

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. L. Fehm

**Prospektive Untersuchung zur Korrelation der  
Primärfunktion und Rejektionsrate allogener  
Nierentransplantate zu donorspezifischen  
Aktivierungsparametern**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät –**

Vorgelegt von  
Elke Nyhof  
aus Wilsum

Münster 2003

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Akute tubuläre Nekrose

### 1.1.1 Ursachen und klinischer Verlauf der Akuten Tubulären Nekrose

Bei der akuten tubulären Nekrose (ATN) unterscheidet man ursächlich zwischen der nephrotoxischen und der ischämischen ATN. Letztere wird am häufigsten durch eine absolute oder funktionelle renale Hypoperfusion hervorgerufen, zum Beispiel durch einen hämorrhagischen Schock, Hypovolämie, im Rahmen großer Operationen, Verbrennungen, Sepsis oder nach einer Nierentransplantation.

Die akute tubuläre Nekrose verläuft in drei Phasen. Während der Initialphase sind die Nieren der Ischämie oder dem Toxin ausgesetzt und die ATN ist noch potentiell vermeidbar.

In der Hauptphase kommt es zum Absinken bzw. Sistieren der glomerulären Filtration für wenige Tage bis zu zwei Wochen, gelegentlich aber auch wesentlich länger. Histologisch erkennbar sind Zeichen der Nekrose vor allem im äußeren Nierenmark, der Zellverlust ist meistens fokal.

Es folgt in der anschließenden Regenerationsphase die Wiederherstellung der Nierenfunktion durch Reparationsvorgänge im Nierengewebe.

Typisch ist die häufig große Diskrepanz zwischen einem ausgeprägtem klinischen Befund (Anurie) und den relativ geringen histologischen Läsionen.

### 1.1.2 Akute Tubuläre Nekrose nach Nierentransplantation

Von einer ATN im Rahmen der Nierentransplantation spricht man bei der Notwendigkeit von mehr als zwei postoperativen Dialysen. Die Inzidenz liegt zwischen 6% und 50%, im Durchschnitt bei etwa 25% (Marcen und Mitarbeiter 1998).

Die Hauptursache der ATN ist nach bisherigen Kenntnissen eine Kombination aus Ischämie- und Reperfusionsschaden. Durch den Sauerstoff- und Nährstoffmangel während der Ischämie kommt es zur Akkumulation von gewebeschädigenden metabolischen Zerfallsprodukten. Bei der anschließenden Reperfusion werden während der Reoxygenierung freie Sauerstoffradikale gebildet, die für die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und die Expression von

Adhäsionsmolekülen im Sinne eines unspezifischen Entzündungsprozesses verantwortlich gemacht werden (Shoskes und Mitarbeiter 2001).

Die Risikofaktoren für eine Akute Tubuläre Nekrose nach Transplantation lassen sich in allgemeine, ischämische und immunologische Faktoren unterteilen. Eine Übersicht über die Einzelfaktoren enthält Tabelle 1.1.

allgemeine Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leichenspender</li> <li>• Spender älter als 50 Jahre</li> <li>• präoperative Erhöhung des Kreatinins beim Spender</li> <li>• intra-operative Mannitolgaben</li> <li>• präoperativ erhöhter Hämatokritwert des Empfängers</li> </ul>
ischämische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• präexistierende ischämische Nierenschäden des Spenders</li> <li>• hypotensive Krisen während der Intensivtherapie des Spenders</li> <li>• hochdosierte Katecholamingaben</li> <li>• inadäquate Organperfusion</li> <li>• kalte Ischämiezeiten* von über 24 Stunden</li> <li>• lange warme Ischämiezeiten**</li> </ul>
immunologische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• erhöhte Panel Reactive Antibody Titer***</li> </ul>

Tabelle 1.1 Risikofaktoren der Akuten Tubulären Nekrose (ATN), \* Zeitintervall von der Ex- bis zur abgeschlossenen Transplantation, \*\* intraoperative Anastomosenzzeit, \*\*\*präformierte Antikörper, hervorgerufen durch Vortransplantationen, Bluttransfusionen oder Geburten (Lit.: Schmidt u. Mitarb. 1993, Koning u. Mitarb. 1995, Troppmann u. Mitarb. 1995, Marcen u. Mitarb. 1998, Shoskes u. Mitarb. 2001)

Zur Abhängigkeit des Transplantatüberlebens von einer ATN gibt es widersprüchliche Aussagen. Die meisten Arbeiten zu diesem Thema geben Hinweise auf eine verkürzte Transplantatüberlebenszeit nach ATN (Koning u. Mitarb. 1995, Feldman u. Mitarb. 1996, Ojo u. Mitarb. 1997). Kommt es zusätzlich noch zu einer Rejektion, nimmt die Transplantatüberlebenszeit weiter ab (Feldman u. Mitarb. 1996, Ojo u. Mitarb. 1997). Andere Autoren finden jedoch keine Auswirkungen der ATN auf das Transplantatüberleben ohne zusätzliches Auftreten einer Rejektion (Troppmann u. Mitarb. 1996, Humar u. Mitarb. 1997, Marcen u. Mitarb. 1998). Eignet sich dann allerdings zusätzlich zur ATN eine akute Rejektion, haben diese Patienten von allen die geringste Transplantatüberlebenszeit (Humar u. Mitarb. 1997, Marcen u. Mitarb. 1998). Besonders von Interesse ist die Beobachtung, dass bei Patienten mit ATN per se die Inzidenz einer Rejektion erhöht ist (Troppmann u. Mitarb. 1995, Ojo u. Mitarb.

1997, Marcen u. Mitarb. 1998). Ein Hinweis auf die Ursache dieses Zusammenhangs könnte die beim Ischämie-Reperfusionsschaden (Shackleton u. Mitarb. 1990) sowie auch bei der ATN (Shoskes u. Mitarb. 1991) beobachtete verstärkte Expression von MHC-Klasse II-Molekülen sein (s. 1.2). Wichtig ist auch, dass eine akute Rejektion einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Rejektion und somit für ein vorzeitiges Transplantatversagen darstellt (Tesi u. Mitarb. 1993).

Mögliche Ursachen einer dauerhaften Schädigung des Transplantats als Folge einer ATN sind während der ATN vermehrt produzierte proinflammatorische Agonisten, wie Interferon- $\gamma$ , Interleukin 2, TGF- $\beta$  und andere (Goes u. Mitarb. 1995). Diese können eine nicht-antigen-abhängige Entzündung und Vernarbung hervorrufen (Shoskes u. Mitarb. 1991). Der dadurch herbeigeführte Verlust an Nephronmasse mit anschließender Hyperfiltration der restlichen Glomerula kann letztendlich zur Fibrose und Sklerose des Organs führen (Shoskes u. Mitarb. 2001). Auch könnte die unspezifische Entzündung mittels Migration von inflammatorischen Zellen des Empfängers zu einer erhöhten Alloantigenpräsentation mit Aktivierung von spezifischer Immunität führen (Ojo u. Mitarb. 1997).

## **1.2 Das Haupthistokompatibilitätssystem (MHC)**

Im Gegensatz zu B-Lymphozyten, die in der Lage sind, freies Antigen zu erkennen, ist für die antigenspezifische Stimulation von T-Lymphozyten eine adäquate Präsentation des Antigens erforderlich. Das Antigen muss ihnen in Form eines Komplexes aus Antigen und körpereigenen MHC-Molekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen. MHC-Klasse I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, die MHC-Klasse II-Moleküle hingegen gewöhnlich nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Zu den APC zählen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten (Lee, Wintrobe`s Clinical Hematology, S. 551). Es können aber auch andere Zellen mittels Interferon- $\gamma$  MHC-Klasse II-Moleküle exprimieren (Pober u. Mitarb. 1983) wie vaskuläre Endothelzellen, einige parenchymatöse Epithelzellen sowie Enterozyten und renale Tubuluszellen (Valente und Alexander 1998).

Der Begriff MHC ist ein Oberbegriff für alle Spezies. Beim Menschen wird der MHC als humanes Leukozyten-Antigen (HLA) bezeichnet. Die Klasse-I-Loci werden beim Menschen als HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet, die Klasse-II-Loci als HLA-DN, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Diese Antigenfamilien (Unterklassen) besitzen wiederum mehrere phenotypische Ausprägungen. Zur Sicherung größtmöglicher Kompatibilität versucht man, jedem Organempfänger eine möglichst ähnliche Phänotypenkonstellation des Spenders zuzuordnen (Antigen Matching). Ein gutes HLA-B und HLA-DR Antigen-Match ist dabei offenbar verbunden mit besserem Kurzzeittransplantatüberleben (bis zu einem Jahr), ein gutes HLA-A Match ist eher mit einer besseren Langzeitprognose assoziiert (Brenner and Rector`s The Kidney, S. 2549).

Nach Injektion von Donorzellen oder bei Transplantation erkennen im Rahmen der Antigenprozessierung naive T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) und dem CD4/CD8-Molekül den Komplex aus MHC-Molekül und Allopeptid auf der Oberfläche der APZ und werden dadurch aktiviert. Die MHC-Komplexe der Spenderzellen wirken hierbei selbst als Antigene; Antikörper oder TZR können an Epitope der MHC-Moleküle binden.

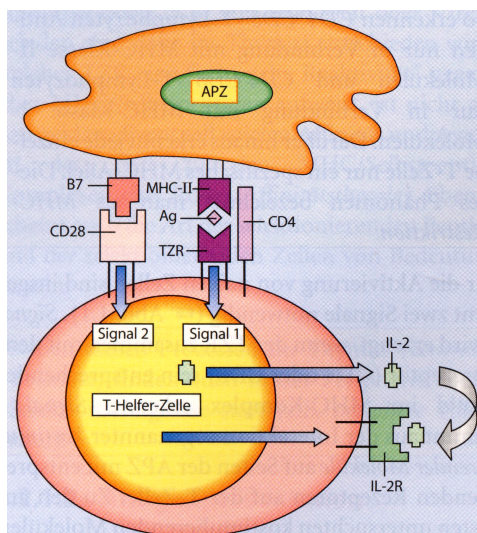


Abb. 1.1 Schema der Alloantigenerkennung – Interaktion zwischen antigen-präsentierender Zelle (APZ) und T-Lymphozyt

Bei der Transplantatabstoßung unterscheidet man zwischen direkter Alloantigenerkennung, bei der eine Empfänger-T-Zelle ein intaktes Allo-MHC-Antigen auf der Oberfläche einer Spenderzelle erkennt und der indirekten Alloantigenerkennung, bei der ein von einer Empfänger-APC prozessiertes Spenderantigen von einer Empfänger-T-Zelle erkannt wird.

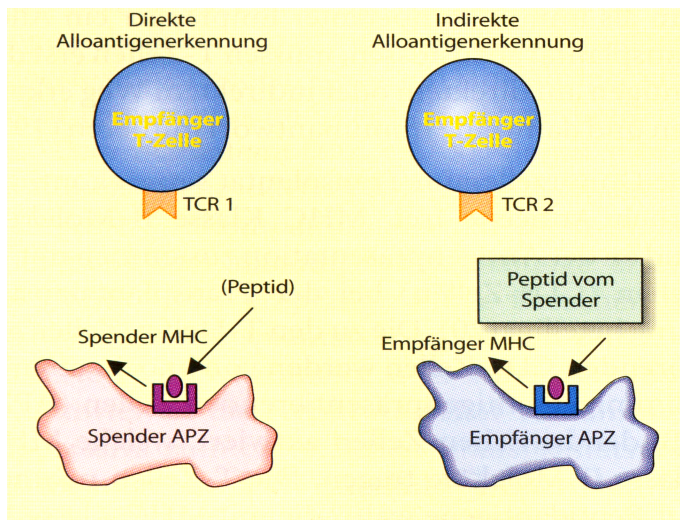


Abb. 1.2 Direkte und indirekte Alloantigenerkennung

### 1.2.1 HLA-DR in der Niere

Bei menschlichen Spendernieren wird HLA-DR im Glomerulum von Endothelien und von mesangialen Zellen, außerhalb der Glomerula von intertubulären Kapillaren und interstitiellen dendritischen Zellen exprimiert (Fuggle u. Mitarb. 1983). In dieser Studie wurde ferner beschrieben, dass HLA-DR von den Epithelien größerer Gefäße kaum und von Tubuli nur in 60 % der untersuchten Nieren exprimiert wurde. Bei letzteren waren nur die proximalen Tubulusabschnitte HLA-DR positiv. Die Inzidenz einer ATN korrelierte hier nicht mit der tubulären HLA-DR Expression.

Bei immunhistologischer Untersuchung von Nierentransplantaten mit ATN oder Funktionsverschlechterung zeigte sich in den Nieren mit einer histologisch nachgewiesenen Rejektion eine verstärkte Expression von HLA-DR in den proximalen und distalen Tubuli, in der Henle-Schleife und in den Sammelrohren (Hall u. Mitarb. 1984). In den Nieren ohne oder mit minimaler Rejektion waren die genannten Strukturen überwiegend negativ. Lediglich die proximalen Tubuli waren

leicht positiv. Hingegen waren das Mesangium und die kapillären Endothelien der Glomerula sowie vaskuläre Endothelien von Venen und Arterien bei allen biopsierten Nieren positiv. Eine neuere Studie bestätigte diese Ergebnisse (Chen u. Mitarb. 1996). Bei postoperativen Biopsien von Transplantatnieren mit klinischen Zeichen einer Rejektion war die HLA-DR Expression in Endothel, peritubulären Kapillaren und Mesangium stärker ausgeprägt als präoperativ. Besonders interessant waren die tubulären Befunde. Präoperativ waren bei 60,7% der untersuchten Nieren die proximalen Tubuli positiv, postoperativ waren sie bei fast allen Nieren mit klinischen Anzeichen einer Rejektion positiv. Es wurde allerdings nicht untersucht, ob gerade diejenigen Transplantate, bei denen schon vor der Transplantation die Tubuli HLA-DR positiv waren, auch die waren, die nach der Transplantation unter Rejektion eine verstärkte HLA-DR Expression aufwiesen. Damit konnte nicht die Frage beantwortet werden, ob die HLA-DR Expression im Spenderorgan möglicherweise durch Spender-abhängige Faktoren als ein Risikofaktor für postoperative Komplikationen beim Empfänger (ATN, Rejektion) einzustufen ist. Ein Zusammenhang wäre jedoch denkbar, da eine erhöhte HLA-DR Expression die Immunogenität des Transplantats steigert und damit Angriffspunkte für den T-Zell-Erkennungsprozess im Sinne eines allogenen Triggers bietet (Pratschke u. Mitarb. 2001).

### **1.2.2 Physiologie des Hirntods und dessen Auswirkung auf die HLA-DR Expression**

Mit dem Auftreten des Hirntods kommt es zu einer Phase, die als „Autonomic Storm“ bezeichnet wird. Die dadurch ausgelöste starke Vasokonstriktion führt zu einer verminderten Durchblutung peripherer Organe trotz erhöhten Perfusionsdrucks (Herijgers u. Mitarb. 1996). Folgen können schwerwiegende Organischämien im Spenderorgan sein. Experimentelle Untersuchungen zur Beziehung zwischen plötzlich auftretendem Hirntod und der immunogenen Aktivierung peripherer Organe haben belegen können, dass es zu einer schnellen Infiltration mit Leukozyten und konsekutiver Hochregulation ihrer assoziierten Zytokine kommt (Takada u. Mitarb. 1998). Zusätzlich führt bei Transplantationen der Reperfusionsschaden zur Hochregulation der HLA-DR Expression (Brenner and Rector`s The Kidney, S. 2534). Insgesamt wird der kombinierte Ischämie- / Reperfusionsschaden als Hauptursache der erhöhten Inzidenz einer ATN nach Leichennierentransplantation gegenüber Lebendnierentransplantation angesehen (Lagiewska u. Mitarb. 1996, Nagareda u. Mitarb. 1993).

Therapeutisch wurde versucht, die mit dem Hirntod in Verbindung stehende immunogene Aktivierung durch Vorbehandlung der Hirntoten mit Steroiden zu verhindern (Pratschke und Mitarb. 2001). Als Vergleichsgruppen dienten Lebendspender- und Leichenspendernieren, die nicht mit Steroiden behandelt wurden. Die Infiltration entzündlicher Zellen und die HLA-DR Expression der interstitiellen mononukleären Zellen waren bei den unbehandelten Leichenspendernieren im Vergleich zu den Lebendspendernieren und den mit Steroiden behandelten Leichenspendernieren stark erhöht. Die Transplantatüberlebenszeit der mit Steroiden behandelten Leichennieren war im Gegensatz zu der der nicht behandelten Leichennieren ähnlich hoch wie bei den Lebendspendernieren.

Durch den Hirntod wird also in den meisten Fällen die Expression von HLA-DR in verschiedenen Strukturen verstärkt. Da dies aber offenbar nicht immer bei allen Nieren von hirntoten Patienten der Fall ist (Fuggle u. Mitarb. 1983, Chen u. Mitarb. 1996), erscheint es wichtig, Unterschiede zwischen den Spendernieren herauszuarbeiten. Ein wichtiger Ansatzpunkt wäre hierzu die genaue Analyse der Spenderkonditionen.

### **1.3 Das Endothelin-System**

#### **1.3.1 Allgemeine Grundlagen des Endothelin-Systems**

Das aus 21 Aminosäuren bestehende Peptid Endothelin (Yanagisawa u. Mitarb. 1988) ist der nach bisherigen Erkenntnissen stärkste endogene Vasokonstriktor (Karet und Davenport 1996b). Endothelin hat neben seiner physiologischen auch eine Bedeutung bei zahlreichen pathologischen Zuständen wie subarachnoidalen Blutungen, Myokardinfarkt, toxischen Wirkungen von Arzneimitteln und der Sepsis (Kohan 1997). Endothelin-assoziierte Nierenschäden werden beim ischämischen Nierenversagen (Begnini u. Mitarb. 1991), beim hepatorenenalen Syndrom (Karet und Davenport 1996b), der akuten vaskulären Transplantatabstoßung (Watschinger u. Mitarb. 1991) und der akuten tubulären Nekrose (Yamada u. Mitarb. 1994) beschrieben. Endothelin ist ein lokal autokrin und parakrin agierendes Hormon und deshalb sowie wegen seiner sehr schnellen Metabolisierung durch seinen Plasmaspiegel nicht ausreichend repräsentiert (Naicker u. Mitarb. 1999).

#### 1.3.1.1 Synthese und Abbau von Endothelin

Der von drei Isotypen im Menschen hauptsächlich zirkulierende Isotyp ist das Endothelin-1 (Ando u. Mitarb. 1989). Das biologische Vorläufermolekül des Endothelin-1 ist das Peptid Pre-Pro-Endothelin-1. Durch Abspaltung von zwei Fragmenten dieses Moleküls entsteht das so genannte Big-Endothelin (Karet und Davenport 1996b). Big-Endothelin-1 (Big-ET-1) wird durch Endothelin Converting Enzyme (ECE) zu Endothelin-1 (ET-1) gespalten (Kohan 1997). Big-Endothelin-1 hat offenbar keine markanten biologischen Wirkungen (Howard u. Mitarb. 1992).

Die Sekretion von Endothelin scheint hauptsächlich durch die Transkription und Translation geregelt zu sein (Naicker u. Mitarb. 1999). Produziert wird es von vaskulären Endothelzellen (Yanagisawa u. Mitarb. 1988, Bunchman u. Brookshire 1991), glomerulären Endothelzellen (Marsden u. Mitarb. 1991), Mesangiumzellen (Sakamoto u. Mitarb. 1990, Zoja u. Mitarb. 1991), Tubulusepithelien (Horie u. Mitarb. 1991) sowie von Leukozyten (Murer u. Mitarb. 1997), Makrophagen und Monozyten in vitro (Ehrenreich u. Mitarb. 1990).

Der Abbau von Endothelin kann auf drei Wegen erfolgen: Degradierung in Lysosomen, Aufnahme von zirkulierendem Endothelin in die Lunge und hydrolytische Spaltung durch die Neutrale Endopeptidase (Simonson 1993).

#### 1.3.1.2 Endothelinrezeptoren

Es existieren zwei Rezeptoren: Der Endothelin-A-Rezeptor (ETA-Rezeptor) und der Endothelin-B-Rezeptor (ETB-Rezeptor). Der humane ETA-Rezeptor bindet ET-1 stärker als ET-2 und dieses wiederum stärker als ET-3 (Hosoda u. Mitarb. 1992). Der humane ETB-Rezeptor bindet alle Endotheline mit der gleichen Affinität (Sakamoto u. Mitarb. 1991). Alle Endothelinrezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Simonson 1993).

Es gibt in der menschlichen Niere etwa doppelt so viele ETB-Rezeptoren wie ETA-Rezeptoren. Etwa 75% aller ET-Rezeptoren befinden sich im Nierenmark. In der Nierenrinde sind die ETA-Rezeptoren überwiegend in den Gefäßen lokalisiert, der ETB-Rezeptor ist heterogener verteilt. Der ETB-Rezeptor konzentriert sich hauptsächlich auf das Nierenmark, insbesondere auf die Markstrahlen (Karet u. Mitarb. 1993).

### **1.3.3 Die Biologie des Endothelins in der Niere**

Endothelin beeinflusst in der Niere die Regulation der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Plasmaflusses (RPF). Es reguliert den Tonus der Gefäße sowie den mesangialen Zelltonus, ist an der Zellproliferation beteiligt und hat Auswirkungen auf den Natrium- und Wasserhaushalt (Kohan 1997). In der Niere wird hauptsächlich ET-1 produziert. Die Niere ist das Organ mit den höchsten Konzentrationen an Endothelin. Daher könnte eine Nierenschädigung zu einer größeren Freisetzung an Endothelin führen als andere Organschäden (Kon und Badr 1991).

#### **1.3.3.1 Endothelin im Gefäßsystem der Niere**

Die Nierengefäße sind gegenüber Endothelin empfindlicher als alle anderen Gefäßsysteme (Madeddu u. Mitarb. 1989, Pernow u. Mitarb. 1989). Die Gründe hierfür liegen zum einen in der großen Anzahl an Endothelinrezeptoren in den Widerstandsgefäßen der Niere (vorwiegend ETA-Rezeptoren) und zum anderen in der bedeutsamen Produktion von Endothelin durch die Nierengefäße selbst. Endothelin wird überwiegend im Endothel der Gefäße synthetisiert und abluminal in Richtung glatter Gefäßmuskulatur sezerniert, wo es mit dieser interagiert und eine Vasokonstriktion bewirkt (Kohan 1997).

Stimuliert wird die Endothelinproduktion durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), durch vasokonstriktorische und thrombogene Mediatoren (zum Beispiel Thrombin, Angiotensin II, Vasopressin, Noradrenalin und Adrenalin) und letztendlich durch physikalische Faktoren wie mechanische Dehnung, Druck und Scherkräfte (Kon und Badr 1991, Yamada u. Mitarb. 1994, Kohan 1997).

Inhibiert wird die endotheliale Endothelinproduktion hauptsächlich durch Vasodilatoren und Antikoagulanzen wie Heparin, Bradykinin, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostazyklin, Stickstoffmonoxid (NO) und ANP (atriales natriuretisches Peptid) (Kohan 1997).

Die Endothelinexpression wurde im Gefäßsystem der gesunden Niere immunhistologisch lokalisiert in interlobulären Arterien, den Aa. arcuatae und den glomerulären Kapillaren (Karet und Davenport 1996a). Auch das peritubulläre kapilläre Netzwerk (PTCN) exprimiert Endothelin (Wilhelm u. Mitarb. 1999b), sowie die afferenten und efferenten Arteriolen der Glomerula (Herman u. Mitarb.

1998). Das komplette venöse System der Niere scheint ebenso Endothelin zu exprimieren. Das Endothel ist der Hauptproduktionsort des Endothelins im renalen Gefäßsystem, obwohl in selteneren Fällen auch die glatte Muskulatur der Arterien Endothelin exprimiert (Herman u. Mitarb. 1998). Die Effekte des Endothelins entsprechen weitgehend der Lokalisation seiner Rezeptoren: Endothelin bewirkt eine Kontraktion der afferenten und efferenten Arteriolen, der Aa. Arcuatae, der interlobulären Arterien und der absteigenden Vasa recta des äußeren Nierenmarks (Kohan 1997). Dies geschieht wie bei anderen Vasokonstriktoren über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Simonson 1993) und erklärt auch, dass Kalziumkanalblocker die von ET-1 induzierte Vasokonstriktion der Nierengefäße mildern können (Rabelink u. Mitarb. 1994).

#### 1.3.3.2 Endothelin im Glomerulum

Die Hauptproduktionsstätten des Endothelins in den Glomerula sind die Endothelzellen vor den epithelialen und mesangialen Zellen (Kohan 1992, Herman u. Mitarb. 1998). In mesangialen Zellkulturen wird die Endothelinproduktion stimuliert durch Thrombin, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (Murer u. Mitarb. 1997). Das Mesangium besitzt vorwiegend ETA-Rezeptoren (Herman u. Mitarb. 1998), über die ET-1 die Kontraktion und Proliferation mesangialer Zellen bewirkt (Kohan 1997), außerdem wirkt Endothelin auf mesangiale Zellen mitogen (Simonson u. Mitarb. 1989).

#### 1.3.3.3 Endothelin in den Tubuli

Die Sammelrohre im Bereich des inneren Nierenmarks (IMCD) sind die Hauptproduktionsstätten von Endothelin-1 im Tubulus. Andere Tubulussegmente wie kortikale Sammelrohre (CCT), dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife und proximaler Tubulus produzieren Endothelin-1 in deutlich geringerem Ausmaß. Wichtigster Rezeptortyp ist der ETB-Rezeptor (Kohan 1997). Über diesen hat Endothelin Einfluss auf die Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts. Lange Zeit herrschte jedoch Unklarheit, ob Endothelin-1 eine Natrium- und Wasserretention oder eine vermehrte Natrium- und Wasserausscheidung bewirkt. ETB-Rezeptoren in den Tubuluszellen können offenbar mittels positiven Feedbacks eine Autoinduktion von ET-1 bewirken (Ong u. Mitarb. 1995). Die Rezeptorstimulation und die konsekutive ET-1-Produktion werden durch eine tubuläre Hypoxie ausgelöst und bewirken über ETB-Rezeptoren eine Zellproliferation (Ong u. Mitarb. 1995).

