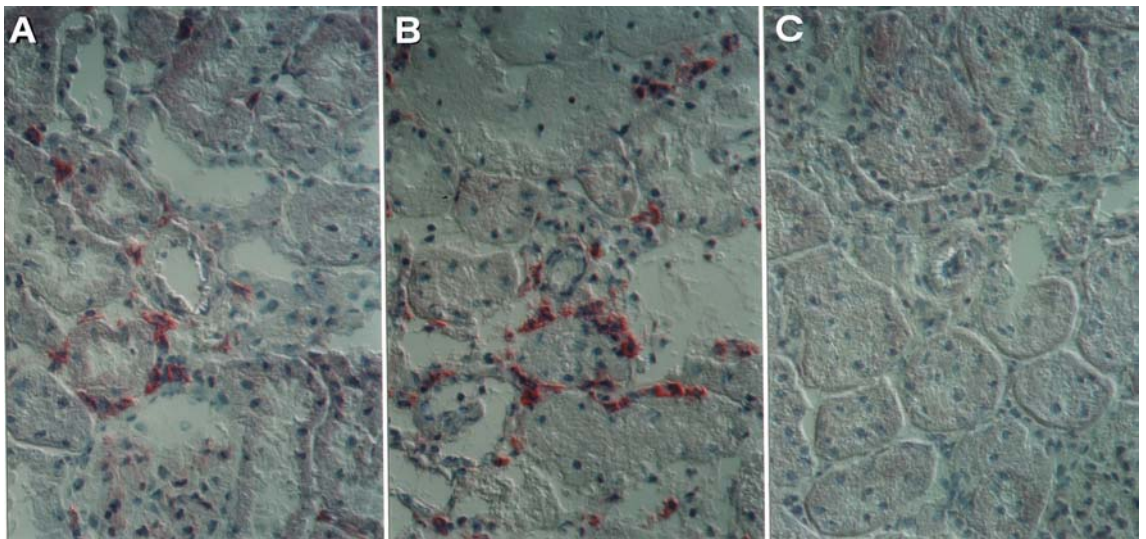


Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis für L-Selektin 6 Stunden nach Transplantation. (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. 400fache Vergrößerung.

5.2.1.2 Nachweis der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 gehören zu Molekülen aus der Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF). Sie spielen unter anderem eine entscheidende Rolle beim Übergang der zunächst reversiblen, Selektin-vermittelten Adhärenz von verschiedenen Abwehrzellen an das Gefäßendothel in eine feste Bindung und deren Migration durch die Gefäßwand (49, 55, 58). Im Nierenparenchym der transplantierten Tiere zeigte ICAM-1 eine diffuse Verteilung auf Endothel- und Tubuluszellen. Nicht nur an der apikalen sondern auch an der basolateralen Membran der Tubuluszellen waren positive Farbreaktionen bei allogenen und isogenen Gruppen für ICAM-1 erkennbar. Auch Zellen des Niereninterstitiums zeigten deutlich positive Markierungen. Die Farbintensität war schon bei den frühesten Zeitpunkten der Organentnahme erhöht. Im weiteren zeitlichen Verlauf waren allerdings keine eindeutigen Intensitätsunterschiede erkennbar. In **Abbildung 7** ist exemplarisch die Expression von ICAM-1 24 Stunden nach der Transplantation bei allogenen und isogen transplantierten Tieren im Vergleich zu nativen Organen dargestellt. Man erkennt bereits in nativen Nieren eine basale konstitutive Expression von ICAM-1 an etwa den gleichen Parenchymstrukturen wie nach der Transplantation – jedoch in wesentlich geringerer Intensität.

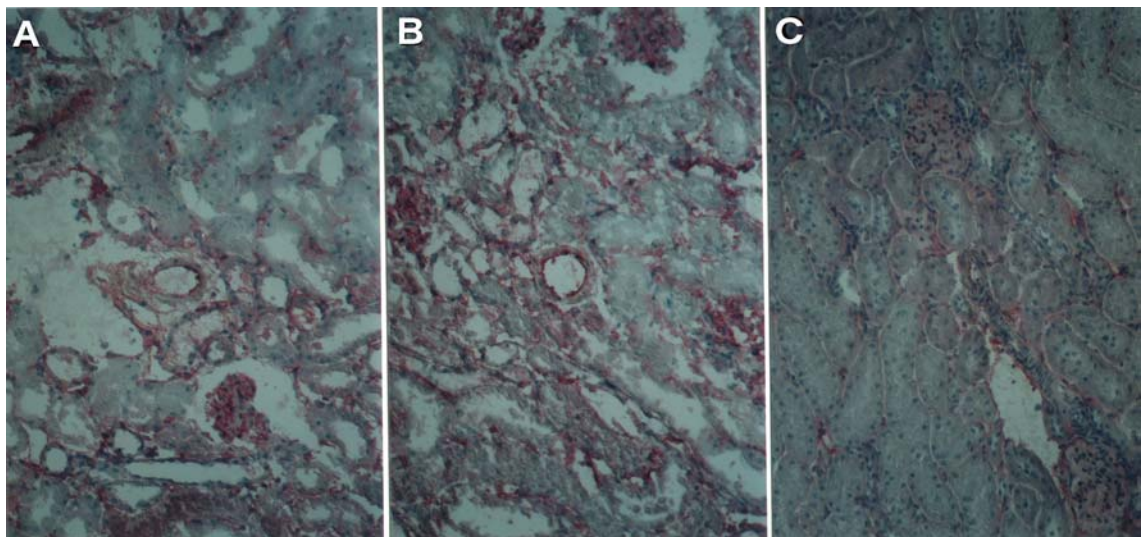


Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis für ICAM-1 24 Stunden nach Transplantation. (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. 200fache Vergrößerung.

Auch das Auftreten von VCAM-1 war streng auf das Endothel beschränkt. Erste

schwache Markierungen traten 6 Stunden nach Transplantation auf, und bis 24 Stunden nach Organübertragung stieg die Intensität auf ein Maximum in isogenen und allogenen Gruppen. Betroffen war vorzugsweise die Intima elastischer Gefäße wie kleinerer Arterien und Arteriolen, während auf kapillärem Endothel VCAM-1 nicht vorzufinden war. In **Abbildung 8** sind die positiven Farbreaktionen in der Intima sowohl allogenen als auch isogen transplantierten Nieren zum Zeitpunkt der maximalen Expression 24 Stunden nach dem Eingriff deutlich erkennbar. Ausschließlich in allogenen Organen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt an nahezu allen glomerulären Gefäßpolen VCAM-1-Positivität (siehe **Abbildung 8E**), die in isogenen Nieren nicht auftrat. Dieses differente Auftreten bei isogenen und allogenen ist mit den bisherigen Erkenntnissen nicht erklärbar. In Kontrollorganen konnte VCAM-1 nicht nachgewiesen werden.

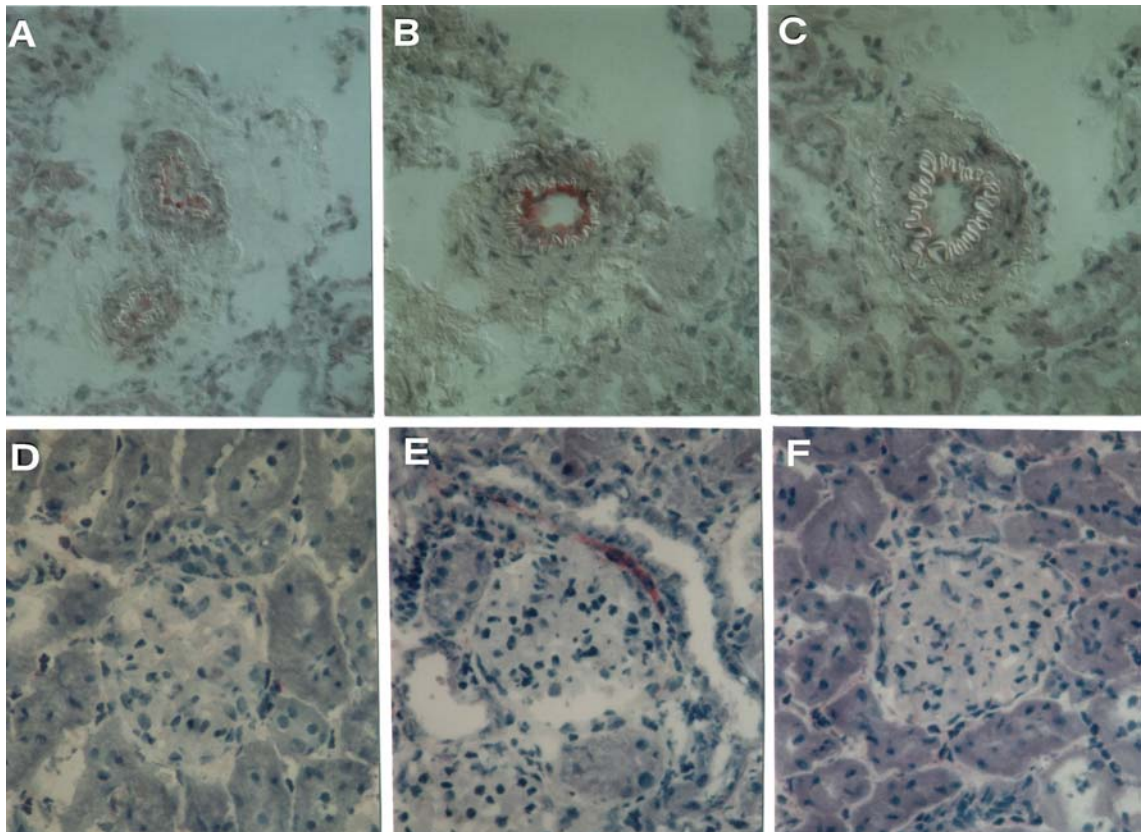


Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis für VCAM-1 24 Stunden nach Transplantation. Vaskuläre Expression: (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. Intraglomeruläre Expression: (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. 400fache Vergrößerung.

In **Abbildung 9** sieht man, dass die Verteilung von PECAM-1 im Gegensatz zu

ICAM-1 auf das Endothel der Gefäße beschränkt war. PECAM-1 ist unter anderem an der Zell-Zell-Verbindung von Endothelzellen beteiligt und wird deshalb von der Endothelschicht in gesunden Nieren in hohem Maße exprimiert (siehe **Abbildung 9c**) und gilt deshalb auch als Marker für ein intaktes Gefäßendothel. In **Abbildung 9A** und **9B** ist gut erkennbar, dass es trotz deutlicher Parenchymschädigung 24 Stunden nach der Transplantation nicht zu einer deutlichen Änderung der PECAM-1-Expression kam. Auch im weiteren zeitlichen Verlauf waren in allen isogenen und allogenen Gruppen keine eindeutigen Intensitätsunterschiede auszumachen.

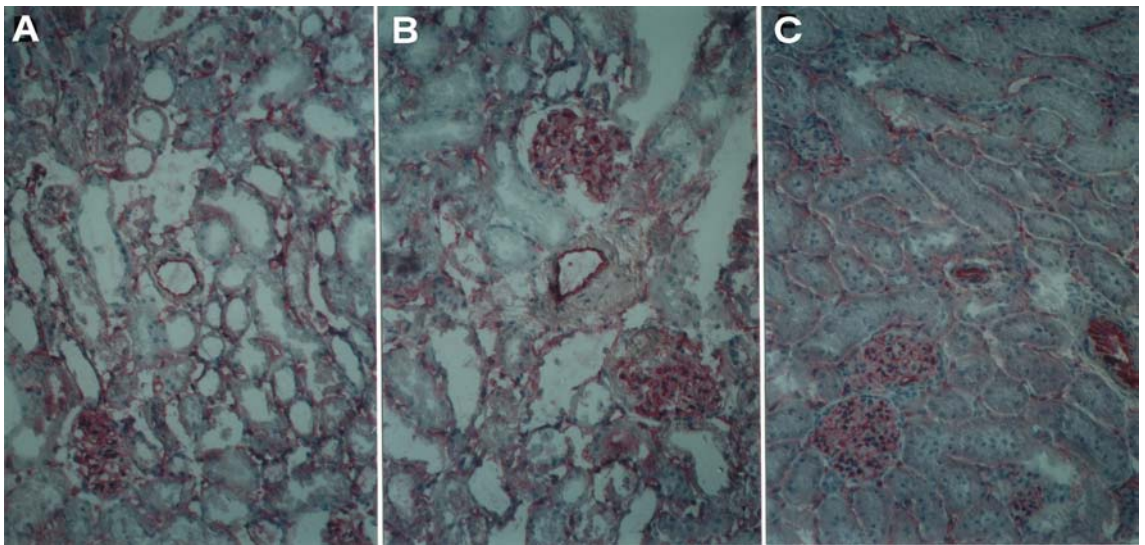


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis für PECAM-1 24 Stunden nach Transplantation. (A) isogenes Transplantat; (B) allogenes Transplantat; (C) native Niere. 200fache Vergrößerung.

5.2.1.3 Nachweis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie der Integrine VLA-4 und LFA-1

Die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen auf Endothelzellen und Leukozyten nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden ist mit einer verstärkten Adhäsion und Migration entzündlicher Zellen aus dem Gefäßsystem ins Gewebe des transplantierten Organs verbunden. Die Interaktion von ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen mit den korrespondierenden Liganden LFA-1 und VLA-4 an der Leukozytenoberfläche hat bei diesen Abläufen wichtigen Einfluss (38, 49, 53). Unter dieser Voraussetzung untersuchten wir die Stärke der Gewebsinfiltration durch neutrophile Granulozyten und monozytäre Zellen in Zusammenhang mit der Ausprägung der Oberflächenintegrine LFA-1 und VLA-4.

In **Abbildung 10** ist der zeitliche Verlauf dieser Zellpopulationen nach der Transplantation zwischen isogenen und allogenen Gruppen dargestellt.

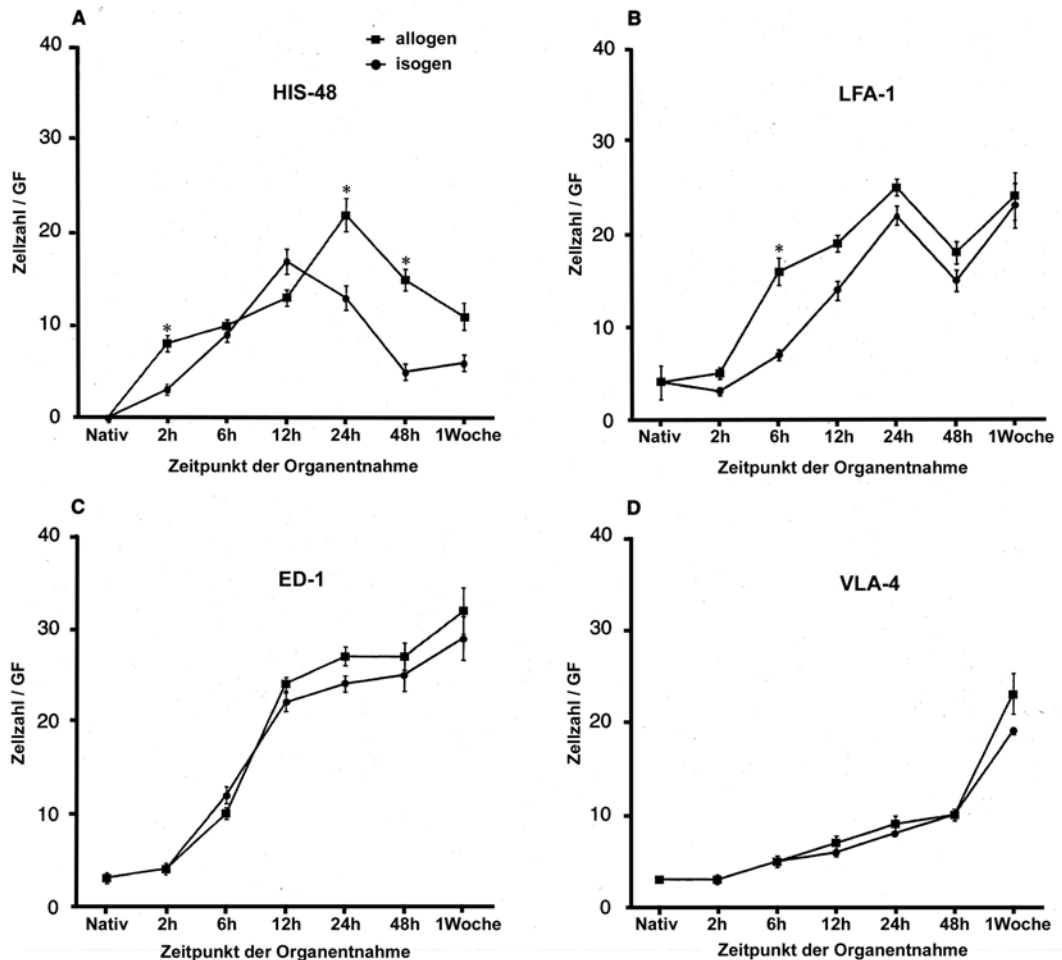


Abb. 10: Zeitverlauf verschiedener Populationen von Abwehrzellen nach der Transplantation. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 15 zufällig gewählten GF in Gewebeschnitten allogener (■) und isogener (●) Organe. (A) neutrophile Granulozyten (HIS-48), (B) LFA-1-positive Zellen, (C) ED-1-positive Monozyten/Makrophagen, (D) VLA-4-positive Zellen. *P = 0,01.

Unter den Mediatoren, die zu einer Verschlechterung der Organfunktion nach Ischämie-/Reperfusionsschaden führen, wird den neutrophilen Granulozyten wesentlicher Einfluss zugeschrieben (91, 92). In **Abbildung 10A** erkennt man, dass die Gewebsinfiltration durch Granulozyten parallel zur gesteigerten Expression von P-Selektin bereits 2 Stunden nach der Transplantation begann und im weiteren Verlauf bis auf ein Maximum zwischen 12 und 24 Stunden

deutlich anstieg. Anschließend nahm ihre Zahl ab, um nach 7 Tagen in etwa wieder auf dem Niveau von 2 Stunden anzulangen. Ein ähnlicher Verlauf spiegelt sich auch in der Verschlechterung der Nierenfunktion wieder (siehe hierzu **Abbildung 3**). 2, 24 und 48 Stunden nach der Transplantation zeigten sich in allogenen Gruppen im Vergleich zu isogenen signifikant höhere Zellzahlen; zu diesen Zeitpunkten lag in den entsprechenden Gruppen jedoch kein signifikanter Unterschied in der Organfunktion vor. In **Abbildung 11 A-D** sind die Hauptlokalisationen der Neutrophilen im Nierenparenchym isogen und allogenen übertragener Organe repräsentativ zum Zeitpunkt 24 nach Transplantation dargestellt: In erster Linie befanden sich die Zellen innerhalb der Glomeruli und in perivaskulären Bereichen, vereinzelt auch im Interstitium.

