

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE
PROF. DR. BERNHARD BANAS
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DAS MUSTER LYMPHOZYTÄRER SUBPOPULATIONEN IM
RAHMEN CHRONISCHER
NIERENTRANSPLANTATVERÄNDERUNGEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrike Weiß

2017

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE
PROF. DR. BERNHARD BANAS
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DAS MUSTER LYMPHOZYTÄRER SUBPOPULATIONEN IM
RAHMEN CHRONISCHER
NIERENTRANSPLANTATVERÄNDERUNGEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrike Weiß

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Tobias Bergler

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Christina Hackl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2018

Meinen Eltern und Geschwistern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	6
1.1 HINTERGRUND ZUR NIERENTRANSPLANTATION	6
1.1.1. <i>Zahlen und Fakten</i>	6
1.1.2. <i>Derzeitige Prognose</i>	11
1.2 TRANSPLANTATIONSMIMMUNOLOGIE	13
1.2.1. <i>HLA-System und Histokompatibilität</i>	13
1.2.2. <i>HLA-Typisierung und Crossmatch</i>	14
1.2.3. <i>Allogenetische Erkennung</i>	16
1.2.4. <i>Immunsuppression</i>	17
1.3 FORMEN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG UND BANFF-KLASSIFIKATION.....	19
1.3.1. <i>Zelluläre Abstoßung</i>	19
1.3.2. <i>Humorale Abstoßung</i>	22
1.4 CHRONISCHE TRANSPLANTATSCHÄDIGUNG	24
1.4.1. <i>Begriffsklärung</i>	24
1.4.2. <i>Einflussfaktoren</i>	26
1.5 GRÜNDE FÜR TRANSPLANTATVERLUST	31
1.6 FRAGESTELLUNG	33
2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 ÜBERSICHT VERWENDETER MATERIALIEN UND GERÄTE	34
2.2 GEWEBEPROBEN/ PATIENTEN	34
2.2.1. <i>Zeitlicher Verlauf</i>	35
2.2.2. <i>Ausschluss von Proben</i>	38
2.3 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	38
2.4 GEWEBEVORBEREITUNG	38
2.4.1. <i>Entparaffinierung</i>	38
2.4.2. <i>Demaskierung</i>	38
2.5 VERWENDETE ANTIKÖRPER	39
2.6 IMMUNHISTOCHEMIE.....	39
2.6.1. <i>Avidin-Biotin-Methode</i>	39
2.6.2. <i>Multimer-Methode</i>	41
2.6.3. <i>Durchführung der Färbung</i>	41
2.7 AUSWERTUNG	42
2.7.1. <i>Software-basierte Auswertung</i>	42
2.7.2. <i>Manuelle Auswertung</i>	43
2.7.3. <i>Statistische Auswertung</i>	47