### **1.3.4 Endothelin bei der Nierentransplantation**

#### 1.3.4.1 Endothelin und Ischämie

Kalte und warme Ischämie erhöhen den renalen Endothelin Spiegel. Unter kalter Ischämie versteht man die Zeit der Kühlung des Organs während des Transports von der Organentnahme bis zur Implantation in den Empfänger; die darauf folgende warme Ischämiezeit ist das Zeitintervall bis zur Reperfusion des Organs, sie entspricht der Zeit zur Herstellung der venösen und arteriellen Anastomosen. Durch die kalte Ischämie kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Expression von Endothelin-1 der kortikalen peritubulären Kapillaren, der medullären Vasa recta und der Sammelrohre des inneren Nierenmarks. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Hochregulation der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA stattfindet. Hieraus folgt, dass die Ursache der vermehrten Freisetzung von Endothelin eine erhöhte Produktion und nicht nur eine vermehrte Freisetzung aus ischämisch geschädigten Zellen ist (Wilhelm u. Mitarb. 1999a). Die Gewebshypoxie in der Niere ist der eigentliche Stimulus für die gesteigerte Endothelinproduktion. Es folgt nach Wiederherstellung des Blutflusses die Freisetzung der während der Ischämie entstandenen metabolischen Zerfallsprodukte und freien Sauerstoffradikale, was eine weitere Steigerung der Endothelinproduktion zur Folge hat. Somit persistiert auch nach Beendigung des auslösenden Ereignisses der verminderte renale Blutfluss und die verminderte glomeruläre Filtrationsrate vermittelt durch die Wirkung des Endothelins (Kohen 1997). Eine Studie von Wilhelm u. Mitarbeitern bestätigt, dass schon durch die Ischämie allein die Bildung von Pre-Pro-Endothelin-1 (ppET-1) gesteigert wird und diese über drei Stunden nach Reperfusion persistiert. Dies ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Endothelins nur durch eine anhaltende Produktion von Endothelin auch während der Reperfusionsphase erklärbar (Wilhelm u. Mitarb. 1999b). Der Ischämie-Reperfusionsschaden kann reduziert werden durch den Gebrauch eines Endothelin-Rezeptorantagonisten (Herrero u. Mitarb. 1999).

#### 1.3.4.2 Zusammenhang zwischen ATN und Endothelin

Endothelin spielt scheinbar eine große Rolle bei der Entwicklung einer Akuten Tubulären Nekrose nach Nierentransplantation. Bei Patienten mit ATN ist der Plasma-Endothelinspiegel erhöht und verläuft parallel zum Plasma-Kreatinin (Yamada u. Mitarb. 1994). Besonders die Endothelinexpression des peritubulären kapillären Netzwerks (PTCN) ist nach Ischämie deutlich erhöht. Das PTCN ist eine Fortsetzung der efferenten Arteriole des Glomerulums und stellt die Hauptblutzufuhr für die Tubuli convoluti dar. Eine durch Endothelin induzierte Vasokonstriktion des PTCN führt zu Hypoxie und Nekrosen der anliegenden tubulären Zellen selbst dann noch, wenn die Makrodurchblutung des Transplantats schon wiederhergestellt ist (Wilhelm u. Mitarb. 1999a). In einer früheren Studie konnte die durch warme Ischämie ausgelöste ATN mittels Verwendung eines Endothelinrezeptorantagonisten erfolgreich therapiert werden (Shibouta u. Mitarb. 1990).

#### 1.3.4.3 Zusammenhang zwischen Rejektion und Endothelin

Bei der akuten und chronischen Rejektion von Nierentransplantaten kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Produktion von Endothelin-1 vorwiegend in den Epithelien des proximalen und distalen Tubulus sowie an Stellen von tubulointerstitiellen Schäden und zellulärer Infiltration (Chareandee 2000). In den Gefäßen wird Endothelin offenbar aber nur bei Patienten mit chronischer Rejektion und Transplantatvaskulopathie verstärkt exprimiert (Simonson u. Mitarb. 1998). Bei der akuten Rejektion war die Expression von ETB-Rezeptoren in den Glomerula signifikant erhöht, während die Expression der ETA-Rezeptoren in den Glomerula und distalen Tubuli nicht relevant war. In den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße sowie im interstitiellen Infiltrat war die Expression sowohl von ETA- als auch von ETB-Rezeptoren erhöht (Naicker u. Mitarb. 1999). Auch bei einer Rejektion scheint die Verabreichung von Endothelin-Rezeptorantagonisten oder von ECE-1-Inhibitoren von Vorteil zu sein, da bei einer Therapie mit diesen Substanzen die intimale Proliferation und die Ausbildung einer Transplantatvaskulopathie gemindert werden (Orth u. Mitarb. 1999, Simonson u. Mitarb. 1999).

#### **1.4 Katecholamintherapie zur Spenderkonditionierung**

Nach Eintritt des Hirntodes sind häufig hochdosierte Katecholamingaben zur Kreislaufstabilisierung notwendig. Dies geschieht oft zu Lasten der Nierenperfusion. In einer Katecholaminvergleichsstudie fanden Ueno und Mitarbeiter heraus, dass Dopamin und Noradrenalin, nicht aber Adrenalin den kortikalen renalen Blutfluss vermindern (Ueno u. Mitarb. 2000). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Adrenalin primär die Herzleistung in einem so großen Ausmaß steigert, dass die Durchblutung der Niere trotz eines erhöhten Gefäßwiderstands suffizient ist.

Schnuelle und Mitarbeiter berichteten über das gehäufte Auftreten von ATN bei Empfängern von Leichennieren, deren Spender mit Noradrenalin therapiert wurden. Allerdings wurde auch eine verminderte Rejektionsrate nach Noradrenalingebrauch beim Spender beobachtet, sowie bei Noradrenalin- und Dopamingebrauch ein verbessertes Langzeitüberleben des Transplantats. Erklärt wurde dies mit dem herabregulierenden Effekt adrenerger Substanzen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM und E-Selektin in den Gefäßen des Transplantats (Schnuelle u. Mitarb. 1999).

Schneider u. Mitarbeiter (1982) und Kadieva u. Mitarb. (1993) berichteten von einer erhöhten Inzidenz der ATN bzw. einem verminderten 1-Jahres-Organ-Überleben nach Verabreichung von Dopamin im Rahmen der Spenderkonditionierung.

## 1.5 Ziel der Studie und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll folgende übergeordnete Frage bearbeitet werden:

Welche Faktoren tragen zur Entstehung der Akuten Tubulären Nekrose nach Nierentransplantation bei und ist sie als spezifische immunologische oder als unspezifische Komplikation anzusehen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden mehrere klinische und laborchemische Parameter der Spender und ihrer Intensivtherapie analysiert sowie die Expression von HLA-DR als spezifisch immunologischer und von Endothelin als eher unspezifischer vaskulärer Marker im Rahmen des Hirntods in Nierenstanzbiopsien immunhistologisch untersucht. Als Vergleich dienten Biopsien von Lebendspendern.

Hieraus ergaben sich dann folgende Detailfragen:

1. Findet sich ein Zusammenhang zwischen der Spenderkonditionierung und dem Auftreten einer ATN oder einer Rejektion? Wirken sich einige dieser Faktoren auch auf die Transplantatüberlebenszeit aus?
2. Unterscheidet sich die Expression von Endothelin bei Leichenspendern von der bei Lebendspendern und hat eine verstärkte Expression von Endothelin einen prädiktiven Wert?
3. Wovon ist das Ausmaß der Expression von HLA-DR abhängig und mit welchen Transplantationskomplikationen ist erhöhte Expression verbunden?

## 2 PATIENTEN, METHODEN UND MATERIALIEN

### 2.1 Patienten

#### 2.1.1 Datenerhebung bei Leichenspendern

In der Zeit vom 02.11.1998 bis 21.10.2001 wurden 35 Leichenspenden untersucht. Zwanzig waren ehemalige Patienten des Universitätsklinikums Lübeck, fünfzehn kamen aus mit dem Transplantationszentrum Lübeck kooperierenden Krankenhäusern in Lüneburg, Winsen/Luhe, Pinneberg, Mölln und Neustadt/Holstein.

Anhand der Akten wurden, soweit vorhanden, folgende Daten erhoben (s.a. Tabellarien 6.1.1 bis 6.1.6 im Anhang):

- Aufnahmedatum in die entsprechende Klinik und Todestag
- Geschlecht, Geburtsdatum, Größe, Gewicht
- Ursache des Hirntods, Notarztprotokoll (Reanimation ?)
- Grunderkrankungen des Patienten
- Drogen-, Nikotin- und Alkoholanamnese
- Labordaten bei Aufnahme sowie aktuelles Labor vor Organentnahme
- Mengen an kristallinen und kolloidalen Infusionen kumulativ in den letzten 24 Stunden vor Organentnahme sowie deren Absolutmengen 24 Stunden, 6 Stunden und eine Stunde vor Organentnahme
- Diurese, zentralvenöser Druck, Temperatur und Blutdruck 24 Stunden, 6 Stunden und eine Stunde vor Organentnahme
- Anzahl und Dauer von Blutdruckkrisen (definiert als Blutdruck von 70/40 mmHg oder weniger) sowie der Minimalwert
- Mengen an Katecholaminen (Dopamin, Dobutamin, Adrenalin und Noradrenalin in mg) kumulativ sowie deren Absolutmengen 24 Stunden, 6 Stunden und eine Stunde vor Organentnahme sowie deren intraoperativer Verbrauch
- Blutgase 24 Stunden, 6 Stunden und eine Stunde vor Organentnahme sowie intraoperativ
- andere Medikamente

### **2.1.2 Datenerhebung bei Leichennierenempfängern des Transplantationszentrums des UKL**

In die Auswertung gingen 30 Patienten ein, deren postoperativer Verlauf direkt verfolgt werden konnte und bei denen folgende Daten protokolliert wurden:

- Alter, Geschlecht
- HLA-Mismatches und Geschlechter-Mismatch (der Begriff Geschlechter-Mismatch ist üblich bei Transplantation eines weiblichen Organs auf einen männlichen Empfänger = Syn. Größen-Mismatch)
- CMV- Konstellation des Spenders und Empfängers
- Kalte und warme Ischämiezeit
- Auftreten einer Akuten Tubulären Nekrose (ATN) sowie einer möglichen Rejektion während der Dauer der ATN-Phase
- Rejektionsinzidenz und Art der Rejektion (zellulär, vaskulär oder gemischte Rejektion)
- Rejektionstherapie
- Infektionen
- Serum-Kreatininwert bei Entlassung
- Funktionsverlust des Transplantats

### **2.1.3 Datenerhebung bei Leichennierenempfängern anderer Transplantationszentren**

Ein großer Teil der Spendernieren aus dem Bereich des Transplantationszentrums des UKL ging an Empfänger anderer Transplantationszentren im In- und Ausland. Anhand der Eurotransplant-ID-Nummern konnten die Zentren dieser Patienten ausfindig gemacht werden und mittels Rundschreiben baten wir um folgende Basisinformationen:

- Kalte und warme Ischämiezeit
- Auftreten einer Akuten Tubulären Nekrose sowie einer möglichen Rejektion während der Dauer einer ATN-Phase
- Rejektionsinzidenz und Art der Rejektion
- Rejektionstherapie
- Funktionsverlust des Transplantats
- Serum-Kreatininwert bei Entlassung

### **2.1.4 Datenerfassung bei Empfängern von Lebendspendernieren**

Bei den dieser Gruppe zugehörigen Patienten wurden alle unter Punkt 2.1.2 erwähnten Parameter erfasst.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung der Gewebeproben**

Für die Studiengruppen wurden Gewebeproben der Nieren von Leichenspendern, Lebendspendern und von den jeweiligen Transplantatempfängern gesammelt. Als Kontrollen dienten Proben von gesunden Anteilen verschiedener tumornephrektomierter Nieren (Murer u. Mitarb. 1997, Pupilli u. Mitarb. 1997). Die Gewebeproben der Spender wurden mittels Stanzbiopsie (Single Action Biopsy Device Einmalstanzgerät, Firma US Biopsy) während der Organentnahme unter Sichtkontrolle unmittelbar vor kalter Perfusion des Organs entnommen. Das Vorgehen war bei Leichen- und Lebendspendern das gleiche. Die ethische Unbedenklichkeit zur Probenentnahme wurde von der Ethikkommission im Oktober 1998 bestätigt.

Sofern sich bei den Transplantatempfängern aus diagnostischen Gründen die Notwendigkeit einer Biopsie ergab (Indikationsbiopsie), wurde diese in Lokalanästhesie unter sonografischer Kontrolle durchgeführt (Biopty Stanzgerät, Firma Radiplast AB). Sämtliche Gewebeproben wurden in Nährmedium (Tissue Freezing) eingebettet und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

### **2.2.2 Anfertigung der Gefrierschnitte**

Das in Nährmedium eingebettete Material wurde in ca. 5 X 5 mm große Blöcke geschnitten, auf dem Kryostat-Tisch befestigt und anschließend in den Kryostaten eingespannt. Hier wurden etwa 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

### **2.2.3 Immunhistologie**

Aus jeder Gewebeprobe wurden Schnitte sowohl mit Endothelin-1- als auch mit HLA-DR-Antikörpern markiert. Zur optischen Auswertung wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) angewendet. Hierbei handelt es sich um eine Enzym-Anti-Enzymkomplex-Technik, durch die eine Signalverstärkung des erstgebundenen Antikörpers bewirkt wird.

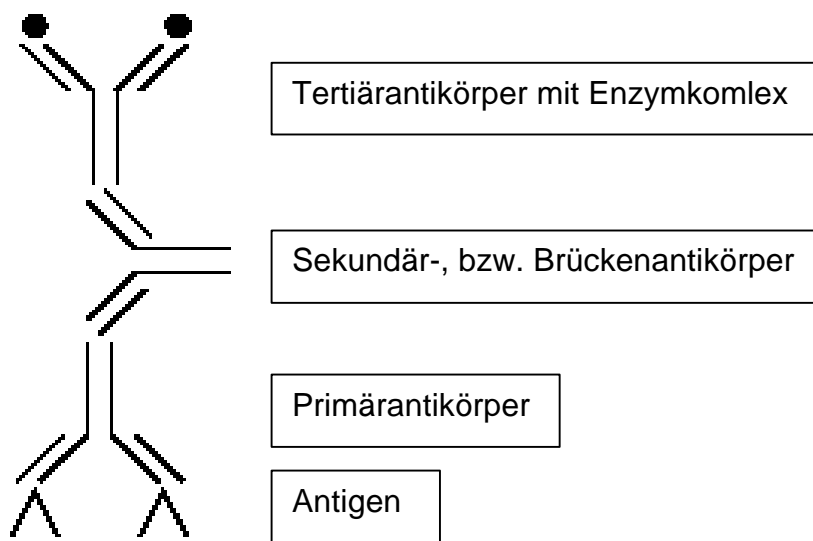


Abbildung 2.1: Schemazeichnung des APAAP-Verfahrens

Das Vorgehen im Einzelnen:

Zunächst werden alle Schnitte für 5 bis 10 Minuten in kaltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fixiert, luftgetrocknet, mit einem Fettstift umkreist und präparatcharakterisierend beschriftet. Anschließend wird auf jeden Schnitt  $50\ \mu\text{l}$  des verdünnten Primärantikörpers (im vorliegenden Fall HLA-DR bzw. Endothelin-1) aufgetragen und für eine Stunde in der feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper werden mit dem Verdünnungspuffer für primäre Antikörper auf eine Verdünnung von 1:250 für Endothelin, bzw. auf eine Verdünnung von 1:100 bis 1:200 für HLA-DR verdünnt. Nach der Inkubation werden die Schnitte in TBS-Waschpuffer gewaschen. Danach wird in einer Verdünnung von 1:25 der unkonjugierte Sekundärantikörper, der Brückenantikörper, aufgetragen. Dieser wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls in TBS-Waschpuffer gewaschen. Der Verdünnungspuffer für sekundäre Antikörper enthält hitzeinaktiviertes Humanserum (AB-Serum) zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Der Sekundärantikörper muss zwei Anforderungen erfüllen: Zum einen muss er gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper als auch der Tertiärantikörper stammen; zum anderen muss er im Überschuss vorliegen, so dass einer der beiden Fab-Arme (= antigenbindendes Fragment eines Antikörpers) an den

Primärantikörper bindet, der andere Fab-Arm hingegen zur Anlagerung des Antikörpers aus dem Enzym-Immunkomplex (entspricht dem Tertiärantikörper) verfügbar ist. Nach Entfernung des überschüssigen Anteils des Sekundärantikörpers durch Waschen in TBS-Waschpuffer wird der Enzym-Immunkomplex, der in diesem Fall auch als APAAP-Komplex bezeichnet wird, aufgetragen und ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der APAAP-Komplex baut sich aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einen dagegen gerichteten Antikörper auf. Auch hier wird nach Ablauf der Inkubationszeit mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Der Sekundär- und der Tertiärantikörper werden nacheinander für jeweils 10 Minuten erneut aufgetragen und nach jedem Arbeitsschritt wird wiederum mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Dies bewirkt eine zusätzliche Enzymanlagerung an die Antigenbindungsstelle und somit eine intensivere Farbreaktion.

Bei der anschließenden Herstellung der Färbelösung wird die Lösung 1 (enthält Levamisole zur Unterdrückung der endogenen alkalischen Phosphatase) mit der Lösung 2, die das Substrat Naphthol-AS-BI-Phosphat der alkalischen Phosphatase enthält, vermischt. Die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes spaltet nun das Substrat in eine Phenolkomponente und Phosphat. Die Phenolkomponente verbindet sich bei der nachfolgenden Zugabe der Lösung 3 mit dem darin enthaltenen Chromogen Neufuchsin zu einem roten Farbstoff. Die Neufuchsin-Entwicklerlösung wird auf alle Schnitte filtriert und 10 bis 20 Minuten inkubiert. Danach werden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen, für zwei Minuten mit Formalin fixiert und nochmals mit Leitungswasser gewaschen. Im Anschluss erfolgt für 15 Minuten die Gegenfärbung mit Hämatoxilin, welches die Zellkerne blau färbt. Danach werden die Präparate mit warmem Leitungswasser gespült und mit Aquatex eingedeckelt.

Zur Sicherstellung der Spezifität wird je eine Isotypkontrolle in der Proteinkonzentration des jeweiligen Primärantikörpers und zur Validierung der Methode eine Leerkontrolle durchgeführt. Bei letzterer wurde der Primärantikörper weggelassen und durch den Verdünnungspuffer für primäre Antikörper ersetzt.

#### **2.2.4 Histologische Auswertung**

Die histologische Auswertung erfolgte semiquantitativ (Chen u. Mitarb. 1996) nach morphologischen Gesichtspunkten. So wurde bei allen Schnitten die Anfärbung durch HLA-DR- und Endothelinexpression in Gefäßen, Tubuli und Glomerula beurteilt. Hierzu wurde folgender Punkte-Score gewählt:

0 Punkte:	keine Expression
1 Punkt:	geringe Expression
2 Punkte:	starke Expression

Um die interne Fehlerquote dieser semiquantitativen Auswertung zu reduzieren, wurden alle Schnitte dreifach ausgewertet und der jeweilige Mittelwert in die Ergebnisauswertung einbezogen. Wurden beispielsweise die Tubuli in einem HLA-DR markierten Schnitt zwei Mal mit einem Punkt und einmal mit 2 Punkten beurteilt, wurde das Ergebnis von 1,33 Punkten in die Auswertung übernommen.

#### **2.2.5 Statistische Methoden**

Zum Vergleich zweier prozentualer Anteile mit den statistischen Größen Stichprobenumfang und Anteil diente der statistische Test Vergleich zweier Anteile. Zum Vergleich zweier Gruppen mit Standardabweichung, Mittelwert und Anzahl diente der unverbundene T-Test. Zur Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede zweier Vergleichsgruppen wurde jeweils der Wert P berechnet. Statistische Signifikanz besteht bei  $P < 0,05$ . Zur Durchführung der statistischen Berechnungen diente das Programm Biostatistik für Windows in der Version 4.04. Die statistischen Auswertungen dieser Arbeit sind als ausschließlich deskriptiv zu verstehen.

## 2.3 Material

### 2.3.1 Reagenzien

- 2-Amino-2-methyl-propan 1,3diol Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethane research grade Serva, Boehringer Ingelheim,
- Natriumchlorid, reinst Merck, Darmstadt
- Levamisole Sigma, Steinheim
- Naphthol-AS-BI-Phosphat Sigma, Steinheim
- N,N-Dimethylformamid Merck, Darmstadt
- HCl Apotheke des UKL
- Neufuchsin Chroma, Brattleboro, USA
- Natriumnitrit Sigma, Steinheim
- Formalin Apotheke des UKL
- Hämatoxilin Apotheke der UKL
- Bovines Serum Albumin (BSA), Fraction V Sigma, St. Louis, USA
- hitzeinaktiviertes Humanserum (AB-Serum) Institut für Transfusionsmedizin des UKL
- Aceton zur Analyse, 99,5% Reinheit Merck, Darmstadt

### 2.3.2 Technische Geräte und Zubehör

- Waage Sartorius Type L610D, Sartorius, Göttingen
- Präzisionswaage AG204Delta Range, Mettler-Toledo, Greifensee, CH
- Zentrifuge Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg
- Kryostat 1720 Digital, Leica, Bensheim
- Schüttler VF2, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
- pH-Meter pH 90, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
- Rührgerät IKAMAG REO, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
- Pipettierhilfe Pipetboy, Brand, Medina, USA
- Pipetten (10, 200, 1000 Mikroliter) Finnpipette, Labsystems, Egelsbach
- Stanze Single Action Biopsy Device ( 18g X 15 cm, 20 mm Throw, 15 mm Notch), US Biopsy, Franklin, USA
- Stanze Biopty, Radiplast AB, Uppsala, Schweden

### 2.3.3 Gebrauchsmaterial

- Objektträger, Super Frost Menzel, Braunschweig
- Deckgläser, 24x50 mm Menzel, Braunschweig
- Aquatex Merck, Darmstadt
- Fettstift
- Zellstoff Pehazell, Hartmann, Heidenheim
- Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl) Saarstedt, Saarstedt
- Filter 595,5 Folded Filters, Schleicher & Schuell, Dassel
- Nadel (für Stanze) Biopty-Cut (18g X 16 cm Länge, Zylinderlänge 1,7 cm), Bard, Covington, Großbritannien
- Nährmedium Tissue freezing

### 2.3.4 Antiseren

- Monoklonal Maus anti Human, HLA-DP, DQ, DR Antigen DAKO, Glostrup, Dänemark
- Endothelin-1, Maus, IgG1 Dianova, Hamburg
- Kaninchen Anti Maus DAKO, Glostrup, Dänemark  
Immunglobulin
- APAAP, Maus, Monoklonal DAKO, Glostrup, Dänemark
- Isotyp IgG1, Maus DAKO, Hamburg

### 2.3.5 Puffer und Lösungen

#### Tris-Stammlösung (pH 7,4)

12 g TRIS  
2000 ml a.d.

#### TRIS-Puffer (pH 9,7)

3 g TRIS  
500 ml a.d.  
6 g NaCl

#### Neufuchsinlösung (5%)

5 g Neufuchsin  
100 ml 2N HCl

#### TRIS Buffered Saline (TBS-Waschpuffer)

10,125 mg NaCl  
125 ml TRIS-Stammlösung  
1125 ml a.d.

Verdünnungspuffer für primäre Antikörper und APAAP-Komplex

TBS

BSA (2%)

Verdünnungspuffer für zweiten Antikörper

8 Teile TBS

2 Teile hitzeinaktiviertes Humanserum (AB-Serum)

Natriumnitrit (4%)

40 mg Natriumnitrit

1 ml a.d.

Lösung 1

18 ml 0,2M 2-Amino-2,2-Methyl-Propan-1,3-diol

50 ml 0,05M TRIS-Puffer

0,6 g 0,15M NaCl

28 mg Levamisole

Lösung 2

35 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat

420 µl N,N-Dimethylformamid

Lösung 3

140 µl 5% Neufuchsinlösung

350 µl 4% Natriumnitritlösung

Neufuchsin-Entwicklerlösung (pH 8,7)

Lösung 1 und Lösung 2 mischen

Lösung 3 hinzugeben

Die Lösungen wurden, soweit erforderlich und nicht anders angegeben, mit 1M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung auf den gewünschten pH-Wert titriert.

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 Leichennierenspender und -empfänger**

Es wurden Nieren von 37 postmortalen Spendern aus dem Einzugsgebiet des Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Lübeck untersucht. Daraus resultieren theoretisch 74 Empfänger von Transplantatnieren. Es konnten jedoch nur 68 Datensätze ausgewertet werden. Der Verbleib von drei Nieren konnte nicht verfolgt werden, bei einem Spender wurde bei der Explantation ein Nierenzellkarzinom diagnostiziert und ein weiterer Spender war einnierig. Von jedem der verbliebenen Spender gewannen wir jeweils eine Stanzbiopsie für unsere Studie.

Von den 68 Transplantatempfängern waren 32 Patienten des Universitätsklinikums Lübeck. Von acht Leichenspendern blieben jeweils beide Nieren an unserer Klinik, so dass hier ein direkter Vergleich des klinischen Verlaufs beider Transplantatnieren möglich war (n=16). Sieben Patienten schieden vorzeitig aus der Studie aus, vier der sieben erlitten einen Organverlust und drei verstarben vor Ablauf der Studie mit erhaltener Transplantatfunktion. 14 Transplantatbiopsien erhielten wir post transplantationem von Patienten, die aus klinischer Indikation biopsiert wurden.

36 Leichennieren von Spendern des UKL wurden an Empfänger in auswärtigen Transplantationszentren vergeben. Zur Auswertung der Verläufe dieser Transplantationen richteten wir ein Rundschreiben mit der Bitte um Angabe der wichtigsten Informationen an die entsprechenden Transplantationszentren. 31 von 36 Rundschreiben wurden beantwortet und gelangten in die Auswertung. Einer der Patienten verstarb vor Ablauf der Studie mit guter Transplantatfunktion und sechs weitere Patienten erlitten einen Transplantatverlust (Tabelle 3.1).

Unsere Studie erfolgte über einen Zeitraum von mehr als drei Jahren. Die kürzeste Beobachtungszeit betrug drei Monate. Ein Patient schied vor Ablauf dieses Zeitraums aus der Studie aus, da er während der ersten drei Monate nach der Transplantation verstarb.

Auswertung über	0-3 Mo.	3-6 Mo.	6-12 M.	1-2 J.	2-3 J.	>3 J.
<b>Transplantate</b>	68	67	61	52	46	17
<b>Organverlust</b>	6	1	1	2	1	0
<b>verstorben</b>	1	0	2	1	0	0

Tabelle 3.1 Zahl ausgewerteter Transplantate, Organverluste von Organempfängern sowie verstorbener Patienten des UKL und auswärtiger Transplantationszentren

### 3.1.2 Lebendspender

14 Nieren von Lebendspendern und deren Transplantatempfängern wurden in die Studie einbezogen. Zum einen war dadurch die Möglichkeit gegeben, Verläufe von Lebendnierentransplantationen mit denen von Leichennierentransplantationen zu vergleichen, zum anderen konnten die Nullbiopsien der Lebendspendernieren als Kontrollen zu Leichennierenbiopsaten dienlich sein. Bei den Empfängern dieser Nieren kam es im Laufe der Studie zu einem Organverlust (1 / 14).

### 3.2 Bildung von Vergleichsgruppen

Zur Ermittlung und zum Vergleich klinischer Ereignisse bei den Transplantatempfängern wurden Gruppen gebildet. Ein Transplantiertes, bei dem mehrere Ereignisse zutrafen, kann in mehr als einer Gruppe aufgeführt sein. In Tabelle 3.2 sind die verschiedenen Vergleichsgruppen und die jeweilige Anzahl von Patienten aufgeführt.