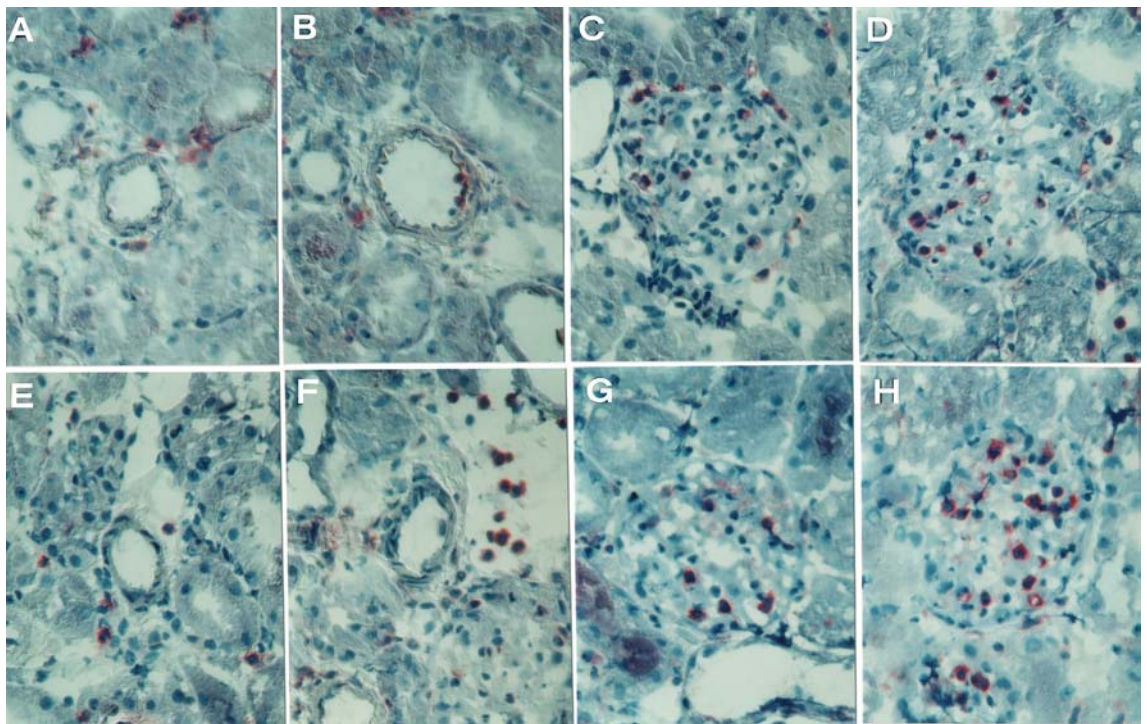


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis für neutrophile Granulozyten und LFA-1-positive Zellen in isogenen und allogenen Transplantaten 24 Stunden nach Transplantation. Perivaskuläre neutrophile Infiltrate: (A) isogen; (B) allogene. Intraglomeruläre neutrophile Infiltrate: (C) isogen; (D) allogene. Perivaskuläre LFA-1-positive Infiltrate: (E) isogen; (F) allogene. Intraglomeruläre LFA-1-positive Infiltrate: (G) isogen; (H) allogene. 400fache Vergrößerung.

Eines der hauptverantwortlichen Integrine für Adhäsion und Transmigration nach Schädigung durch IR in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten ist LFA-1, dessen korrespondierender Ligand ICAM-1 auf Endothelzellen ist (41, 93). In

Abbildung 10B sieht man, dass bereits zwischen 2 und 6 Stunden nach der Transplantation vermehrt LFA-1-positive Zellen im Nierengewebe auftraten. Die maximale Zellzahl wurde nach 24h erreicht. Anschließend ging ihre Zahl bis 48 Stunden nach der Operation zunächst wieder zurück, um danach auf einen zweiten Höhepunkt nach einer Woche anzusteigen. Signifikant höhere Werte als bei isogenen Tieren fanden sich für LFA-1 in allogenen Gruppen lediglich nach 6 Stunden. Die positiv markierten Zellen waren in allogenem ebenso wie in isogenem Nierengewebe hauptsächlich perivaskulär und intraglomerulär lokalisiert – vereinzelt auch interstitiell (**siehe Abbildung 11 E-H**). An den früheren Zeitpunkten bis etwa 48 Stunden nach der Transplantation korrelierte diese Verteilung mit der Lokalisation neutrophiler Granulozyten im Gewebe; danach entsprach sie eher der Verteilung von Monozyten/Makrophagen im Nierenparenchym. Bei unbehandelten Kontrolltieren fanden sich nur vereinzelt im Interstitium LFA-1-positive Zellen - jedoch nicht in perivaskulären Arealen oder Glomeruli.

Welchen konkreten Anteil Monozyten/Makrophagen an den entzündlichen Abläufen nach Ischämie-/Reperfusionsschäden haben, ist noch nicht ausreichend geklärt. Ihre Fähigkeit, bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren freizusetzen, lässt allerdings vermuten, dass diese Zellen unter anderem auch an regenerativen Prozessen im Nierenparenchym beteiligt sind (94). In **Abbildung 10C** ist der parallele Verlauf der Zellzahlen zwischen isogenen und allogenen Tieren innerhalb der ersten Woche nach der Transplantation sehr deutlich erkennbar. Die Migration der ED-1-positiven Zellen begann nach 2 Stunden und zeigte im weiteren Verlauf einen sehr raschen Anstieg, so dass diese Zellpopulation nach 24 Stunden mit bis zu 27 Zellen pro Gesichtsfeld (GF) bereits den Großteil der infiltrierenden Zellen ausmachte. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass nicht ausschließlich neutrophile Granulozyten für die Verschlechterung der Nierenfunktion verantwortlich waren. Zwischen 24 und 48 Stunden hielt sich die Zahl ED-1-positiver Zellen auf gleichbleibend hohem Niveau. Daraufhin kam es zu einem weiteren Anstieg bis zum Zeitpunkt 7 Tage nach der Transplantation. Signifikante Unterschiede zwischen isogenen und allogenen Transplantaten traten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte auf. **Abbildung 12 A-D** zeigt die Hauptlokalisationen ED-1-positiver Zellen in peritubulären Bereichen und in der Umgebung elastischer Gefäße exemplarisch 24h nach der Transplantation. In erster Linie fanden sich

diese Zellinfiltrate in der Nähe von Gefäßen, die auch positive Farbreaktionen für VCAM-1 aufwiesen. Auch innerhalb der Glomeruli fanden sich ED-1-positive Zellen. In Kontrolltieren traten lediglich vereinzelt positiv markierte Zellen auf, die vermutlich zu den gewebsständigen Makrophagen zu zählen sind.

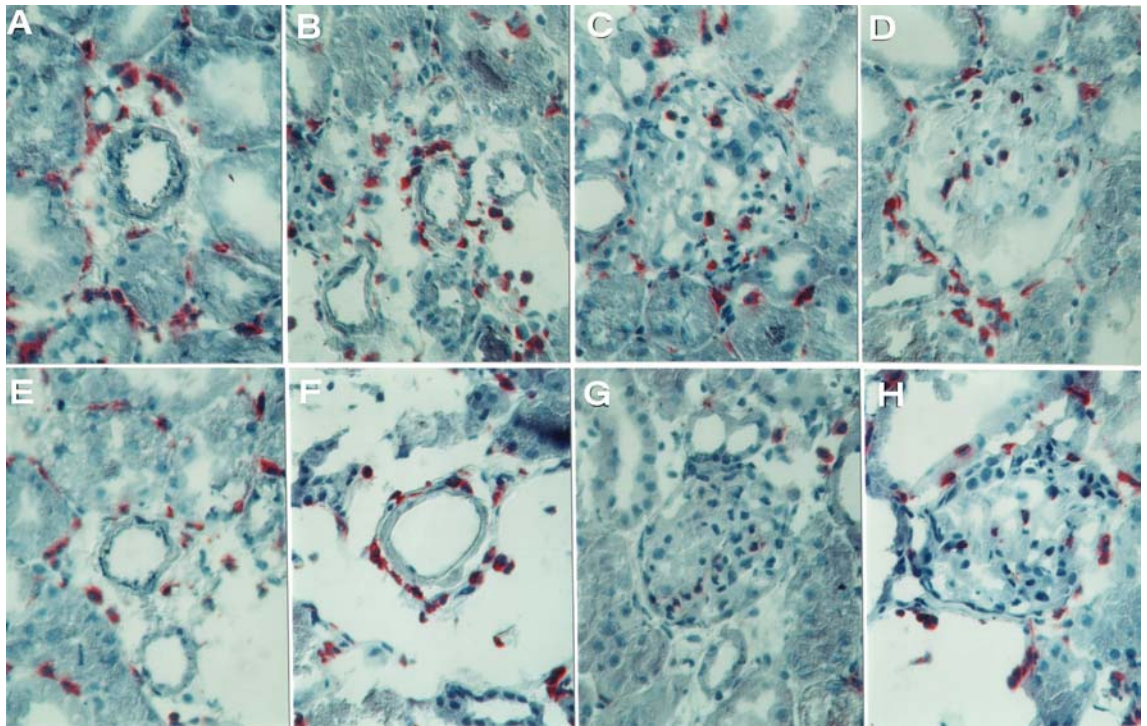


Abb. 12: : Immunhistochemischer Nachweis für ED-1-positive Monozyten/Makrophagen und VLA-4-positive Zellen in isogenen und allogenen Transplantaten 24 Stunden nach Transplantation. Perivaskuläre ED-1-positive Infiltrate: (A) isogen; (B) allogene. Intraglomeruläre ED-1-positive Infiltrate: (C) isogen; (D) allogene. Perivaskuläre VLA-4-positive Infiltrate: (E) isogen; (F) allogene. Intraglomeruläre VLA-4-positive Infiltrate: (G) isogen; (H) allogene. 400fache Vergrößerung.

Mit VLA-4 wurde das Auftreten eines der Leukozytenintegrine untersucht, das hauptsächlich mit Adhäsion und Transmigration von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten durch die Gefäßwand assoziiert wird (40, 53). Wie in **Abbildung 10D** dargestellt war die Gewebsinfiltration durch VLA-4-positive Zellen zunächst weniger stark als durch ED-1-positive. Bis 24 Stunden nach der Transplantation erhöhten sich die Zellzahlen zunächst nur langsam bis auf 8-10 Zellen/GF. Zwischen 24 und 48 Stunden blieben die Werte auf diesem Niveau, um erst danach bis zum Zeitpunkt von 1 Woche nach dem Eingriff auf deutlich höhere Werte von 20-23 Zellen/GF anzusteigen. Dabei war die zeitliche Dynamik bei isogen und allogene transplantierten Tieren nahezu identisch, so dass an

keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Gruppen auftraten. In **Abbildung 12 E-H** sind die Lokalisationen VLA-4-positiver Zellen repräsentativ zum Zeitpunkt 24h nach der Transplantation bei isogenen und allogenen Transplantaten in perivaskulären und peritubulären Bereichen sowie in den Glomeruli gut erkennbar. In nativen Organen traten nur einzelne VLA-4- positive Zellen auf.

5.2.1.4 Nachweis von ED-1- und ED-2-positiven Zellen in allogenen transplantierten Tieren 10 Tage nach Transplantation ohne versus 1,5 mg/kg bzw. 5 mg/kg immunsuppressiver Behandlung mit Cyclosporin-A (CsA)

Monozyten/Makrophagen zeigten die größten Infiltrationszahlen unter den untersuchten Zellpopulationen in isogenen und allogenen Transplantaten. Für diesen Zelltyp wurde der Untersuchungszeitraum deshalb bis auf 10 Tage nach dem Eingriff ausgeweitet, weil es dann in allogenen übertragenen Organen ohne Immunsuppression nach vorausgegangener Regeneration zu zellulärer und vaskulärer Rejektion kommt. Um den Einfluß immunsuppressiver Behandlung mit CsA auf den Einstrom von Entzündungszellen in das Nierenparenchym zu ermitteln, untersuchten wir drei weitere allogene Tiergruppen mit niedrig dosierter Behandlung (1,5 mg/kg CsA), Standarddosis (5 mg/kg CsA) bzw. ohne Gabe von Immunsuppressiva während der ersten Woche nach der Operation. In **Abbildung 13** sieht man, dass es bei Tieren ohne immunsuppressive Behandlung nach 10 Tagen im Vergleich zum Wert nach 7 Tagen zu einem weiteren heftigen Anstieg ED-1-positiver Zellen auf bis zu 60 Zellen/GF kam. Diese massiven Zellinfiltrate waren mit dem Bild der akuten Transplantatabstoßung vereinbar. Während es nach Gabe von 1,5 mg/kg CsA zunächst zu einer mäßigen Reduktion der Zahl ED-1-positiver Zellen kam, wurden deutlich niedrigere Infiltrationszahlen erst unter der Therapie mit 5 mg/kg CsA erreicht. Einen speziellen Subtyp differenzierter antigenpräsentierender Makrophagen stellt der Klon ED-2 dar. In weiteren Färbungen für diesen Zellklon zeigte sich, dass der Anteil ED-2-positiver Zellen durch die immunsuppressive Behandlung nicht beeinflusst wurde.

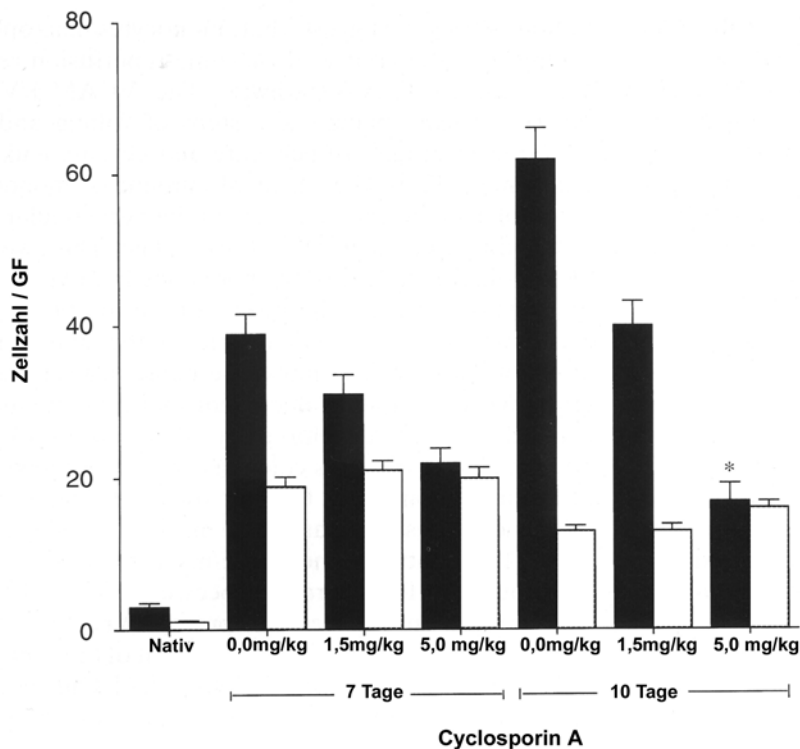


Abb. 13: Einfluß der Behandlung mit Cyclosporin A (CsA) in niedriger Dosis oder Standarddosis auf die Zahl ED-1- bzw. ED-2-positiver Monozyten/Makrophagen in Organen allogener transplantierte Tiere 7 und 10 Tage nach dem Eingriff. (■) ED-1-positive Zellen, (□) ED-2-positive Zellen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *P = 0,001

5.2.2 Immunhistochemische Ergebnisse bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)

Im folgenden Kapitel sind die immunhistochemischen Ergebnisse für isogen transplantierte Tiere 24 Stunden nach der Operation aufgeführt, deren Organe 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden kalter Ischämiezeit ausgesetzt waren. Nach 48 Stunden kalter Ischämiezeit waren alle entsprechenden Nieren komplett nekrotisch und deshalb für weitere immunhistochemische Untersuchungen nicht mehr verwendbar.

5.2.2.1 Nachweis der Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und VCAM-1

Das Adhäsionsmolekül PECAM-1 spielt - wie bereits in *Kapitel 1.2.4* ausführlich beschrieben wurde - eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Verbindung zwischen intakten Endothelzellen und bei der Transmigration von Leukozyten aus dem Gefäßsystem durch diese Barriere (57, 58). Weil in entzündetem oder geschädigtem Endothel die Struktur dieser Zell-Zell-Verbindungen erheblich

verändert ist, kommt es dort unter anderem zu erhöhter Permeabilität der Endothelbarriere und verstärkter Migration zahlreicher Abwehrzellen ins umliegende Gewebe.