3	ERGEBNISSE	48
3.1	MAKROPHAGEN - CD68	48
3.1.1.	<i>Verlauf ohne initiale Abstoßung (oRjt)</i>	48
3.1.2.	<i>Verlauf mit initialer Abstoßung (Rjt)</i>	50
3.2	B-LYMPHOZYTEN – CD20	53
3.2.1.	<i>Verlauf ohne initiale Abstoßung (oRjt)</i>	53
3.2.2.	<i>Verlauf mit initialer Abstoßung (Rjt)</i>	54
3.3	T-LYMPHOZYTEN – CD3.....	58
3.3.1.	<i>Verlauf ohne initiale Abstoßung (oRjt)</i>	58
3.3.2.	<i>Verlauf mit initialer Abstoßung (Rjt)</i>	59
3.4	PLASMAZELLEN – CD138	62
3.4.1.	<i>Verlauf ohne initiale Abstoßung (oRjt)</i>	63
3.4.2.	<i>Verlauf mit initialer Abstoßung (Rjt)</i>	64
4	DISKUSSION	71
4.1	B-LYMPHOZYTEN UND PLASMAZELLEN	71
4.1.1.	<i>Vorangegangene akute Abstoßung und IF/TA-Entwicklung (Rjt)</i>	71
4.1.2.	<i>Nicht-immunologische Faktoren und IF/TA-Entwicklung (oRjt)</i>	75
4.2	T-LYMPHOZYTEN.....	76
4.2.1.	<i>Nicht-immunologische Faktoren und IF/TA-Entwicklung (oRjt)</i>	76
4.2.2.	<i>Vorangegangene akute Abstoßung und IF/TA-Entwicklung (Rjt)</i>	77
4.3	MAKROPHAGEN	80
4.3.1.	<i>Makrophagen und akute Abstoßung (Rjt)</i>	80
4.3.2.	<i>Nicht-immunologische Faktoren und IF/TA-Entwicklung (oRjt)</i>	81
4.3.3.	<i>Makrophagen und chronischer Transplantatschaden</i>	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ANHANG	101
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
7.2	TABELLENVERZEICHNIS	103
7.3	BANFF'97 KLASSIFIKATION , UPDATE 2005	104
8	ERKLÄRUNG.....	106
9	DANKSAGUNG.....	107
10	LEBENSLAUF	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABMR	Antikörper-vermittelte Abstoßung (Antibody Mediated Rejection)
	Synonym: humorale Abstoßung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AR	Akute Rejektion
	Synonym: Akute Transplantatabstoßung
BK-Virus	Humanes Polyomavirus 1 (lässt BK-Nephropathie aus)
BPAR	Akute Rejektion, biopsisch bewiesen (Biopsy Proven Acute Rejection)
CAD	Chronische Allograft Dysfunktion
CAI	Chronischer Transplantatschaden (Chronic Allograft Injury)
CAMR	Chronische Antikörper-vermittelte Abstoßung (Chronic Antibody Mediated Rejection)
CAN	Chronische Transplantatnephropathie (Chronic Allograft Nephropathy)
CD	Oberflächenmerkmal auf Zellen (Cluster of Differentiation)
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizitätsanalyse (Complement Dependent Cytotoxicity Assay)
CMV	Cytomegalievirus
CNI	Calcineurininhibitor
CR	Chronische Abstoßung (Chronic Rejection)
CsA	Ciclosporin A
CTS	Collaborative Transplant Study
DGF	Verzögerte Transplantatfunktion (Delayed Graft Function)
DSA	Donor-spezifische Antikörper
DTH	Verzögerte Hypersensitivitätsreaktion (Delayed Type Hypersensitivity)
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation

ESP	Eurotransplant-Senior-Programm
ET	Verein Eurotransplant
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN γ	Interferon gamma
IF/TA	Interstitielle Fibrose / Tubuläre Atrophie
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden (Ischemia Reperfusion Injury)
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTORi	mTOR-Inhibitor (mTOR = mechanistic/mammalian Target of Rapamycin)
MW	Mittelwert
NODAT	Posttransplantations-Diabetes mellitus (New-onset Diabetes After Transplantation)
NTx	Nierentransplantation
oRjt-f	Gruppe: ohne vorangehende akute Rejektion – frühe Entwicklung einer IF/TA
oRjt-s	Gruppe: ohne vorangehende akute Rejektion – späte Entwicklung einer IF/TA
PRA	Panel Reactive Antibodies
PTC	Peritubuläre Kapillaren
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder)
Rjt-f	Gruppe: vorangehende akute Rejektion – frühe Entwicklung einer IF/TA
Rjt-s	Gruppe: vorangehende akute Rejektion – späte Entwicklung einer IF/TA
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
Tac	Tacrolimus
TCMR	T-Zell vermittelte Abstoßung (T Cell-Mediated Rejection) Synonym: zelluläre Abstoßung
TLT	Tertiäres lymphatisches Gewebe (Tert. Lymphatic Tissue)

1 EINLEITUNG

1.1 HINTERGRUND ZUR NIERENTRANSPLANTATION

1.1.1. ZAHLEN UND FAKTEN

Als Behandlung der terminalen dialysepflichtigen Niereninsuffizienz bestehen zwei Möglichkeiten des Nierenersatzverfahrens: Dialyse (Hämo- oder Peritonealdialyse) oder Nierentransplantation.