Vergleichsgruppen (Ereignisse nach Transplantation)	Empfänger von			
	Leichennieren		Lebendnieren	
	Anzahl	in %	Anzahl	in %
Akute Tubuläre Nekrose (ATN)	23	34	4	27
keine Akute Tubuläre Nekrose	45	66	10	71
Rejektion in ATN	12	18	1	7
keine Rejektion in ATN	56	82	13	93
andere Rejektion (ohne Rej. in ATN)	17	25	4	29
keine andere Rejektion	51	75	10	71
Rejektionen insgesamt	30	44	5	36
keine Rejektion	38	56	9	64
ATN u./o. Rejektion u./o. Organverlust	39	57	7	50
weder ATN, noch Rej. o. Organverlust	29	43	7	50
Organverlust	11	16	1	7
Kein Organverlust	57	84	13	93

Tabelle 3.2 Anzahl und Inzidenz von klinischen Ereignissen bei Leichen- und Lebendnierenempfängern

### 3.3 Laborparameter und klinische Ereignisse der Leichenspender

Die untersuchten Laborwerte entsprachen den auf dem Spenderinformationsblatt nach Eurotransplant-Standard geforderten Parametern. Im Folgenden beschränke ich mich auf die Beschreibung klinisch relevanter und statistisch signifikanter Parameter im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Im Text nicht dargestellte Einzelergebnisse sind im Anhang aufgeführt (s. Verweise).

#### 3.3.1 Laborparameter

Die **Leberenzyme** ASAT, ALAT und LDH waren bei den Spendern der Transplantatempfänger, die postoperativ eine Rejektion oder einen Organverlust erlitten, sowohl bei Aufnahme auf die Intensivstation als auch bei der letzten Kontrolle vor der Organentnahme gegenüber den Vergleichsgruppen ohne Rejektion oder Organverlust erhöht (n.s.). Ähnliches gilt für die  $\gamma$ -GT (n.s., s. Abb. 6.1 – 6.8 im Anhang).

Die **Pankreasenzyme** Amylase und Lipase waren ebenfalls in fast allen Gruppen mit Komplikationen im Transplantationsverlauf im Vergleich zu den jeweiligen Gruppen ohne Komplikationen schon im Aufnahmelabor erhöht. Noch deutlicher wurde dies in der letzten Laboruntersuchung vor Explantation. Wegen der großen Streubreite der erfassten Laborparameter waren die genannten Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant. Eine exemplarische Darstellung der Pankreasenzyme der Spender vor Explantation zum Vergleich der verschiedenen Patientengruppen mit Posttransplantationskomplikationen zeigen die Abbildungen 3.1 und 3.2.

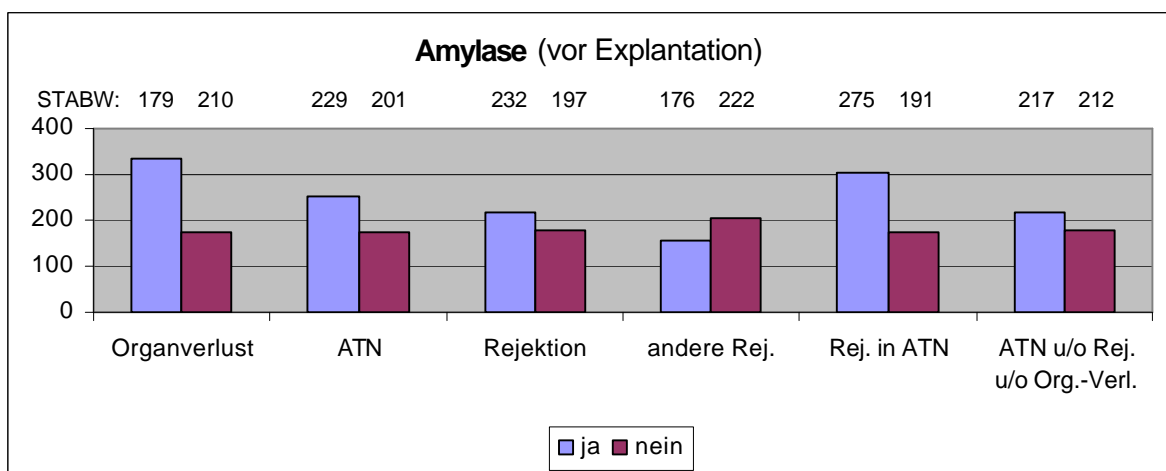


Abbildung 3.1 Mittelwerte und Standardabweichungen für Amylase vor Explantation (U/l), STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

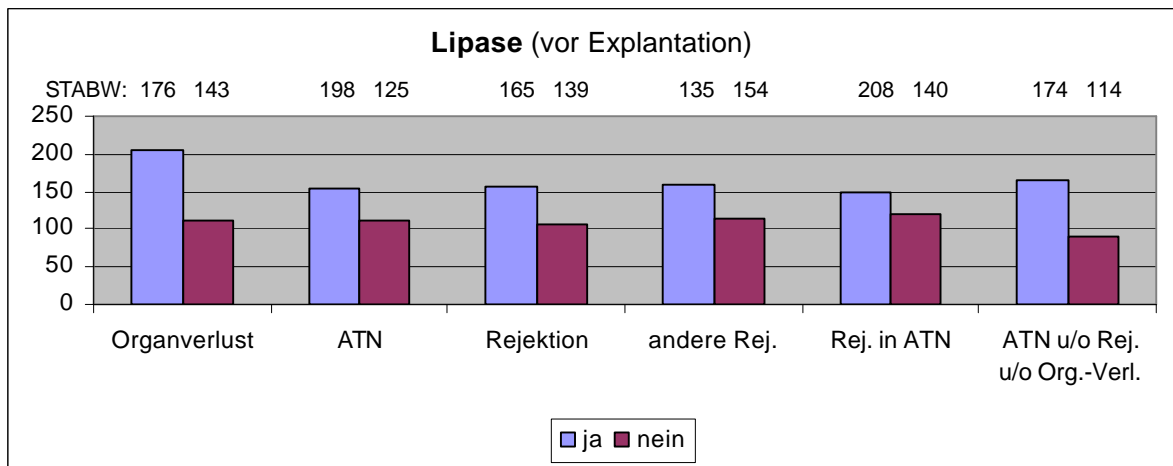


Abbildung 3.2 Mittelwerte und Standardabweichungen für Lipase vor Explantation (U/l), STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

Auch die **Herz- und Muskelenzyme** CPK und CKMB waren prä-explantationem bei den Spendern erhöht, deren Empfänger postoperativ eine ATN und/oder während der ATN-Phase eine Rejektion erlitten (n.s., s. Abb. 6.9 u. 6.10 im Anhang).

In den Gruppen ATN, Organverlust und alle Komplikationen war der letzte vor der Organentnahme gemessene **Serum-Kreatininwert** im Vergleich zu den jeweiligen Gruppen ohne Komplikationen erhöht. In der Vergleichsgruppe ATN / keine ATN war der Unterschied statistisch signifikant (s. Tab 3.3).

Vergleichsgruppen	N	S-Kreatinin (µmol / l)	Statistische Prüfung
<b>ATN</b>	20	104 ± 75	<b>P = 0,043</b>
<b>keine ATN</b>	47	78 ± 28	
Organverlust	10	101 ± 75	P = 0,306
kein Organverlust	57	84 ± 42	
ATN u./o. Rejektion u./o. Organverlust	36	94 ± 61	P = 0,177
weder ATN, noch Rejektion, noch Organverlust	31	77 ± 27	

Tabelle 3.3 Serum-Kreatininwerte der Spender vor Organexplantation, ATN = Akute Tubuläre Nekrose

Die **Leukozytenzahlen** der Spender waren in der Gruppe der Empfänger mit Organverlust bei Aufnahme auf die Intensivstation im Durchschnitt  $15,5 \pm 4,96$  (N = 10) und vor der Explantation  $16,7 \pm 5,95$  (N = 10). Im Vergleich dazu waren die Leukozytenzahlen in der Gruppe ohne Organverlust mit  $12,0 \pm 4,8$  (N = 59) bei Aufnahme und  $12,6 \pm 5,5$  (N = 59) vor Explantation jeweils signifikant geringer (P = 0,036 zu beiden Zeitpunkten, Abb. 3.3). In den übrigen Parametern des Blutbildes fanden sich keine Unterschiede.

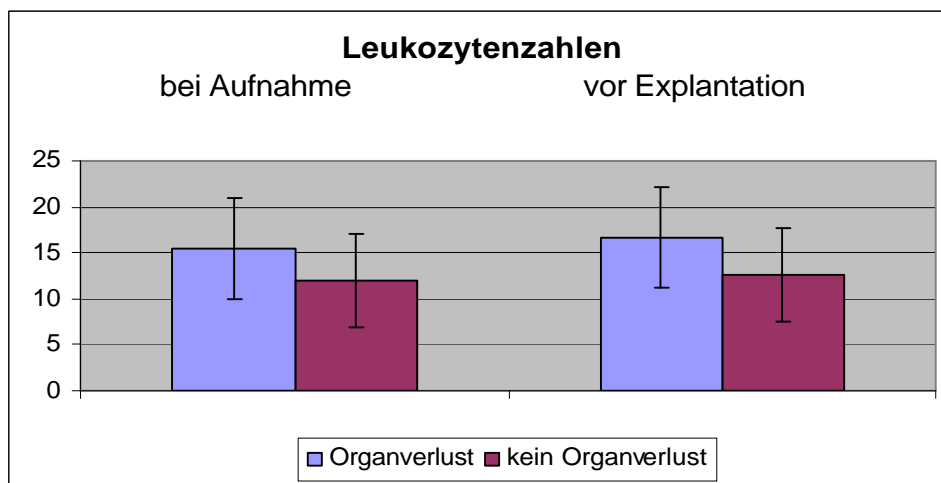


Abbildung 3.3 Mittelwerte und Standardabweichungen für Leukozyten nach Aufnahme und vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschiede statistisch signifikant (P jeweils = 0,036).

Ebenfalls auffällig zwischen den Vergleichsgruppen Organverlust / kein Organverlust war der Unterschied in der **Sauerstoffsättigung** dieser Spender direkt vor der Organentnahme (eine Stunde präoperativ). Diese betrug bei den Spendern von Transplantaten, die nach Ablauf der Studie noch funktionstüchtig waren,  $97,7\% \pm 2,74$  (N = 32). Bei den Organspendern, deren Empfänger einen Organverlust erlitten, betrug die Sauerstoffsättigung zum entsprechenden Zeitpunkt nur  $94,1\% \pm 4,62$  (N = 4). Mit einem P-Wert von 0,026 ist dieser Unterschied statistisch signifikant (Abb. 3.4).

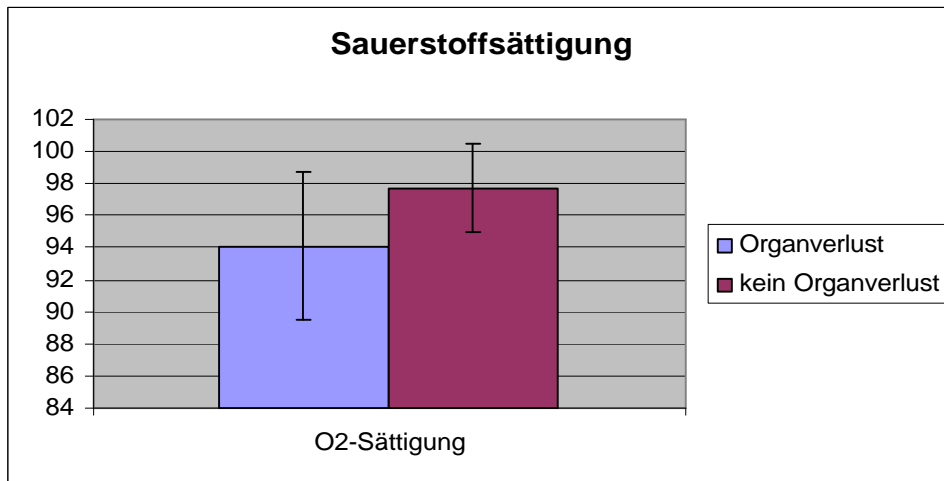


Abbildung 3.4 Mittelwerte und Standardabweichungen für die Sauerstoffsättigung vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschied stat. signifikant ( $P = 0,026$ ).

### 3.3.2 Spendertherapie

Die Auswertung der verabreichten Katecholamindosen bei den Organspendern beschränkt sich auf die Verabreichung von Dopamin, da andere Katecholamine wie Dobutamin, Adrenalin oder Noradrenalin nur sporadisch appliziert wurden und es somit nicht möglich war, eine Auswertung vorzunehmen.

Vergleichsgruppen	N	Kumulative Dopamindosen (mg, über die letzten 24 h prä-op., Mittelwerte, STABW)	Statistische Prüfung
ATN	19	681 ± 482	P = 0,105
Keine ATN	46	484 ± 421	
Rejektion	25	551 ± 438	P = 0,893
Keine Rejektion	34	535 ± 457	
Rejektion in ATN	10	720 ± 425	P = 0,177
Keine Rejektion in ATN	51	509 ± 450	
ATN u./o. Rejektion u./o. Organverlust	35	589 ± 463	P = 0,333
weder ATN, noch Rejektion, noch Organverlust	29	479 ± 431	

Tabelle 3.4 Kumulative Dopamingaben in den letzten 24 Stunden prä-explantationem, ATN = Akute Tubuläre Nekrose, STABW = Standardabweichung

Obwohl deutliche Tendenzen zu höheren Dopamindosen bei Spendern zu erkennen sind, deren Empfänger mit einer ATN konfrontiert wurden, sind die Unterschiede statistisch nicht zu sichern.

### 3.4 Transplantationsparameter

#### 3.4.1 Spender- und Empfängeralter

Fasst man alle **Spender** von Transplantierten, die entweder eine ATN, eine Rejektion oder einen Organverlust erlitten haben, zu einer Gruppe zusammen, waren diese mit  $55 \pm 15,4$  Jahren ( $N = 11$ ) etwa fünf Jahre älter als die Spender der Empfänger ohne jegliche Komplikationen ( $51 \pm 14,4$  Jahre,  $N = 50$ ). Wegen der insgesamt jedoch geringen Zahl von Ereignissen waren die Altersunterschiede statistisch nicht signifikant.

Am Auffälligsten war bei diesem Parameter der Vergleich der Gruppen Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN. Die Spender der ersten Gruppe waren im Mittel  $61 \pm 17,0$  Jahre alt ( $N = 12$ ), die der Gruppe ohne Rejektion in ATN jedoch nur  $52 \pm 14,0$  Jahre ( $N = 48$ ). Der P-Wert liegt mit 0,053 an der Signifikanzgrenze.

Die **Transplantatempfänger**, die einen Organverlust erlitten, waren im Durchschnitt  $54 \pm 17,8$  Jahre alt ( $N = 11$ ). Im Vergleich dazu waren die Transplantatempfänger, deren Organe nach Ablauf der Studie noch voll funktionstüchtig waren, nur  $50 \pm 16,9$  Jahre alt ( $N = 51$ ). Aufgrund der geringen Zahl an Organverlusten war jedoch auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Wie beim Spenderalter war auch im Prüfkriterium Empfängeralter der Vergleich der Gruppen Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN am auffälligsten. Während die Empfänger der Gruppe ohne Rejektion in ATN nur  $48 \pm 17,4$  Jahre alt waren ( $N = 50$ ), betrug das Durchschnittsalter der Empfänger mit einer Rejektion in ATN  $59 \pm 11,7$  Jahre ( $N = 11$ ). Die Grenze zur statistischen Signifikanz wurde mit  $P = 0,059$  auch hier fast erreicht.

#### 3.4.2 Ischämiezeiten

Bei der Analyse der **warmen Ischämiezeiten** gab es keine Unterschiede in den Vergleichsgruppen. Statistisch signifikant war der Unterschied der **kalten Ischämiezeit** (KIZ) in den Gruppen andere Rejektion / keine andere Rejektion (KIZ  $16,8 \pm 5,92$  ( $N = 14$ ) vs.  $13,2 \pm 5,17$  Stunden ( $N = 39$ );  $P = 0,031$ , Abb. 3.4).

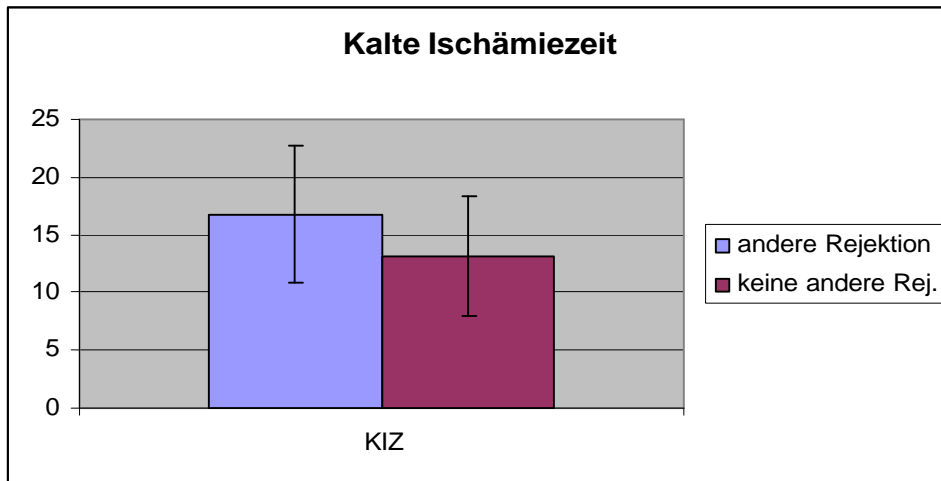


Abbildung 3.5 Mittelwerte und Standardabweichungen für die kalte Ischämiezeit, STABW = Standardabweichung, Unterschied statistisch signifikant (P = 0,031).

### 3.4.3 HLA-Mismatches

Die Unterschiede in den HLA-Mismatches zwischen den verschiedenen Gruppen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.5) zusammengefasst.

Vergleichsgruppen	N	HLA-Mismatches	Statistische Prüfung
Akute Tubuläre Nekrose	21	2,19 ± 1,74	P = 0,727
keine Akute Tubuläre Nekrose	34	2,03 ± 1,58	
<b>Rejektion in ATN</b>	11	3,00 ± 1,65	<b>P = 0,028</b>
<b>keine Rejektion in ATN</b>	43	1,81 ± 1,54	
Andere Rejektion (ohne Rej. in ATN)	13	2,00 ± 1,36	P = 0,894
keine andere Rejektion	41	2,07 ± 1,20	
Rejektionen insgesamt	25	2,52 ± 1,58	P = 0,073
keine Rejektion	30	1,73 ± 1,61	
ATN u./o. Rejektion u./o. Organverlust	34	2,38 ± 1,68	P = 0,093
weder ATN, noch Rej. o. Organverlust	21	1,62 ± 1,46	
Organverlust	11	2,64 ± 1,97	P = 0,184
kein Organverlust	44	1,95 ± 1,52	

Tabelle 3.5 HLA-Mismatches der verschiedenen Vergleichsgruppen, HLA-Mismatches = Anzahl von Fehlübereinstimmungen im humanen Leukozyten-Antigen System, ATN = Akute Tubuläre Nekrose

Mit Ausnahme der Vergleichsgruppen andere Rejektion / keine andere Rejektion wurde jeweils ein höheres Mismatch-Niveau bei den Empfängern mit Komplikationen analysiert. In dem Vergleich Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN war dieser Unterschied statistisch signifikant.

### 3.5 Zusammenhänge zwischen Posttransplantationskomplikationen

Bei der Prüfung der Gruppen auf Überlappungsereignisse (mehrere Ereignisse bei einem Transplantatempfänger) ergaben sich auffällige Koinzidenzen in den Gruppen ATN / keine ATN mit den Gruppen Rejektion / keine Rejektion. So erlitten 65 % (N = 23) der Patienten mit einer ATN auch eine Rejektion, bei den Patienten ohne ATN waren es nur 34 % (N = 41, P= 0,033, Abb. 3.6).

Bei Gegenprüfung betrug die Inzidenz einer ATN bei Patienten mit einer Rejektion im Verlauf nach Transplantation 55 % (N = 29). Von den Patienten, die keine Rejektion erlitten, hatten nur 23 % (N = 31) eine ATN. Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant (P= 0,023, Abb. 3.6).

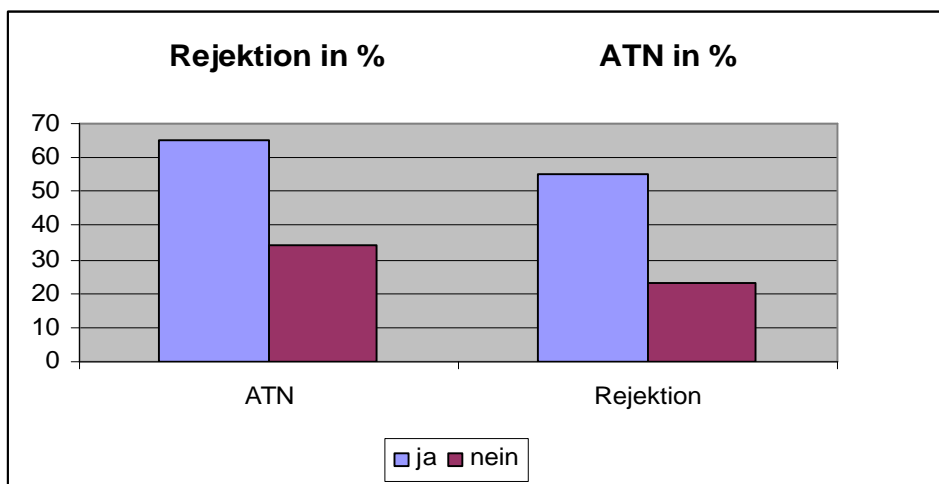


Abbildung 3.6 Koinzidenz einer ATN bei Patienten mit Rejektion (P = 0,023), bzw. Koinzidenz einer Rejektion bei Patienten mit einer ATN (P = 0,033)

### 3.6 HLA-DR Immunhistologie

Von insgesamt 37 zur Verfügung stehenden Biopsaten von Leichenspendern wurden 35 untersucht. Der Datensatz eines Spenders wurde nicht verwertet, da der Verbleib seiner beiden explantierten Nieren nicht nachverfolgt werden konnte und bei einem weiteren wurde während der Explantation ein Nierenkarzinom diagnostiziert. Von den verbliebenen 35 Spendernieren waren 5 aufgrund einer qualitativ minderwertigen Stanzbiopsie nicht auswertbar. Von weiteren 3 Stanzen waren wegen der Knappheit des Materials für die HLA-DR Immunhistologie keine Schnitte verfügbar, da die wenigen vorhandenen Schnitte zur Untersuchung der ET-1 Immunhistologie verwendet wurden. Insgesamt konnten somit 27

Nierenbiopsate von Leichenspendern HLA-DR immunhistologisch untersucht werden.

Empfängerseits gab es 32 Patienten, deren postoperativen Verlauf wir entweder durch unser Rundschreiben oder direkt an unserer Klinik verfolgen konnten. Natürlich hatten wir nur bei den Leichennierenempfängern des UKL die Möglichkeit, eine Stanzbiopsie durchzuführen. Dieses erfolgte nur aus medizinischer Indikation, Protokollbiopsien wurden nicht durchgeführt. Damit standen uns 14 Stenzen zur Verfügung, von denen wiederum drei aufgrund der Minderwertigkeit des Stanzmaterials nicht auswertbar waren. Somit wurden 11 Stenzen immunhistologisch untersucht.

Außerdem war es uns möglich, von 15 Lebendspendern Nullbiopsien zu gewinnen. Auch hier konnten zwei Stenzen aufgrund der gegebenen Materialbeschaffenheit nicht ausgewertet werden, somit wurde die HLA-DR Expression von 13 Nullbiopsaten der Lebendspender immunhistologisch untersucht.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen negativen, einfach und zweifach positiven Färbungen wurden beispielhaft Präparate von Glomerula, Tubuli und Gefäßen zur photographischen Darstellung ausgewählt (s. Abb. 3.7 bis 3.13).