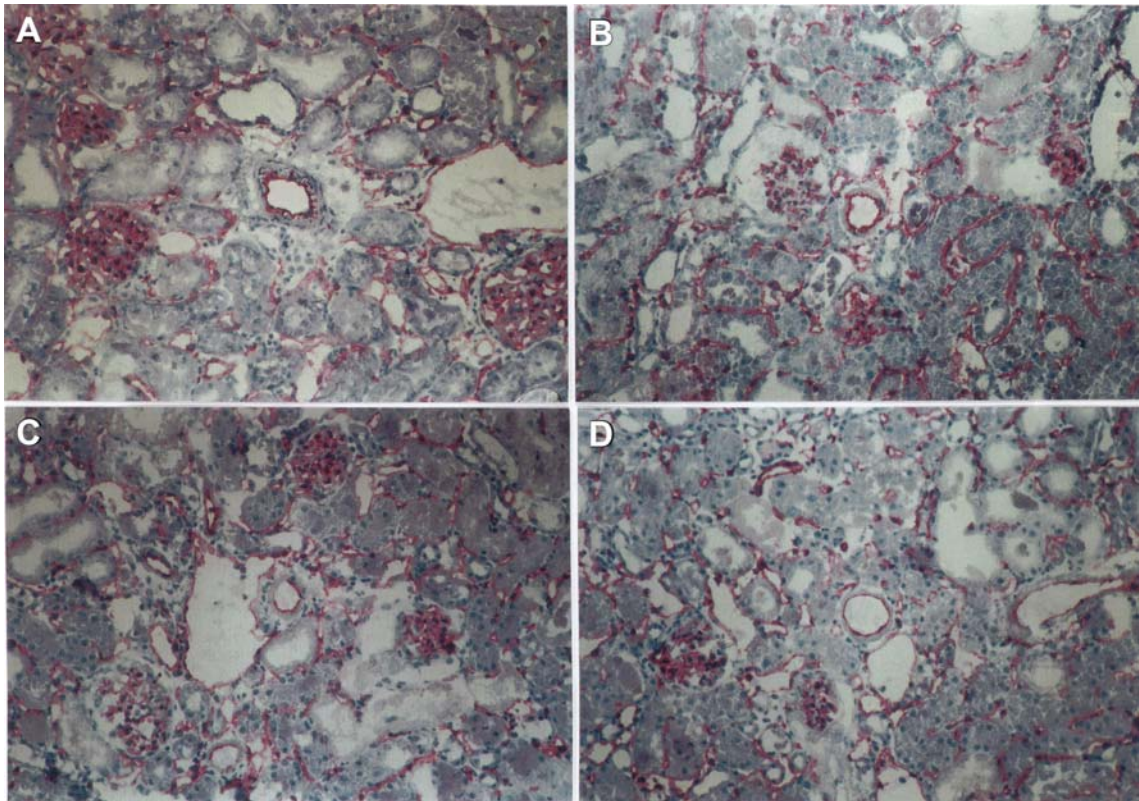


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis für PECAM-1 24 Stunden nach Transplantation in isogenen Transplantaten nach (A) 2h, (B) 6h, (C) 12h und (D) 24h vorausgegangener kalter Ischämiezeit. 200fache Vergrößerung.

In nativen Kontrollorganen zeigte sich wie bereits beschrieben beim Nachweis für PECAM-1 eine hohe Farbintensität und gleichmäßige Verteilung auf das Endothel intraglomerulärer und peritubulärer Kapillaren sowie größerer Gefäße. Zwischen Kontrollnieren und Organen aus Gruppen mit kürzeren kalten Ischämiezeiten bis zu 4 h waren keine Unterschiede in Intensität und Verteilung der positiv markierten Areale erkennbar. Dagegen wurde die Färbung in Organen, die langen kalten Ischämiezeiten von 12 h bis 24 h ausgesetzt waren, deutlich schwächer und offenbarte im Verteilungsmuster Lücken in der Integrität der Endothelbarriere. **Abbildung 14** zeigt die Verteilung von PECAM-1 in den Nieren nach 2h (**Abb.14A**) bzw. 6h (**Abb.14B**) vorausgegangener kalter Ischämiezeit im Vergleich zu 12h (**Abb. 14C**) bzw. 24h (**Abb.14D**) Ischämiezeit. Man erkennt, dass

insbesondere in den stärker geschädigten Arealen die Intensität der PECAM-1-Färbung abnahm und die Verteilung nicht mehr streng auf die Endothelschicht beschränkt war, sondern sich auch auf angrenzende Bereiche des Interstitiums ausweitete. Der Intensitätsverlust betraf größere arterielle Gefäße in gleichem Ausmaß wie peritubuläres und glomeruläres kapilläres Endothel.

Analog zu den Ergebnissen aus dem ersten Teil der Studie (Teil A) war die Verteilung von VCAM-1 auch in Gruppen mit variierten kalten Ischämiezeiten auf die Endothelschicht beschränkt.

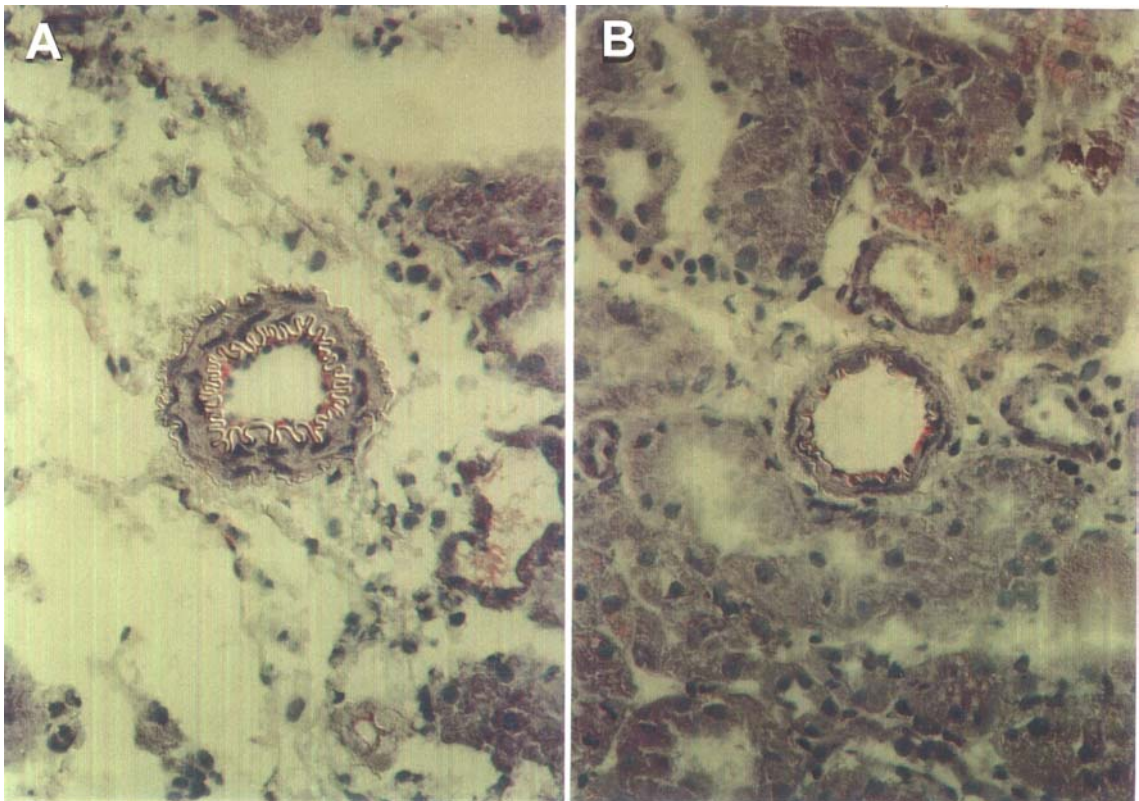


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis für VCAM-1 24 Stunden nach Transplantation in isogenen Transplantaten nach (A) 2h, und (B) 6h vorausgegangener kalter Ischämiezeit. 400fache Vergrößerung.

In erster Linie waren elastische Gefäße wie kleinere Arterien und Arteriolen betroffen. **Abbildung 15** zeigt exemplarisch den Nachweis für VCAM-1 auf dem Endothel kleinerer elastischer Gefäße nach 2h (**Abb. 15A**) und nach 6h (**Abb.15B**) vorausgegangener kalter Ischämiezeit. Die Intensität der positiv markierten Bereiche war in Organen, die kürzeren kalten Ischämiezeiten von 4 - 6 Stunden ausgesetzt waren, geringer ausgeprägt als nach Exposition mit langen

Ischämiezeiten von 12 - 24 h.

5.2.2.2 Nachweis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie der Integrine LFA-1 und VLA-4

Im ersten Teil der Studie (Teil A) hatte sich bereits gezeigt, dass sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten/Makrophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation wesentliche Anteile der infiltrierenden Zellpopulationen ausmachen. Anhand zeitlicher Verteilungsmuster und charakteristischer Lokalisationen im Nierengewebe ergaben sich Korrelationen in Bezug auf LFA-1 und VLA-4 als mögliche Integrine an der Oberfläche dieser Zellen. Deshalb wurden auch im zweiten Teil (Teil B) der Studie Färbungen für diese vier Parameter durchgeführt, um den Einfluss der Dauer der kalten Ischämiezeit zu ermitteln. In **Abbildung 16** sind die Zellzahlen für neutrophile Granulozyten (HIS-48), LFA-1-positive Zellen, Monozyten/Makrophagen (ED-1) und VLA-4-positive Zellen dargestellt.

Um herauszufinden, ob das Ausmaß der entzündlichen Antwort auf Reperfusionsschäden nach Exposition mit längeren kalten Ischämiezeiten ansteigt, wurden zunächst Menge und räumliche Verteilung der neutrophilen Granulozyten in Organen, die ansteigenden kalten Ischämiezeiten ausgesetzt waren, untersucht. Bei allen Gruppen befanden sich die granulozytären Infiltrate hauptsächlich innerhalb der Glomeruli und in perivaskulären sowie interstitiellen Bereichen. Dies entsprach den Lokalisationen in den Gruppen aus Teil A. Längere kalte Ischämiezeiten (12 – 24h) führten im Vergleich zu kürzeren (2 – 6h) nicht zu signifikant höheren Zellzahlen bei neutrophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 16A**). Diese Ergebnisse standen im Einklang mit der Nierenfunktion bei diesen Tieren, die sich ebenfalls zwischen Gruppen mit längeren und kürzeren Ischämiezeiten nicht wesentlich unterschied (siehe **Kapitel 3.1.2**).

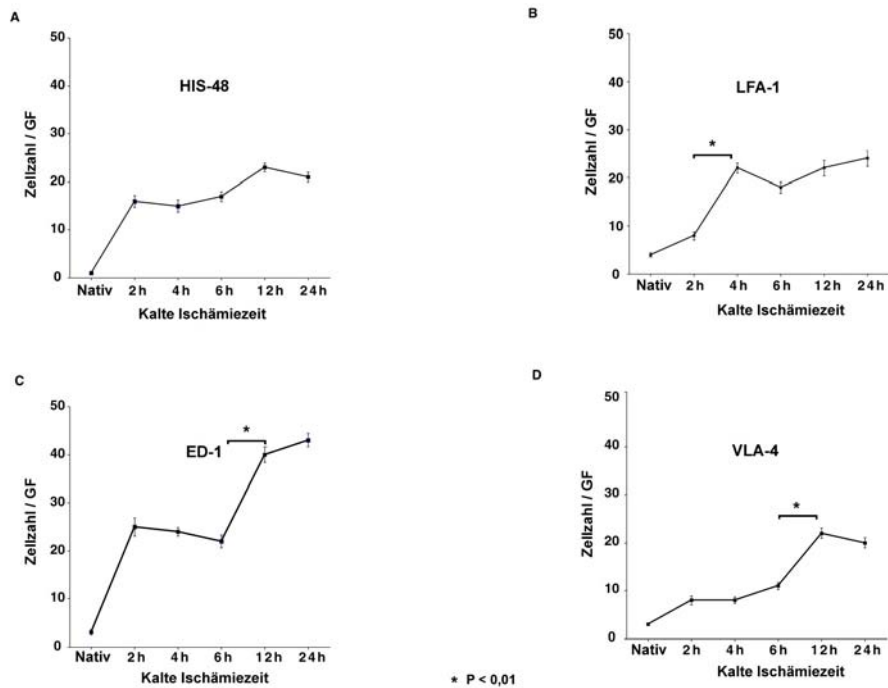


Abb. 16: Verschiedene Populationen von Abwehrzellen in Gruppen mit variablen kalten Ischämiezeiten 24h nach der Transplantation. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 15 zufällig gewählten GF pro Gewebeschnitt. * P = 0,01. (A) neutrophile Granulozyten, (B) LFA-1-positive Zellen, (C) ED-1-positive Monozyten/Makrophagen, (D) VLA-4-positive Zellen.

Da LFA-1 wie bereits beschrieben einen wichtigen Beitrag zu Adhäsion und Migration neutrophiler Granulozyten durch die Gefäßwand leistet (93), wurde untersucht, ob es in Verteilungsmuster und Zellzahl LFA-1-positiver Zellen zu Parallelitäten mit neutrophilen Granulozyten bei Tieren mit ansteigenden kalten Ischämiezeiten kam. In **Abbildung 16B** sieht man, dass die Zahl LFA-1-positiver Zellen im Gewebe bei einer Verlängerung von 2h vorausgegangener kalter Ischämiezeit auf 4h signifikant anstieg. Darüber hinaus verlängerte Ischämiezeiten von 6h bis hin zu lang andauernder Ischämie von 12h bzw. 24h führten jedoch nicht zu einer weiteren Verstärkung der Zellinfiltration. Anhand von Untersuchungen an Serienschnitten zeigte sich, dass die Hauptlokalisationen in Glomeruli, im Interstitium und in perivaskulären Arealen bei kürzeren Ischämiezeiten von 2h nahezu identisch mit denen der Granulozyten waren. Nach längeren Ischämiezeiten fanden sich aber auch Übereinstimmungen mit der Verteilung von Monozyten/Makrophagen.

Bereits in Teil A der Studie hatten sich Monozyten/Makrophagen als eine der vorherrschenden infiltrierenden Zellpopulationen im Gewebe herausgestellt und die Vermutung nahegelegt, dass diese Zellen unter anderem auch wesentlichen Anteil an der Gewebeschädigung in der Akutphase nach der Transplantation haben. In **Abbildung 16C** erkennt man deutlich, dass ED-1-positive Zellen in allen Gruppen mit ansteigenden Ischämiezeiten der vorherrschende Zelltyp in den Organen waren. Entsprechend den Ergebnissen aus Teil A befanden sich ED-1-positive Zellen wiederum hauptsächlich in der Nähe elastischer Gefäße, peritubulär und intraglomerulär. Insbesondere nach kürzeren Ischämiezeiten (2-6h) befand sich die Mehrzahl der Infiltrate im Bereich von Gefäßen, die auch VCAM-1-positiv waren. Der Einstrom ED-1-positiver Zellen zeigte signifikante Anstiege von 20-25 Zellen/GF nach kürzeren Ischämiezeiten von 2-6h auf nahezu doppelt so hohe Werte in transplantierten Organen, die längeren Ischämiezeiten von 12-24h ausgesetzt waren. Im Wesentlichen war dieser Anstieg in perivaskuläre und peritubulären Bereichen zu verzeichnen, während in den Glomeruli die Zellzahl nicht zunahm.

Analog zum ersten Teil der Studie wurde auch in Organen, die ansteigenden kalten Ischämiezeiten ausgesetzt waren, Verteilung und Menge VLA-4-positiver Zellen bestimmt. Weil VLA-4 unter anderem in Adhäsionsprozesse von Monozyten/Makrophagen involviert ist (40), wurden Parallelitäten in Bezug auf Verteilung und Infiltrationsmenge durch Untersuchungen von Serienschnitten überprüft. In **Abbildung 16D** sieht man, dass die Zellzahlen im Vergleich zu ED-1 deutlich geringer ausfielen. Nach kürzeren kalten Ischämiezeiten (2-6h) zeigte sich zunächst nur ein dezenter Anstieg der Infiltration des Gewebes mit VLA-4-positiven Zellen auf 8-10 Zellen/GF, während nach langen Ischämiezeiten (12-24h) signifikant höhere Zellzahlen von bis zu 20 Zellen/GF in den Nieren auftraten. Die Verteilung der Zellen in den Organen verhielt sich analog zu den Ergebnissen für VLA-4 in Teil A. Hauptsächlich fanden sich Infiltrationen in perivaskulären, peritubulären und intraglomerulären Bereichen. Nach langen kalten Ischämiezeiten war in den Transplantaten in erster Linie die peritubuläre Fraktion VLA-4-positiver Zellen erhöht.

5.2.2.3 Nachweis von MHC-II-positiven Zellen, dendritischen Zellen (OX-62) und ED-2-positiven Zellen

Nach der „Response-to-Injury“-Hypothese (95, 96) wird vermutet, dass der Schweregrad der spezifischen Immunantwort und das Auftreten von Rejektionsereignissen nach Transplantationen mit dem Ausmaß der Gewebeschädigung vor und während der Transplantation korreliert. In Kapitel 1.4.1 wurde bereits erläutert, dass so genannte Antigen-präsentierende Zellen (APC) durch Präsentation von Fremdanigen in Verbindung mit MHC-II-Molekülen T-Helferzellen aktivieren und eine entscheidende Rolle bei Initiation und Ablauf der spezifischen Immunantwort haben (70, 71, 72).

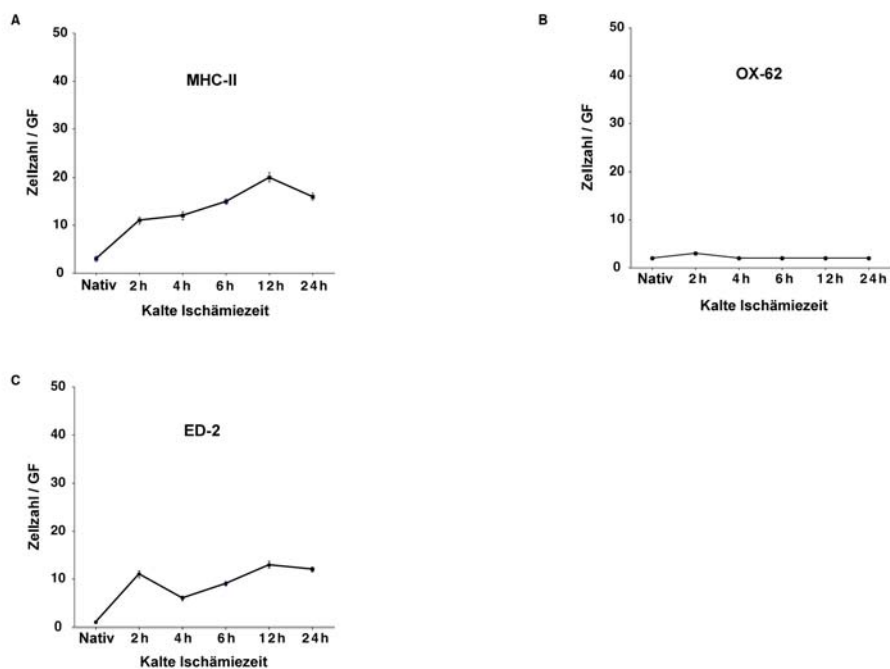
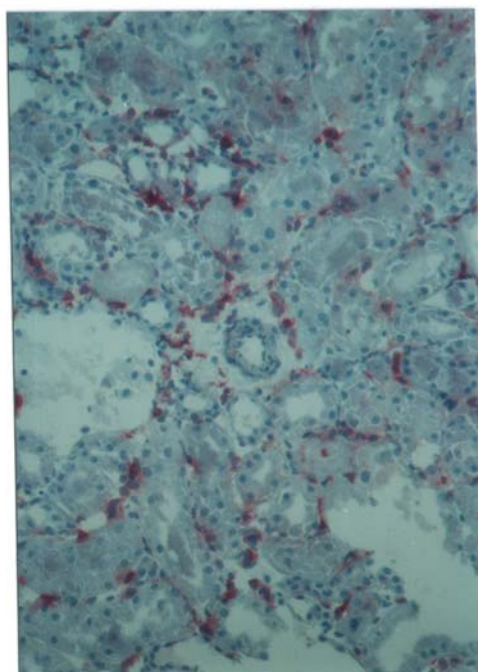


Abb. 17: Verschiedene Populationen von Abwehrzellen in Gruppen mit variablen kalten Ischämiezeiten 24h nach der Transplantation. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 15 zufällig gewählten GF pro Gewebeschnitt. (A) MHC-II-positive Zellen, (B) Dendritische Zellen (OX-62), (C) ED-2-positive Zellen.