Die Inzidenz von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stieg über viele Jahrzehnte an, seit 2008 gehen die Zahlen jedoch sowohl in den USA als auch in Europa zurück (Europa 2008-2011 jährlich um 2,2%) (1, 2). Dennoch sind die Patienten im Vergleich zu den Anfängen der Nierenersatztherapie in den 1970iger Jahren durchschnittlich um circa 10 Jahre älter und multimorbider (3). Grund hierfür ist zum Einen die Verbesserung der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz, sodass eine Progression bis zum terminalen Stadium insgesamt seltener wird (1). Außerdem verschob sich in den letzten Jahrzehnten auch der Zeitpunkt, an dem die Indikation zur Nierenersatztherapie gestellt wird weiter nach hinten. Laut älterer Studien ergab sich ein Vorteil, wenn die Dialysetherapie, vor allem bei älteren Patienten und Diabetikern, zu einem früheren Zeitpunkt bei noch besserer Nierenfunktion begonnen wird (4, 5). Dies wurde jedoch später u.a. in der IDEAL-Studie 2010 widerlegt (6). Heutzutage wird daher mit dem Beginn einer Nierenersatztherapie bis zum Erreichen einer insgesamt schlechteren Filtrationsrate gewartet.

Die Gesamtzahl der Patienten hingegen, die ein Nierenersatzverfahren aufgrund terminaler Niereninsuffizienz benötigt steigt weiter stetig an. 1985 benötigten in den USA nur etwa 113000 Patienten Dialyse oder Transplantation (7), wohingegen es bis 2011 zu einem fünffachen Anstieg auf etwa 616000 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz kam (3, 8).

Der wichtigste Grund hierfür ist das längere Gesamtüberleben der Patienten mit Nierenersatztherapie. Obwohl die Patienten insgesamt älter und kränker sind, stieg in den letzten 40 Jahren die altersspezifische Lebenserwartung um 8% (für einen 50- Jährigen von 7,3 Jahre auf 7,8 Jahre) an. In der gleichen Zeit erreichte diese in der Normalbevölkerung jedoch 12%.

Insgesamt verschlechterte sich die relative Lebenserwartung für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz daher (3).

Dennoch: trotz vermehrter Multimorbidität des Patientenguts mit terminaler Niereninsuffizienz verbesserte sich das Überleben. Einen wichtigen Einflussfaktor hierfür stellt auch die Wahl des

Nierenersatzverfahrens dar. Wurden 1977 nur 15 % der Dialysepatienten in den USA nierentransplantiert, so waren es 2007 bereits 30 % (3).

Zwar verbesserte sich sowohl in Europa als auch den USA im ersten Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts die Lebenserwartung an der Dialyse (1), allerdings ist die Prognose nach Transplantation weiterhin derer der Dialysepatienten weit überlegen. Zwischen 2005 und 2009 war das Patientenüberleben nach Transplantation in Europa mit einem postmortalen Organspender im ersten Jahr 96,1 % und nach 5 Jahren noch 87,9 % (9). Bei Lebendspendern betrug es sogar 98,4% im ersten Jahr und 94,2% nach 5 Jahren. Im ersten Jahr der Dialysetherapie war das Überleben mit 81,6% ebenfalls noch hoch, nach 5 Jahren sank es aber auf 48,1% ab (10).