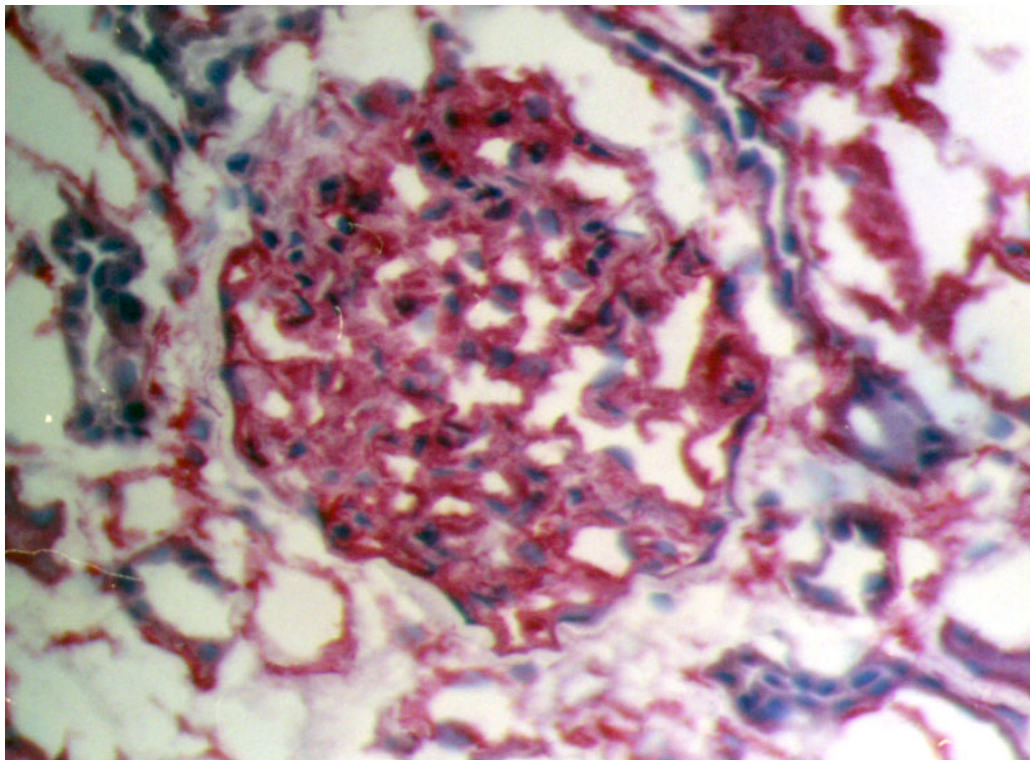


Abbildung 3.7 zweifach positives Glomerulum

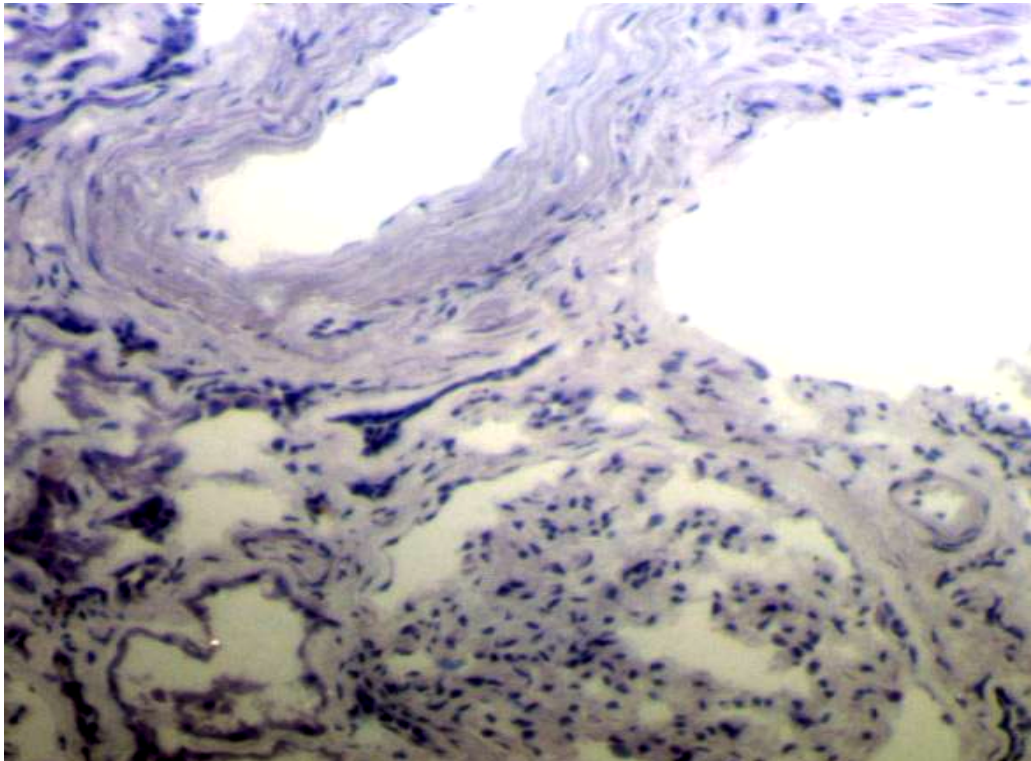


Abbildung 3.8 negatives Glomerulum u. negatives Gefäß

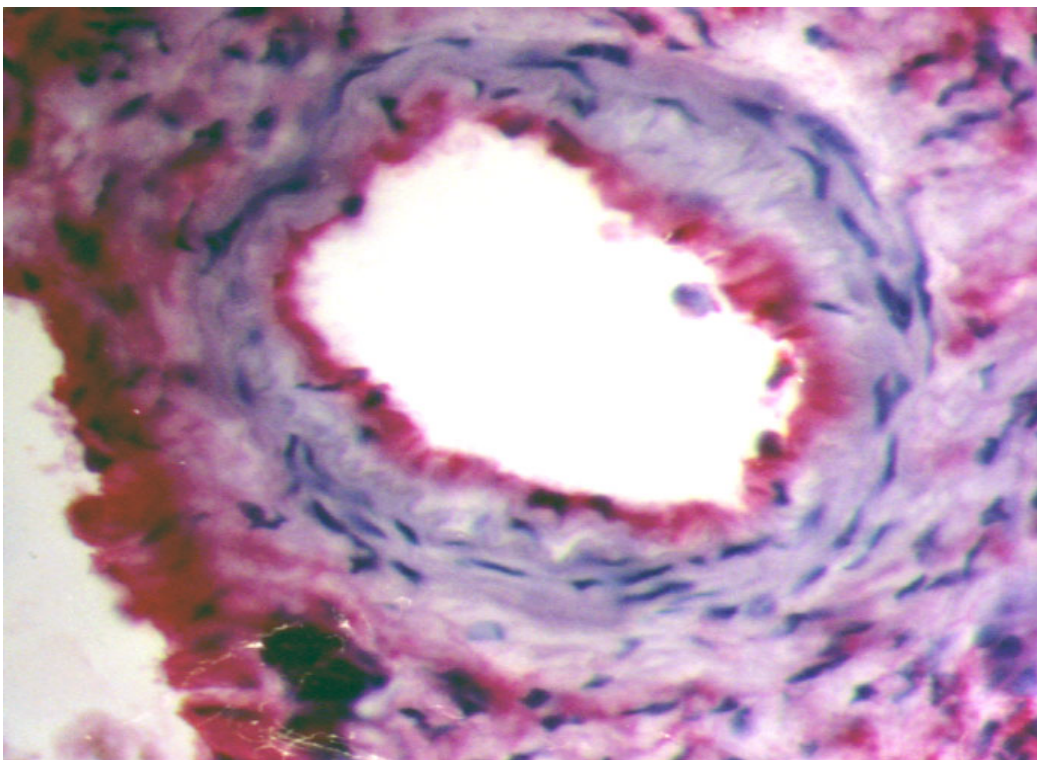


Abbildung 3.9 positives Gefäß

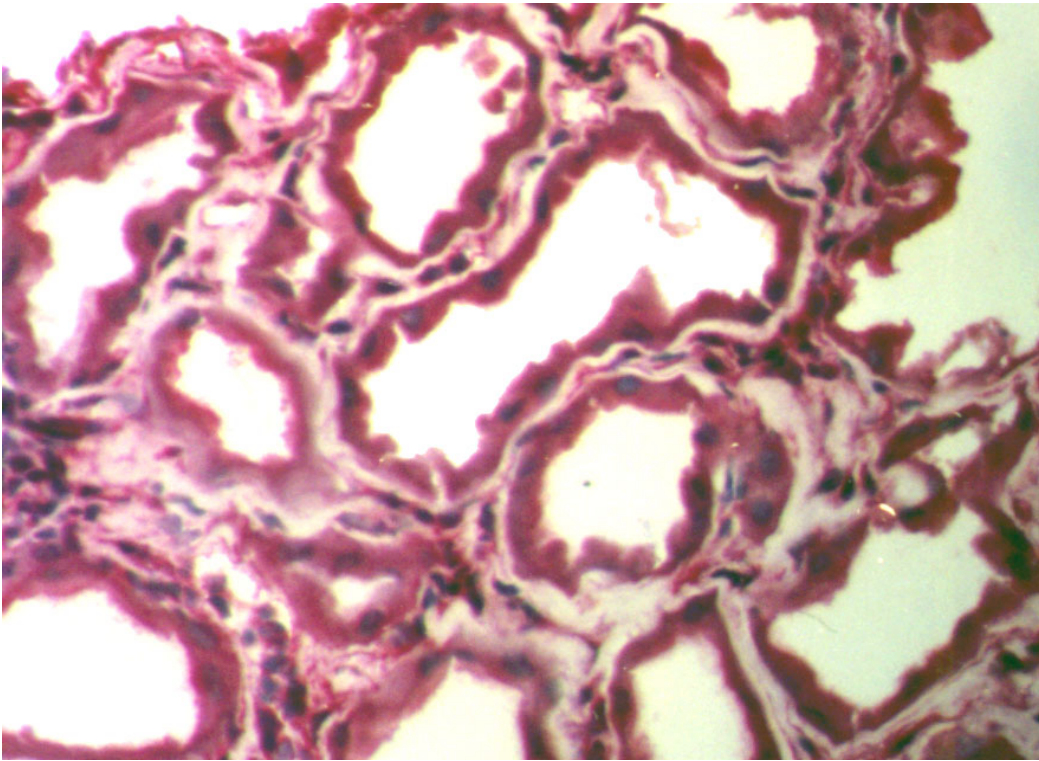


Abbildung 3.10 zweifach positive Tubuli

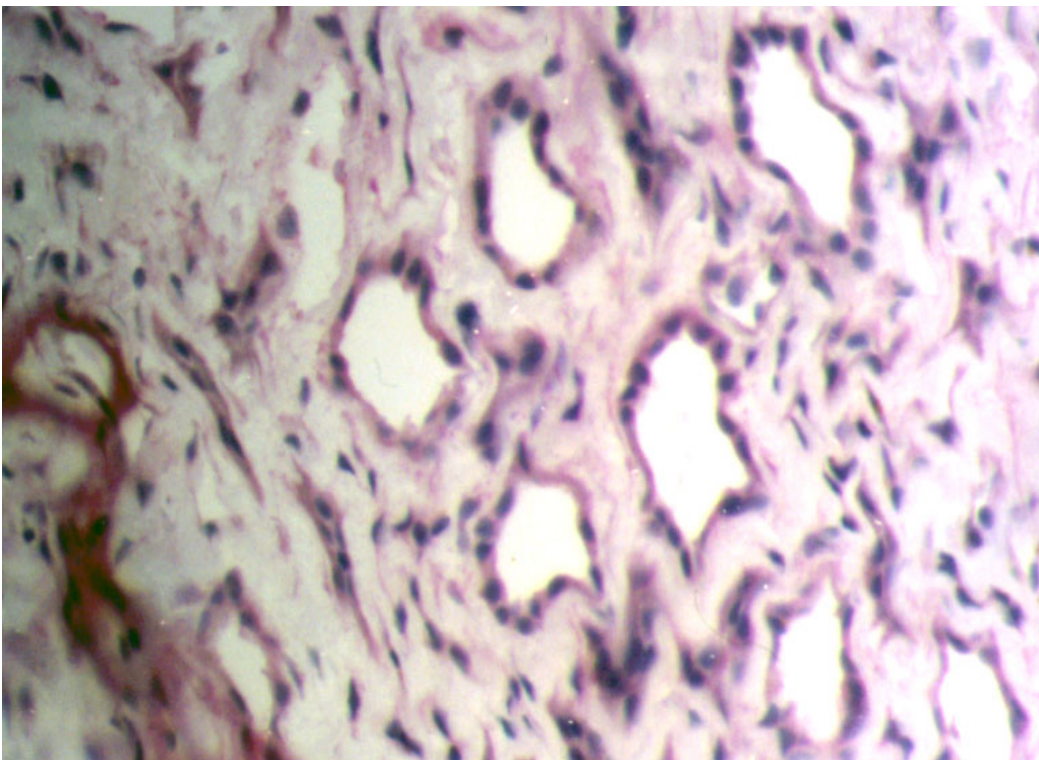


Abbildung 3.11 einfach positive Tubuli

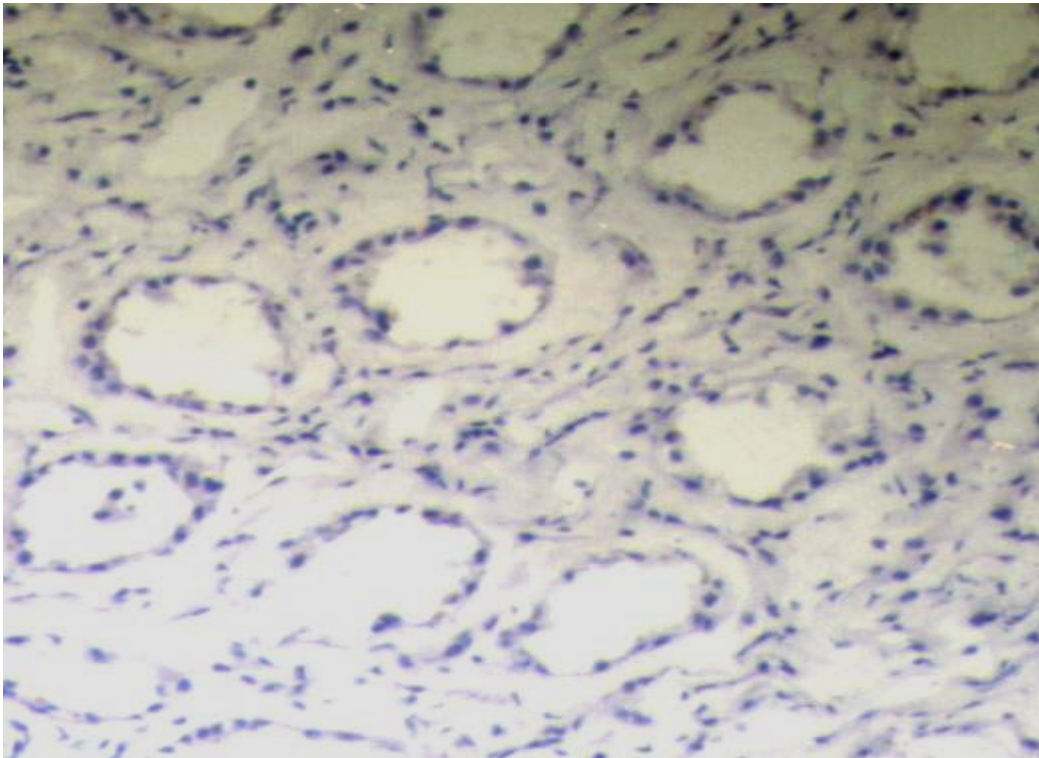


Abbildung 3.12 negative Tubuli

Von zentraler Bedeutung ist die Tatsache, dass die ausgewerteten Stanzeln fast aller Leichenspendern, Leichennierenempfänger und Lebendspendern eine HLA-DR Basisexpression aller bewerteten Strukturen, soweit in den jeweiligen Schnitten vorhanden, aufwiesen. Sie wurde mit einem Expressionsgrad von 1 bewertet. Eine Ausnahme bildeten die Tubuli im Biopsat eines Lebendspenders, die komplett HLA-DR negativ waren.

### **3.6.1 Leichenspendernieren und Transplantate von Leichen- und Lebendspendern**

Bei der Auswertung der Gesamt-HLA-DR Expression der Nieren fiel bei den Leichenspendern im Vergleich zu den Lebendspendern eine höhere HLA-DR Expression auf. Bei den Stanzeln, die von Empfängern von Leichennieren gewonnen wurden, war die HLA-DR Expression nochmals höher als bei Nullbiopsien der Organe vor der Transplantation.

Beim Vergleich der histologischen Einzelstrukturen zwischen den drei verschiedenen Gruppen fällt auf, dass es hinsichtlich der HLA-DR Expression der Glomerula kaum Unterschiede gibt. Sowohl in den Tubuli als auch in den Gefäßen

ist die HLA-DR Expression der Lebendspendernieren geringer als bei den Leichenspendernieren prä-transplantationem und diese wiederum geringer als bei Leichenspendernieren post-transplantationem. Die statistische Berechnung der Unterschiede ergab bei den angeführten Ergebnissen jedoch kein Signifikanzniveau.

	<b>Durchschnittliche Stärke der HLA-DR Expression der</b>			
	<b>Tubuli</b>	<b>Glomerula</b>	<b>Gefäße</b>	<b>Tub., Glom., Gefäße</b>
<b>Lebendnieren (prä-Tx)</b>	1,07 ± 0,62 N = 14	1,5 ± 0,58 N = 4	1 ± 0,0 N = 10	1,05 ± 0,53 N = 14
<b>Leichennieren (prä-Tx)</b>	<u>1,23</u> ± 0,42 N = 53	<u>1,48</u> ± 0,51 N = 29	<u>1,09</u> ± 0,29 N = 45	<u>1,22</u> ± 0,32 N = 53
<b>Leichennieren (post-Tx)</b>	<u>1,3</u> ± 0,48 N = 10	<u>1,5</u> ± 0,55 N = 6	<u>1,2</u> ± 0,4 N = 9	<u>1,28</u> ± 0,42 N = 10

Tabelle 3.6 Durchschnittliche Stärke der HLA-DR Expression, wobei gilt: negativ=0, einfach positiv=1, zweifach positiv=2, Unterschiede nicht signifikant.

### 3.6.2 Korrelation zu Posttransplantationskomplikationen

Die durchschnittliche HLA-DR Expression aller Strukturen (= Mittelwert aus dem Grad der HLA-DR Expression von Tubuli, Glomerula und Gefäßen) war in der Nullbiopsie bei der Mehrheit der Spendernieren < 1,5. Daher stufen wir diesen Wert als geringgradige HLA-DR Expression ein; Durchschnittswerte von ≥ 1,5 wurden als hochgradig angesehen. Bei 14 Empfängern betrug die durchschnittliche HLA-DR Expression der entsprechenden renalen Strukturen ≥ 1,5. 10 dieser Empfänger (71%) entwickelten postoperative Komplikationen (entweder ATN, Rejektion, Organverlust oder mehrere dieser Ereignisse kombiniert). 40 Empfänger gehörten zu der Gruppe mit einer durchschnittlichen HLA-DR Expression von < 1,5. Ein deutlich geringerer Anteil von 58% (N=23) entwickelte eine der oben genannten Komplikationen. Aufgrund der geringen Zahl der Empfänger war dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant.

### **3.6.3 Unterschiede zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen**

In den Vergleichsgruppen ATN / keine ATN waren keine markanten Unterschiede bezüglich der HLA-DR Expression zu verzeichnen. Deutlicher waren die Unterschiede im Zusammenhang mit einer Abstoßung, also in den Vergleichsgruppen Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN sowie andere Rejektion / keine andere Rejektion. Bei den Spendern, deren Empfänger postoperativ eine Rejektion in der ATN-Zeit entwickelten, war bereits vor der Transplantation die Expression von HLA-DR der Glomerula im Vergleich zu denen in der Gruppe keine Rejektion in ATN erhöht (Rejektion in ATN  $1,67 \pm 0,57$ , N = 3 vs. keine Rejektion in ATN  $1,48 \pm 0,51$ , N = 25, P = 0,55, n.s.). Im Gegensatz hierzu war bei den Spenderorganen, deren Empfänger unabhängig von einer ATN eine Rejektion entwickelten, die Expression von HLA-DR in den Tubuli gegenüber der in der entsprechenden Vergleichsgruppe erhöht (andere Rejektion  $1,36 \pm 0,5$ , N = 14, vs. keine andere Rejektion  $1,18 \pm 0,39$ , N = 38, P = 0,18, n.s.). Die HLA-DR Expression der Gefäße war im Zusammenhang mit einer postoperativ auftretenden Rejektion in beiden genannten Vergleichsgruppen schon präoperativ in der Spenderniere erhöht (Rejektion in ATN  $1,17 \pm 0,41$ , N = 6 vs. keine Rejektion in ATN  $1,08 \pm 0,27$ , N = 38, P = 0,48, n.s. // andere Rejektion  $1,17 \pm 0,39$ , N = 12 vs. keine andere Rejektion  $1,06 \pm 0,25$ , N = 32, P = 0,27, n.s.).

Bei den Empfängern von Leichennieren, die im Laufe der Studie einen Organverlust erlitten, war postoperativ die HLA-DR Expression in den Tubuli, vor allem aber in den Glomerula, gegenüber den Empfängern ohne einen Organverlust erhöht. Das gleiche gilt für Empfänger, bei denen postoperativ eine Rejektion ohne ATN (= andere Rejektion) auftrat gegenüber denjenigen, bei denen diese Komplikation nicht auftrat. Zusätzlich war bei diesen auch die HLA-DR Expression der Gefäße erhöht (n.s.).

Zur Übersicht über diese Resultate dienen die Tabellen 6.1 und 6.2 im Anhang.

### **3.7 Endothelin Immunhistologie**

Aus den oben beschriebenen Gründen (s. 3.6) gelangten von den anfänglich 37 in die Studie aufgenommenen Leichenspenderbiopsaten nur 35 in die immunhistologische Auswertung. Von diesen 35 waren drei aufgrund der Beschaffenheit des Materials nicht auswertbar. Von weiteren vier Stenzen standen

uns aufgrund der Knappheit des Materials nach bereits durchgeführter HLA-DR Immunhistologie nicht genügend Schnitte für die ET-1 Immunhistologie zur Verfügung. Somit blieben 28 Stenzen zur Auswertung. Empfängerseits konnte von den 14 Nierenbiopsaten eines wegen der schlechten Qualität der Stanze nicht ET-1 immunhistologisch untersucht werden. Daher gelangten 13 Stenzen in die Auswertung. Von den Lebendspenderstanzen konnten ebenfalls 13 immunhistologisch auf ET-1 Expression untersucht werden; von den 15 zunächst zur Verfügung stehenden Stenzen konnten zwei wiederum aufgrund der Materialbeschaffenheit nicht ausgewertet werden.

Auch von der ET-1 Immunhistologie wurden exemplarisch Bilder von verschiedenen Strukturen mit einer unterschiedlich starken ET-1 Expression ausgewählt (s. Abb. 3.14 – 3.20).