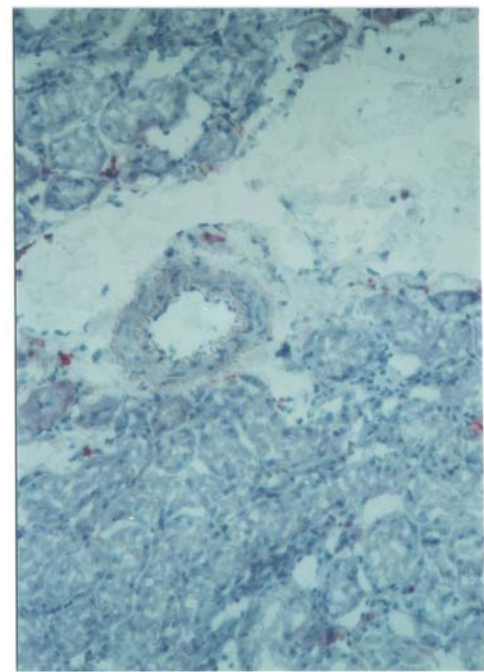
Das Wissen über den Einfluß der Dauer der kalten Ischämiezeit auf Ausmaß und Mechanismen der Immunantwort des Empfängers ist bisher noch sehr unvollständig. Deshalb wurden im zweiten Teil der Studie Infiltrationsausmaß und

Hauptlokalisationen von MHC-II-positiven Zellen, dendritischen Zellen (OX-62) und ED-2-positiven Makrophagen vom dendritischen Phänotyp nach ansteigenden kalten Ischämiezeiten untersucht. In **Abbildung 17** sind die Zellzahlen im Nierengewebe für diese Zellpopulationen dargestellt.

Schädigung durch IR führt in der Niere zur Hochregulation immunologischer Marker wie dem Membranprotein MHC-Klasse-II insbesondere an der basolateralen Seite von Tubuluszellen. Außerdem können aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen MHC-II-Moleküle zusammen mit Fremdanigenen an der Zelloberfläche exprimieren. Deshalb wurde untersucht, ob die Menge infiltrierender MHC-II-positiver Zellen im isogenen Transplantat und die Expression auf Parenchymzellen durch die Dauer der kalten Ischämiezeit beeinflusst wurde.



12h kalte Ischämiezeit



native Niere

Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis für MHC-II-positive Zellen nach 12 h kalter Ischämiezeit 24 Stunden nach Transplantation im Vergleich zum nativen Organ. 200fache Vergrößerung.

In **Abbildung 17A** erkennt man, dass die Zellzahl nach langen kalten Ischämiezeiten (12-24 h) im Vergleich zu kürzeren (2-6 h) numerisch leicht erhöht war. Es gab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied. In **Abbildung 18**

ist die Verteilung MHC-II-positiver Zellen nach 12h kalter Ischämiezeit im Vergleich zum nativen Organ zu erkennen. Infiltrierende Zellen befanden sich hauptsächlich peritubulär – vereinzelt auch in der Umgebung größerer Gefäße. Auch in nativen Organen traten vereinzelt MHC-II-positiver Zellen vorwiegend im Interstitium in peritubulären Bereichen.

Dendritische Zellen (OX-62) haben wie bereits ausführlich beschrieben eine entscheidende Funktion bei der direkten und indirekten Antigenpräsentation im afferenten Arm der Immunantwort (71, 72). In **Abbildung 17B** sieht man deutlich, dass durch ansteigende kalte Ischämiezeiten und den anschließenden Reperfusionsschaden keine verstärkte Migration von dendritischen Zellen ins Gewebe im Vergleich zu nativen Organen induziert wurde.

Um mehr Aufschluss über die Zusammensetzung der vorherrschenden Zellpopulation Monozyten/Makrophagen (ED-1) in den transplantierten Nieren zu gewinnen, wurden zusätzliche Färbungen für die Subpopulation ED-2 durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen aktivierten Subtyp von Makrophagen mit dendritischem Phänotyp. Aktivierte Makrophagen haben genau wie dendritische Zellen wichtige Bedeutung für die Präsentation von Antigenen an T-Helferzellen im Rahmen immunologischer Prozesse der Transplantatabstoßung. Vergleicht man **Abbildung 17C** und **16C** wird deutlich, dass ED-2-positive Makrophagen nur etwa 1/3 der Gesamtzahl an Monozyten/Makrophagen ausmachten. Außerdem kam es in Organen auch nach langen kalten Ischämiezeiten im Vergleich zu kürzeren nicht zu einem signifikanten Anstieg ED-2-positiver Zellen.

5.2.2.4 Nachweis von Tissue Factor (TF)

Das membranständige Glykoprotein Tissue Factor (TF) übernimmt nach Gewebeschädigung eine regulierende Funktion in der Aktivierung der Gerinnungskaskade und beeinflusst durch die veränderten Endothel Eigenschaften auch die entzündliche Antwort. Unter physiologischen Bedingungen wird TF nicht von Zellen mit direktem Blutkontakt gebildet sondern von Mesenchym- und Epithelzellen der Gefäßadventitia (61). Wird TF unter pathologischen Bedingungen wie nach Ischämie-Reperfusionsschäden auch von Endothelzellen generiert (62), kommt es durch die gesteigerte intravasale Gerinnung zu Gefäßverschlüssen (63). Außerdem ist TF an der Migration und Adhäsion von

Leukozyten beteiligt (64).

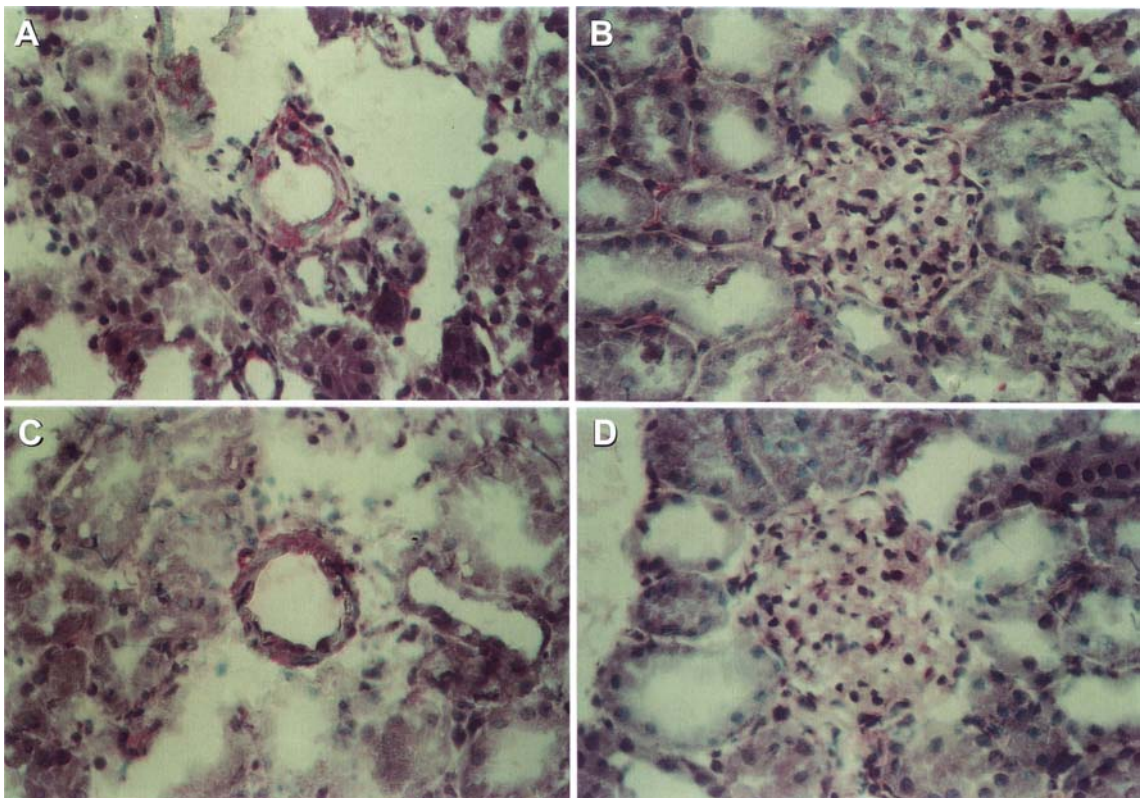


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis für Tissue Factor 24 Stunden nach Transplantation in isogenen Transplantaten nach vorausgegangener kalter Ischämiezeit von 2h (A) vaskuläre, (B) glomeruläre und 6h (C) vaskuläre und (D) glomeruläre Expression. 200fache Vergrößerung.

In **Abbildung 19** sind die Lokalisationen von TF in Organen, die unterschiedlich langen kalten Ischämiezeiten ausgesetzt waren, dargestellt. TF zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie VCAM-1 und befand sich bei allen Gruppen auf dem Endothel sowohl größerer Gefäße aber auch peritubulärer Kapillaren. Ausserdem reagierten teilweise auch Zellinfiltrate in der Umgebung dieser Gefäße positiv mit dem TF-Antikörper. Der Intensitätsgrad der Färbung für TF war umso höher, je länger die vorausgegangene kalte Ischämiezeit war.

5.3 Pathohistologische Analyse

Die mit Hematoxylin/Eosin gefärbten Präparate der in Paraffin eingebetteten Organanteile wurden im Hinblick auf typische Veränderungen in der Akutphase nach Ischämie-Reperfusionsschäden sowie morphologische Zeichen der akuten Tubulusschädigung und der akuten Rejektion untersucht (97, 98). Dies beinhaltete

thrombotische Gefäßverschlüsse gefolgt von Stauungszeichen und kollabierten Glomeruli sowie tubuläre Schädigungen, die nach dem „Acute Tubular Necrosis Score“ (ATN-Score) quantifiziert wurden. In dieser Einteilung werden Zeichen wie Lumenausformungen durch hyaline Proteinablagerungen, Zelldetritus oder Leukozyten, aufgetriebenes Tubuluslumen, Schädigung des Bürstensaums, Volumenverlust des Tubulusepithels bis hin zu Vakuolisierung und fokalen Nekrosen der Tubuluszellen beurteilt. Die Einteilung erfolgt in vier Schweregrade von milden (Grad 1, bis zu 20%) über mäßigen (Grad 2, 20-40%) und schweren Veränderungen (Grad 3, 40-60%) bis hin zu totaler Nekrose von mehr als 80% der Nierenparenchymfläche (Grad 4).

5.3.1 Morphologische Veränderungen bei konstanter kalter Ischämiezeit in isogen und allogenen transplantierten Tieren innerhalb der ersten 10 Tage nach Transplantation (Teil A)

Die morphologischen Veränderungen im Nierengewebe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation korrelierten mit den entsprechenden Nierenfunktionswerten der Tiere. Die frühesten Veränderungen sowohl bei isogenen als auch bei allogenen Gruppen traten 6 Stunden nach der Organübertragung auf und äußerten sich in gestauten Vasa recta, vereinzelt weißen Thromben in Venolen sowie einigen wenigen kollabierten Glomeruli. Im weiteren Verlauf traten zunehmend auch tubuläre Schädigungen auf. 12 Stunden nach der Transplantation stieg die Zahl an Ausformungen der Tubuli mit hyalinen Proteinablagerungen deutlich an, um nach 24 Stunden ihr Maximum zu erreichen. Hinzu kamen als weitere Anzeichen zunehmender Tubulusschädigung deutlich dilatierte Tubuli mit vakuolisierten Zellen und Arealen fokaler Nekrosen. Diese für akute tubuläre Nekrose (ATN) typischen Veränderungen in Organen 24 Stunden nach der Operation sind in **Abbildung 20 A** und **B** dargestellt. Parallel zum klinischen Verlauf bildeten sich die Gewebeschäden anschließend zurück, und bis 7 Tage nach dem Eingriff liefen zunächst regenerative Vorgänge in den Organen ab. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine signifikanten Unterschiede zwischen allogenen und isogenen Organen erkennbar. In den zusätzlich durchgeführten Gruppen kam es nach 10 Tagen in allogenen Organen ohne Immunsuppression zu akuter zellulärer und vaskulärer Rejektion des Transplantats mit massiven

Zellinfiltraten und Zerstörung des Nierenparenchyms (siehe **Abbildung 20c**).

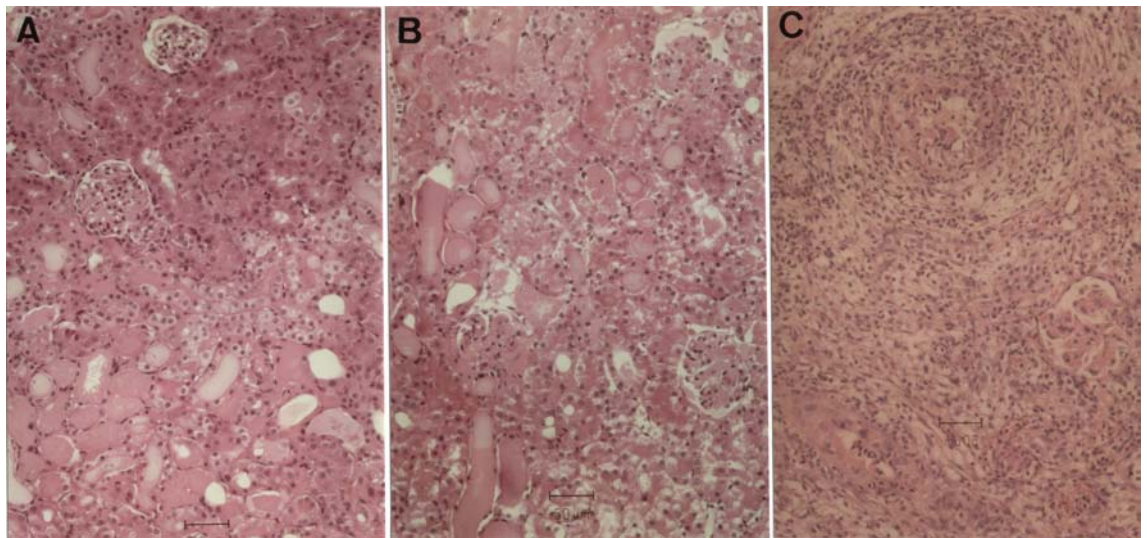


Abb. 20: Histologische Färbung des Nierenparenchyms mit Hämatoxylin/Eosin: Deutliche Zeichen Akuter Tubulärer Nekrose (ATN) in isogen (A) und allogenen (B) transplantierten Tieren 24 Stunden nach der Transplantation. Akute Rejektion in allogenen transplantierten Tieren ohne Immunsuppression 10 Tage nach der Transplantation (C).

5.3.2 Morphologische Veränderungen bei ansteigender kalter Ischämiezeit und Organentnahme nach 24h (Teil B)

In Teil A der Studie hatte sich bereits gezeigt, dass innerhalb der ersten Woche bereits 24 Stunden nach der Transplantation die morphologischen Schädigungen einen Höhepunkt erreichten. Folglich fanden sich in allen Gruppen mit ansteigender kalter Ischämiezeit 24 Stunden nach dem Eingriff analoge Veränderungen im Nierenparenchym. In **Abbildung 21** sieht man allerdings, dass die Schäden gemäß dem ATN-Score umso größer waren, je länger die vorausgegangene Ischämiezeit andauert hatte. Die Nierenfunktion verschlechterte sich entgegen den morphologischen Beobachtungen nach längeren Ischämiezeiten jedoch nicht weiter. Organe nach 2 Stunden kalter Ischämiezeit zeigten nur milde (Grad 1), nach 4-6 Stunden mäßige (1,8 bis 2,3 = Grad 2) und nach langen Ischämiezeiten von 12-24 Stunden schwere (3,6 = Grad 3-4) Veränderungen an den Tubuli. Alle Transplantate nach vorausgegangener kalter Ischämiezeit von 48 Stunden waren vollständig nekrotisch.

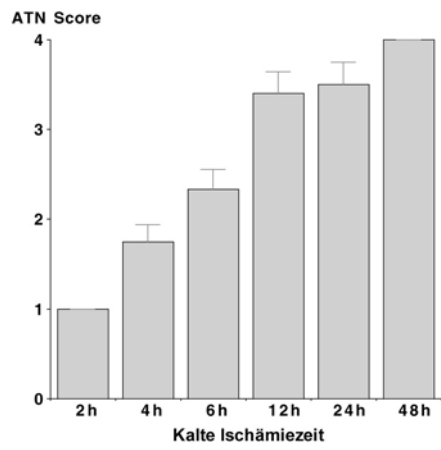


Abb. 21: ATN-Score für Gruppen mit ansteigenden kalten Ischämiezeiten 24h nach der Transplantation. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

6 Diskussion

6.1 Bedeutung von Allogenität und Ischämie-/Reperfusionsschaden für die entzündlichen Vorgänge in der Frühphase nach der Transplantation

Die Ergebnisse zum zeitlichen Ablauf der entzündlichen Vorgänge nach IR und Transplantation haben gezeigt, dass innerhalb der ersten Woche nach der Organübertragung Alloantigen-abhängige Faktoren im verwendeten Tiermodell nicht beteiligt sind. Die wichtigen Phasen der funktionellen Verschlechterung nach 12 bis 48 Stunden, der anschließenden Regeneration und Erholung der Nierenfunktion zwischen 48 Stunden und einer Woche bis hin zur einsetzenden akuten Rejektion ab Tag 7 nach der Operation liefen unabhängig von den unterschiedlichen immunologischen Voraussetzungen in allogenen und isogenen Transplantaten gleich ab. In Einklang zum Verlauf der Nierenfunktion standen die morphologischen Veränderungen, die nach anfänglicher Verschlechterung regenerative Vorgänge und keine Anzeichen akuter Rejektion innerhalb der ersten 7 Tage in allogenen Gruppen erkennen ließen. Bei den immunhistologischen Ergebnissen traten fast keine Unterschiede in zeitlichem Auftreten, Intensität und Verteilung wichtiger Adhäsionsmoleküle zwischen allogenen und isogenen auf. Auch in Bezug auf Menge und räumliche Verteilung infiltrierender Leukozyten und den mit diesen assoziierten Integrinen zeigten sich kaum Differenzen. Die entzündlichen Vorgänge waren bestimmt durch den Einstrom von Neutrophilen ins geschädigte Gewebe unmittelbar nach der Transplantation, die wahrscheinlich vornehmlich durch Interaktion mit dem Endothel über Selektine und ICAM-1/LFA-1 aus dem Gefäßsystem austraten. Die parallel ablaufende Gewebsinfiltration durch Monozyten/Makrophagen erfolgte wahrscheinlich in erster Linie durch Adhäsionsmechanismen über Interaktion von VCAM-1 und VLA-4. Möglicherweise kamen zusätzlich auch andere Interaktionsmechanismen über bisher noch nicht bekannte Adhäsionsmoleküle zum Tragen.