Insgesamt ist die Lebenserwartung nach Transplantation gegenüber Dialysetherapie etwa 10 Jahre höher (11, 12). Dieser deutliche Überlebensvorteil ist in der Metaanalyse von 110 internationalen Studien durch Tonelli et al (13) aus dem Zeitraum 1960-2006 unabhängig von der Art der Organspende (Lebend- vs. postmortal). Darüber hinaus war aber auch eine Unabhängigkeit von anderen Patientenkriterien wie Alter oder Diabetes mellitus gezeigt worden. Des Weiteren zeigte sich im Vergleich zur Dialyse ein deutlich reduziertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (1, 13), und eine bessere Lebensqualität für den Patienten (13–15). Somit ist die Transplantation Therapie der Wahl bei terminaler dialysepflichtiger Niereninsuffizienz.

Verschiedene Erkrankungen können schlussendlich zur terminalen Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit führen. In Abbildung 1 wird die Verteilung der Grunderkrankungen, die im Jahr 2014 zur terminalen Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie führten aus dem europäischen ERA-EDTA Register aufgeführt (9). Die diabetische Nephropathie sowie die große Gruppe der Glomerulonephritiden führen die Liste immer noch knapp an, jedoch zeichnet sich im letzten Jahrzehnt ein Wandel ab.

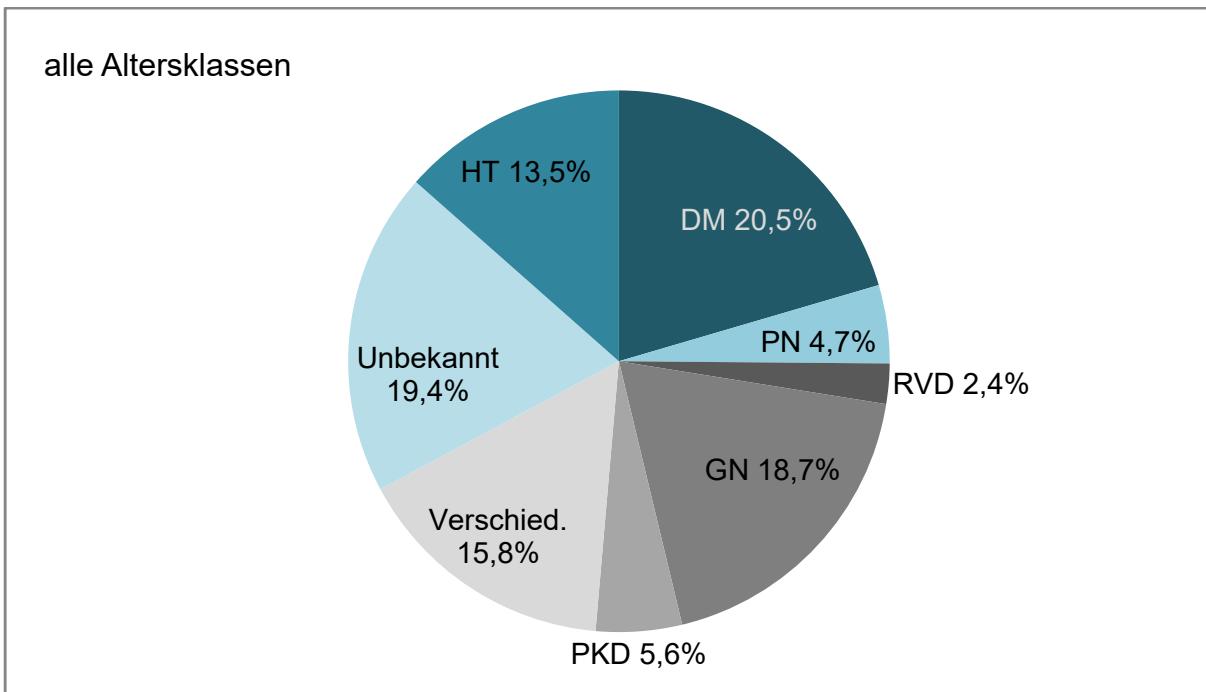


Abbildung 1 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten.
Alle Altersklassen. Arterielle Hypertonie (HT), Diabetes mellitus (DM), Pyelonephritis (PN), Renovaskuläre Erkrankungen (RVD), Glomerulonephritis /-sklerose (GN), Polyzystische Nierenenerkrankung d. Erwachsenen (PKD). (Abb. nach ERA-EDTA Registry Annual Report 2014, (9))

Insgesamt sinkt die Inzidenz für die diabetische Nephropathie als Grund für die terminale Niereninsuffizienz, obwohl die Inzidenz für Diabetes mellitus in der Bevölkerung jährlich stetig steigt. Grund hierfür ist laut James et al die Verbesserung der Diabetestherapie und daher die Reduktion des Endorganschadens (16).