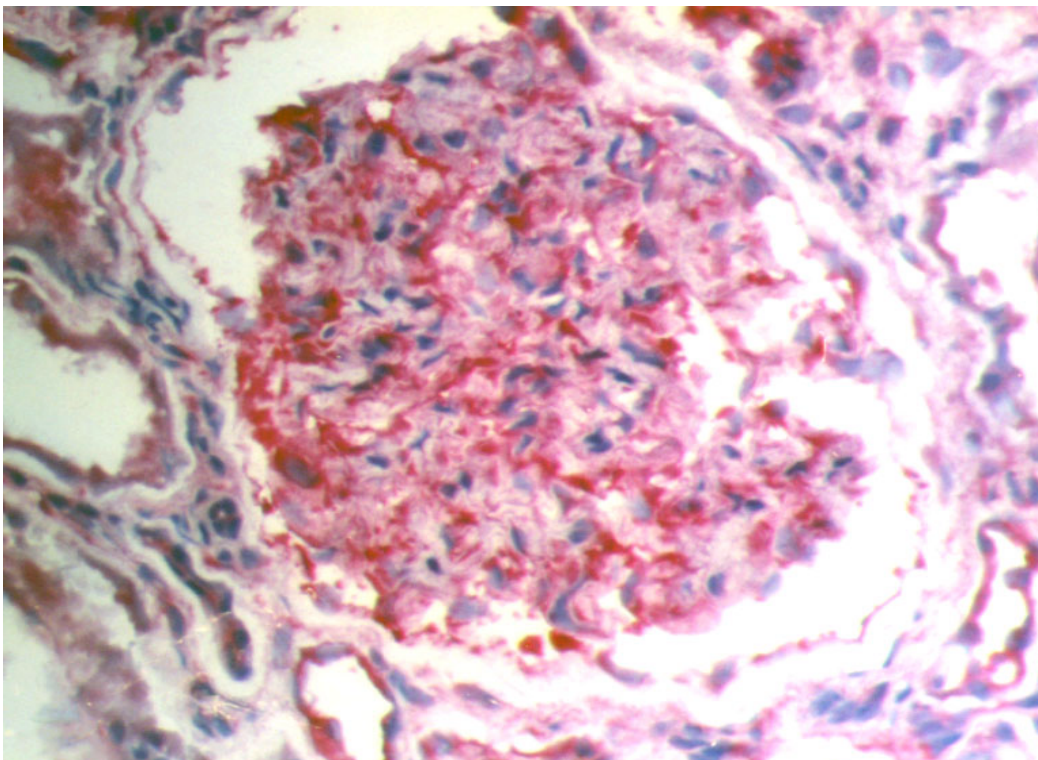


Abbildung 3.13 zweifach positives Glomerulum

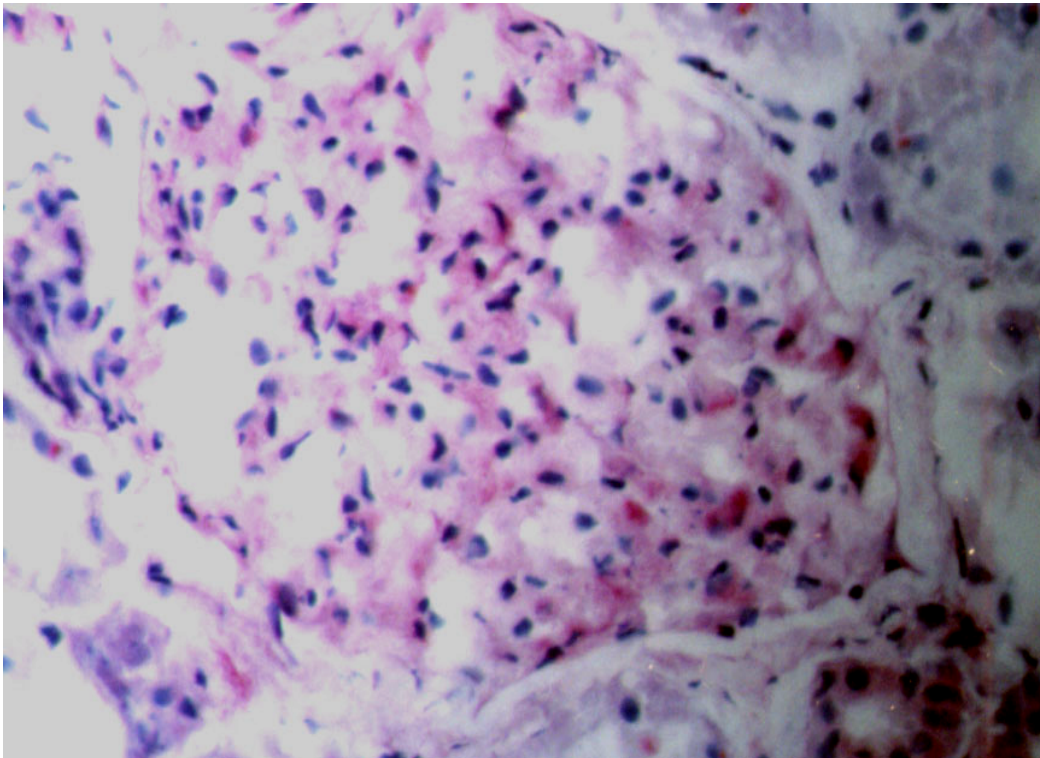


Abbildung 3.14 einfach positives Glomerulum

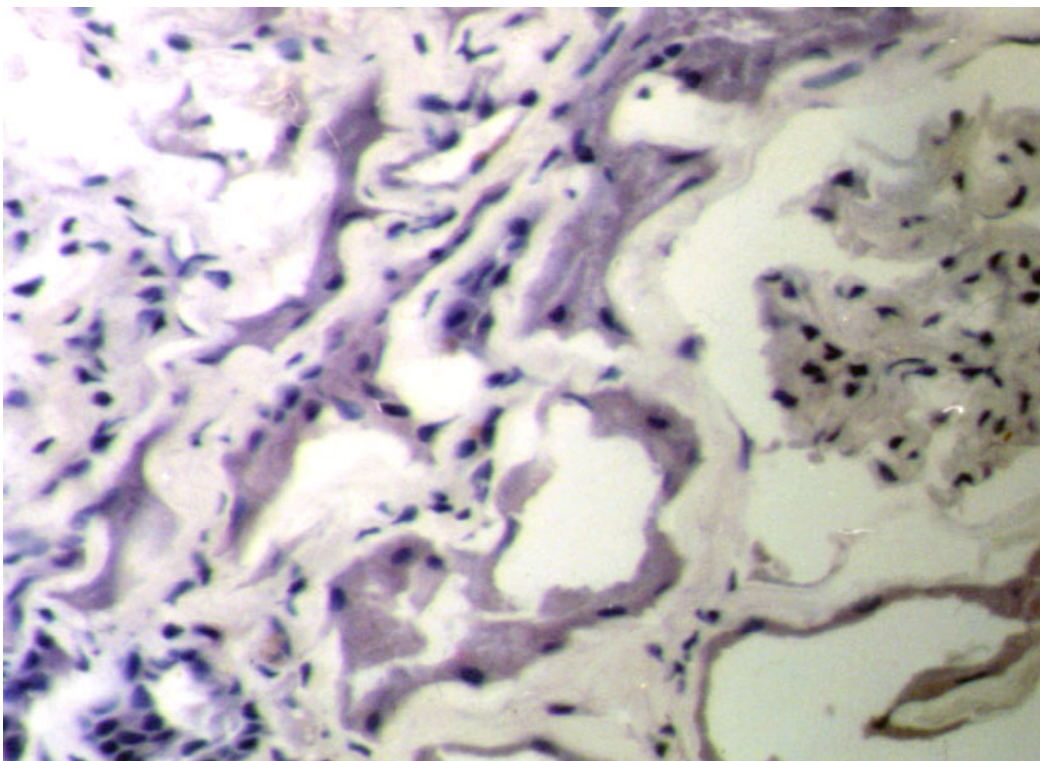


Abbildung 3.15 negatives Glomerulum

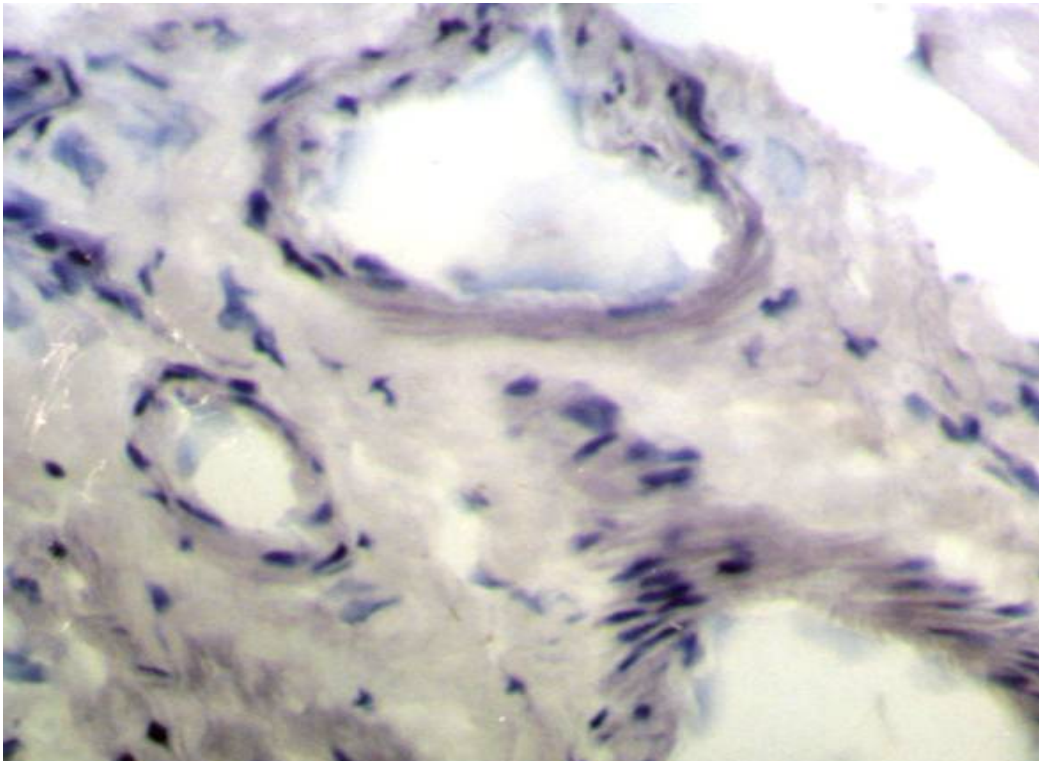


Abbildung 3.16 negative GefäÙe

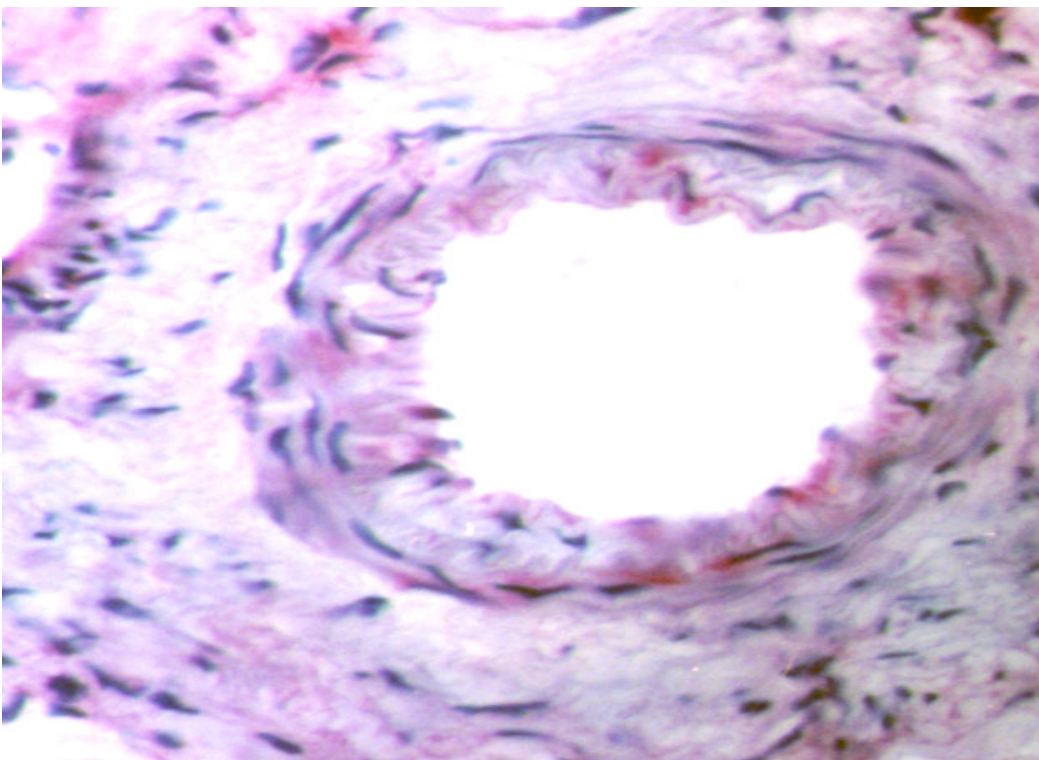


Abbildung 3.17 positives GefäÙ

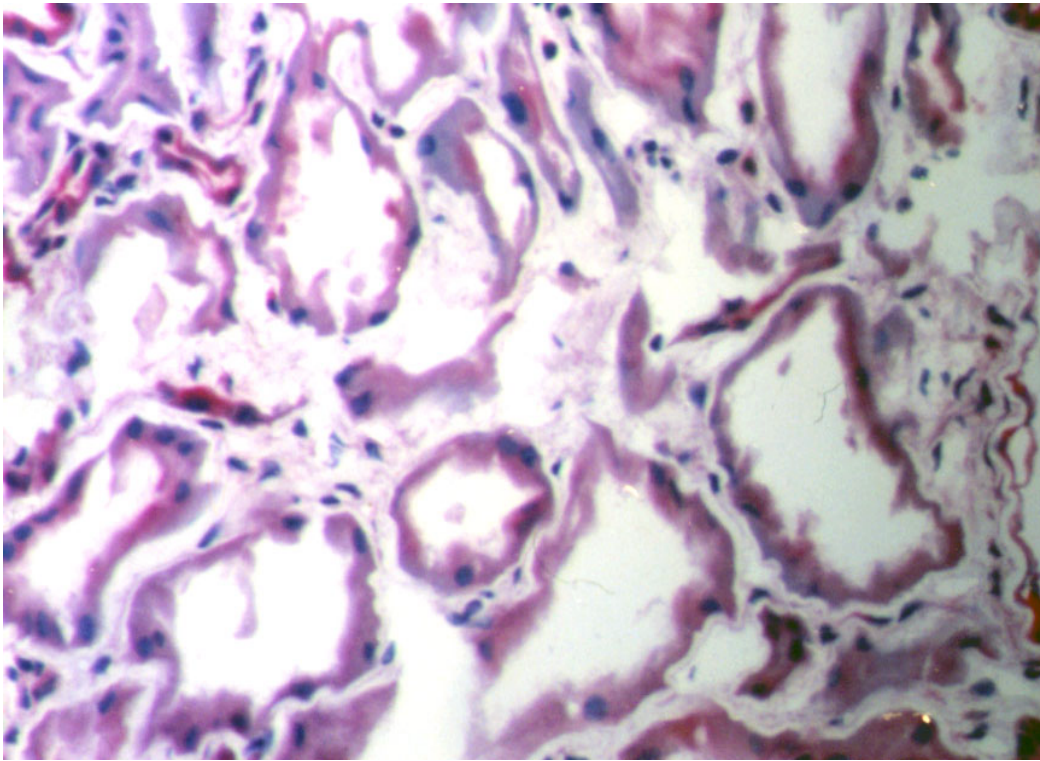


Abbildung 3.18 einfach positive Tubuli

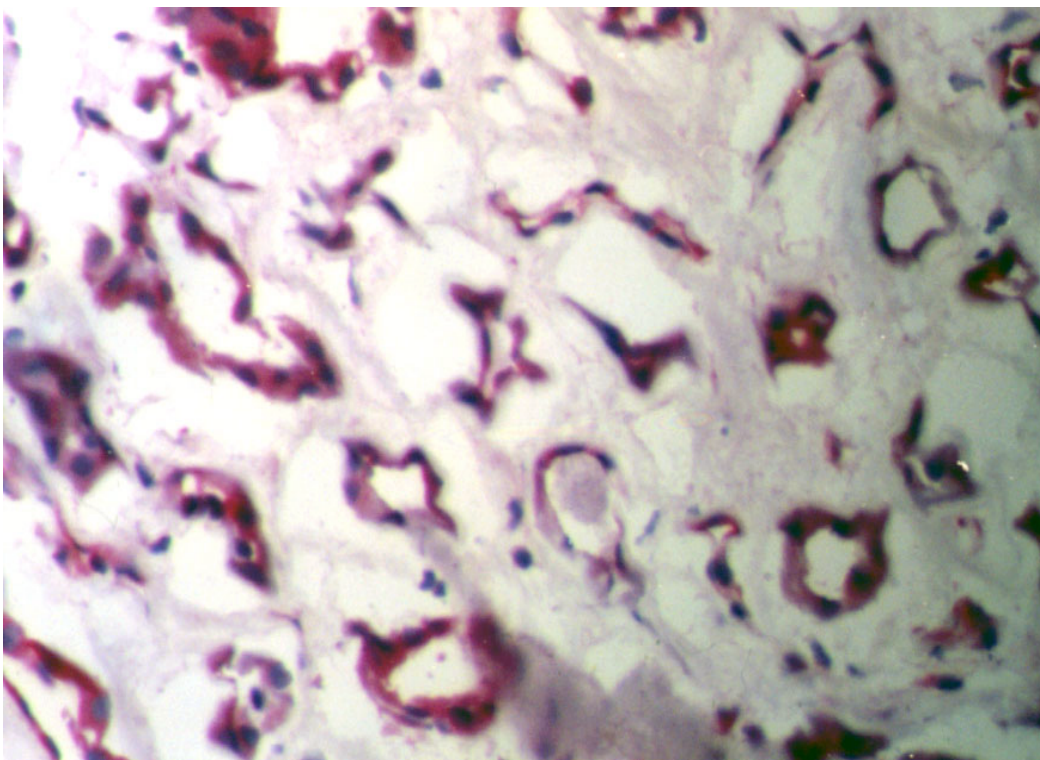


Abbildung 3.19 zweifach positive Tubuli

### 3.7.1 Leichenspendernieren und Transplantate von Leichen- und Lebendspendern

Die durchschnittliche Stärke der ET-1 Expression der postoperativ von Leichennierenempfängern gewonnenen Biopsate war deutlich höher als die derselben Nieren präoperativ. Überraschenderweise war die Expression bei dem präoperativ von Lebendspendern untersuchtem Nierengewebe höher als bei den präoperativ untersuchten Leichennieren (Tab. 3.7).

	Durchschnittliche Stärke der ET-1 Expression der			
	Tubuli	Glomerula	Gefäße	Tub., Glom., Gefäße
<b>Leichennieren (prä-Tx)</b>	<b>1,14 ± 0,35 *+</b> N = 57	<b>1,37 ± 0,49 **</b> N = 41	0,96 ± 0,19 N = 55	<b>1,13 ± 0,24***</b> N = 57
<b>Leichennieren (post-Tx)</b>	<b>1,4 ± 0,52 *</b> N = 10	<b>1,75 ± 0,46 **</b> N = 8	1 ± 0 N = 10	<b>1,36 ± 0,23***</b> N = 10
<b>Lebendnieren (prä-Tx)</b>	<b>1,5 ± 0,65 +</b> N = 14	1,4 ± 0,55 N = 5	1,09 ± 0,3 N = 11	1,3 ± 0,53 N = 14

Tabelle 3.7 Durchschnittliche Stärke der ET-1 Expression, wobei gilt: negativ = 0, einfach positiv = 1, zweifach positiv = 2; die Berechnung der Statistik ergab folgende **statistische Signifikanzen**: \* P = 0.049, \*\* P = 0.049, \*\*\* P = 0.007; + P = 0.006

### 3.7.2 Korrelation zu Posttransplantationskomplikationen

Wir sahen bei der Auswertung der ET-1 Immunhistologie nur relativ wenige Biopsate mit einer hohen Expression. Wir bildeten daher eine Gruppe mit einer Basisexpression von  $\leq 1$  (N = 40) und verglichen sie mit einer Gruppe mit einer erhöhten ET-1 Expression von  $> 1$  (N = 16). 21 Empfänger (53%) von Leichentransplantaten aus der Basisexpressionsgruppe erlitten Komplikationen wie ATN, Rejektion, Organverlust oder mehrere dieser Ereignisse. Komplikationen bei Empfängern von Leichennieren mit erhöhter ET-1 Expression traten bei 62% auf (N = 10). Die Unterschiede erreichten jedoch kein Signifikanzniveau.

### 3.7.3 Unterschiede zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen

In der Gruppe ATN ist die Expression von Endothelin-1 der Glomerula schon bei der noch nicht transplantierten Niere im Spender höher als in der Gruppe keine ATN. In Biopsaten, die aufgrund der Komplikation einer ATN entnommen wurden (Indikationsbiopsie), war die Expression von ET-1 der Glomerula noch stärker als zuvor. Allerdings war auch bei den Empfängern, bei denen bioptisch keine ATN festgestellt wurde, die Expression von Endothelin-1 der Glomerula höher als in den entsprechenden Nieren vor der Transplantation. Die statistische Berechnung der Unterschiede ergab jedoch kein Signifikanzniveau. Einzelergebnisse siehe Anhang (Tab. 6.3).

Größere Unterschiede der Expression von ET-1 waren erkennbar in den Gruppen mit einer Rejektion, besonders in der Gruppe Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN. Hier war bei den Spendern der Gruppe Rejektion in ATN die Expression in den Tubuli und in den Glomerula höher als in der zugehörigen Vergleichsgruppe, der Unterschied in den Tubuli war signifikant ( $P=0,046$ ). Nach der Transplantation war ein nennenswerter Unterschied zwischen der Niere beim Empfänger mit Rejektion in ATN und ohne Rejektion in ATN jedoch nur in den Glomerula zu beobachten. Die Expression von ET-1 war hier jeweils höher als bei den Organen im Spender vor der Transplantation.

In der allgemeiner definierten Vergleichsgruppe Rejektion / keine Rejektion (unabhängig vom Auftreten einer ATN), war bei den Spendern der Rejektionsgruppe die Expression von ET-1 ebenfalls in den Tubuli und den Glomerula höher als bei denen ohne eine Rejektion (Tab. 3.8).

	Spender				Empfänger	
	Tubuli	N	Glomerula	N	Glomerula	N
<b>Keine Rej. in ATN</b>	<b>1,09 ± 0,28 *</b>	47	1,3 ± 0,47	33	1,67 ± 0,58	3
<b>Rejektion in ATN</b>	<b>1,33 ± 0,5 *</b>	9	1,57 ± 0,53	7	2,0 ± 0	3
<b>Keine Rejektion</b>	1,09 ± 0,29	34	1,32 ± 0,48	25		
<b>Rejektion</b>	1,22 ± 0,42	23	1,44 ± 0,51	16		

Tabelle 3.8 Expression von ET-1 in Verbindung mit einer Rejektion; der Unterschied der Expression in den Tubuli beim Vergleich der Gruppen mit bzw. ohne Rejektion in ATN war **statistisch signifikant (\* P = 0,046)**

## 4 DISKUSSION

Die Prognose nach Nierentransplantation hängt von mehreren immunologischen und nicht-immunologischen Faktoren ab (Frei 2001, Klemptner 2001, McKay 1996, Opelz 2001, Sperschneider 2001); von diesen vereinigen sich bei fast jedem Transplantatempfänger wenige bis mehrere Faktoren zu einem multifaktoriellen Risiko für einen vorzeitigen Funktionsverlust des Organs.

Zu den immunologischen Ursachen einer chronischen Transplantatdysfunktion zählen (McKay u. Mitarb. 1996, Frei 2001, Opelz 2001):

- Inkompatibilitäten im humanen Leukozyten Antigen (HLA) – System
- Anzahl und Schwere akuter Rejektionen
- Retransplantation
- Unterimmunsuppression
- Infektionen

Diese Faktoren werden am häufigsten im Zusammenhang mit dem Auftreten von akuten und / oder chronischen Rejektionen beobachtet. Rejektionen ihrerseits können dann konsekutiv zu akutem oder schleichendem Funktionsverlust des Nierentransplantats führen.

Zu den nicht-immunologischen Faktoren gehören:

- Kalte Ischämiezeit (Zeitintervall zwischen Explantation und Transplantation)
- **Akute Tubuläre Nekrose (ATN) bzw. Initiale Nicht-Funktion (INF)**
- Primäre Organdysfunktion (delayed graft function [DGF])
- Inkompatibilität zwischen Größe des Spenderorgans und Körpermasse des Empfängers sowie in der Altersdifferenz zwischen Spender und Empfänger
- Toxizität (insbesondere Nephrotoxizität) der immunsuppressiven Therapie
- Posttransplantationshypertonie
- Diabetes mellitus
- Hyperlipidämie
- Nikotinabusus
- Non-Compliance

Diese Faktoren tragen besonders zum Entstehen der chronischen Transplantatdysfunktion bei. Für die chronischen Transplantatschäden hat sich – unabhängig von der auslösenden Ursache – in jüngster Zeit der Begriff der „chronic allograft nephropathy“ (CAN) durchgesetzt (Halloran u. Mitarb. 1999 u. 2002).

Das Auftreten eines Akuten Nierenversagens (ANV) des Transplantats im Sinne initialer (postoperativer) Nicht-Funktion (INF) und mit dem histomorphologischen

Korrelat der Akuten Tubulären Nekrose (ATN) gehört zu den etablierten Faktoren für verkürztes Organüberleben. Die Zuordnung der ATN zu den nicht-immunologischen Faktoren indes wird zunehmend in Frage gestellt. Bei der Charakterisierung dieses Nierenversagens sind bis heute viele Fragen offen geblieben. So ist nicht geklärt, ob unterschiedliche Ursachen des ANV (zirkulatorisch, toxisch etc.) zu gleichen oder unterschiedlichen Auswirkungen und Verläufen führen; ferner ist unklar, ob primär spenderassoziierte Faktoren oder überwiegend perioperative Faktoren (kalte Ischämie, warme Ischämie) für das Auftreten einer ATN verantwortlich sind. Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen über das Problem der initialen Nicht-Funktion der transplantierten Niere erscheint aber wichtig, da eine Klärung direkte therapeutische Konsequenzen hätte. So galt es in vorliegender Arbeit primär zu klären, ob das ANV des Nierentransplantats als ein primär immunologisches oder als ein unspezifisches, z.B. zirkulatorisches Ereignis zu charakterisieren ist. Könnte man eindeutig eine immunogene Ursache nachweisen, hätte man mit der Verstärkung der induktiven Immunsuppression in den ersten Wochen nach Transplantation einen therapeutischen Ansatzpunkt zur Vermeidung früher akuter Rejektionen, deren Inzidenz bei ATN bekanntlich höher ist als bei Patienten mit Sofortfunktion (Troppmann u. Mitarb. 1995, Ojo u. Mitarb. 1997, Marcen u. Mitarb. 1998). Lange Zeit konzentrierte sich die Suche nach Risikofaktoren für eine akute Rejektion nur auf den Transplantatempfänger. Ein junges Empfängeralter, Zugehörigkeit zur afroamerikanischen Rasse, ein hoher Grad an präformierten Antikörpern prätransplantationem, Retransplantationen und ein schlechtes HLA-Match bedingen eine erhöhte Inzidenz einer akuten Rejektion (Benson und Mitarbeiter 2002). Wir haben in diesem Zusammenhang hingegen versucht, Kriterien von Spendern auf ihre Relevanz für Veränderungen an den Transplantatnieren zu untersuchen und diese mittels immunhistologischer Bestimmung der HLA-DR- und Endothelin-1-Expression in verschiedenen renalen Strukturen der Spenderorgane vor und im Verlauf nach Transplantation zu validieren. Die potenziell relevanten Kriterien suchten wir in den durch die Spender gegebenen allgemeinen Faktoren (Spenderalter, Geschlecht, Grunderkrankungen etc.), in der präoperativen Intensivtherapie der Leichennierenspender (Spenderkonditionierung) sowie in den transplantationsoperativen Bedingungen. Die Untersuchungen erfolgten im Vergleich zu Lebendspendern. Die Ergebnisse sollten beitragen zu klären, ob eine

Modifizierung der herkömmlichen Therapiestandards bei hirntoten Organspendern das Transplantationsergebnis verbessern kann.

Die Patienten mit Leichennierentransplantation in dieser Studie wiesen eine wesentlich höhere Rate an ATN, Rejektionen und Organverlusten auf. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem Schrifttum (Cecka 1998, Sesso u. Mitarb. 1998, Pratschke u. Mitarb. 2001). ATN und Rejektionen sind unabhängige Risikofaktoren für Transplantatverluste (Prommool u. Mitarb. 2000, Shoskes u. Mitarb. 2001). Darüber hinaus werden nach dem Auftreten einer postoperativen ATN aber auch deutlich mehr Rejektionen beobachtet. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Ursachen für ATN und Rejektionen z.T. unterschiedliche, andererseits aber auch gemeinsame sind. Wir haben in den Analysen der prä- und perioperativen Bedingungen der untersuchten Transplantationen im Einzelnen versucht, Labordaten der Spender, ihre Pharmakotherapie sowie die verschiedenen Spender- / Empfängerkonstellationen mit den Transplantationsergebnissen zu korrelieren:

#### **4.1 Spenderbedingungen**

Barnett und Mitarbeiter untersuchten 1997 bei Säuglingen, die durch einen schweren hypoxischen Hirnschaden starben, die Kollateralschäden anderer Organe. Eindeutige pathologische Veränderungen fanden sich in 62 % der Herzen, in 33 % der Lungen, in 28 % der Nieren und in 22 % der Lebern. Dabei wiesen häufig schon klinisch völlig unauffällige Organe in der histopathologischen Untersuchung Schäden auf (Barnett und Mitarbeiter 1997). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit einer Nierenschädigung hoch, wenn gleichzeitig ein Leberschaden durch Erhöhung der Leberenzyme messbar ist. Wir haben gezeigt, dass ASAT, ALAT, LDH und ?-GT bei den Leichennierenspendern von Transplantatempfängern, deren postoperativer Verlauf durch das Auftreten einer Rejektion kompliziert wurde oder gar mit einem Organverlust endete, vor der Organexplantation im Vergleich zu den Spendern von Transplantatempfängern ohne Rejektion oder Organverlust erhöht waren. Durch die insgesamt noch zu geringe Fallzahl, mehr jedoch noch durch die große Streubreite der Enzymwerte, wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Die Pankreasenzyme Amylase und

Lipase waren vor Organentnahme in fast allen Vergleichsgruppen mit Komplikationen gegenüber denen ohne Komplikationen erhöht. Das Pankreas wurde von Barnett und Mitarbeitern zwar nicht untersucht, möglicherweise treten Schäden am Pankreas als Kollateralschaden des Hirntods jedoch ebenfalls früher auf als an der Niere, so dass im Falle einer laborchemisch nachweisbaren Schädigung des Pankreas auch von einer simultanen Schädigung der Niere ausgegangen werden kann. Auch die Enzyme CPK und CKMB waren in einigen Patientengruppen mit Komplikationen gegenüber denen ohne Komplikationen erhöht (ATN / keine ATN; Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN). Da in der Studie von Barnett und Mitarbeitern bei 62 % der Herzen pathologische Veränderungen gefunden wurden, jedoch nur bei 28 % der Nieren, kann man bei einem potenziellen Leichennierenspender mit erhöhten CPK- und / oder CKMB-Werten prä-explantationem nur in einigen Fällen von einer gleichzeitigen Schädigung der Niere ausgehen.

Mit dem Auftreten des Hirntods kommt es zum sogenannten „Autonomic Storm“ i.S. massiver Katecholaminfreisetzung. Diese führt zu einer extremen Vasokonstriktion mit Hypoxie der peripheren Organe (Herijgers u. Mitarb. 1996). Ein Multiorganversagen kann die Folge sein. Ist die Leber betroffen, kommt es schon bei einer vergleichsweise geringen Schädigung zu einem Plasmaenzymanstieg. Da es sich beim „Autonomic Storm“ um eine systemische Reaktion handelt, ist vor allem deshalb von einer Mitbeteiligung der Niere auszugehen, weil sog. high-flow Organe wie die Niere von dem Katecholaminexzess besonders betroffen sind. Der bei einem Nierenschaden am frühesten messbare Laborparameter ist das Serum-Kreatinin, das jedoch erst ansteigt, wenn die glomeruläre Filtrationsrate auf unter 50 % des Normalwertes sinkt. Es fehlt also eine Möglichkeit, schon geringe Nierenschäden anhand der herkömmlichen Laborparameter zu erkennen. Durch die zuvor beschriebenen Zusammenhänge kann man bei erhöhten Leberwerten im Plasma zu einem früheren Zeitpunkt als mit den herkömmlichen Untersuchungen von einer wahrscheinlichen Schädigung der Niere ausgehen.

Die Leichennierenspender der Empfänger, die post-transplantationem eine ATN, eine Rejektion oder einen Organverlust erlitten, waren durchschnittlich 5 Jahre älter als die Spender der Empfänger ohne diese Komplikationen. Diejenigen Spender, deren Empfänger eine ATN entwickelten und in der ATN-Zeit eine

Rejektion erlitten, waren im Vergleich zu denen, die hiervon nicht betroffen waren, im Mittel sogar 10 Jahre älter. Ein erhöhtes Spenderalter gilt als Risikofaktor für eine ATN (Troppmann u. Mitarb. 1995, Marcen u. Mitarb. 1998, Shoskes u. Mitarb. 2001). Ebenso ist die Transplantatüberlebenszeit bei Nieren von älteren Spendern reduziert. Erklärt wird dies durch die verminderte funktionelle Reserve in älteren Nieren. Ab dem 30. Lebensjahr sinkt die glomeruläre Filtrationsrate mit jeder weiteren Lebensdekade um 13 ml/min (Modlin u. Mitarb. 2001). Nach einer Studie von Ojo und Mitarbeitern erhöhen Bluthochdruck und Diabetes der Spender die Inzidenz der ATN und einer akuten Rejektion und vermindern die Transplantatüberlebenszeit. Die Spender mit diesen Risikofaktoren waren durchschnittlich 17 Jahre älter als die Spender ohne eine Hypertonie oder Diabetes (Ojo u. Mitarb. 2000).