6.1.1 Spezifische Mechanismen und Kinetik der Adhäsionskaskade nach IR und Transplantation

Die Beobachtungen zu Kinetik der Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und

infiltrierenden Leukozyten an den frühen Zeitpunkten nach der Transplantation ähnelten Ergebnissen aus in vitro Studien an mit Interleukin-1 stimuliertem Endothel (99).

Das frühe Auftreten von P-Selektin 2 und 6 Stunden nach der Transplantation auf Gefäßendothel parallel zum Einstrom L-Selektin-positiver Zellen spricht dafür, dass Interaktion der Selektine für den erhöhten Einstrom neutrophiler Granulozyten in dieser Phase verantwortlich waren. Dies bestätigte sich an Färbungen von Serienschnitten, auf denen Kolo-kalisation innerhalb der Glomeruli zwischen P-Selektin auf kapilärem Endothel und infiltrierenden neutrophilen Granulozyten festgestellt werden konnte. Das Verteilungsmuster von P-Selektin auf dem Endothel von Arteriolen, Kapillaren und intraglomerulär entsprach dabei ähnlichen Beobachtungen an Biopsien aus kadaverischen Transplantaten unmittelbar nach Revaskularisation (27). Interessanterweise konnte in derselben Biopsiestudie durch Doppelfärbungen für P-Selektin und Thrombozyten-spezifisches CD41 zusätzlich gezeigt werden, dass P-Selektin nicht aus Endothelzellen sondern aus Thrombozyten freigesetzt worden war. Bereits zuvor konnte in einer anderen Studie in vitro gezeigt werden, dass am Endothel haftende Thrombozyten die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten über P-Selektin unterstützen können (34). Es ist anzunehmen, dass auch in der vorliegenden Studie P-Selektin thrombozytären Ursprungs war; dies konnte allerdings nicht abschließend nachgewiesen werden, da ein rattenspezifischer Thrombozyten-Antikörper leider nicht kommerziell verfügbar war.

Der Rückgang der Selektin-Expression im weiteren Zeitverlauf deutet auf einen Wechsel zu anderen Adhäsionsmechanismen hin. Zunehmende Übereinstimmung der Verteilung neutrophiler Granulozyten mit den Lokalisationen LFA-1-positiver Zellen ab etwa 6h nach der Transplantation und die gesteigerte ICAM-1-Expression lassen vermuten, dass die Interaktion dieser Adhäsionsmoleküle vermehrt an der Gewebsinfiltration durch Neutrophile beteiligt war. Diese Beobachtungen entsprechen Ergebnissen aus anderen Studien, in denen die Bedeutung der Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 für die Neutrophilen-Adhäsion durch Intervention mit Antikörpern oder Antisense-Oligonukleotiden gezeigt werden konnte (25, 26, 49, 100). Bei der Infiltration des Gewebes durch neutrophile Granulozyten zeigten sich leichte Unterschiede im Zeitverlauf nach isogener und allogener Transplantation. In allogenen Gruppen kam es, verglichen

mit isogenen, zu einem schnelleren Anstieg der Zellzahlen und zu einem späteren, langsameren Abfall. Überraschenderweise kam es aber trotz der größeren Menge an Neutrophilen in allogenen Transplantaten jedoch nicht zu signifikant schlechteren Nierenfunktionswerten oder größeren morphologischen Schäden, verglichen mit isogenen Transplantaten an denselben Zeitpunkten. Daneben fiel auf, dass nach Transplantation neutrophile Granulozyten sowohl in isogenen als auch in allogenen Gruppen ein anderes Verteilungsmuster zeigten als nach IR in nativen Nieren. Charakteristischerweise fanden sich Neutrophile nach Transplantation außer in perivaskulären Infiltraten vornehmlich intraglomerulär (26, 27). Dagegen liegen die Hauptlokalisationen der Granulozyten nach IR in nativen Organen vornehmlich in peritubulären Bereichen der äußeren Medulla (25, 100). Welche Ursachen diesen unterschiedlichen Verteilungsmustern zugrunde liegen, ist unklar. Möglicherweise führen veränderte rheologische Bedingungen und erhöhte Gerinnungsaktivität durch den zusätzlichen operativen Stress im transplantierten Organ zur Stase im Bereich der Kapillarschlingen der Glomeruli. Dies könnte wiederum zu einer gesteigerten Adhärenz der Leukozyten innerhalb der Glomeruli und in vorgeschalteten größeren Gefäßen führen.

Die Expression von ICAM-1 war bereits an den frühesten Zeitpunkten nach der Transplantation erhöht und zeigte im weiteren Verlauf keine Intensitätsänderungen. Dies lässt vermuten, dass ICAM-1 während des gesamten Untersuchungszeitraums in Abläufe der Leukozytenmigration involviert war. Wahrscheinlich war ICAM-1 in der frühen Phase nach der Transplantation an der Migration von Neutrophilen zum Ort der Gewebeschädigung beteiligt, während an späteren Zeitpunkten auch die Infiltration durch Monozyten/Makrophagen von ICAM-1 mitbestimmt wurde. Das Verteilungsmuster von ICAM-1 entsprach dabei Beobachtungen aus früheren Studien an autotransplantierten Rattennieren (26) und war vergleichbar mit Ergebnissen aus humanen Biopsien vor und nach der Revaskularisation (101, 102). Die fehlende Änderung in der Intensität der Expression von PECAM-1 auf Endothelzellen während des gesamten Untersuchungszeitraums in isogenen und allogenen Gruppen lässt die Schlussfolgerung zu, dass trotz heftiger Entzündungsvorgänge in den transplantierten Organen die strukturelle Integrität des Endothels weitgehend erhalten blieb. Diese Beobachtungen decken sich ebenfalls mit Untersuchungen an Biopsien aus humanen allogenen Transplantaten (101, 102).

Auch VCAM-1 zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster nach ischämischer Schädigung in transplantierten Nieren und fand sich in isogenen und allogenen Gruppen vornehmlich auf dem Endothel größerer elastischer Gefäße und Arteriolen. Im Gegensatz dazu wurde in Biopsien bei anderen entzündlichen Erkrankungen der Niere verstärkte Expression von VCAM-1 hauptsächlich im basolateralen Bereich der Tubuluszellen bzw. im vaskulären Bereich auf kleineren Gefäßen und postkapillären Venolen beobachtet (103, 104). Möglicherweise bedingen neben ischämischer Schädigung des Endothels und Aktivierung durch operativen Stress im Rahmen der Transplantation auch hier veränderte rheologische Bedingungen die erhöhte Expression von VCAM-1 auf größeren, elastischen Gefäßen und den damit verbundenen vermehrten subendothelialen Austritt von Leukozyten in diesen Bereichen. Obstruktion im Bereich der glomerulären Kapillarschlingen nach Reperfusion des Organs könnte durch Stase in den vorgeschalteten Arterien und Arteriolen zu erhöhter Aktivierung des Endothels in diesen Gefäßen führen. Andere Untersuchungen an transplantierten Nieren zeigten im Gegensatz dazu, dass während akuter Rejektion die Mehrheit der Leukozyten aus peritubulären Kapillaren in das Organ einströmt (105). Dabei kamen ähnliche Mechanismen wie in den sogenannten „high endothelial venules“ von Lymphknoten und Milz bei Adhäsion und Austritt der Lymphozyten zum Tragen. Diese differenten Beobachtungen machen deutlich, dass unterschiedliche Bedingungen im selben Organ auch zu großen Unterschieden bei den Mechanismen der Adhäsion und Infiltration von Abwehrzellen führen können und diese Vorgänge entscheidend von der Art der vorausgegangenen Schädigung abhängen. Die beobachteten leichten Unterschiede in der Lokalisation von VCAM-1 zwischen isogenen und allogenen Gruppen sind mit den bisherigen Erkenntnissen jedoch nicht hinreichend zu erklären. Die zusätzliche Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen des vaskulären Pols in allogenen Gruppen ist möglicherweise eine Reaktion auf die leicht erhöhte Infiltration durch neutrophile Granulozyten in allogenen Organen verbunden mit einer dezent verstärkten Endothelaktivierung. Allerdings zog diese differente Expression keine vermehrte Infiltration durch Monozyten in allogenen transplantierten Tieren nach sich.

6.1.2 Mögliche Einflüsse der vorherrschenden Entzündungszellen auf morphologische und funktionelle Veränderungen des Transplantats

Während in früheren Studien neutrophile Granulozyten als Hauptmediatoren der Gewebeschädigung nach IR angesehen wurden (91, 92), traten in neueren Untersuchungen sowohl im Tiermodell nach Schädigung durch IR (106) wie auch an humanen allogenen Transplantaten unmittelbar nach Reperfusion (107) zunehmend Monozyten/Makrophagen in den Mittelpunkt. Die Bedeutung monozytärer Zellen nach ischämischer Schädigung wurde vermutlich auch deshalb unterschätzt, weil Neutrophilen-Marker wie die Myeloperoxidase auch Bestandteil von Monozyten/Makrophagen sind. Auch der monoklonale Antikörper HIS-48 ist kein hochspezifischer Nachweis für Granulozyten sondern mit Monozyten/Makrophagen kreuzreaktiv (106). Auch in der vorliegenden Studie zeigten sich Überschneidungen bei Lokalisationen von ED-1+- und HIS-48+-Zellen, sodass ein zusätzlicher Anteil von Monozyten an der Gesamtzahl infiltrierender Zellen angenommen werden kann. Daneben konnte in weiteren neueren Studien eine größere Bedeutung von CD4+-T-Helferzellen und kostimulatorischen Signalen wie dem Protein B7-1 bei der Pathogenese des IR-Schadens und der Extravasation von Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden (108, 109). Diese neuen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, bei denen sich Monozyten/Makrophagen als vorherrschende Zellpopulation unter den infiltrierenden Zellen in allogenen und isogenen Gruppen herausgestellt hatten. Die Topographie im Gewebe und die zeitliche Dynamik von Zellinfiltration und Adhäsionsmolekülen unterstützten die Vermutung, dass Monozyten/Makrophagen an den späteren Zeitpunkten nach der Transplantation über Interaktion von VCAM-1 und VLA-4 aus dem Gefäßsystem austraten. Dies korreliert mit Ergebnissen aus Studien *in vitro* (40, 55) und *in vivo* bei Modellen zu akuten, subakuten und chronischen Entzündungsvorgängen (110). Der frühe Anstieg von Monozyten/Makrophagen in den transplantierten Organen, die bereits 6 Stunden nach Reperfusion des Organs genauso hohe Zellzahlen wie Neutrophile im Gewebe erreichten, spricht für eine Beteiligung dieser Zellpopulation an der Gewebeschädigung. Die zwischen 24 und 48 Stunden nach der Transplantation einsetzende Erholung der Nierenfunktion unter zunehmendem Einstrom von Monozyten/Makrophagen in das Organ legt die

unmittelbare Beteiligung dieser Zellen an den regenerativen Abläufen in dieser Phase nahe. Diese Fähigkeit der Monozyten/Makrophagen je nach vorherrschenden Bedingungen in der unmittelbaren Umgebung entweder weitere Gewebeschäden hervorzurufen oder reparative Mechanismen zu steuern wird auch „macrophage programming“ genannt und ist in neueren Untersuchungen immer mehr in den Vordergrund getreten (111). Schließlich kam es in allogenen transplantierten Tieren nach etwa 10 Tagen ohne Immunsuppression unter maximaler Infiltration von Monozyten/Makrophagen zur akuten Rejektion. Inwieweit die massiven Infiltrate von ED-1+- Monozyten/Makrophagen Auslösung und Fortgang der spezifischen Immunantwort beeinflussten ist jedoch unklar. In weiteren allogenen Gruppen konnte gezeigt werden, dass immunsuppressive Therapie mit CyclosporinA (CsA) zwar zu einer dosisabhängigen Reduktion ED1-positiver Monozyten/Makrophagen zum Zeitpunkt der akuten Rejektion führte. Allerdings wurde der Anteil ED2-positiver Makrophagen – eines aktivierten Subtyps vom dendritischen Phänotyp - durch Gabe von CsA nicht beeinflusst. Die genaue Funktion aktivierter Makrophagen nach IR und im Rahmen der Transplantationsimmunologie ist noch weitgehend unerforscht. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch eine Protokollbiopsiestudie bei der Unterschiede zwischen klinischer und subklinischer Rejektion untersucht wurden. Unter den untersuchten Zellpopulationen waren lediglich die Zahlen für einen aktivierten Makrophagen-Subtyp beim Auftreten klinischer Rejektion signifikant erhöht (112). Möglicherweise spielen also aktivierte Makrophagenformen oder von diesen freigesetzte Stoffe eine bedeutende Rolle für die Manifestation klinisch apparanter Rejektionsereignisse.

6.2 Auswirkungen der Dauer der kalten Ischämiezeit auf Gewebeschädigung, Immunogenität und Adhäsionsmechanismen

Im zweiten Teil der Studie wurden die Auswirkungen ansteigender kalter Ischämiezeiten auf Morphologie, Funktion, inflammatorische Antwort und Immunogenität des Transplantats untersucht. Dabei zeigte sich, dass längere Aufbewahrungszeiten (12-24 Stunden) im Vergleich zu kürzeren (2-6 Stunden) nicht zu einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion führten, obwohl bei

ansteigender Ischämiezeit die für ATN typischen morphologischen Schäden linear zunahmen. Trotz verstärkter Gewebeschädigung, aber in Einklang mit der gleich bleibend schlechten Nierenfunktion zeigte sich immunhistochemisch keine vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Organen nach längeren Ischämiezeiten. Auch der Einstrom von APCs wie dendritischen Zellen (OX-62), aktivierten Makrophagen (ED2) und MHC-Klasse-II-positiven Zellen in das Transplantat blieb von längeren Ischämiezeiten, verglichen mit kürzeren unbeeinflusst, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Traumatisierung des Gewebes nach langer kalter Ischämie - zumindest 24 Stunden nach der Transplantation - noch nicht mit einer erhöhten „Antigenität“ des Transplantats verbunden war. Die wichtigsten Veränderungen nach Ischämiezeiten von mehr als 6 Stunden waren eine massive Zunahme des Einstroms ED-1-positiver Monozyten/Makrophagen bis auf doppelt so hohe Werte. Diese vornehmlich perivaskulären Zellinfiltrate gingen mit einer deutlich gesteigerten endothelialen Expression von VCAM-1 einher, während die Intensität von PECAM-1 auf dem Gefäßendothel zunehmend lückenhafter wurde und Interstitialzellen in der Nähe von Gefäßen ebenfalls positive Farbereaktionen zeigten. Zu diesen deutlichen Anzeichen der Endothelschädigung kamen außerdem Anzeichen erhöhter prothrombotischer Aktivität, die sich in gesteigerter Expression von Tissue Factor (TF) auf Endothel und infiltrierenden Zellen äußerte. Die geschädigten Gefäße zeigten zusammen mit einwandernden Leukozyten in deren Umgebung eine deutlich gesteigerte TF-Expression insbesondere auf Endothelzellen aber zum Teil auch auf Gefäßmuskelzellen.

Retrospektive Studien nach Nierentransplantation mit uni- und multivariaten Analysemethoden haben immer wieder gezeigt, dass zunehmende Dauer der kalten Aufbewahrungszeit des Organs vor der Transplantation einer der wichtigsten Prädiktoren für das Auftreten von verzögerter Organfunktion, akutem Organversagen und verkürzter Überlebenszeit des Transplantats sind (11, 88, 113, 114). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine interessante klinische Studie, bei der jeweils beide Nieren eines kadaverischen Spenders nacheinander durch dasselbe Chirurgeteam verpflanzt wurden (115). Bei ausgeglichenem Matching für HLA, Panel-reaktive Antikörper, Geschlecht und Alter war lediglich die kalte Ischämiezeit der beiden Organe unterschiedlich. Trotz relativ geringer Unterschiede der kalten Aufbewahrungszeit von durchschnittlich 5

Stunden, kam es nach längerer Ischämiezeit in den Organen signifikant häufiger zum Auftreten verzögerter Organfunktion und akuter Tubulusnekrose mit der Notwendigkeit von Dialysemaßnahmen. Unter anderen Bedingungen ist es in klinischen Studien allerdings kaum möglich, Aussagen über die tatsächlichen Auswirkungen der Ischämiezeit zu machen und den Anteil an Gewebeschädigung und Entzündungsreaktion zu messen, weil neben vielen anderen unspezifischen Faktoren zusätzlich spezifische alloreaktive Abstoßungsmechanismen zum Tragen kommen. Tierexperimentelle Untersuchungen zu den veränderten Auswirkungen ansteigender kalter Aufbewahrungszeiten auf das transplantierte Organ gibt es bisher nur wenige. Nur vereinzelt wurden Ischämiezeiten von mehr als 6 Stunden getestet (116), und 2 Stunden kalte Ischämiezeit wurden teilweise bereits als verlängerte Aufbewahrungszeit für die Spezies Ratte bewertet (117, 118).