Die vaskuläre Nephropathie hingegen, welche im Rahmen des arteriellen Hypertonus auftritt, spielt eine immer größere Rolle und löst vor allem bei älteren Patienten die diabetischen Veränderungen in ihrer Bedeutung ab (Abb. 3). Bei jüngeren Patienten führen die Glomerulonephritiden noch deutlich häufiger zu einer dialysepflichtigen Nierenfunktionseinschränkung (Abb. 2).

Patientenalter < 65 Jahre

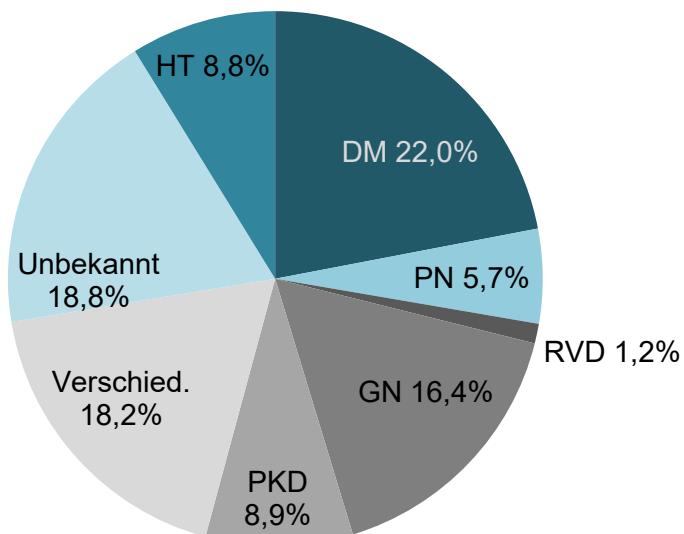


Abbildung 2 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten.

Patientenalter < 65 Jahre. Arterielle Hypertonie (HT), Diabetes mellitus (DM), Pyelonephritis (PN), Renovaskuläre Erkrankungen (RVD), Glomerulonephritis /-sklerose (GN), Polyzystische Nierenerkrankung d. Erwachsenen (PKD). (Abb. nach ERA-EDTA Registry Annual Report 2014, (9))

Patientenalter ≥ 65 Jahre

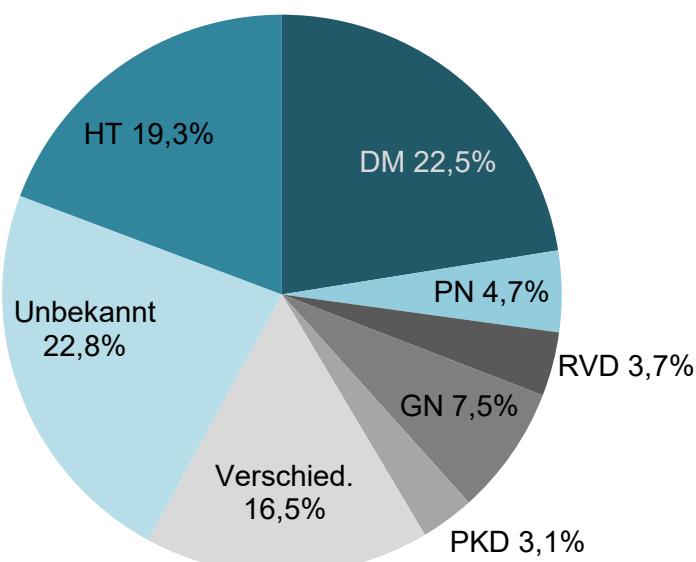


Abbildung 3 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten.