In Zusammenschau unserer Ergebnisse mit denen aus dem Schrifttum kann behauptet werden, dass ein erhöhtes Spenderalter sowohl die Inzidenz der ATN als auch der Rejektionen sowie der Organverluste erhöht. Nach unseren Ergebnissen kommt es nach Transplantation älterer Spenderorgane besonders häufig zu einem gemeinsamen Auftreten von ATN und Rejektion.

Das Durchschnittsalter der Empfänger mit einem Organverlust war etwa 5 Jahre höher als das derer ohne Organverlust. Mit etwa 10 Jahren war der Altersunterschied der Empfänger mit Rejektion in der ATN-Zeit gegenüber denen ohne Rejektion noch deutlicher. Mit zunehmendem Alter nimmt die Immunkompetenz bekanntlich ab. Dies führt möglicherweise zu einer geringeren Rate an Rejektionen bei älteren Menschen. Man nimmt dies häufig zum Anlass, bei dieser Patientengruppe die pharmakologische Immunsuppression gegenüber den Standardprotokollen zu reduzieren. Studienergebnisse, die dieses Vorgehen rechtfertigen, stehen jedoch aus. Troppmann und Mitarbeiter beschrieben ein erhöhtes Empfängeralter als Risikofaktor für eine ATN (Troppmann u. Mitarb. 1995). Auch bei Palomar und Mitarbeitern war die Inzidenz einer ATN bei Organempfängern über 60 Jahren mit 31 % größer als bei den unter sechzigjährigen mit 22,8 %. Ebenso war das 1-Jahres-Transplantatüberleben etwa 10% geringer als bei den jüngeren Empfängern (Palomar u. Mitarb. 2001).

Nach unseren Ergebnissen ist eine ATN bei älteren Transplantatempfängern ein besonderes Risiko für das gleichzeitige Auftreten einer Rejektion. Ursache ist

wahrscheinlich die durch die tubuläre Nekrose hervorgerufene Entzündungsreaktion, die auch beim älteren Menschen mit einem potenziell schwächeren Immunsystem eine Rejektion triggern kann.

In vorliegender Studie konnten wir einen signifikanten Unterschied in der kalten Ischämiezeit (KIZ) zwischen den Vergleichsgruppen andere Rejektion / keine andere Rejektion (also alle Rejektionen außer denen in ATN) nachweisen. Die KIZ in der Gruppe mit Rejektion war deutlich länger als in derjenigen ohne Rejektion. Der Einfluss der kalten Ischämiezeit auf die Inzidenz einer ATN wurde - im Gegensatz zum Einfluss der KIZ auf eine Rejektion - schon häufig untersucht und konnte positiv korreliert werden (Koning u. Mitarb. 1995, Troppmann u. Mitarb. 1995, Marcen u. Mitarb. 1998, Shoskes u. Mitarb. 2001). Die Arbeitsgruppe von Christopher F. Bryan hat den Zusammenhang zwischen kalter Ischämiezeit und der Bildung von Antikörpern gegen HLA-Klasse I-Moleküle untersucht. Sie hat nachgewiesen, dass nach einer KIZ von über 15 Stunden diese Antikörper vermehrt gebildet werden, vermutlich über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung. Bei diesen wird, im Gegensatz zur direkten Antigenerkennung, ein allogenes Antigen von einer eigenen antigenpräsentierenden Zelle (APZ) des Wirts den Lymphozyten präsentiert. Mögliche Ursachen hierfür sind die vermehrte Expression von HLA-Molekülen sowie von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TGF  $\beta$ -1, IL-2 und IL-10 bei langer KIZ mit der Folge gesteigerter Immunogenität des Transplantats (Bryan u. Mitarb. 2001). Somit steigt mit zunehmender Dauer der kalten Ischämiezeit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Rejektion.

Erwartungsgemäß waren auch in vorliegender Studie die Unterschiede in den HLA-Mismatches in den Gruppen am größten, in denen Rejektionen auftraten: In den Vergleichsgruppen Rejektion / keine Rejektion mit  $P = 0,073$  und in denen mit Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN mit  $P = 0,028$ . Mit der Anzahl der HLA-Mismatches steigt bekanntermaßen das klassische immunogene Risiko für eine Rejektion im postoperativen Verlauf einer Transplantation. Der besonders markante Unterschied in letzterer Gruppe mit simultanem Auftreten von ATN und Rejektion stützt die Hypothese, dass die tubuläre Nekrose als immunogenes Ereignis aufzufassen ist.

Koning und Mitarbeiter beschrieben einen erhöhten Serum-Kreatininwert der Organspender als einen Risikofaktor für ein primäres Versagen des Transplantats (Koning u. Mitarb. 1995). Dies konnten wir mit unseren Ergebnissen bestätigen: Die Serum-Kreatininwerte der Organspender waren in der Gruppe der Empfänger mit einer ATN signifikant höher als bei den Empfängern ohne ATN ( $P = 0,043$ ). Ein ähnliches Ergebnis sahen wir bei der Analyse der Blutbilder der Organspender. Bei den Spendern, deren Organe postoperativ frühzeitig verloren gingen, waren die Leukozytenzahlen prä-explantationem signifikant höher als in der entsprechenden Gegengruppe ohne Organverlust. In einer neuen Studie aus dem Jahre 2002 von Benson und Mitarbeitern wurde die Leukozyteninfiltration der Spendernieren histologisch untersucht. Die Spendernieren wurden hierbei in zwei Gruppen unterteilt: Nieren mit einer konsekutiven akuten Rejektion beim Empfänger versus jene ohne akute Rejektion. Es ergab sich eine signifikant höhere Leukozytenzahl in Nieren, die im postoperativen Verlauf akut abgestoßen wurden. Dabei fand man Leukozyten in den Glomerula wie auch intertubulär. Bei der Analyse möglicher Ursachen dieser Resultate fanden die Autoren heraus, dass bei Cytomegalie-AK-positiven Spendern die Leukozytenzahlen in der Niere signifikant höher waren als bei denen ohne CMV-Antikörper (Benson u. Mitarb. 2002). In diesem Zusammenhang ist die CMV-Infektion sicher nur ein Beispiel für die Triggerung von Rejektionen durch ein anderes immunogenes Ereignis. Man kann davon ausgehen, dass auch durch viele andere Ereignisse, die die Leukozytenzahl im Blut erhöhen, eine Migration von Entzündungszellen in das Transplantat stattfindet. Die Leukozyten erhöhen die Immunogenität verschiedener renaler Strukturen und können damit eine Immunreaktion i.S. akuter Rejektionen auslösen. Eine stattgehabte akute Rejektion ist wiederum eine der Hauptursachen für die Induktion einer chronischen Rejektion und somit für frühzeitigen Transplantatverlust.

Zur perioperativen Sauerstoffsättigung der Spender im Zusammenhang mit dem Resultat von Organtransplantationen gibt es bisher keine Studien. Wir fanden einen hochsignifikanten Unterschied ( $P = 0,026$ ) in der durchschnittlichen Sauerstoffsättigung bei den Vergleichsgruppen Organverlust / kein Organverlust. Primäre durch pulmonale Komplikationen hervorgerufene Sättigungsabfälle haben hierbei vermutlich einen geringeren Stellenwert als die durch kritische Kreislaufsituationen bedingten sekundären Sättigungsabfälle, z.B. im Rahmen

starker Blutdruckabfälle sowie durch extreme Vasokonstriktion im Rahmen des „Autonomic Storm“ beim Hirntod. Eine niedrige präoperative Sauerstoffsättigung wäre als einfacher und sensitiver Messparameter für die hier dargestellte Kausalkette und somit als prospektiver Marker für ein erhöhtes Risiko nach Transplantation denkbar. Da Studien hierzu fehlen, wäre eine prospektive Evaluierung dieses Parameters wünschenswert.

Neben der Deskription von Laborparametern der Organspender und ihrer Korrelation zu Ereignissen nach Transplantation war die Analyse der therapeutischen Interventionen beim Spender Gegenstand vorliegender Studie. Die wichtigsten Interventionen betrafen die Kreislaufunterstützung mit Katecholaminen. Bis heute ist umstritten, ob sich der Einsatz von Katecholaminen zur Spenderkonditionierung generell positiv oder negativ auf die Transplantatfunktion auswirkt oder ob es obere bzw. untere Grenzdosierungen gibt, die über positive oder negative Auswirkungen entscheiden. Unsere Ergebnisse deuten jedoch wie die der meisten Arbeitsgruppen auf einen Negativeffekt der Katecholamintherapie hin:

Während der letzten 24 Stunden präoperativ erhielten die Spender der Komplikationsgruppe ATN kumulativ ca. 200 mg mehr Dopamin als die der Gruppe keine ATN. Noch etwas deutlicher war der Unterschied in den Gruppen Rejektion in ATN / keine Rejektion in ATN. Aufgrund der unvermeidlich großen Streubreite in den Mengen an verabreichtem Dopamin von 0 mg bis über 2000 mg konnten wir bei der gegebenen Patientenzahl in vorliegender Untersuchung keine statistische Signifikanz beschreiben. Wir haben aber versucht, eine Grenzdosis zu bestimmen, oberhalb derer die Gefahr einer ATN unverhältnismäßig steigt. Unterhalb von 500 mg/24 h lag die Inzidenz der ATN bei 25 %, oberhalb von 500 mg/24 h bei 48,4 %.

Kadieva und Mitarbeiter berichteten 1993 über ein vermindertes 1-Jahres-Organüberleben nach Therapie der Spender mit Dopamin. In einer Studie aus dem Jahre 1996 von Marshall und Mitarbeitern betrug die Inzidenz der ATN nach Behandlung der Spender mit positiv inotropen Substanzen (Dopamin, Dobutamin, Adrenalin, Noradrenalin oder einer Kombination dieser Substanzen) von mehr als 10 µg/kg/min 41,7 % und das 1-Jahres-Organüberleben 72,9 %. Dies wurde verglichen mit Spendern, die keine Katecholamintherapie benötigten. Hier lag die

Inzidenz der ATN nur bei 17,6 % und das 1-Jahres-Organüberleben bei 91,2 %. Die Unterschiede waren statistisch signifikant. Ähnliche Ergebnisse legten O'Brien und Mitarbeiter vor: Sie untersuchten ebenfalls die Auswirkung einer Therapie der Spender mit Vasopressoren (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin in einer Dosis von  $> 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  vs. keine Vasopressorentherapie). Zusätzlich führten sie ein Matching bezüglich Spenderalter und kalten Ischämiezeiten durch. Auch in dieser Versuchsreihe war die Inzidenz einer ATN in der Gruppe der mit Vasopressoren behandelten Spender (61,5 %) signifikant höher als in der Gruppe der nicht vasopressorpflchtigen Spender (34,6 %, O'Brien u. Mitarb. 1996). Bereits 1982 beobachteten Schneider und Mitarbeiter vermehrt primäre Nicht-Funktion nach Dopamingabe bei der Spenderkonditionierung.

#### **4.1.1 Konsequenzen aus den Analysen der Spenderdaten**

Aus unseren Analysen der prospektiv erfassten Spenderkonditionen lassen sich zusammenfassend einige markante Risikofaktoren für den Transplantationsverlauf erkennen:

- Das Auftreten einer Akuten Tubulären Nekrose ist eng assoziiert mit zunehmendem Alter von Spender und Empfänger, höherem Serum-Kreatinin und höherer Katecholamindosis der Spender sowie längerer kalter Ischämiezeit.
- Die Rejektionsinzidenz ist positiv korreliert mit erhöhten Leberwerten und höherer Katecholamindosis der Spender, längerer kalter Ischämiezeit sowie - erwartungsgemäß - mit der HLA-Inkompatibilität.
- Frühzeitiger Organverlust konnte auf die Risiken Alter sowie erhöhte Leberwerte, Leukozytose und verminderte Sauerstoffsättigung der Spender zurückgeführt werden.

Spender- bzw. Transplantationsbedingungen sind entweder unumgänglich (Alter, HLA-Kompatibilität etc.) oder beeinflussbar (Katecholamindosen, Ischämiezeiten, z.T. die Organfunktionsparameter). Besonders für letztere gilt, dass eine optimierte Spenderkonditionierung das Risiko für den Transplantatempfänger deutlich senken und zu einem verbesserten Transplantatüberleben beitragen kann. Müssen potenziell beeinflussbare negative Bedingungen dennoch im Einzelfall akzeptiert werden, besteht durch die Kenntnis dieser Risiken sekundär nach Transplantation noch die Möglichkeit, durch Modifikation der Therapie des Transplantatempfängers (Beispiel: verstärkte induktive Immunsuppression) eine Risikominimierung herbeizuführen.

## **4.2 Immunhistologische Untersuchungen**

Nach den Ergebnissen dieser Studie führt das primäre Transplantatversagen mit ATN zu erhöhter Inzidenz von akuten Rejektionen. Auch bei Umkehrung der Prüfung war eine akute Rejektion am häufigsten mit einer ATN vergesellschaftet. Beide Parameter waren statistisch signifikant unterschiedlich von der jeweiligen Kontrollgruppe.

Auch im Schrifttum finden sich zahlreiche Beispiele für eine erhöhte Inzidenz von Rejektionen bei Patienten mit ATN (Troppmann u. Mitarb. 1995, Ojo u. Mitarb. 1997, Marcen u. Mitarb. 1998), nicht jedoch für eine erhöhte Inzidenz der ATN bei Patienten mit einer Rejektion. Aufgrund der offensichtlich sehr engen Verknüpfungen dieser Ereignisse kann man auch von ähnlichen pathophysiologischen Ursachen ausgehen. Da einer Rejektion bekanntermaßen immunogene Ursachen zugrunde liegen, kann man diese Zusammenhänge als weiteres Indiz für eine vermutlich ebenfalls immunogene Ursache der ATN werten. Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Untersuchung von Shoskes und Mitarbeitern, die eine verstärkte Expression von MHC-Klasse II-Molekülen bei Patienten mit einer ATN beobachteten (Shoskes u. Mitarb. 1991). Um die mögliche gemeinsame Pathogenese von ATN und früher akuter Rejektion näher charakterisieren zu können, dienten die longitudinalen immunhistologischen Untersuchungen renaler Strukturen im Vergleich prä- vs. post-transplantationem.

### **4.2.1 HLA-DR Immunhistologie**

Die Expression von HLA-DR war in den in situ vor Explantation entnommenen Nullbiopsaten der Leichennieren höher als in denen der Lebendspendernieren. Dies wurde auch schon von einigen anderen Arbeitsgruppen beschrieben (z.B. Pratschke u. Mitarb. 2001). Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist eine Ischämie der Leichenspendernieren (Hall u. Mitarb. 1984, Shoskes u. Mitarb. 1991). Für diese sind zahlreiche Ursachen denkbar: Nach Eintritt des Hirntodes kommt es zunächst zu dem bereits zitierten „Autonomic Storm“ mit konsekutiver Vasokonstriktion in den Widerstandsgefäßen verschiedener Organe und daraus resultierender Ischämie. Im weiteren Verlauf des Hirntodes entstehen aufgrund des Ausfalls der zerebralen Kreislaufregulation häufig massive Blutdruckkrisen, die die Organischämie weiter verstärken können. Durch Ischämien selbst wird

wiederum ET-1 freigesetzt, das als starker Vasopressor die Ischämien nochmals verstärkt (Wilhelm u. Mitarb. 1999a) und somit Teil eines sich selbst dynamisierenden circulus vitiosus wird.

Denkbar ist auch, dass eine systemische Hypoxie die gleichen Auswirkungen auf die HLA-DR Expression hat wie eine Ischämie. Hypoxämien als Folge respiratorischer Komplikationen sind sowohl vor als auch nach Eintritt des Hirntodes häufige Begleiterscheinungen. Sekundäre Hypoxämien z.B. als Folge absoluten oder relativen Volumenmangels lassen sich jedoch nicht von o.g. Ischämieursachen trennen, da sie mit diesen pathophysiologisch direkt verbunden sind. Alle bisher erwähnten Gründe für eine Ischämie betreffen die Spenderorgane prä-explantationem.

Post-transplantationem fanden wir die durchschnittliche HLA-DR Expression aller Strukturen der Spenderorgane nochmals verstärkt. Ursache ist der mit der kalten und warmen Ischämie im Rahmen der Transplantation durchgemachte Ischämie- / Reperfusionsschaden, dessen Wirkung sich zu denen der oben beschriebenen Ischämien / Hypoxien addiert. Weitere Ursachen sind vermutlich Komplikationen der Empfänger, wie z.B. ATN oder Rejektion; dies lässt sich aus unseren Studienergebnissen zwar unschwer folgern, nicht aber beweisen, da wir aus ethischen Gründen auf eine postoperative Protokollbiopsie von Empfängern mit einem unkomplizierten Verlauf verzichtet haben. Somit fehlt ein Vergleich von Leichennierenempfängern mit und ohne postoperative Komplikationen.

Bei allen untersuchten Kategorien von Nieren (Leichenspendernieren prä- u. post-transplantationem, Lebendspendernieren) fiel auf, dass die durchschnittliche HLA-DR Expression jeweils in den Glomerula höher als in den Tubuli und in den Tubuli wiederum höher als in den Gefäßen war. Die gleichen Unterschiede in der HLA-DR Expression der verschiedenen renalen Strukturen beschrieb schon 1983 die Gruppe von Fuggle, allerdings wurde durch sie nur Leichennieren prä-transplantationem untersucht (Fuggle u. Mitarb. 1983).

Bei den Leichenspendernieren mit einer ATN im postoperativen Verlauf (ohne eine zusätzliche Rejektion) gab es keine wesentlichen Unterschiede in der HLA-DR Expression. Kam es jedoch in der ATN-Phase zu einer Rejektion, waren Glomerula und Gefäße der Spendernieren schon präoperativ stärker HLA-DR positiv als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war die HLA-DR Expression der Tubuli und Gefäße in der Gruppe mit anderen Rejektionen (unabhängig von

einer ATN) höher als in der Gruppe ohne Rejektion. Somit lassen sich möglicherweise Rejektionen mit oder ohne gleichzeitige ATN durch unterschiedliche Expressionsmuster von HLA-DR Molekülen immunhistologisch differenzieren. Im Schrifttum gibt es Beispiele für eine erhöhte HLA-DR Expression der Tubuli bei Transplantaten mit einer Rejektion (Hall u. Mitarb. 1984, Chen u. Mitarb. 1996). Bei Chen und Mitarbeitern waren bei Anzeichen einer Rejektion auch Glomerula und Gefäße verstärkt HLA-DR positiv, bei Hall und Mitarbeitern fanden sich zwischen diesen Strukturen keine Unterschiede. Von beiden Arbeitsgruppen wurde jedoch nicht zwischen einer Rejektion in ATN und einer Rejektion unabhängig von ATN unterschieden. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte HLA-DR Expression der Glomerula bei den Untersuchungen von Chen und Mitarbeitern wäre daher unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse ein höherer Anteil von biopsierten Transplantatnieren mit einer Rejektion in der ATN-Phase. Untersuchungen der HLA-DR Expression von Transplantatnieren in Abhängigkeit vom Auftreten einer ATN existieren nicht. Um die Frage zu beantworten, ob die verstärkte Expression von HLA-DR einzelner Strukturen bei den verschiedenen Komplikationen nach Transplantation Ursache oder Folge der jeweiligen Ereignisse ist, führten wir die immunhistologischen Untersuchungen prospektiv an Leichenspendernieren schon vor der Explantation durch. Nach unseren Ergebnissen scheint eine verstärkte HLA-DR Expression der Tubuli der Spendernieren vor Explantation mit einem erhöhten Risiko für eine Rejektion, unabhängig vom Auftreten einer ATN, verbunden zu sein. Eine vermehrte Expression von HLA-DR der Glomerula hingegen scheint die Inzidenz von Rejektionen in der ATN-Zeit zu erhöhen.

Die von uns untersuchten renalen Strukturen gehören nicht zu den primär professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Zu diesen zählen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten (Lee, Wintrobe`s Clinical Hematology, S. 551). Unter gewissen Umständen können aber mittels Stimulation durch Interferon- $\gamma$  auch andere Zellen HLA-DR exprimieren (Pober u. Mitarb. 1983). Explizit beschrieben wurde diese Fähigkeit für vaskuläre Endothelzellen und renale Tubuluszellen von Valente und Alexander 1998. Somit können wir für unsere Studie davon ausgehen, dass es sich bei den massiv HLA-DR exprimierenden Glomerula und Tubuli der Gruppen mit unterschiedlichen

Rejektionen um potenziell antigenpräsentierende Zellen handelt, die in der Lage sind, eine Immunantwort im Sinne der Abstoßungsreaktion auszulösen.

Fasst man alle aus unterschiedlichen Gründen zu einem frühen Organverlust führenden Transplantationen zu einer Gruppe zusammen, so ist hier die Expression von HLA-DR in den Tubuli, besonders aber in den Glomerula höher als in der Kontrollgruppe ohne Organverlust (1,33 vs. 1,2 bzw. 2,0 vs. 1,33). Da einem frühen Organverlust meist akute Rejektionen (mit oder ohne parallel verlaufender ATN) oder frühe chronische Rejektionen zugrunde liegen, bieten hierfür unsere immunhistologischen Ergebnisse und die diskutierten Kausalketten eine folgerichtige Erklärung.

#### **4.2.2 Endothelin Immunhistologie**

Als zweiter immunhistochemischer Parameter wurde in vorliegender Arbeit Endothelin (ET) untersucht. Verstärkte Expression von ET in der Niere wird in Zusammenhang mit verschiedenen Schädigungen beschrieben, unter anderem bei renaler Ischämie sowie bei akuten vaskulären Abstoßungsreaktionen und akuter tubulärer Nekrose im Verlauf nach Nierentransplantation (Watschinger u. Mitarb. 1991, Yamada u. Mitarb. 1994). Da in der Niere hauptsächlich ET-1 produziert wird (Kon und Badr 1991), haben wir uns auf die Untersuchung dieses Isotyps konzentriert.

Über Unterschiede zwischen Lebend- bzw. Leichenspendernieren bezüglich der ET-1 Expression ist im Schrifttum bisher nicht berichtet worden. Beim Vergleich der präoperativen Expression von ET-1 von Leichen- mit Lebendspendernieren stellte sich in unserer Studie heraus, dass die Expression von ET-1 in den Tubuli der Lebendspendernieren signifikant höher war als bei den Leichennieren ( $p = 0,006$ ). Bei den Glomerula und Gefäßen gab es keine nennenswerten Unterschiede; dennoch waren diese Ergebnisse überraschend. Eher zu erwarten war eine durch Katecholamine (endogen freigesetzt im Rahmen des Hirntodes und / oder iatrogen verabreicht zur Kreislaufstützung) und durch einige andere Faktoren induzierte Stimulation der Endothelinproduktion bei den Leichennieren und weniger bei den Lebendspendernieren. Es muss jedoch bedacht werden, daß dem Hirntod der Leichennierenspende meist intrakranielle Prozesse (wie z.B. Apoplex, Aneurysmablutungen) oder massive Traumata zugrunde liegen. Durch diese Schädigungen und die durch sie hervorgerufenen Entzündungsreaktionen

werden auch zahlreiche Mediatoren freigesetzt, die die endotheliale Endothelinproduktion inhibieren. Zu diesen zählen das Heparin (endogen freigesetzt, wie auch therapeutisch verabreicht), Kallikrein und das durch dieses gebildete Bradykinin. Kallikrein wird bei Verletzungen und Entzündungen aus Niere, Darm und Pankreas freigesetzt. Diese Mediatoren bewirken hauptsächlich eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität und eine Vasodilatation. Durch beide Mechanismen wird die Endothelinproduktion inhibiert. Ferner wird hierdurch vermehrt Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostazyklin freigesetzt. Diese Substanzen verstärken über eine weitere Verminderung des Gefäßtonus die Vasodilatation und Nierendurchblutung, was die Produktion von ET-1 zusätzlich hemmt. Insgesamt ist eine Vielzahl an Mechanismen denkbar, die einerseits die Produktion und Freisetzung von Endothelin fördern, andererseits aber auch hemmen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Leichennieren mehr hemmende als stimulierende Mechanismen der Endothelinproduktion wirksam sein könnten.

Die Expression von Endothelin-1 war bei Transplantaten von Leichennierenempfängern, die aufgrund postoperativer Komplikationen biopsiert wurden, höher als bei den Nullbiopsien aller Leichenspendernieren. Dieses entsprach den Erwartungen. Bei der Analyse der Summe aus allen untersuchten renalen Strukturen waren die Unterschiede hochsignifikant ( $p = 0,007$ ) mit Betonung der Expression von ET-1 in Tubuli und Glomerula ( $p$  jeweils = 0,049). Damit konnten wir bestätigen, dass ET-1 eine wichtige Rolle bei Komplikationen nach Nierentransplantationen spielt (Watschinger u. Mitarb. 1991). In fast allen Fällen konnten bioptisch die vermuteten Komplikationen (Rejektionen) bestätigt werden. Interessant erschien uns die Frage, ob bei den Empfängern mit postoperativen Komplikationen die ET-1 Expression der Leichenspendernieren bereits schon präoperativ erhöht war. Wir ermittelten, dass Empfänger von Leichennieren mit einer ET-1 Expression oberhalb eines Cutoff-Index von 1 eine um etwa 10 % höhere Komplikationsrate gegenüber der Vergleichsgruppe unterhalb dieses Cutoffs aufwiesen. Dies erscheint zunächst im Widerspruch zu unserer Beobachtung zu stehen, dass die ET-1 Expression von Lebendspendernieren präoperativ höher war als die der Leichenspendernieren. Denkbar wäre aber, dass bei den Leichennierenspendern die ET-1 Produktion erst dann ansteigt, wenn sich diese in einer kritischen Kreislaufsituation befinden. In

dieser Situation könnte eine erhöhte Produktion von ET-1 die physiologische Endstrecke vor dem kompletten Kreislaufzusammenbruch und somit auch vor einem drohenden Multiorganversagen darstellen. Da bekannt ist, dass die Organe derart kompromittierter marginaler Spender die schlechtesten Transplantationsergebnisse liefern, könnte die erhöhte ET-Expression bei Zutreffen dieser Postulate in der Tat einen Hinweis auf bedenkliche Transplantatqualität geben.

Ischämien per se sowie lange kalte und warme Ischämiezeiten sind im Rahmen von Transplantationen bekannte Risikofaktoren für eine akute tubuläre Nekrose (Koning u. Mitarb. 1995, Troppmann u. Mitarb. 1995, Marcen u. Mitarb. 1998, Shoskes u. Mitarb. 2001). Eine Ischämie bewirkt eine verstärkte ET-1 Expression des peritubulären kapillären Netzwerkes (PTCN), welches die Hauptblutzufuhr für die Tubuli convoluti darstellt. Eine durch ET-1 induzierte Vasokonstriktion dieser Gefäße führt zu Hypoxie und akuter Nekrose der Tubuluszellen (ATN, Wilhelm u. Mitarb. 1999a). Die Autoren dieser Studie zeigten darüber hinaus auch eine gesteigerte ET-1 Expression in anderen renalen Strukturen, wie z.B. in den medullären Vasa recta und den Sammelrohren. Unsere Studie beschränkte sich auf die Untersuchung von Glomerula, Tubuli und Gefäßen. Jedoch kann angenommen werden, dass bei einer gesteigerten ET-1 Expression dieser Strukturen auch die des PTCN erhöht ist. Die Expression von ET-1 war nach unseren Ergebnissen in den Tubuli der Spendernieren mit ATN kaum, in den Glomerula jedoch deutlich höher (1,46 vs. 1,32; NS) als in den Spendernieren, deren Empfänger keine ATN aufwiesen. In den von Transplantaten mit einer ATN entnommenen Biopsien war die ET-1 Expression nochmals höher als in den Nullbiopsien der gleichen Nieren während der Organentnahme (2,0 vs. 1,46). Dies würden wir deuten als fortbestehende und ggf. sich verstärkende Reaktion auf eine Vorschädigung der Niere durch den zusätzlichen Ischämie- / Reperfusionsschaden.