Da sich beim verwendeten Tiermodell keine wesentlichen Unterschiede für die entzündlichen Vorgänge zwischen allogenen und isogenen Transplantaten während der ersten Woche nach Transplantation gezeigt hatten, wurden die Auswirkungen ansteigender kalter Ischämiezeiten nur in isogen transplantierten Organen untersucht. Während des Aufbewahrungszeitraums zwischen 2 und 48 Stunden wurden die Nieren bei 4° C in UW-Lösung gelagert, weil dieses Medium in der humanen Nierentransplantation am verbreitetsten ist und sich gegenüber anderen in klinischen Studien durchsetzen konnte (119). Um mögliche Änderungen der Antigenität des Transplantats zu ermitteln, wurden zusätzlich zu den Adhäsionsparametern und infiltrierenden Zellen, die im Zeitverlauf in isogenen und allogenen Transplantaten überprüft worden waren, der Einstrom bestimmter Antigen-präsentierender Zellen (APC) untersucht. Alle Organe wurden 24 Stunden nach der Transplantation wieder entnommen, weil im ersten Teil der Studie zu diesem Zeitpunkt ein Höhepunkt der funktionellen Verschlechterung verbunden mit prominenter Entzündungsreaktion festgestellt worden war.

Der ausbleibende Anstieg neutrophiler Granulozyten nach langen kalten Ischämiezeiten zeigte zwar Parallelität mit der gleichbleibenden Nierenfunktion; dieser Verlauf stand jedoch nicht in Einklang mit der Zunahme der morphologischen Schäden. Folglich waren neutrophile Granulozyten vermutlich nicht die hauptverantwortlichen Zellen für die ansteigende Gewebeschädigung. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu früheren Studien, in denen

Neutrophile als zentrale Mediatoren der Schädigung nach IR in nativen und transplantierten Nieren eingeschätzt wurden (27, 91, 92, 120). Die zunehmende Traumatisierung der Organe nach längeren kalten Ischämiezeiten, verglichen mit kürzeren führte auch nicht zum vermehrten Einstrom von APCs und somit nicht zu einer erhöhten Antigenität im Sinne von Hallorans „Response-to-Injury“-Hypothese. Möglicherweise war der Zeitpunkt 24 Stunden nach der Transplantation aber noch zu früh, um eine erhöhte Antigenität des stärker geschädigten Transplantats nachzuweisen, und es kommt erst im weiteren Verlauf zu vermehrter Rekrutierung von APCs. In einer anderen Studie an syngen transplantierten Ratten konnte beispielsweise ein Anstieg dendritischer Zellen erst eine Woche nach der Transplantation aufzeigt werden (121). Zahlreiche neuere Untersuchungen konnten außerdem einen wesentlichen Anteil von APCs an der Initiierung spezifischer Abstoßungsreaktionen aufzeigen (70, 71). Der massive Anstieg ED-1+-Monozyten/Makrophagen nach langen kalten Ischämiezeiten spricht - wie sich bereits im ersten Teil der Studie angedeutet hatte - für eine wesentliche Beteiligung dieser Zellen an der steigenden Gewebeschädigung.

Der Anstieg der VCAM-1-Expression im Bereich der perivaskulären Infiltrate von Monozyten/Makrophagen weist wiederum auf die Bedeutung von VCAM-1 für den Gefäßaustritt dieser Zellen hin. Der parallel dazu eintretende Intensitätsverlust von PECAM-1 auf dem Gefäßendothel nach langen Ischämiezeiten und Übergang in eine lückenhaftere Verteilung zeigt einen Anstieg vaskulärer Schäden auf. Lange kalte Ischämiezeiten von mehr als 6 Stunden waren vermutlich entscheidender Auslöser für die vaskulären Läsionen, während unter anderen Bedingungen bei humanen Transplantationen und im Rahmen entzündlicher Nierenerkrankungen die Expression von PECAM-1 unbeeinflusst blieb (101, 104). Interessant sind in diesem Zusammenhang neuere Untersuchungen zur Gefäßdichte und Angiogenese, die zeigen konnten, dass es nach ischämischer Schädigung in nativen Nieren zum Verlust peritubulärer Kapillaren und anschließender Fibrosierung in diesen Bereichen kommen kann (122). Möglicherweise können derartige Schäden auch entscheidend zur Progression der chronischen allogenen Nephropathie beitragen (123).

Zusätzliche Hinweise für eine Endothelschädigung ergaben sich auch aus der vermehrten Expression von TF insbesondere auf Endothelzellen aber auch im Bereich der Media und auf infiltrierenden Leukozyten in der Umgebung dieser

Gefäße. Ähnliche Verteilungsmuster für TF waren auch in anderen experimentellen und klinischen Studien nach IR in nativen und transplantierten Nieren beobachtet worden (66, 67, 68). Dabei konnte mit Antisense-ODN gegen TF eine deutliche Reduktion der Schädigung nach IR in Ratten erzielt werden (67). Auch in der Xenotransplantation von Herzen, bei der die vaskuläre Rejektion mit Ablagerung von Fibrin während der hyperakuten Abstoßung im Vordergrund steht, konnte eine deutliche Hochregulation von TF auf Endothel und infiltrierenden Zellen nachgewiesen werden (124). Neben prothrombotischen Effekten ist die Beteiligung von TF an Adhäsion und Migration der Entzündungszellen nach langen kalten Ischämiezeiten von besonderer Bedeutung. In vitro konnte gezeigt werden, dass Monozyten/Makrophagen über TF mit Endothel interagieren. Dabei stellte sich heraus, dass aktivierte Monozyten mittels TF durch reverse Transmigration den Ort der Schädigung wieder verlassen können und so zu den lokalen Lymphknoten gelangen (64). Daraus ergibt sich möglicherweise auch ein wichtiger Anteil von TF an Vorgängen der indirekten Antigenpräsentation. Da auch nach langen kalten Ischämiezeiten nicht vermehrt Fibrinthromben in den Transplantaten auftraten, ist anzunehmen, dass TF 24 Stunden nach der Transplantation weniger in thrombotische Prozesse, sondern eher in Abläufe der Monozytenmigration involviert war.

Der deutliche Anstieg von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von der kalten Aufbewahrungsdauer der Organe parallel zur Verstärkung der Schäden unterstreicht die Bedeutung dieser Zellen nicht nur für regenerative, sondern auch für schädigende Prozesse nach IR. Für eine führende Rolle der Monozyten in der frühen entzündlichen Antwort auf ischämische Schädigung nach Transplantation spricht auch der ausbleibende Anstieg neutrophiler Zellinfiltrate trotz zunehmender Traumatisierung der Organe nach langen Ischämiezeiten. Welche genauen Mechanismen bei der durch Monozyten vermittelten Schädigung nach IR und Transplantation zum Tragen kommen, muss allerdings noch näher untersucht werden. In vitro konnte gezeigt werden, dass Monozyten bei Kontakt mit Endothelzellen vermehrt Metalloproteinasen sezernieren können und so unter anderem zur Zerstörung der extrazellulären Matrix beitragen können (125). Einige klinische und experimentelle Untersuchungen konnten bereits die wesentliche Bedeutung der Monozyten/Makrophagen für die Entstehung von chronischer Allograft Nephropathie und Transplantatversagen aufzeigen (126, 127). Dabei

ergab die Auswertung der Erstbiopsien nach der Transplantation, dass schon in diesen frühen Biopsien signifikant höhere monozytäre Infiltrationsraten mit einem späteren Auftreten progredient chronischer Rejektion vergesellschaftet waren (127).

Die Zunahme vaskulärer Schäden in Kombination mit massiven monozytären Infiltraten und das Ausbleiben anderer entzündlicher Reaktion legen die Vermutung nahe, dass diese Faktoren hauptverantwortlich für die resultierenden tubulären Schäden und den vermutlich anschließenden Verlust von Nephronen nach langen kalten Ischämiezeiten waren.

6.3 Vaskuläre Schädigung im Kontext der „Response to injury“-Hypothese

Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien und zahlreichen klinischen Untersuchungen lassen einen Zusammenhang zwischen unspezifischer Schädigung des transplantierten Organs durch Ischämie/Reperfusion und dem Auftreten verzögert einsetzender Transplantatfunktion (DGF) (9, 77) und akuter Rejektionen (78) in der Frühphase nach Transplantation sowie indirekt zur Entstehung der chronischen Transplantatnephropathie (117, 118, 128) vermuten. Den negativen Effekt unspezifischer Organschädigung auf Kurz- und Langzeitüberleben des transplantierten Organs erklärte Philip Halloran durch die „Response-to-Injury“-Hypothese (95), die von vielen anderen Untersuchern übernommen wurde (96). Danach wird vermutet, dass die Schädigung durch IR zu erhöhter Antigenität des Transplantats und amplifizierter alloreaktiver Abstoßungsreaktion führt. Ausgelöst durch die Gewebeschädigung kommt es zunächst zur Freisetzung proinflammatorischer Substanzen wie freien Radikalen, Interleukinen, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und PAF. Die gesteigerte entzündliche Antwort führt über Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf aktiviertem Endothel zu verstärkter Leukozyteninfiltration. Außerdem kommt es zur vermehrten Expression alloantigener Oberflächenrezeptoren wie den MHC-Klasse-II-Molekülen auf Parenchymzellen des Transplantats. Schließlich resultiert somit aus der zunächst gesteigerten unspezifischen Immunantwort des Empfängers auf die Schädigung vermutlich auch eine verstärkte spezifische Abstoßung des übertragenen Organs. Wie stark Alloantigen-abhängige im Vergleich zu Alloantigen-unabhängigen

Mechanismen an den Vorgängen in der Frühphase nach der Transplantation beteiligt sind, ist bisher jedoch noch weitgehend ungeklärt. Weil Protokollbiopsien innerhalb der ersten Woche nach der Organübertragung nicht durchgeführt werden, um Empfänger und Organ nicht zu gefährden, können klinische Studien nur wenig zur Aufdeckung der Abläufe in diesem frühen Zeitraum beitragen. Deshalb wurde in dieser Studie ein etabliertes tierexperimentelles Modell zur chronischen Abstoßung nach Nierentransplantation gewählt (80). Dabei dienen Lewisratten als Empfänger von Organen aus Lewisratten (isogene Gruppen) bzw. Fischer-Ratten (allogene Gruppen). Dieses sogenannte „Low-Responder“-Modell erschien für die Untersuchung der Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens, der Regeneration und der beginnenden Rejektion als geeigneter gegenüber der Kombination von „High-Responder“-Tierstämmen, bei denen starke Immunglobulinablagerungen im Rahmen früher vaskulärer Rejektion eine fulminante inflammatorische Antwort auslösen, so dass die Tiere innerhalb von zwei Wochen an urämischem Nierenversagen versterben (129).

Im zeitlichen Verlauf nach IR und Transplantation wie auch nach zunehmender kalter Aufbewahrungszeit der Organe hatten sich Monozyten/Makrophagen als vorherrschende Zellpopulation im Nierengewebe herausgestellt. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Monozyten/Makrophagen sowohl an regenerativen Abläufen (94) als auch an der Schädigung im Rahmen akuter (112, 127) und chronischer Ereignisse (126, 130) nach Transplantation beteiligt sein können. Wie bereits angesprochen kommt in diesem Zusammenhang der Fähigkeit von Monozyten/Makrophagen je nach den vorherrschenden Bedingungen in der unmittelbaren Umgebung entweder weitere Gewebeschäden hervorzurufen oder reparative Mechanismen zu steuern – dem sogenannten „Macrophage Programming“ - besondere Bedeutung zu (111).

Verzögert einsetzende Organfunktion ist ein häufiges Phänomen nach ischämischer Schädigung im Rahmen der Transplantation und geht morphologisch meist mit dem Bild der akuten tubulären Nekrose (ATN) einher (78). Für die regenerativen Vorgänge nach ATN sind Makrophagen wegen ihrer Fähigkeit Wachstumsfaktoren wie transforming growth factor α und β (TGF- α , TGF- β), insulinlike growth factor 1 (IGF-1), EGF-like growth factor (EGF-like) fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF) und platelet activating factor (PAF) zu sezernieren von zentraler Bedeutung (94, 111). Dabei

bilden Monozyten mit Lymphozyten und Parenchymzellen eine Art Netzwerk mit hohem regenerativem Potential: EGF und TGF- α fördern die Regeneration von Epithelzellen (131), FGF fördert die Revaskularisierung (132), PDGF und PAF wirken chemotaktisch, und TGF- β hat zentrale Bedeutung beim Umbau der extrazellulären Matrix (133). Die Vielzahl der beteiligten Chemokine und Wachstumsfaktoren verdeutlicht die Komplexität der Leukozyteninteraktion während des Regenerationsprozesses. Die Geschwindigkeit der ablaufenden Heilungsprozesse führt in der Regel nicht zur vollständigen Restitution des Parenchymgewebes sondern zur Ausbildung fibrösen Narbengewebes, welches durch einen Überschuss an Strukturen der extrazellulären Matrix gekennzeichnet ist (134). Auch nach ischämischer Schädigung und Transplantation kam es innerhalb der ersten Woche parallel zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten zunächst zur Funktionsverschlechterung mit anschließender Regeneration, während die Infiltration durch monozytäre Zellen weiter zunahm. Der ausbleibende Rückgang monozytärer Zellen im Nierenparenchym trotz Regeneration der Nierenfunktion deutet auf ein mögliches Missverhältnis zwischen reparativen und schädigenden Prozessen hin, was eventuell die Auslösung der spezifischen Abstoßungsreaktion in allogenen transplantierten Tieren begünstigte.

Nach Verlängerung der kalten Aufbewahrungszeit der Organe zeigte sich neben zunehmender tubulärer Schädigung und massiv gesteigerter Monozyteninfiltration auch ein erheblicher Anstieg der vaskulären Schäden. Möglicherweise ist die Endothelschädigung in der Frühphase nach der Transplantation auch für die Progredienz der chronischen Abstoßung und des späteren Organversagens von Bedeutung. Denn neben fortschreitender interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie ist vornehmlich die zunehmende Vaskulopathie arterieller Gefäße für das chronische Transplantatversagen verantwortlich (135). Intravasale Ultraschalluntersuchungen im Rahmen chronischer Rejektion bei transplantierten Herzen konnten zeigen, dass Umbauprozesse in perivaskulären Bereichen der Arterien zur Schrumpfung der Gefäße beitragen (136). Dabei umgeben Makrophagen und Lymphozyten die Arterien manschettenartig. Während nach akuter Schädigung die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus diesen Zellen regenerativ wirkt, kommt es bei chronischer Einwirkung zur Vermehrung der extrazellulären Matrix. Daraus resultieren Vernarbungen der Adventitia, gefolgt von Lumeneinengung und Elastizitätsverlust (130, 137). Auch am Fortschreiten

der chronischen allogenen Nephropathie haben Gefäßveränderungen wichtigen Anteil (79, 138, 139). In transplantierten Nieren stehen allerdings die Verdickung und Fibrosierung der arteriellen Intima im Vordergrund (79, 138). Dabei ähneln die vaskulären Veränderungen physiologischen Alterungsprozessen in der Niere und atherosklerotischen Umbauprozessen (139, 140). Es ist aber erwiesen, dass auch in der Pathogenese der Atherosklerose Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen in der Gefäßwand spielen (141). Bei diesen Abläufen hat auch VCAM-1 für die Interaktion von Monozyten und Endothelzellen wesentliche Bedeutung (142). Die initialen vaskulären Schäden unmittelbar nach der Reperfusion in Folge ischämischer Schädigung sind dabei vielleicht von entscheidender für die später auftretenden entzündlichen Gefäßveränderungen im Rahmen der chronischen Abstoßung.

6.4 Perspektiven und mögliche therapeutische Konsequenzen

Die Schädigung durch lange kalte Aufbewahrung und anschließende Reperfusion des Organs hat in der kadaverischen Nierentransplantation bedeutenden Einfluss auf Organfunktion und immunologische Abstoßung in der akuten Phase nach der Transplantation (9, 77, 78, 115). Außerdem reduzieren lange Ischämiezeiten vor der Implantation signifikant das Langzeitüberleben des Transplantats (8, 114). Im Tiermodell führt ischämische Schädigung unabhängig von Alloantigen-abhängigen Mechanismen zu ähnlichen Veränderungen wie bei der chronischen Rejektion in allogenen Transplantaten (128). In neueren experimentellen Studien konnten synergistische Effekte von Alloantigen-abhängigen und –unabhängigen Faktoren bei der Progredienz der chronischen Schädigung transplantierte Nieren festgestellt werden (81).

Die Ergebnisse aus den Tierexperimenten dieser Studie haben gezeigt, dass bereits in der ersten Woche nach der Transplantation wichtige Phasen tubulärer und vaskulärer Schädigung gefolgt von regenerativen Prozessen ablaufen. Es konnte gezeigt werden, dass die entzündliche Antwort nach IR und Transplantation durch komplexe Interaktion von Leukozyten untereinander und mit Endothelzellen über eine Vielzahl unterschiedlicher Adhäsionsmechanismen erfolgt. Zahlreiche Ansätze zur Intervention auf der Ebene der Leukozytenadhäsion konnten bereits Erfolge in Bezug auf akute Schädigungen und chronisches Organversagen erzielen. Durch Blockade auf Ebene der

Selektine (23) und der Liganden ICAM-1/LFA-1 (24, 26, 29) konnten positive Effekte erzielt werden. Die zentrale Funktion des Endothels für die Regulation des Leukozytenaustritts ins Gewebe und die Langzeitbedeutung für die chronische Rejektion durch Blockade dieser Funktion mittels Antisense-Oligonukleotiden gegen ICAM-1 konnte in anderen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ebenfalls gezeigt werden (143). Unterschiede bei der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie mögliche Redundanz dieser Mechanismen könnten erklären, warum Anti-Adhäsionsstrategien mit Antikörpern gegen ICAM-1 in klinischen Studien keinen Benefit in Bezug auf akute Rejektionsereignisse und verzögert einsetzende Organfunktion brachten (30). Die vorherrschende Infiltration von Monozyten/Makrophagen nach zunehmenden kalten Ischämiezeiten stützt diese Theorie, weil diese Zellen wahrscheinlich hauptsächlich über VCAM-1/VLA-4 aus den Gefäßen austraten (55). Die Blockade der Interaktion von VCAM-1 und VLA-4 bietet folglich weitere therapeutische Möglichkeiten, insbesondere weil diese Liganden an mehreren Schritten der Adhäsionskaskade beteiligt sind (53). Hinzu kommt, dass unter dem Einfluss zunehmender Gefäßschädigung bei ansteigenden Ischämiezeiten über Tissue Factor vermutlich weitere Adhäsionswege für Monozyten beteiligt waren (64). Durch Verhinderung der Expression von TF mittels Antisense-Oligonukleotiden konnte im Tierexperiment bereits eine deutliche Reduktion der Schäden nach IR erreicht werden, wodurch weitere Interventionsmöglichkeiten aufgezeigt wurden (67). Da TF neben der Migration von Leukozyten vor allem auch an der Aktivierung der Blutgerinnung (63) beteiligt ist, bieten sich auch hier optimale Therapieoptionen für die kadaverische Transplantation.