Patientenalter ≥ 65 Jahre. Arterielle Hypertonie (HT), Diabetes mellitus (DM), Pyelonephritis (PN), Renovaskuläre Erkrankungen (RVD), Glomerulonephritis /-sklerose (GN), Polyzystische Nierenerkrankung d. Erwachsenen (PKD). (Abb. nach ERA-EDTA Registry Annual Report 2014, (9))

Die Nierentransplantation ist heute ein Routineverfahren. Laut Eurotransplant wurden im Jahr 2014 deutschlandweit 2079 Nierentransplantationen (kidney-only) durchgeführt (645 Lebendspenden, 1434 postmortal Spenden) (17).

Abbildung 4 zeigt dem gegenübergestellt die aktive Warteliste 2014 mit 7961 Patienten. Davon wurden allein im selben Jahr 3096 Patienten neu registriert. Die Anzahl der Neuanmeldungen übersteigt also deutlich die Zahl der durchgeführten Eingriffe. Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, bleibt die Zahl der Wartelistenpatienten in Summe dennoch in den letzten Jahren konstant. Dies ist auch durch die erhöhte Sterblichkeit der Wartelistenpatienten zu erklären.

Aus dem Jahresbericht 2015 von Eurotransplant geht hervor, dass in Deutschland ca. 43% der Wartelistenpatienten fünf und mehr Jahre (seit 1. Tag Dialyse) auf ein Organ warten, wohingegen es in den anderen ET-Ländern nur zwischen 6-12 % sind, die eine so lange Wartezeit haben. Die meisten warten laut dieser Auflistung zwischen 0-1 Jahr nach Registrierung und 2-4 Jahre (43 Monate) seit dem 1. Tag der Dialyse (17).