In der Patientengruppe mit Rejektion war die ET-1 Expression in den Tubuli und Glomerula in den Nullbiopsien ihrer Spenderorgane höher als in der Gruppe ohne Rejektionen. Simonson und Mitarbeiter haben gezeigt, dass bei akuten und chronischen Rejektionen von Nierentransplantaten ET-1 in den Tubuli verstärkt exprimiert wird (Simonson u. Mitarb. 1998). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb eine verstärkte Expression von ETB-Rezeptoren in den Glomerula (Naicker u.

Mitarb. 1999). Beide Studien konnten jedoch nicht zwischen einer erhöhten Endothelinexpression als Ursache für eine Rejektion oder als Folge einer Rejektion unterscheiden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine erhöhte ET-1 Expression eher ursächlich an der Ausbildung einer Rejektion beteiligt ist, da wir schon in der Nullbiopsie vor Transplantation eine verstärkte ET-1 Expression fanden. Diese ist jedoch primär nicht als immunologische Reaktion zu verstehen, wie es bei einer Rejektion zu erwarten wäre. Möglich wäre aber, dass die Endothelinexpression im Transplantat Schäden anzeigt, die die Immunogenität des Transplantats steigern und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Rejektion erhöhen. Deutlichere, statistisch signifikante Unterschiede in der ET-1 Expression von Tubuli und Glomerula fanden sich bei Patienten mit Rejektion bei gleichzeitigem Vorliegen einer ATN gegenüber denen ohne Rejektion ( $p = 0,046$ ). Wie oben beschrieben, steigt die Inzidenz einer ATN mit erhöhter ET-1 Expression. Ihre Ausprägung in den Glomerula ist bei den Nullbiopsien der Empfänger mit postoperativer ATN einerseits und Rejektion andererseits nahezu identisch. Scheinbar werden also beide Ereignisse gleichsinnig durch den Grad der ET-1 Expression repräsentiert und / oder kausal beeinflusst. Bei zeitgleichem Auftreten beider Ereignisse ist die ET-1 Expression folgerichtig noch höher als bei den Einzelereignissen. Eine zunehmende ET-1 Expression erhöht demnach das Risiko für eine Rejektion in der Phase der akuten tubulären Nekrose.

Bei den Empfängern, die ihr Transplantat bereits in der Nachbeobachtungszeit der Studie verloren, war die Expression von ET-1 der Tubuli und der Glomerula erhöht. Dies steht im Einklang sowohl mit den Ergebnissen erhöhter ET-1 Expression bei ATN und / oder Rejektion als auch mit den bekannten statistischen Ergebnissen eingeschränkten Organüberlebens durch die dafür unabhängigen Risikofaktoren ATN und Rejektion.

#### **4.2.3 Konsequenzen aus den immunhistologischen Ergebnissen**

Aus immunhistologischen Ergebnissen klinisch fassbare Konsequenzen abzuleiten, ist generell eine zu hohe Anforderung an diese Methodik. Trotz Auswertung, die in vorliegender Studie auf semiquantitativem Weg erfolgte, und trotz Dreifachauswertung jedes Schnitts bleibt ein erhebliches Maß an Zufall („sampling error“) und Subjektivität, so dass signifikante Resultate primär eigentlich nicht erwartet wurden. Es wären alternativ exorbitant höhere

Stichproben nötig gewesen, um diese systemimmanenten Nachteile ausgleichen zu können. Dies wäre besonders für die Biopsien von den Transplantatempfängern unrealistisch gewesen, da wir ethisch nicht vertreten mochten, ohne klinische Indikation eine große Zahl von Protokollbiopsien vorzunehmen. Wir verstehen deshalb diese Ergebnisse vielmehr als Trends mit dem Ziel, Anlass zu weiteren detaillierteren und noch stärker fokussierten Untersuchungen zu geben.

Zusammenfassend zeigen die immunhistologischen Untersuchungen, dass beide Parameter sowohl spezifische als auch komplementäre Bedeutung für die prospektive Einschätzung von Spenderorganen haben.

Für die **ET-1 Expression** gilt:

- Sie zeigt keine direkte Abhängigkeit von der primären Immunogenität: in der Nullbiopsie von Lebendnieren z.B. höher als bei Leichennieren
- Sie ist im Gegensatz zum HLA-DR bereits bei ATN erhöht (glomerulär), gesteigert dann nochmals durch Rejektion
- Erhöhte Expression im Spenderorgan prädisponiert nur beim Leichenspender zur Rejektion und zum frühzeitigen Organverlust.

Für die **HLA-DR Expression** gilt:

- Sie ist höher, je mehr Immunogenität vorliegt: post-Tx > prä-Tx und Leichenniere > Lebendniere!
- Sie ist nicht erhöht bei unkomplizierter ATN, wohl aber bei Rejektion in der ATN-Zeit
- Erhöhte Expression bereits im Spenderorgan prädisponiert zur Rejektion.

Da wir uns bemüht hatten, die immunhistologischen Untersuchungen semiquantitativ darzustellen, versuchten wir auch für HLA-DR einen Grenzwert herauszuarbeiten, der geeignet erschien, zwischen einem weitgehend unkomplizierten und einem eher komplizierten Verlauf zu unterscheiden. Dabei ergab sich für einen mittleren HLA-DR Expressionswert von 1,5 als Grenze, dass 71 % der Patienten, die eine Niere mit einem Expressionsindex von  $\geq 1,5$  erhielten, postoperative Komplikationen (ATN, Rejektionen, Organverlust oder mehrere dieser Ereignisse) entwickelten, während nur 57 % der Patienten mit einem

präoperativen HLA-DR Expressionsindex von  $<1,5$  oben genannte Komplikationen zeigten. Obwohl die Stichproben in vorliegender Studie letztlich noch zu klein waren, um derartige, klinisch wünschenswerte Ergebnisse mit entsprechender statistischer Absicherung präsentieren zu können, erscheint uns aber dennoch der eindeutige Trend dieser Resultate ausreichend zu sein, um anzuregen, in Zukunft von Spendernieren, mindestens jedoch von sog. marginalen Spendern, eine HLA-DR Immunhistologie im Nullbiopsat anzufertigen. Denkbar wäre, dass man bei den Empfängern, die ein Transplantat mit einer von vornherein hohen HLA-DR Expression erhalten, die postoperative Therapie modifizieren könnte, wie zum Beispiel mittels Verstärkung der induktiven Immunsuppression, um absehbaren Komplikationen vorzubeugen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine Akute Tubuläre Nekrose (ATN) des Nierentransplantats sowie eine Rejektion sind unabhängige Risikofaktoren für eine chronische Transplantatdysfunktion (CAN, chronic allograft nephropathy). Diese wiederum stellt die häufigste Ursache für einen frühzeitigen Transplantatverlust dar. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die zugrunde liegenden Mechanismen (unspezifisch-zirkulatorisch vs. spezifisch-immunologisch), die zu einer ATN nach Transplantation führen, bislang noch nicht geklärt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden prospektiv mehrere klinische und laborchemische Parameter während der Spenderkonditionierung analysiert sowie die Expression von HLA-DR als spezifischen immunologischen und von Endothelin als eher unspezifischen vaskulären Marker im Rahmen des Hirntods in Nierenstanzbiopsien immunhistologisch untersucht. Als Vergleich dienten Biopsien von Lebendspendern. Die eingangs gestellten Fragen konnten dadurch im Einzelnen wie folgt beantwortet werden:

1. Die **Spenderparameter** und die allgemeinen Transplantationsbedingungen lassen sich im Hinblick auf den Transplantationsverlauf folgendermaßen charakterisieren:
  - Das Auftreten einer Akuten Tubulären Nekrose ist eng assoziiert mit zunehmendem Alter von Spender und Empfänger, mit höherem Serum-Kreatinin und höheren Katecholamindosen der Spender sowie mit längerer kalter Ischämiezeit.
  - Die Rejektionsinzidenz ist positiv korreliert mit erhöhten Leberwerten und höheren Katecholamindosen der Spender, mit längerer kalter Ischämiezeit sowie erwartungsgemäß mit der HLA-Inkompatibilität.
  - Frühzeitiger Organverlust konnte auf die Risiken Alter sowie erhöhte Leberwerte, Leukozytose und verminderte Sauerstoffsättigung der Spender zurückgeführt werden.
2. Die **Endothelin-1 Expression** in verschiedenen renalen Strukturen der Spenderorgane zeigt
  - keine direkte Abhängigkeit von der primären Immunogenität: Sie ist in der Nullbiopsie von Lebendnieren z.B. höher als bei Leichennieren

- sie ist im Gegensatz zum HLA-DR bereits bei ATN erhöht (glomerulär), gesteigert dann nochmals durch Rejektion
- erhöhte Expression im Spenderorgan prädisponiert nur beim Leichenspender zur Rejektion und zum frühzeitigen Organverlust

### 3. Die **HLA-DR Expression** zeigt

- stärkere Ausprägung bei höherer Immunogenität: post-Tx > prä-Tx und Leichenniere > Lebendniere
- sie ist nicht erhöht bei unkomplizierter ATN, wohl aber bei Rejektion in der ATN-Zeit
- erhöhte Expression im Spenderorgan prädisponiert zu einer erhöhten Rejektionsinzidenz
- Eine kumulative HLA-DR Expression oberhalb eines Grenzwertindex von 1,5 ist mit einem erhöhten Risiko für postoperative Komplikationen verbunden

Die eingangs gestellte Grundfrage nach der Immunogenität der Akuten Tubulären Nekrose nach Nierentransplantation muss unter Zusammenschau der Ergebnisse damit positiv beantwortet werden, sie ist ein immunologisch begründetes Ereignis mit Fortwirkung auf die Rejektionshäufigkeit und die Organüberlebenszeit.

Die Kenntnis von Spenderparametern mit negativem Einfluss auf den Transplantationsverlauf – auch ohne Induktion einer ATN - hilft darüber hinaus, **Konsequenzen für die Diagnostik und Therapie** von Organspendern zu erarbeiten: hierzu gehören insbesondere die Vermeidung hoher Katecholamindosen, die Therapie von Infektionen und die Optimierung der Beatmung beim Spender, ferner die Vermeidung langer kalter Organkonservierungszeiten sowie die immunhistologische Diagnostik der Spenderorgane schon vor der Organentnahme. Letztere hat nach unseren Ergebnissen ein klares prädiktives Potenzial für die am meisten gefürchteten Transplantationskomplikationen. Neben den unumgänglichen Transplantationsbedingungen (Alter, HLA-Kompatibilität etc.) kann man für die beeinflussbaren Parameter (Katecholamindosen, Ischämiezeiten, z.T. die Organfunktionsparameter) unterstellen, dass das Risiko für den

Transplantatempfänger mittels optimierter Spenderkonditionierung deutlich gesenkt und sein Transplantatüberleben deutlich gebessert werden kann. Müssen negative Bedingungen dennoch im Einzelfall akzeptiert werden, besteht durch die Kenntnis dieser Risiken sekundär nach Transplantation dennoch die Möglichkeit, durch Modifikation der Therapie des Transplantatempfängers eine Risikominimierung herbeizuführen. In Bezug auf die vorliegenden immunhistologischen Ergebnisse erscheint es sinnvoll, zumindest bei sog. marginalen Spendern, eine HLA-DR Immunhistologie im Nullbiopsat anzufertigen und bei erhöhter Expression die postoperative Standardtherapie, z.B. mittels Verstärkung der induktiven Immunsuppression, zu modifizieren.

## 6 ANHANG

### 6.1 Tabellarien der Spenderdaten

#### 6.1.1 Allgemeine Faktoren

Pat.	Alter	m/w	Größe	Gewicht	Hirntod	Ursache	Hypertonus	Diab. mell.
	Jahre		cm	kg	Datum		0=nein, 1=ja	0=nein, 1=ja
1	62	m	175	75	20.01.1999	ICB	0	0
2	64	w	168	65	02.11.1998	SAB	1	0
3	67	w	165	60	26.02.1999	cer.Inf.,sek.Bltg.	0	0
4	43	m	180	80	06.03.1999	SAB	0	?
5	65	w	168	65	29.10.1998	Mediainsult	1	0
6	76	w	155	75	06.03.1999	ICB		
7	59	w	165	70	11.09.1999	SAB	1	0
8	22	m	190	90	06.10.1999	Traum. ICB	0	0
9	46	w	170	100	18.10.1999	Insult	?	0
10	43	w	170	85	09.09.1999	SAB	1	0
11	65	m	180	75	31.08.1999	SDH	?	?
12	57	m	175	100	29.08.1999	Stammgangl.-Blit.	0	0
13	37	w	155	50	14.08.1999	ICB	1	1
14	26	m	180	65	30.03.1999	Hirnininfarkt	0	0
15	64	m	175	70	28.01.1999	ICB	0	0
16	48	m	180	80	01.03.1999	ICB	1	0
17	45	m	175	105	02.03.1999	ICB	1	0
18	70	m	165	60	03.03.1999	ICB	1	0
19	46	m	180	100	28.05.1999	ICB	1	0
20	49	w	165	60	05.09.1999	ICB	0	0
21	52	w	165	60	08.09.1999	SAB	0	0
22	39	m	185	110	20.11.1999	ICB	0	0
23	19	m	180	80	10.10.1999	SHT	0	0
24	69	w	165	72	08.03.2000	KH-Blutung		
25	42	m	185	85	11.01.2000	SAB	0	0
26	71	m	185	90	13.01.2000	Z.n. Reanimation	1	0
27	76	m	170	75	24.03.2000	SAB + ICB	1	0
28	44	m	165	70	14.12.1999	SAB, Hirnödem	0	0
29	44	w	160	65	02.06.2001	SAB	1	0
30	64	m	170	80	27.02.2001	SAB	1	0
31	44	m	180	80	20.02.2001	SAB	0	0
32	52	w	170	80	13.01.2001	Polytrauma	0	0
33	70	m	180	80	05.01.2001	ICB	1	0
34	75	w	170	75	27.06.2001	Basilaristhromb.	1	?
35	69	m	175	80	21.10.2001	Carotisverschluss		

### 6.1.2 Laborwerte

		Patient XX	
		1. Routine ICU	letzte Routine ICU
Datum/Uhrzeit		19.01., 23:00	20.01., 08.00
<b>L</b>	Hb	154	<b>120-</b>
<b>A</b>	Hkt	47	<b>36-</b>
<b>B</b>	Leukozyten	<b>16,6+</b>	<b>11.6+</b>
<b>O</b>	Thrombozyt.	159	<b>109-</b>
<b>R</b>	Natrium	139	140
	Kalium	4,53	4,5
	Glucose	<b>178+</b>	<b>211+</b>
	CPK	<b>153+</b>	<b>140+</b>
	CKMB	<b>17+</b>	8
	ASAT (SGOT)		<b>23+</b>
	ALAT (SGPT)	<b>28+</b>	19
	LDH	<b>401+</b>	<b>296+</b>
	Gamma-GT	<b>125+</b>	<b>90+</b>
	Quick/ PT	86	81
	APTT	26	30
	Albumin	47,1	36,7
	Kreatinin	104	99
	Fibrinogen	2,13	2,92
	Bilirubin tot.	13,3	16,4
	Bilirubin dir.		
	Total Protein		61,8
	Alk. Phos.		<b>49-</b>
	Amylase		
	Lipase	82	269

### 6.1.3 Medikation

		Patient XX				
		intra-op.	letzte 24h kumulativ	vor 24 h	vor 6 h	letzte h
<b>M</b>	Dopamin		2,6mg/kg Kg	10mg/h	20mg/h	
<b>E</b>	Dobutamin					
<b>D</b>	Suprarenin	2,7mg/h	22,8mg	0mg	1,6mg/h	
<b>I</b>	Arterenol					
<b>K</b>	Vaso-, Desmopressin					
<b>A</b>	koll. Inf. (ml/h)	1500ml	3500ml			
<b>T</b>	krist. Inf. (ml/h)	1000ml	7455ml	160ml/h	160ml/h	
<b>I</b>						
<b>O</b>						
<b>N</b>						

### 6.1.4 Diurese, ZVD, Vitalparameter und Blutgasanalysen

		letzte 24h kumulativ	vor 24 h	Patient vor 6 h	letzte h	Anzahl	Minimum	Dauer (min,kum)
	Diurese	4850ml	620ml	200ml	460ml			
	ZVD		5 mmHg	9 mmHg	11mmHg			
	Temperatur		37,6	36,2	36,2			
	RR		200/110	130/60	100/50			
	RR-Krisen (letzte24h)					1	60/35	35
<b>B</b>	pO2		112,9	86,9	84			
<b>G</b>	pCO2		39	53	42,3			
<b>A</b>	pH		7,39	7,18	7,2			
	PEEP		kein	2	2			
	HCO3		23,9	19,4	16,8			
	O2-Sätt.		100	92,8	99			

## 6.2 Leberenzyme

### 6.2.1 ASAT

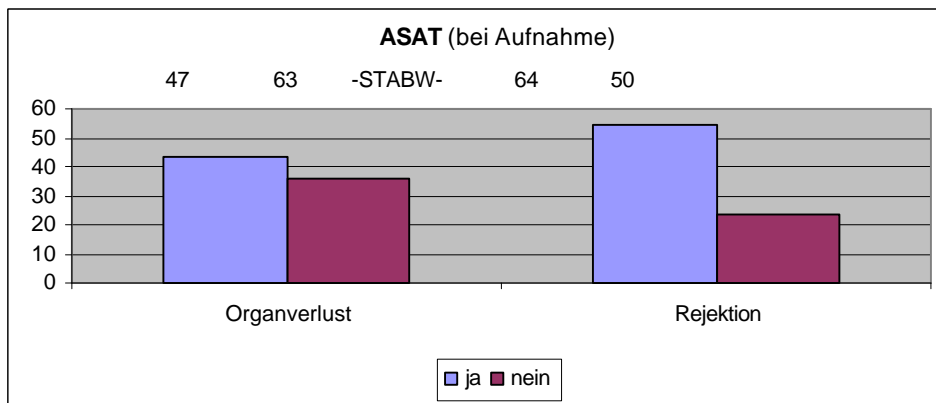


Abbildung 6.1 Mittelwerte und Standardabweichungen für ASAT (U/l) bei Aufnahme des Spenders, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

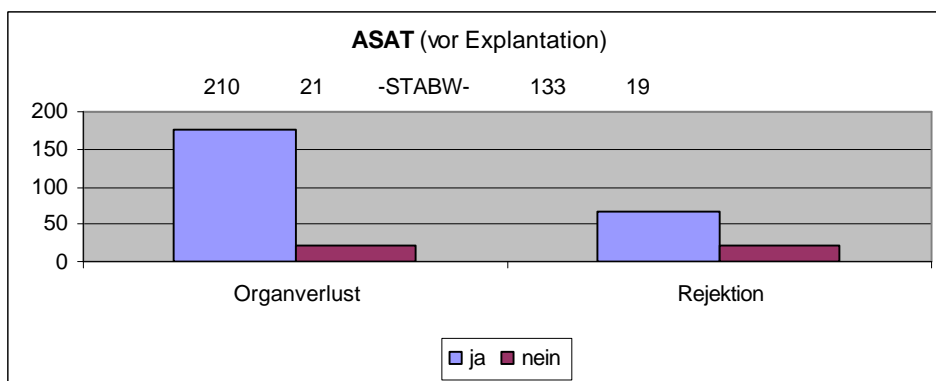


Abbildung 6.2 Mittelwerte und Standardabweichungen für ASAT (U/l) vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

### 6.2.2 ALAT

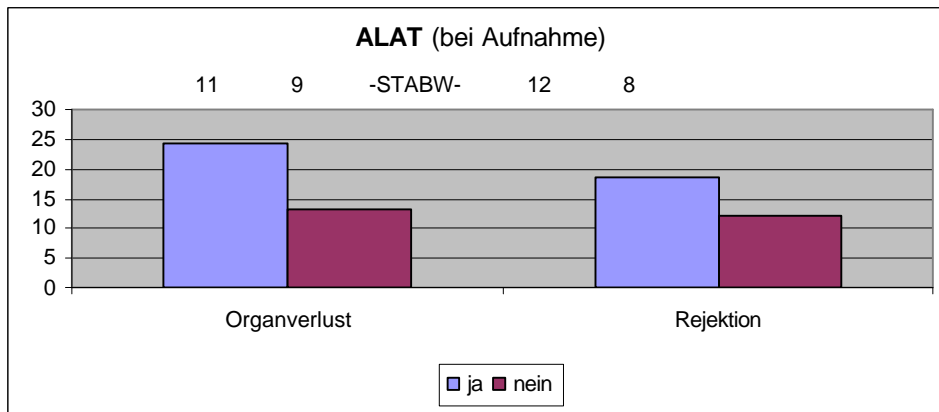


Abbildung 6.3 Mittelwerte und Standardabweichungen für ALAT (U/l) bei Aufnahme des Spenders, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

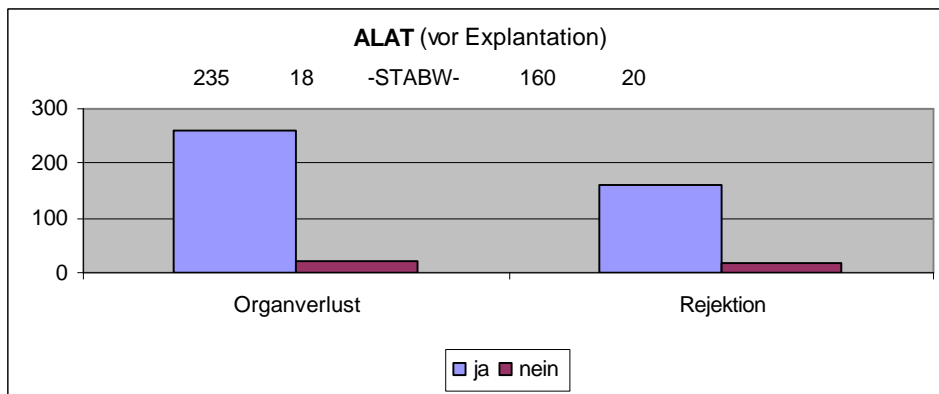


Abbildung 6.4 Mittelwerte und Standardabweichungen für ALAT (U/l) vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

### 6.2.3 LDH

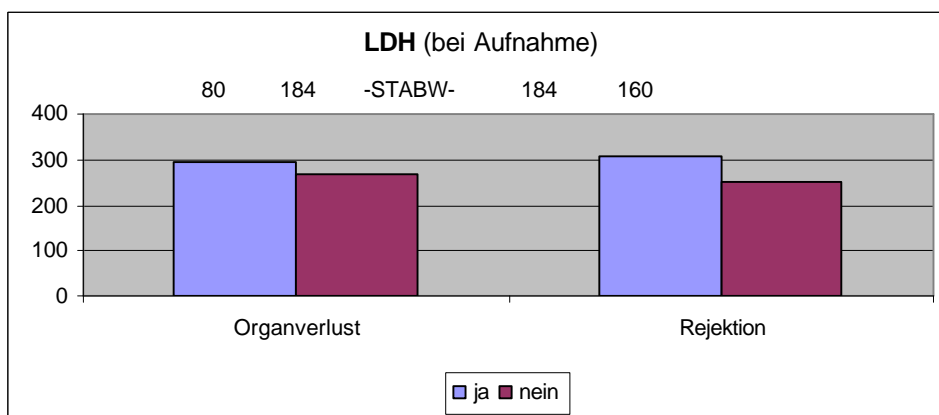


Abbildung 6.5 Mittelwerte und Standardabweichungen für LDH (U/l) bei Aufnahme des Spenders, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

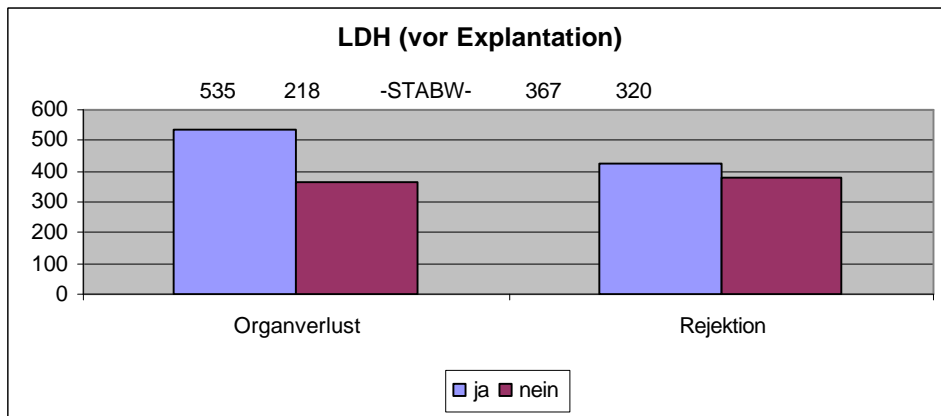


Abbildung 6.6 Mittelwerte und Standardabweichungen für LDH (U/l) vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

#### 6.2.4 gamma-GT

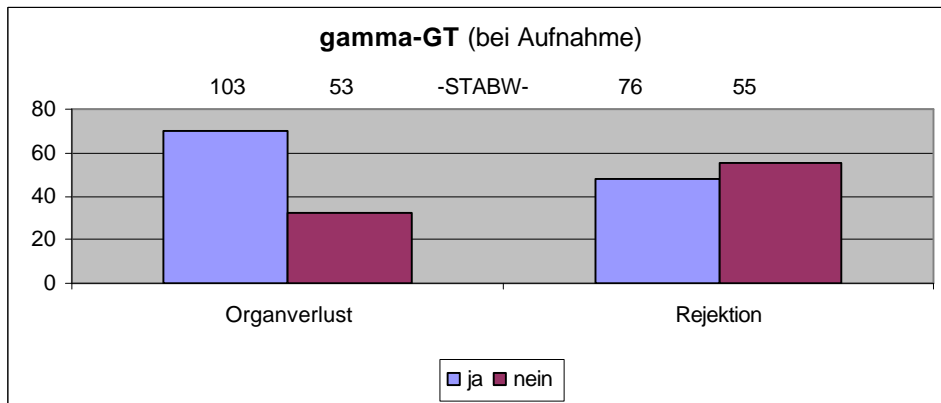


Abbildung 6.7 Mittelwerte und Standardabweichungen für gamma-GT (U/l) bei Aufnahme des Spenders, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