Der große Einfluss von Monozyten/Makrophagen an Vorgängen in der akuten Phase nach der Transplantation (112) und im Rahmen der chronischen Abstoßung (126, 127) bietet ebenfalls mögliche Ansätze zur Intervention. Im Tiermodell konnte durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors von Makrophagen und Monozyten das Auftreten der funktionellen und morphologischen Veränderungen bei chronischer Rejektion verhindert werden (126). Die Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf lassen allerdings vermuten, dass innerhalb der ersten Woche nach der Transplantation sowohl schädigende als auch wichtige regenerative Einflüsse von Monozyten/Makrophagen ausgingen. Von entscheidender Bedeutung bei diesen Prozessen ist vermutlich die Ausschüttung

zahlreicher unterschiedlicher Wachstumsfaktoren aus diesen Zellen (144). Im Tiermodell konnten für die Wachstumsfaktoren EGF (145), FGF (146), TGF- β 1 (147) und HGF (148) positive Effekte auf die tubuläre Regeneration, Hämodynamik und Funktion in der akuten Phase nach IR nachgewiesen werden. Die Wirkungen der einzelnen Wachstumsfaktoren unterscheiden sich aber erheblich bei akuten Ereignissen von denen im Rahmen chronischer Prozesse. So spielt unter anderem TGF- β 1 eine wichtige Rolle für die Progredienz der chronischen Abstoßung beim Umbau der extrazellulären Matrix (149). Der Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Akutphase nach der Transplantation oder bei der Aufbewahrung des Organs bietet demnach möglicherweise weitere therapeutische Optionen.

Einen weiteren möglichen Angriffspunkt bietet vermutlich der „indirekte“ Weg der Alloantigen-Präsentation über APCs des Empfängers. Wie bereits beschrieben, wird dieser Form der Auslösung einer spezifischen Immunantwort wichtige Bedeutung beim Ablauf chronischer Abstoßungsvorgänge zugesprochen (70). Insbesondere Strategien, die zur Blockade kostimulatorischer Signale bei der T-Zell-Aktivierung durch APCs wie der Interaktion von CD28 mit B7 oder von CD40L mit CD40 führen, zeigten schon erste vielversprechende Erfolge in tierexperimentellen Studien (113,150, 151).

Die deutliche Zunahme vaskulärer und tubulärer Schäden nach längeren kalten Ischämiezeiten könnte eventuell auch durch alternative Aufbewahrungsmethoden wie die maschinelle Perfusion des Organs gemildert werden (152). Beim Vergleich der pulsatilen maschinellen Perfusion des Transplantats mit der Technik des „cold flush“ durch UW-Lösung und anschließender kalter Aufbewahrung konnten geringeres Auftreten verzögerter Organfunktion und höhere Ein- und Zwei-Jahres-Überlebensraten festgestellt werden (153).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben einen tieferen Einblick in die entzündlichen Vorgänge nach IR und Transplantation während der akuten Phase. Aus den Erkenntnissen lassen sich neue Ansätze ableiten für weitere experimentelle Studien auf diesem Gebiet und für die Entwicklung von Therapien, die das Auftreten verzögerter Organfunktion und möglicherweise auch akuter sowie chronischer Rejektionsereignisse verringern können. Durch neue therapeutische Möglichkeiten könnte außerdem eine Dosisreduktion anderer nephrotoxischer Immunsuppressiva erreicht werden (154).

7 Zusammenfassung

Die Schädigung des Organs durch lange kalte Aufbewahrung und Reperfusion nach der Implantation im Rahmen der kadaverischen Transplantation hat bedeutenden Anteil an der Pathogenese verzögert einsetzender Organfunktion und Auswirkungen auf das Langzeitüberleben des Transplantats. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss unspezifischer Schädigung durch IR verglichen mit spezifischen Alloantigen-abhängigen Mechanismen während der frühen Phase nach der Transplantation zu bestimmen. Außerdem sollte geklärt werden, ob längere kalte Aufbewahrung die Schäden und die entzündliche Reaktion verstärkt sowie eine höhere Immunogenität im Transplantat hervorruft.

1. Nach vorausgegangener vierstündiger kalter Ischämiezeit wurden Organe aus syngen (Lew/Lew) und allogenen (Lew/F344) transplantierten Ratten an 8 aufeinander folgenden Zeitpunkten innerhalb der ersten 10 Tage zu immunhistochemischen und morphologischen Veränderungen untersucht. Parallel dazu wurden Nierenfunktionsparameter an diesen Zeitpunkten im Serum bestimmt.

2. In weiteren Gruppen wurden syngen (Lew/Lew) transplantierte Organe 24 Stunden nach der Transplantation untersucht, die zuvor ansteigenden kalten Ischämiezeiten zwischen 2 und 48 Stunden ausgesetzt wurden. Auch bei diesen Tieren wurden immunhistochemische, morphologische und funktionelle Veränderungen ermittelt.

3. Im zeitlichen Verlauf zeigten sich bis 7 Tage nach der Transplantation keine wesentlichen Unterschiede zu Nierenfunktion, Morphologie, Zellinfiltration und Expression von Adhäsionsmolekülen zwischen allogenen und isogenen Gruppen. Die zunächst eintretende Verschlechterung der Nierenfunktion war begleitet von einem Einstrom Neutrophiler und monozytärer Zellen und morphologischen Veränderungen im Sinne von ATN. Unter zunehmender Infiltration von Monozyten/Makrophagen kam es funktionell und morphologisch zur Regeneration. Nach 7 bis 10 Tagen kam es in allogenen transplantierten Organen zur zellulären und vaskulären Rejektion.

4. Räumliche Verteilungsmuster und zeitlicher Verlauf der Zellinfiltration und Expression von Adhäsionsmolekülen ließen vermuten, dass Neutrophile

vornehmlich über ICAM-1/LFA-1 und Monozyten/Makrophagen in erster Linie über VCAM-1/VLA-4 aus dem Gefäßsystem austraten.

5. Gabe von Cyclosporin A, gemäß Standard dosiert, führte zu signifikanter Reduktion ED-1-positiver Makrophagen nach 10 Tagen, während niedrige Dosis lediglich eine leicht geringere Infiltration zur Folge hatte. Der Anteil des aktivierten Makrophagensubtyps ED-2 wurde durch CsA aber nicht beeinflusst.

6. Ansteigende kalte Aufbewahrung des Organs führte zu größerer vaskulärer Schädigung, die sich durch abnehmende Intensität und lückenhaftere Verteilung von PECAM-1 auf dem Endothel äußerte. Hinzu kam eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle. Zunahme der Intensität von TF auf Endothel und infiltrierenden Leukozyten deutete neben gesteigerter Thrombogenese auf alternative Adhäsionsmechanismen hin. Morphologisch zeigte sich eine Zunahme tubulärer Schäden, ohne dass es zu einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion kam.

7. ED-1-positive Monozyten/Makrophagen waren die einzige Zellpopulation, deren Zellzahl 24 Stunden nach der Transplantation in den Nieren nach langer kalter Ischämie und bei zunehmenden Schäden signifikant anstieg. Neutrophile und antigenpräsentierende Zellen zeigten keine weitere Zunahme der Infiltration nach längerer Aufbewahrung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der ersten 10 Tage nach der Transplantation wichtige Phasen der Gewebeschädigung und Regeneration ablaufen - ausgelöst durch kalte Aufbewahrung und anschließende Reperfusion und weitestgehend ohne Beteiligung Alloantigen-abhängiger Faktoren. Dabei waren nicht nur neutrophile Granulozyten wichtige Mediatoren der Gewebeschädigung sondern vorwiegend auch Monozyten/Makrophagen. Allerdings waren Monozyten/Makrophagen auch der vorherrschende Zelltyp bei anschließenden regenerativen Prozessen. Trotz ansteigender Schäden bei zunehmender Aufbewahrungsdauer kam es 24 Stunden nach der Transplantation noch nicht zu erhöhter Antigenität. Die Vielzahl involvierter Adhäsionsmechanismen bei den ablaufenden Prozessen in der Frühphase nach der Transplantation bieten neue Möglichkeiten der therapeutischen Intervention, um eine bessere Organfunktion, weniger akute Abstoßungsereignisse und langfristig ein längeres Transplantatüberleben zu erreichen.

8 Literaturverzeichnis

1. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med.* 2000 Mar 2, *342(9)*: S.605-12.
2. Cyclosporin a as sole immunosuppressive agent in recipients of kidney allografts from cadaver donors. Preliminary results of a European multicentre trial. *Lancet.* 1982 Jul 10, *2(8289)*: S.57-60.
3. Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, LaQuaglia MP, Tolkoff-Rubin N, Rubin RH, Herrin JT, Russell PS: Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation.* 1981 Dec, *32(6)*: S.535-9.
4. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH: Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet.* 1999 Mar 27, *353(9158)*: S.1083-91.
5. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB: Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002 Feb 21, *346(8)*: S.580-90.
6. Cecka JM: The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 1999, *1-21*.
7. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S: High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995 Aug 10, *333(6)*: S.333-6.
8. Tullius SG, Tilney NL: Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation.* 1995 Feb 15, *59(3)*: S.313-8.
9. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL: Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997 Apr 15, *63(7)*: S.968-74.
10. Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan, *10(1)*: S.167-81.
11. Smits JM, van Houwelingen HC, De Meester J, le Cessie S, Persijn GG, Claas FH, Frei U: Permanent detrimental effect of nonimmunological factors on

- long-term renal graft survival: a parsimonious model of time-dependency. *Transplantation*. 2000 Jul 27, *70*(2): S.317-23.
12. Land W, Messmer K: The Impact of Ischemia / Reperfusion Injury on Specific and Non-Specific, Early and Late Chronic Events After Organ Transplantation. *Transplantation Reviews*. 1996 April, *Vol 10, No2*: S.108-27.
 13. Menger MD, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol*. 1992 Dec, *263*(6 Pt 2): S.H1892-900.
 14. Williams GM: Quantitation of free radical-mediated reperfusion injury in renal transplantation. *Methods Enzymol*. 1990, *186*: S.748-51.
 15. Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Messmer K, Land W: The impact of free radical-mediated reperfusion injury on acute and chronic rejection events following cadaveric renal transplantation. *Clin Transpl*. 1993, S.219-32.
 16. Davenport A, Hopton M, Bolton C: Measurement of malondialdehyde as a marker of oxygen free radical production during renal allograft transplantation and the effect on early graft function. *Clin Transplant*. 1995 Jun, *9*(3 Pt 1): S.171-5.
 17. Introna M, Breviario F, d'Aniello E, Luchetti MM, Vidal V, Dejana E, Mantovani A: Cytokine regulation of endothelial cell function. *Behring Inst Mitt*. 1993 Aug, (92): S.23-9.
 18. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S: Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol*. 1996, *14*: S.155-77.
 19. Connolly JK, Guy SP, Parrott NR: Cytokine gene expression and eicosanoid production in renal reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1995 Oct, *27*(5): S.2816-8.
 20. Solez K, Racusen LC, Abdulkareem F, Kemeny E, von Willebrand E, Truong LD: Adhesion molecules and rejection of renal allografts. *Kidney Int*. 1997 May, *51*(5): S.1476-80.
 21. Rabb H, O'Meara YM, Maderna P, Coleman P, Brady HR: Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1997 May, *51*(5): S.1463-8.

22. Fuggle SV, Koo DD: Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation*. 1998 Mar 27, *65*(6): S.763-9.
23. Nemoto T, Burne MJ, Daniels F, O'Donnell MP, Crosson J, Berens K, Issekutz A, Kasiske BL, Keane WF, Rabb H: Small molecule selectin ligand inhibition improves outcome in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2001 Dec, *60*(6): S.2205-14.
24. Cosimi AB, Conti D, Delmonico FL, Preffer FI, Wee SL, Rothlein R, Faanes R, Colvin RB: In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J Immunol*. 1990 Jun 15, *144*(12): S.4604-12.
25. Haller H, Maasch C, Dragun D, Wellner M, Haller H, Dragun D, Miethke A, Park JK, Weis A, Lippoldt A, Gross V, Luft FC: Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int*. 1996 Aug, *50*(2): S.473-80.
26. Dragun D, Tullius SG, Park JK, Maasch C, Lukitsch I, Lippoldt A, Gross V, Luft FC, Haller H: ICAM-1 antisense oligodesoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation. *Kidney Int*. 1998 Aug, *54*(2): S.590-602.
27. Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV: Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *Am J Pathol*. 1998 Aug, *153*(2): S.557-66.
28. Gaber LW, Gaber AO, Tolley EA, Hathaway DK: Prediction by postrevascularization biopsies of cadaveric kidney allografts of rejection, graft loss, and preservation nephropathy. *Transplantation*. 1992 Jun, *53*(6): S.1219-25.
29. Hourmant M, Bedrossian J, Durand D, Lebranchu Y, Renoult E, Caudrelier P, Buffet R, Souillou JP: A randomized multicenter trial comparing leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody with rabbit antithymocyte globulin as induction treatment in first kidney transplantations. *Transplantation*. 1996 Dec 15, *62*(11): S.1565-70.
30. Salmela K, Wramner L, Ekberg H, Hauser I, Bentsdal O, Lins LE, Isoniemi H, Backman L, Persson N, Neumayer HH, Jorgensen PF, Spieker C, Hendry B, Nicholls A, Kirste G, Hasche G: A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute

- rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group. *Transplantation*. 1999 Mar 15, *67*(5): S.729-36.
31. Brown EJ: Adhesive interactions in the immune system. *Trends in Cell Biology*. 1997 July, *Vol. 7*: S.289-95.
 32. Muller WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003 Jun, *24*(6): S.327-34.
 33. Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J Clin Invest*. 1993 Feb, *91*(2): S.379-87.
 34. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA: Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996 Jul 1, *88*(1): S.146-57.
 35. Dunon D, Piali L, Imhof BA: To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Oct, *8*(5): S.714-23.
 36. Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, Beaudet AL: Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med*. 1996 May 1, *183*(5): S.2329-36.
 37. Stewart M, Thiel M, Hogg N: Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Oct, *7*(5): S.690-6.
 38. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28, *76*(2): S.301-14.
 39. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV: Regulation of vascular integrins. *Blood*. 1993 Jun 1, *81*(11): S.2827-43.
 40. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA: The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*. 1995 Mar, *128*(6): S.1243-53.
 41. Hemler ME, Lobb RR: The leukocyte beta 1 integrins. *Curr Opin Hematol*. 1995 Jan, *2*(1): S.61-7.
 42. Lub M, van Kooyk Y, Figdor CG: Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today*. 1995 Oct, *16*(10): S.479-83.
 43. Diamond MS, Springer TA: A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18)

- molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol.* 1993 Jan, *120*(2): S.545-56.
44. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990 Aug 2, *346*(6283): S.425-34.
 45. Marlin SD, Springer TA: Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987 Dec 4, *51*(5): S.813-9.
 46. van de Stolpe A, van der Saag PT: Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996 Jan, *74*(1): S.13-33.
 47. Wuthrich RP: Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Dec, *3*(6): S.1201-11.
 48. Xu H, Bickford JK, Luther E, Carpenito C, Takei F, Springer TA: Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J Immunol.* 1996 Jun 15, *156*(12): S.4909-14.
 49. Issekutz AC, Rowter D, Springer TA: Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol.* 1999 Jan, *65*(1): S.117-26.
 50. de Fougerolles AR, Qin X, Springer TA: Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med.* 1994 Feb 1, *179*(2): S.619-29.
 51. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989 Dec 22, *59*(6): S.1203-11.
 52. Siegelman MH, Stanescu D, Estess P: The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J Clin Invest.* 2000 Mar, *105*(5): S.683-91.
 53. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC: alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995 Feb 10, *80*(3): S.413-22.
 54. Shang XZ, Issekutz AC: Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *Eur J Immunol.* 1998 Jun, *28*(6):

S.1970-9.

55. Chuluyan HE, Osborn L, Lobb R, Issekutz AC: Domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) both support very late activation antigen-4 (CD49d/CD29)-dependent monocyte transendothelial migration. *J Immunol.* 1995 Sep 15, *155(6)*: S.3135-4.
56. van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R, ten Klooster JP, Zwaginga JJ, Hordijk PL: VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Aug, *285(2)*: S.343-52.
57. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993 Aug 1, *178(2)*: S.449-60.
58. Thompson RD, Wakelin MW, Larbi KY, Dewar A, Asimakopoulos G, Horton MA, Nakada MT, Nourshargh S: Divergent effects of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo. *J Immunol.* 2000 Jul 1, *165(1)*: S.426-34.
59. Druid H, Enestrom S, Rammer L: Effect of anticoagulation upon nephron obstruction in experimental acute ischaemic renal failure. A morphological study. *Int J Exp Pathol.* 1998 Feb, *79(1)*: S.55-66.
60. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost.* 1991 Jul 12, *66(1)*: S.67-79.
61. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989 May, *134(5)*: S.1087-97.
62. Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, Mackman N, Quehenberger P, Haase M, Luther T, Muller M, Bohrer H, Greten J, et al: Mechanism of the tumor necrosis factor alpha-mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3, *270(44)*: S.26419-32.
63. Nemerson Y: Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988 Jan, *71(1)*: S.1-8.
64. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA: Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood.* 1998 Dec 1, *92(11)*: S.4167-77.
65. Fan ST, Mackman N, Cui MZ, Edgington TS: Integrin regulation of an

- inflammatory effector gene. Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of beta 1 or alpha 4 integrin chains. *J Immunol.* 1995 Apr 1, *154*(7): S.3266-74.
66. Ushigome H, Sano H, Okamoto M, Kadotani Y, Nakamura K, Akioka K, Yoshimura R, Ohmori Y, Yoshimura N: The role of tissue factor in renal ischemic reperfusion injury of the rat. *J Surg Res.* 2002 Feb, *102*(2): S.102-9.
 67. Matsuyama M, Yoshimura R, Akioka K, Okamoto M, Ushigome H, Kadotani Y, Nakatani T, Yoshimura N: Tissue factor antisense oligonucleotides prevent renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2003 Sep 15, *76*(5): S.786-91.
 68. Bukovsky A, Labarrere CA, Haag B, Carter C, Faulk WP: Tissue factor in normal and transplanted human kidneys. *Transplantation.* 1992 Oct, *54*(4): S.644-50.
 69. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG: CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med.* 1996 Nov 1, *184*(5): S.2013-8.
 70. Sayegh M: Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int.* 1999 Nov, *56*(5): S.1967-79.
 71. Fox A, Harrison LC: Innate immunity and graft rejection. *Immunol Rev.* 2000 Feb, *173*: S.141-7.
 72. Austyn JM, Larsen CP: Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation.* 1990 Jan, *49*(1): S.1-7.
 73. Sayegh MH, Turka LA: The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med.* 1998 Jun 18, *338*(25): S.1813-21.
 74. Batchelor JR: Transplant immunology. *Transplant Proc.* 1994 Aug, *26*(4): S.1875-6.
 75. Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, Auchincloss H Jr: Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med.* 1996 Feb 1, *183*(2): S.699-703.
 76. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH: Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation.* 1997 Sep 27, *64*(6): S.795-800.

77. Samaniego M, Baldwin WM, Sanfilippo F: Delayed graft function: immediate and late impact. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997 Nov, 6(6): S.533-7.
78. Lechevallier E, Dussol B, Luccioni A, Thirion X, Vacher-Copomat H, Jaber K, Brunet P, Leonetti F, Lavelle O, Coulange C, Berland Y: Posttransplantation acute tubular necrosis: risk factors and implications for graft survival. *Am J Kidney Dis*. 1998 Dec, 32(6): S.984-91.
79. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999 Feb, 55(2): S.713-23.
80. Paul LC: Animal models of chronic heart and kidney allograft rejection. *Transplant Proc*. 1993 Apr, 25(2): S.2080-1.
81. Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, Lloberas N, Alsina J, Grinyo JM: Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy. *Am J Pathol*. 2003 Jan, 162(1): S.127-37.
82. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, Neuhaus P, Hancock WW, Tilney NL: Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov, 12(11): S.2474-81.
83. Kauffman HM, Bennett LE, McBride MA, Ellison MD: The expanded donor. *Transplant Rev*. 1997, 11: S.165-190.
84. Epstein M: Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Aug, 7(8): S.1106-22.
85. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Gores PF, Gruessner RW, Najarian JS: Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation*. 1993 May, 55(5): S.993-5.
86. van Saase JL, van der Woude FJ, Thorogood J, Hollander AA, van Es LA, Weening JJ, van Bockel JH, Bruijn JA: The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation*. 1995 May, 1559(9): S.1280-5.

87. Held PJ, Kahan BD, Hunsicker LG, Liska D, Wolfe RA, Port FK, Gaylin DS, Garcia JR, Agodoa LY, Krakauer H: The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N Engl J Med.* 1994 Sep 22, *331(12)*: S.765-70.
88. Connolly JK, Dyer PA, Martin S, Parrott NR, Pearson RC, Johnson RW: Importance of minimizing HLA-DR mismatch and cold preservation time in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* 1996 Mar, *1561(5)*: S.709-14.
89. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW: Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin Transplant.* 1997 Oct, *11(5 Pt 1)*: S. 366-72.
90. Homan WP, Fabre JW, Williams KA, Millard PR, Morris PJ: Studies on the immunosuppressive properties of cyclosporin a in rats receiving renal allografts. *Transplantation.* 1980 May, *29(5)*: S. 361-6.
91. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence R, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol.* 1989 May, *256(5 Pt 2)*: S.794-802.
92. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE: Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1. *Kidney Int.* 1995 Nov, *48(5)*: S.1584-91.
93. Rabb H, Mendiola CC, Dietz J, Saba SR, Issekutz TB, Abanilla F, Bonventre JV, Ramirez G: Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol.* 1994 Dec. *267(6 Pt 2)*: S.1052-8.
94. Ghielli M, Verstrepen W, Nouwen E, De Broe ME: Regeneration processes in the kidney after acute injury: role of infiltrating cells. *Exp Nephrol.* 1998 Nov-Dec, *6(6)*: S.502-7.
95. Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM: The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar, *29(1-2)*: S.79-81.
96. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR: Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process. *Kidney Int.* 1999 Jun, *55(6)*: S.2157-68.

97. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K: Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: morphology and pathogenesis. *Medicine (Baltimore)*. 1989 May, 68(3): S.173-87.
98. Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1993 May, 43(5): S.1160-78.
99. Jones DA, Smith CW, Picker LJ, McIntire LV: Neutrophil adhesion to 24-hour IL-1-stimulated endothelial cells under flow conditions. *J Immunol*. 1996 Jul 15, 157(2): S.858-63.
100. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV: Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 18, 91(2): S.812-6.
101. Fuggle SV, Sanderson JB, Gray DW, Richardson A, Morris PJ: Variation in expression of endothelial adhesion molecules in pretransplant and transplanted kidneys--correlation with intragraft events. *Transplantation*. 1993 Jan, 55(1): S.117-23.
102. Gibbs P, Berkley LM, Bolton EM, Briggs JD, Bradley JA: Adhesion molecule expression (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM) in human kidney allografts. *Transpl Immunol*. 1993, 1(2): S.109-13.
103. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O: Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med*. 1994, 45: S.361-78.
104. Hauser IA, Riess R, Hausknecht B, Thuringer H, Sterzel RB: Expression of cell adhesion molecules in primary renal disease and renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Jun, 12(6): S.1122-31.
105. Renkonen R, Turunen JP, Rapola J, Hayry P: Characterization of high endothelial-like properties of peritubular capillary endothelium during acute renal allograft rejection. *Am J Pathol*. 1990 Sep, 137(3): S.643-51.
106. Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME: Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Oct, 15(10): S.1562-74.
107. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, John Swanson S, Hale DA, Mannon RB, Blair PJ, Kirk AD: Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human

- renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2002 Oct, 1574(7): S.916-23.
108. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H: Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001 Nov, 108(9): S.1283-90.
109. De Greef KE, Ysebaert DK, Dauwe S, Persy V, Vercauteren SR, Mey D, De Broe ME: Anti-B7-1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia. *Kidney Int*. 2001 Oct, 60(4): S.1415-27.
110. Johnston B, Walter UM, Issekutz AC, Issekutz TB, Anderson DC, Kubes P: Differential roles of selectins and the alpha4-integrin in acute, subacute, and chronic leukocyte recruitment in vivo. *J Immunol*. 1997 Nov 1, 159(9): S. 4514-23.
111. Erwig LP, Rees AJ: Macrophage activation and programming and its role for macrophage function in glomerular inflammation. *Kidney Blood Press Res*. 1999, 22(1-2): S.21-5.
112. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, Liu B, Jeffery J, Rush DN: Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jul, 10(7): S.1582-9.
113. Roodnat JI, Mulder PG, Van Riemsdijk IC, IJzermans JN, van Gelder T, Weimar W: Ischemia times and donor serum creatinine in relation to renal graft failure. *Transplantation*. 2003 Mar 27, 75(6): S.799-804.
114. Asderakis A, Dyer P, Augustine T, Worthington J, Campbell B, Johnson RW: Effect of cold ischemic time and HLA matching in kidneys coming from "young" and "old" donors: do not leave for tomorrow what you can do tonight. *Transplantation*. 2001 Aug 27, 72(4): S.674-8.
115. Tandon V, Botha JF, Banks J, Pontin AR, Pascoe MD, Kahn D: A tale of two kidneys--how long can a kidney transplant wait? *Clin Transplant*. 2000 Jun, 14(3): S.189-92.
116. Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Heemann UW, Marquet RL, IJzermans JN
Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Heemann UW, Marquet RL, IJzermans JN: Late graft dysfunction after prolonged cold ischemia of the donor kidney: inhibition by cyclosporine. *Transplantation*. 1999 Oct 15, 68(7): S.1004-10.
117. Yilmaz S, Paavonen T, Hayry P: Chronic rejection of rat renal allografts. II.

- The impact of prolonged ischemia time on transplant histology. *Transplantation*. 1992 Apr, *53*(4): S.823-7.
118. Tullius SG, Reutzel-Selke A, Egermann F, Nieminen-Kelha M, Jonas S, Bechstein WO, Volk HD, Neuhaus P: Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jul, *11*(7): S.1317-24.
 119. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, Thorogood J, Hermans J: Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet*. 1992 Jul 18, *340*(8812): S.129-37.
 120. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation*. 1997 Oct 15, *64*(7): S. 945-7.
 121. Penfield JG, Dawidson IA, Ar'Rajab A, Kielar MA, Jeyarajah DR, Lu CY: Syngeneic renal transplantation increases the number of renal dendritic cells in the rat. *Transpl Immunol*. 1999 Dec, *7*(4): S.197-200.
 122. Basile DP: Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004 Jan, *13*(1): S1-7.
 123. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ: Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Mar, *13*(3): S.806-16.
 124. Nagayasu T, Saadi S, Holzknrecht RA, Plummer TB, Platt JL: Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: clues to the pathogenesis of acute vascular rejection. *Transplantation*. 2000 Feb 27, *69*(4): S.475-82.
 125. Amorino GP, Hoover RL: Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol*. 1998 Jan, *152*(1): S.199-207.
 126. Azuma H, Nadeau KC, Ishibashi M, Tilney NL: Prevention of functional, structural, and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation*. 1995 Dec 27, *60*(12): S. 1577-82.
 127. Pilmore HL, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW, Eris JM: Early up-regulation of macrophages and myofibroblasts: a new marker for development of chronic renal allograft rejection. *Transplantation*. 2000 Jun

- 27, 69(12): S.2658-62.
128. Tullius SG, Heemann U, Hancock WW, Azuma H, Tilney NL: Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg.* 1994 Oct, 220(4): S.425-35.
 129. Nagano H, Nadeau KC, Takada M, Kusaka M, Tilney NL: Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation.* 1997 Apr 27, 63(8): S.1101-8.
 130. Libby P, Pober JS: Chronic rejection. *Immunity.* 2001 Apr, 14(4): S.387-97.
 131. Humes HD, Beals TF, Cieslinski DA, Sanchez IO, Page TP: Effects of transforming growth factor-beta, transforming growth factor-alpha, and other growth factors on renal proximal tubule cells. *Lab Invest.* 1991 Apr, 64(4): S.538-45.
 132. Slavin J: Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int.* 1995 May, 19(5): S.431-44.
 133. Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10, 331(19): S.1286-92.
 134. Strutz F, Neilson EG: New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol.* 2003 May, 24(4): S.459-76.
 135. Cosio FG, Pelletier RP, Sedmak DD, Falkenhain ME, Henry ML, Elkhammas EA, Davies EA, Bumgardner GL, Ferguson RM: Pathologic classification of chronic allograft nephropathy: pathogenic and prognostic implications. *Transplantation.* 1999 Mar 15, 67(5): S.690-6.
 136. Schwarzacher SP, Uren NG, Ward MR, Schwarzkopf A, Giannetti N, Hunt S, Fitzgerald PJ, Oesterle SN, Yeung AC: Determinants of coronary remodeling in transplant coronary disease: a simultaneous intravascular ultrasound and Doppler flow study. *Circulation.* 2000 Mar 28, 101(12): S.1384-9.
 137. Pethig K, Heublein B, Wahlers T, Haverich A: Mechanism of luminal narrowing in cardiac allograft vasculopathy: inadequate vascular remodeling rather than intimal hyperplasia is the major predictor of coronary artery stenosis. Working Group on Cardiac Allograft Vasculopathy. *Am Heart J.* 1998 Apr, 135(4): S.628-33.
 138. Solez K, Vincenti F, Filo RS: Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tarolimus

- versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*. 1998 Dec 27, *66*(12): S.1736-40.
139. Koskinen P, Lemstrom K, Hayry P: Chronic rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996 May, *5*(3): S.269-72.
140. Solez K: Graft atherosclerosis and chronic rejection in the kidney. *Transplant Proc*. 1997 Sep, *29*(6): S.2541.
141. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14, *340*(2): S.115-26.
142. Gerszten RE, Lim YC, Ding HT, Snapp K, Kansas G, Dichek DA, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Gimbrone MA Jr, Rosenzweig A, Luscinskas FW: Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells: implications for atherogenesis. *Circ Res*. 1998 May, *482*(8): S.871-8.
143. Dragun D, Lukitsch I, Tullius SG, Qun Y, Park JK, Schneider W, Luft FC, Haller H: Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 with antisense deoxynucleotides prolongs renal isograft survival in the rat. *Kidney Int*. 1998 Dec, *54*(6): S.2113-22.
144. Humes HD, Lake EW, Liu S: Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab*. 1995, *21*(4-5): S.353-65.
145. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C: Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 1989 Dec, *84*(6): S.1757-61.
146. Cuevas P, Martinez-Coso V, Fu X, Orte L, Reimers D, Gimenez-Gallego G, Forssmann WG, Saenz De Tejada I: Fibroblast growth factor protects the kidney against ischemia-reperfusion injury. *Eur J Med Res*. 1999 Oct 15, *4*(10): S.403-10.
147. Docherty NG, Perez-Barriocanal F, Balboa NE, Lopez-Novoa JM: Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1): a potential recovery signal in the post-ischemic kidney. *Ren Fail*, 2002 Jul, *24*(4): S.391-406.
148. Nakatani T, Kim T, Uchida J, Kumata N, Kawashima H, Sugimura K: Hepatocyte growth factor ameliorates renal hemodynamic disorder after ischemia/reperfusion. *Int J Mol Med*. 2002 Aug, *10*(2): S.217-9.
149. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y, Weffer MI: Expression of TGF-beta 1 and

- matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int.* 1996 Dec, *50(6)*: S.1904-13.
150. Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, Sayegh MH: Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996 Oct 29, *93(22)*: S.12439-44.
151. Glysing-Jensen T, Raisanen-Sokolowski A, Sayegh MH, Russell ME: Chronic blockade of CD28-B7-mediated T-cell costimulation by CTLA4Ig reduces intimal thickening in MHC class I and II incompatible mouse heart allografts. *Transplantation*. 1997 Dec 27, *64(12)*: S.1641-5.
152. St Peter SD, Imber CJ, Friend PJ: Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet*. 2002 Feb 16, *359(9306)*: S.604-13.
153. Polyak MM, Arrington BO, Stubenbord WT, Boykin J, Brown T, Jean-Jacques MA, Estevez J, Kapur S, Kinkhabwala M: The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s. *Transplantation*. 2000 Jan 27, *69(2)*: S.249-58.
154. Hong JC, Kahan BD: Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future. *Semin Nephrol*. 2000 Mar, *20(2)*: S.108-25.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
HLA	Human Leukocyte Antigen
IR	Ischämie/Reperfusion
MDA	Malondialdehyd
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
MHC	Major Histocompatibility Complex
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
LFA	Leukocyte Function-associated Antigen
CsA	Cyclosporin A
sLex	Sialyl Lewis X
PSGL	P selectin glycoprotein ligand
GlyCAM	Glycosilation dependent cell adhesion molecule
ESL	E selectin ligand
PAF	Platelet activating factor
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
VLA	Very late antigen
Mac	Membrane attach complex
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
TCR	T-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
TF	Tissue Factor
APC	Antigen-präsentierende Zellen

ATN	akute Tubulusnekrose
DGF	delayed graft function
CAN	chronic allograft nephropathy
PRA	panel reactive antibodies
UW	University of Wisconsin
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase
APES	Aminopropyltriethoxysilane
RT	Raumtemperatur
FCS	fetales Kälberserum
SEM	Standard Error of Means
GF	Gesichtsfeld
ODN	Oligodesoxynucleotides
TGF	transforming growth factor
EGF	epidermal growth factor
FGF	fibroblast growth factor
PDGF	platelet derived growth factor
HGF	hepatocyte growth factor

9.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Franz-Volhard-Klinik in Berlin-Buch unter der Leitung von Professor Dr. med. Hermann Haller und Professor Dr. med. Friedrich C. Luft in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. med. Duska Dragun. Bei ihnen möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die Bereitstellung des Arbeitsthemas und den wissenschaftlichen Rat bedanken.

Frau Professor Dr. med. Duska Dragun danke ich insbesondere für die Betreuung in allen Phasen der Dissertation bis zur Abgabe und die wichtige fachliche Unterstützung.

Dr. Joon-Keun Park gilt mein besonderer Dank für die intensive Einarbeitung in die Techniken der Immunhistologie und die Vermittlung wichtiger Grundlagen für sorgfältige wissenschaftliche Arbeitstechniken.

Für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und zahlreiche konstruktive Hinweise danke ich meinem Bruder Holger Hoff. Für motivierende Unterstützung vor allem in schwierigen Phasen der Dissertation danke ich neben einigen guten Freunden besonders meiner Freundin Meike Benke.

9.3 Lebenslauf

Name: Hoff
Vorname: Uwe
Geburtsdatum: 20. April 1975
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulausbildung

1981-1994 Evangelische Schule Berlin-Frohnau /
Grundschule und Gymnasium
Abschluss: Hochschulreife

Studium

Okt. 1994 – Apr. 1996 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin

Aug. 1996 Physikum

Aug. 1996 Wechsel an die Humboldt Universität Berlin

Aug. 1997 1. Staatsexamen

Apr. 1998 – Apr. 2001 Promotionsstudium an der Franz-Volhard Klinik,
Charité Berlin / Campus Berlin-Buch, unter
medizinischer Leitung von Prof. Dr. F. C. Luft in
der Arbeitsgruppe von Dr. D. Dragun zum Thema:
„Bedeutung der Alloantigen-unabhängigen
Faktoren in der Frühphase nach
tierexperimenteller Nierentransplantation“

April 2001 2. Staatsexamen

April 2001 – März 2002 Praktisches Jahr (Innere Medizin - Robert Rössle
Klinik Berlin-Buch unter Prof. Dr. W. D. Ludwig,
Chirurgie - Charité Berlin unter Prof. Dr. P.
Neuhaus und Prof. Dr. N. Haas, Gynäkologie und
Geburtshilfe - DRK-Kliniken Westend Berlin unter
Prof. Dr. H. Kentenich)

Juni 2002 3. Staatsexamen

Aug. 2002 - Dez. 2003 abschließende Arbeiten zur Promotion

seit April 2004 Tätigkeit als AiP in der Klinik für Nephrologie an
der Charité Berlin Campus Mitte unter Leitung von
Professor Dr. Hans-H. Neumayer.

9.4 Veröffentlichungen

Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, Haller H:

Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background.

Kidney Int. 2000 Nov; 58: 2166-77

Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, Haller H:

Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function.

Kidney Int. 2001 Sep; 60:1173-81

9.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Literaturstellen verwendet zu haben.

Berlin, den 6. Juni 2004