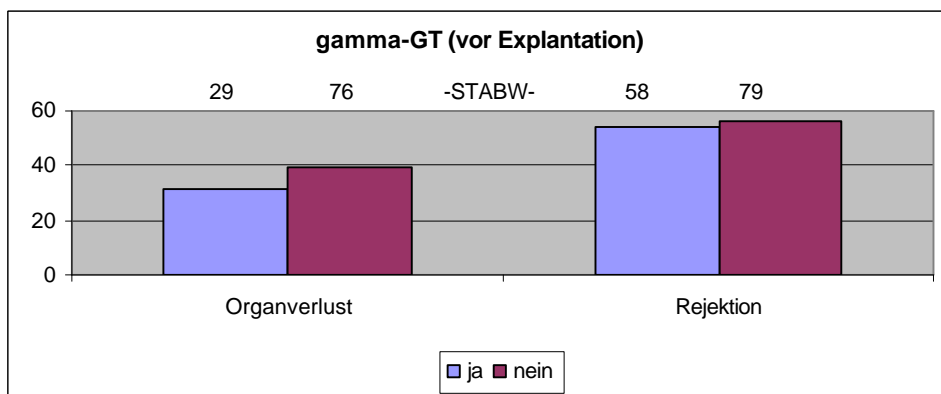


Abbildung 6.8 Mittelwerte und Standardabweichungen für gamma-GT (U/l) vor Explantation, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

### 6.3 Herz- und Muskelenzyme

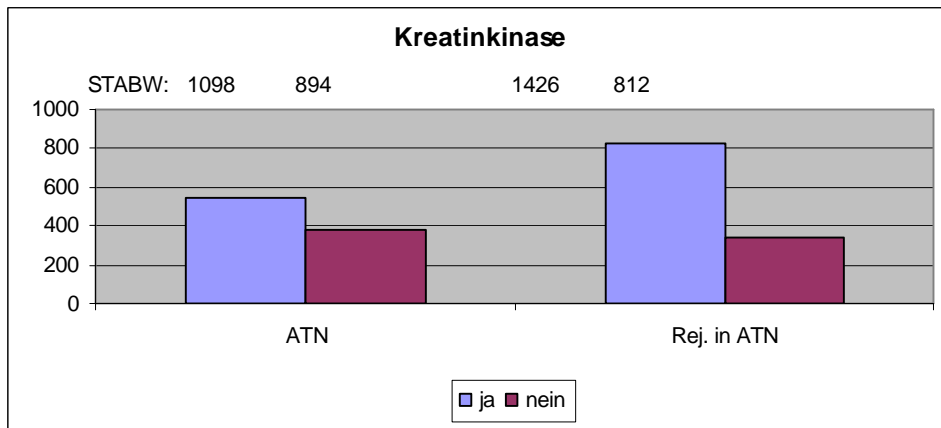


Abbildung 6.9 Mittelwerte und Standardabweichungen für Kreatinkinase, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

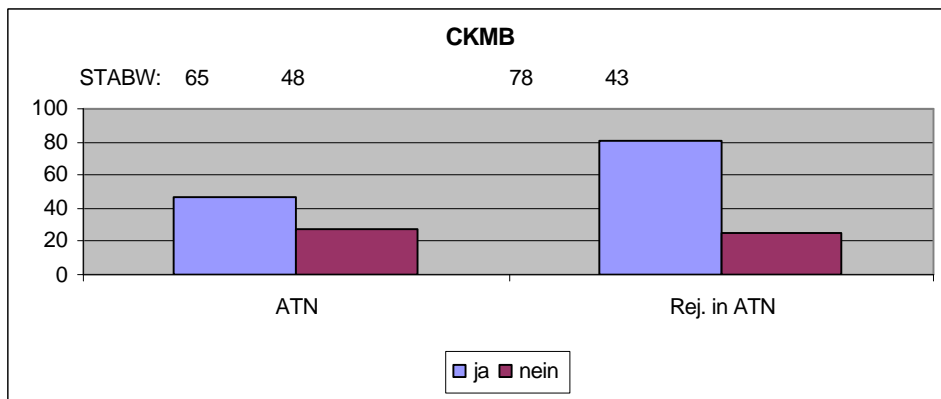


Abbildung 6.10 Mittelwerte und Standardabweichungen für CKMB, STABW = Standardabweichung, Unterschiede nicht signifikant.

## 6.4. HLA-DR Immunhistologie

### 6.4.1 Wichtige Ergebnisse der HLA-DR Immunhistologie der Spender

	<b>Tubuli</b>	<b>N</b>	<b>Glomerula</b>	<b>N</b>	<b>Gefäße</b>	<b>N</b>
<b>Keine Rej. in ATN</b>			1,48 ± 0,51	25	1,08 ± 0,27	38
<b>Rejektion in ATN</b>			1,67 ± 0,58	3	1,17 ± 0,41	6
<b>Keine andere Rej.</b>	1,18 ± 0,98	38			1,06 ± 0,98	32
<b>Andere Rejektion</b>	1,36 ± 0,5	14			1,17 ± 0,39	12

Tabelle 6.1 HLA-DR Expression der Leichenspendernieren (präoperativ), bei denen im Verlauf (postoperativ) eine Rejektion auftrat im Vergleich zu denen ohne Rejektion; ATN = Akute Tubuläre Nekrose. Die statistische Berechnung der Unterschiede ergab keine Signifikanzen

### 6.4.2 Wichtige Ergebnisse der HLA-DR Immunhistologie der Empfänger

	<b>Tubuli</b>	<b>N</b>	<b>Glomerula</b>	<b>N</b>	<b>Gefäße</b>	<b>N</b>
<b>Keine andere Rej.</b>	1,0 ± 0,98	3	1,0	1	1,0 ± 0,7	2
<b>Andere Rejektion</b>	1,25 ± 0,5	4	1,67 ± 0,58	3	1,25 ± 0,5	4
<b>Kein Organverlust</b>	1,2 ± 0,5	5	1,33 ± 0,71	3		
<b>Organverlust</b>	1,33 ± 0,58	3	2,0	1		

Tabelle 6.2 HLA-DR Expression in Biopsien transplantierte Leichennieren der Gruppen andere Rejektion / keine andere Rejektion, sowie Organverlust / kein Organverlust; die statistische Berechnung der Unterschiede ergab keine Signifikanzen

## 6.5 Expression von Endothelin im Zusammenhang mit einer ATN

	<b>Endothelin-1 Expression der Glomerula beim</b>			
	<b>Spender</b>	<b>N</b>	<b>Empfänger</b>	<b>N</b>
<b>ATN</b>	1,46 ± 0,52	13	2,0 ± 0	4
<b>Keine ATN</b>	1,32 ± 0,48	28	1,5 ± 0,7	2

Tabelle 6.3 Endothelin-1 Expression in der Vergleichsgruppe ATN / keine ATN; die statistische Berechnung der Unterschiede ergab keine Signifikanzen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- A Ando K, Y Hirata, M Shichiri, T Emori, F Marmo  
Presence of immunoreactive endothelin in human plasma  
FEBS Lett 1989; 245; 164- 166
- B Barnett CP, M Perlman, PG Ekert  
Clinicopathological correlations in postasphyxial organ damage: A donor organ perspective  
Pediatrics 1997; 99 (6); 797- 799
- Benigni A, M Perico, F Gaspari, C Zofa, L Bellizzi, M Gabanelli, G Remuzzi  
Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass  
Am J Physiol 1991; 260; F331- F338
- Benson SRC, AR Ready, COS Savage  
Donor platelet and leukocyte load identify renal allografts at an increased risk of acute rejection  
Transplantation 2002; 73; 93- 100
- Bryan CF, AM Luger, J Martinez, N Muruve, PW Nelson, GE Pierce, G Ross, CF Shield, III, BA Warady, MI Aeder , TS Helling  
Cold ischemia time: An independent predictor of increased HLA class I antibody production after rejection of a primary cadaveric renal allograft  
Transplantation 2001; 71 (7); 875- 879
- Bunchman TE, CA Brookshire  
Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells  
J Clin Invest 1991; 88; 310- 314

C Cecka M

Clinical outcome of renal transplantation. Factors influencing patient and graft survival

Surg Clin North Am 1998; 78 (1); 133- 148

Chareandee C, WH Herman, DE Hricik, MS Simonson

Elevated Endothelin-1 in tubular epithelium is associated with renal allograft rejection

Am J Kidney Dis 2000; 36 (3); 541- 549

Chen HP, WX Hu, LS Li, H Zhou, JP Wang

Sequential changes of HLA-DR expression in renal allografts and their significance

Transplant Proc 1996; 28 (3); 1252- 1254

E Ehrenreich H, RW Anderson, CH Fox, P Rieckmann, GS Hoffman, WD Travis, JE Coligan, JH Kehrl, AS Fauci

Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages

J Exp Med 1990; 172; 1741- 1748

F Feldman HI, R Gayner, JA Berlin, DA Roth, R Silibovsky, S Kushner, KL Brayman, JE Burns, SM Kobrin, AL Friedman, RA Grossman

Delayed function reduces renal allograft survival independent of acute rejection

Nephrol Dial Transplant 1996; 11; 1306- 1313

Frei U

Resümee zum Themenbereich >Abstoßung und Nephrotoxizität<

Aus: Langzeitüberleben nach Nierentransplantation sichern (Frei U,

Klempnauer J, Ringe B, Sperschneider H)

Springer, Berlin Heidelberg 2001; 93- 94

Fuggle SV, P Errasti, AS Daar, JW Fabre, A Ting, PJ Morris  
Localization of major histocompatibility complex (HLA-ABC and DR) antigens  
in 46 kidneys  
Transplantation 1983; 35 (4); 385- 390

G Goes N, J Urmson, V Ramassar, PF Halloran  
Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response:  
evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1,  
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and  
interleukin-10  
Transplantation 1995; 59 (4); 565

H Hall BM, GA Bishop, GG Duggin, JS Horvath, J Philips, DJ Tiller  
Increased expression of HLA-DR antigens on renal tubular cells in renal  
transplants: Relevance to the rejection response  
Lancet 1984; 247- 251

Halloran PF, A Melk, C Barth  
Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated  
senescence  
J Am Soc Nephrol 1999; 10 (1); 167-181

Halloran PF  
Call for revolution: a new approach to describing allograft deterioration  
Am J Transplant 2002; 2 (3); 195-200

Herijgers P, V Leunens, TB Tjandra-Maga, K Mubagwa, W Flameng  
Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to  
circulating catecholamines  
Transplantation 1996; 62; 330- 335

Herman WH, SN Emancipator, RLP Rhoten, MS Simonson  
Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney  
Am J Physiol 1998; 275 (1Pt2); F8- F17

Herrero I, J Torras, M Riera, E Condom, O Coll, JM Cruzado, M Hueso, J Bover, N Lloberas, J Alsina, JM Gringo  
Prevention of cold ischemia-reperfusion injury by an endothelin receptor antagonist in experimental renal transplantation  
Nephrol Dial Transplant 1999; 14; 872- 880

Horie M, S Uchida, M Yanagisawa, Y Matsuita, M Kuokawa, E Ogata  
Mechanisms of endothelin-1 mRNA and peptide induction by TGF- $\beta$  and TPA in MDCK cells  
J Cardiovas Pharmacol 1991; 17; S222- S225

Hosoda K, K Nakao, N Tamura, H Arai, Y Ogawa, S Suga, S Nakanishi, H Imura  
Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor  
J Biol Chem 1992; 267; 18797- 18804

Howard PG, C Plumpton, AP Davenport  
Anatomical localisation and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue  
J Hypertens 1992; 10; 1379- 86

Humar A, EM Johnson, WD Payne, L Wrenshall, DE Sutherland, JS Najarian, KJ Gillingham, AJ Matas  
Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival  
Clin Transplant 1997; 11; 623

K Kadieva VS, L Friedman, LP Margolius, SA Jackson, DF Morrell  
The effect of dopamine on graft function in patients undergoing renal transplantation  
Anesth Analg 1993; 76; 362- 365

Karet FE, RE Kuc, AP Davenport

Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes  
ETA and ETB in human kidney

Kidney Int 1993; 44; 36- 42

Karet FE, AP Davenport

Localization of endothelin peptides in human kidney

Kidney Int 1996; 49; 382- 387

Karet FE, AP Davenport

The endothelin system in the kidney

Nephrology 1996; 2; 73- 85

Klempnauer J

Resümee zum Themenbereich >Weitere Einflussfaktoren<

Aus: Langzeitüberleben nach Nierentransplantation sichern (Frei U,  
Klempnauer J, Ringe B, Sperschneider H)

Springer, Berlin Heidelberg 2001; 93- 94

Kohan DE

Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: Regulation by tumor  
necrosis factor

J Lab Clin Med 1992; 119; 477- 484

Kohan DE

In-depth review: Endothelins in the normal and diseased kidney

Am J Kidney Dis 1997; 29 (1); 2- 26

Kon V, KF Badr

Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney

Kidney Int 1991; 40; 1- 12

Koning OHJ, JH van Bockel, FJ van der Woude, GG Persijn, J Hermans, RJ Ploeg

Risk factors for delayed graft function in University of Wisconsin solution preserved kidneys from multiorgan donors. European multicenter study group on organ preservation

Transplantation Proc 1995; 27 (1); 752- 753

- L Lagiewska B, M Pacholczyk, M Szostek, J Walaszewski, W Rowinski  
Hemodynamic and metabolic disturbances observed in brain-dead organ donors

Transplantation Proc 1996; 28; 165- 166

Lee GR, J Foerster, J Lukens, F Paraskevas, JP Greer, GM Rodgers  
Wintrobe`s Clinical Hematology

10. Auflage, 1999 Lippincott Williams & Wilkins, 551

- M Madeddu P, C Troffa, N Glorioso, A Pazzola, A Soro, P Manunta, G Tonolo, MP Demontis, MV Varoni, V Anania

Effect of endothelin on regional hemodynamics and renal function in awake normotensive rats

J Cardiovasc Pharmacol 1989; 14; 818- 825

Marcén R, L Orofino, J Pascual, MA de la Cal, JL Teruel, JJ Villafruela, ME Rivera, F Mampaso, FJ Burgos, J Ortuño

Delayed graft function does not reduce the survival of renal transplant allografts

Transplantation 1998; 66 (4); 461- 466

Marsden PA, DM Dorfmann, T Collins, BM Brenner, SH Orkin, BJ Ballermann  
Regulated expression of endothelin-1 in glomerular capillary endothelial cells

Am J Physiol 1991; 261; F117- F125

Marshall R, N Ahsan, S Dhillon, M Holman, HC Yang  
Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year  
kidney allograft function  
Surgery 1996; 120 (4); 663- 665

DB McKay, EL Milford, NF Tolckoff-Rubin  
Clinical aspects of renal transplantation  
Brenner & Rector`s The Kidney, Band II  
W. B. Saunders Company, Philadelphia; 6. Auflage; 2542- 2590

Modlin CS, DA Goldfarb, AC Novick  
The use of expanded criteria cadaver and live donor kidneys for  
transplantation  
Urol Clin North Am 2001; 28 (4); 687- 707

Murer L, G Zacchello, R dall`Amico, M Masiero, G Montini, G Basso, F  
Zacchello  
Renal immunohistochemical distribution, plasma levels and urinary excretion  
of endothelin after kidney transplantation  
J Nephrol 1997; 10 (6); 318- 324

N Nagareda T, Y Kinoshita, A Tanaka, M Takeda, T Sakano, K Yawata, T  
Sugimoto, Y Nishizawa, N Terada  
Clinicopathology of kidneys from brain dead patients treated with vasopressin  
and epinephrine  
Kidney Int 1993; 43; 1363- 1370

Naicker S, P Gathiram, S Naidoo, A Nadar, W Müller-Esterl, KD Bhoola  
Endothelin-1 and endothelin receptor status in kidney transplants undergoing  
acute rejection  
Immunopharmacology 1999; 44; 67- 74

- O O'Brien EA, SA Bour, RL Marshall, N Ahsan, HC Yang  
Effect of use of vasopressors in organ donors on immediate function of renal allografts  
J Transpl Card 1996; 6 (4); 215- 216
  
- Ojo AO, RA Wolfe, PJ Held, FK Port, RL Schmouder  
Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival  
Transplantation 1997; 63 (7); 968- 974
  
- Ojo AO, AB Leichtman, JD Punch, JA Hanson, DM Dickinson, RA Wolfe, FK Port, LY Agodoa  
Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes  
Am J Kidney Dis 2000; 36 (1); 153- 159
  
- Ohnaka K, R Takayanagi, T Yamauchi, H Okazaki, M Ohashi, F Umeda, H Nawata  
Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells  
Biochem Biophys Res Commun 1990; 168; 1128- 36
  
- Ong ACM, TP Jowett, JD Firth, S Burton, FE Karet, LG Fine  
An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration  
Kidney Int 1995; 48; 390- 401
  
- Opelz G  
Resümee zum Themenbereich >Faktoren, die das Langzeit-Patienten- und Transplantatüberleben beeinflussen<  
Aus: Langzeitüberleben nach Nierentransplantation sichern (Frei U, Klempnauer J, Ringe B, Sperschneider H)  
Springer, Berlin Heidelberg 2001; 93- 94

P Palomar R, JC Ruiz, JG Cotorruelo, JA Zubimendi, AL de Francisco, E Rodrigo, S Sanz, M Arias  
Effect of recipient age on the clinical course of renal transplantation  
Nefrologia 2001; 21 (4); 386- 391

Pernow J, A Franco-Cereceda, R Matran, JM Lundberg  
Effect of endothelin-1 on regional vascular resistances in the pig  
J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13 (suppl 5); S 205- S 206

Pober JS, MA Gimbrone, RS Cotran, CS Reiss, SJ Burakoff, W Fiers, KA Ault  
HLA Expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human  $\gamma$  interferon  
J Exp Med 1983; 157; 1339- 1353

Pratschke J, G Kofla, MJ Wilhelm, A Vergopoulos, I Laskowski, GD Shaw, H Volk, P Neuhaus, NL Tilney  
Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor  
Ann Surg 2001; 234 (6); 732- 740

Pratschke J, MJ Wilhelm, I Laskowski, M Kusaka, F Beato, SG Tullius, P Neuhaus, WW Hancock, NL Tilney  
Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats  
J Am Soc Nephrol 2001a; 12 (11); 2474- 2481

Prommool S, GS Jhangri, SM Cockfield, PF Halloran  
Time dependency of factors affecting renal allograft survival  
J Am Soc Nephrol 2000; 11 (3); 565- 573

Pupilli C, P Romagnani, L Lasagni, F Bellini, N Misciglia, N Emoto, M Yanagisawa, M Rizzo, M Mannelli, M Serio  
Localization of endothelin-converting enzyme-1 in human kidney  
Am J Physiol 1997; 273 (5 Pt 2); F 749- 56

- R Rabelink TJ, KAH Kaasjager, P Boer, EG Stroes, B Braam, HA Koomans  
Effects of endothelin-1 on renal function in humans: Implications for physiology  
and pathophysiology  
Kidney Int 1994; 46; 376- 381
- S Sakamoto H, S Sasaki, T Hirata, T Imai, K Ando, T Ida, T Sakurai, M  
Yanagisawa, T Masaki, F Marumo  
Production of endothelin-1 by rat cultured mesangial cells  
Biochem Biophys Res Commun 1990; 169; 462- 468
- Sakamoto H, M Yanagisawa, T Sakurai, Y Takuwa, H Yanagisawa, T Masaki  
Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin  
receptor  
Biophys Res Commun 1991; 178; 656- 663
- Schmidt R, W Kupin, F Dumler, KK Venkat, M Mozes  
Influence of the pretransplant hematocrit level on early graft function in primary  
cadaveric renal transplantation  
Transplantation 1993; 55 (5); 1034- 1040
- Schneider A, LH Toledo-Pereyra, WD Zeichner, R Allaben, J Whitten  
Effect of dopamine and pitressin on kidneys procured and harvested for  
transplantation  
Transplantation 1982; 36 (1); 110- 111
- Schnuelle P, D Lorenz, A Mueller, M Trede, FJ van der Woude  
Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft  
survival after cadaveric renal transplantation  
Kidney Int 1999; 56; 738- 746
- Sesso R, MA Josephson, MS Ancao, SA Draibe, D Sigulem  
A retrospective study of kidney transplant recipients from living unrelated  
donors  
J Am Soc Nephrol 1998; 9 (4); 684- 692

Shackleton CR, SL Ettinger, MG McLoughlin, CH Scudamore, RR Miller, PA Keown

Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression

Transplantation 1990; 49; 641

Shibouta Y, N Suzuki, A Shino, H Matsumoto, ZI Terashita, K Kondo, K Nishikawa

Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure

Life Sci 1990; 46; 1611

Shoskes DA, PF Halloran

Ischemic injury induces altered MHC gene expression in the kidney, by an IFN-gamma dependent pathway

Transplant Proc 1991; 23; 599

Shoskes DA, AR Shahed, S Kim

Delayed Graft Function: Influence on Outcome and Strategies for Prevention”

Urol Clin North Am 2001; 28 (4); 721-32

Simonson MS, S Wann, P Mené, G Dubyak, M Kester, Y Nakazato, JR Sedor, MJ Dunn

Endothelin stimulates phospholipase C, Na/H exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells

J Clin Invest 1989; 83; 708- 712

Simonson MS

Endothelins: Multifunctional renal Peptides

Physiol Rev 1993; 73 (2); 375- 411

Simonson MS, SN Emancipator, T Knauss, DE Hricik

Elevated neointimal endothelin-1 in transplantation-associated arteriosclerosis of renal allograft recipients

Kidney Int 1998; 54; 960- 971

Simonson MS, WH Herman, A Robinson, J Schulak, DE Hricik  
Inhibition of endothelin converting enzyme attenuates transplant vasculopathy  
and rejection in rat cardiac allografts  
Transplantation 1999; 67; 1542- 1547

Sperschneider H  
Resümee zum Themenbereich >Kardiovaskuläre Risikofaktoren<  
Aus: Langzeitüberleben nach Nierentransplantation sichern (Frei U,  
Klempnauer J, Ringe B, Sperschneider H)  
Springer, Berlin Heidelberg 2001; 93- 94

T Takada M, KC Nadeau, WW Hancock, HS Mackenzie, GD Shaw, AM Waaga,  
A Chandraker, MH Sayegh, NL Tilney  
Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in  
the rat  
Transplantation 1998; 65; 1533- 1542

Tesi RJ, EA Elkhammas, ML Henry, EA Davies, A Salazar, RM Ferguson  
Acute rejection episodes: Best predictor of long-term primary cadaveric renal  
transplant survival  
Transplant Proc 1993; 25 (1); 901- 902

Troppmann C, KJ Gillingham, E Benedetti, PS Almond, RW Gruessner, JS  
Najarian, AJ Matas  
Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal  
Transplantation. The multivariate analysis  
Transplantation 1995; 59 (7); 962- 968

Troppmann C, KJ Gillingham, RW Gruessner, DL Dunn, WD Payne, JS  
Najarian, AJ Matas  
Delayed graft function in the absence of rejection has no long-term impact: A  
study of cadaver kidney recipients with good graft function at 1 year after  
transplantation  
Transplantation 1996; 61; 1331

- U Ueno T, C Zhi-Li, T Itoh  
Unique circulatory responses to exogenous catecholamines after brain death  
Transplantation 2000; 70 (3); 436- 440
- V Valente JF, J Wesley Alexander  
Immunobiology of renal transplantation  
Surg Clin North Am 1998; 78 (1); 1- 26
- W Watschinger B, A Vychytil, M Schuller, E Hartter, O Traindl, E Pohanka, W Ulrich, J Kovarik  
The pathophysiologic role of endothelin in acute vascular rejection after renal transplantation  
Transplantation 1991; S2; 743- 746
- Wilhelm SM, MS Simonson, AV Robinson, NT Stowe, JA Schulak  
Cold ischemia induces endothelin gene upregulation in the preserved kidney  
J Surg Res 1999a; 85; 101- 108
- Wilhelm SM, MS Simonson, AV Robinson, NT Stowe, JA Schulak  
Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion  
Kidney Int 1999b; 55; 1011- 1018
- Y Yamada K, Y Gunji, E Hishikawa, H Kashiwabara, K Sakamoto, S Arita, T Yokoyama  
Possible involvement of endothelin in post transplant acute tubular necrosis.  
I: Studies in renal transplant patients  
Transplantation 1994; 57; 1137- 1139
- Yanagisawa M, H Kurihara, S Kumura; Y Tomobe, M Kobayashi, Y Mitsui, K Goto, Y Yazaki, T Masaki  
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells  
Nature 1988; 332; 411- 415

Z Zoja C, S Orisio, N Perico, A Benigni, M Morigi, L Benatti, A Rambaldi, G Remuzzi

Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth-factor- $\beta$ , thrombin and thromboxane A2 analogue

Lab Invest 1991; 64; 16- 20

## 8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Lutz Fricke für die Überlassung des Themas, die jahrelange Betreuung und konstruktive Kritik,

Herrn Prof. Dr. Burkhardt Kreft für die Betreuung und Unterstützung im experimentellen Teil dieser Arbeit,

besonders herzlich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des nephrologischen Labors für die jahrelange freundliche Zusammenarbeit und unermüdliche Unterstützung

Frau Petersen im Sekretariat des Transplantationszentrums, die mir trotz eigenen Zeitmangels immer mit Rat und Tat zur Seite stand,

Herrn Prof. Dr. H.J. Friedrich für die Beratung in Fragen der Statistik,

den Schwestern und Pflegern des Transplantationszentrums des UKM für ihre stete Hilfsbereitschaft,

sowie vor allem meinen Eltern für die jahrelange unermüdliche Unterstützung und die stets aufmunternden Worte.

## 9 LEBENS LAUF

<b>Name</b>	<b>Elke Nyhof</b> , geb. 06.07.1973
Geburtsort	Nordhorn
1980 – 1984	Grundschule Wilsum
1984 – 1986	Orientierungsstufe Uelsen
1986 – 1993	Gymnasium Neuenhaus, Abschluss mit dem Abitur
1993 – 1994	Freiwilliges Soziales Jahr im Kindergarten Föhrenstraße in Nordhorn
1994 – 1995	Krankenpflegeausbildung im KKH Nordhorn
Apr. 1995 – März 1997	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin, Vorklinik
Apr. 1997 – Nov. 2001	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
SS 1998	Beginn der experimentellen Arbeit
WS 99 / 00	Dissertationssemester
Okt. 2000 – Jan. 2001	Praktisches Jahr Chirurgie an der Università degli Studii di Ancona, Italien
Feb. u. März 2001	Praktisches Jahr Emergency Medicine und Innere Medizin an der Virginia Commonwealth University in Richmond, U.S.A.
Apr. u. Mai 2001	Praktisches Jahr Anästhesie im Hermann Hospital und im M.D. Anderson Cancer Center der University of Texas, U.S.A.
Juni 2001	Praktisches Jahr Innere Medizin im Charity Hospital der Louisiana State University in New Orleans
Juli – Aug. 2001	Praktisches Jahr Anästhesie am UK Lübeck
November 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, UK Lübeck

Dez. 2001 – März 2002	Fertigstellung des experimentellen Teils der Dissertation
Juli 2002 – Dez. 2003	Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsklinik Münster
seit Jan. 2004	Assistenzärztin in der Anästhesie in den Kliniken St. Antonius in Wuppertal