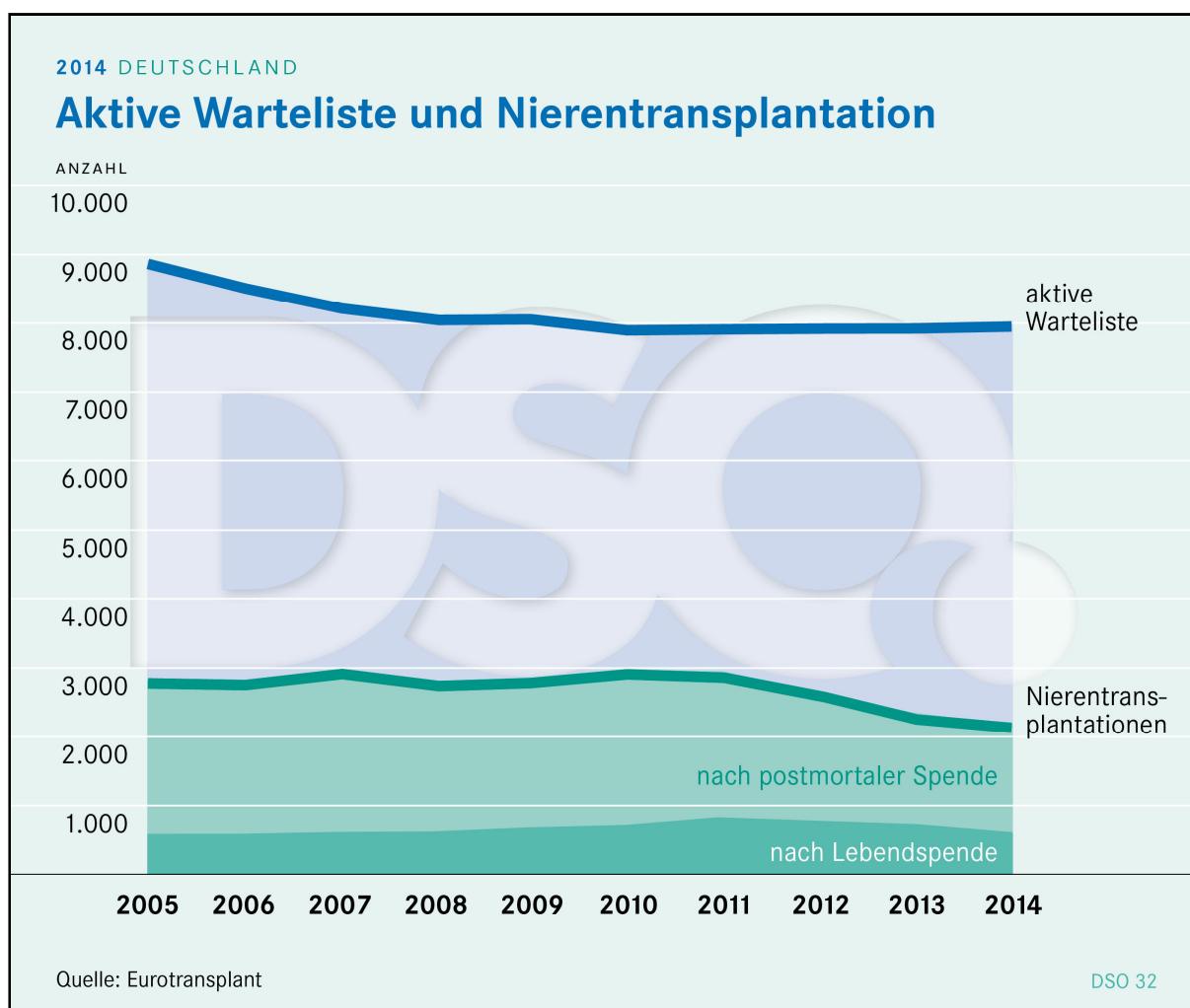


Abbildung 4 Verhältnis zwischen aktiver Warteliste und Nierentransplantationen in Deutschland in den Jahren 2005 bis 2014 (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2015, Quelle Eurotransplant)

Aktuell nimmt die Diskrepanz zwischen Angebot und Bedarf nach dem sich unlängst ereigneten „Organspendeskandal“ eher noch zu. Aus dem Jahresbericht 2013 der Deutschen Stiftung Organtransplantation ist zu entnehmen, dass die genauen Gründe für den Rückgang der Spenderzahlen jedoch unklar bleiben. „Die Ursache liegt nicht allein in der Verunsicherung der Bevölkerung. Auch die positive Entwicklung bei der Behandlung von Schlaganfallpatienten, sowie Intensivpatienten im Allgemeinen, die geringe Zahl von Verkehrstoten, das steigende Lebensalter und die damit verbundenen möglichen Vorerkrankungen der Organspender führen zu einem kontinuierlichen Rückgang der Spendermeldungen der Krankenhäuser an die DSO.“

1.1.2. DERZEITIGE PROGNOSE

Im Jahr 1954 führte Joseph E. Murray die erste erfolgreiche Nierentransplantation durch (18). Die Transplantationsmedizin hat sich seit jener Zeit stetig weiterentwickelt und ist vor allem dem Hauptgrund des frühen Organverlusts entgegen getreten: der akuten Rejektion. Nachdem Ciclosporin und Muromonab-CD3 eingeführt wurden, verbesserte sich in den frühen 80iger Jahren das Einjahresüberleben von etwa 60 % auf 80-90 %. Dennoch sank die Häufigkeit an akuten Abstoßungen zunächst nicht, ungefähr die Hälfte aller Empfänger erlebte weiterhin mindestens eine akute Abstoßung. Zu einem signifikanten Rückgang der AR führte dann erst Anfang der 1990iger die Einführung weiterer Immunsuppressiva (19, 20). Heutzutage besteht die Therapie im Allgemeinen aus einer Kombination von Glukokortikoiden, Calcineurininhibitoren, antiproliferativen Substanzen und Biologicals.

Im Langzeitverlauf änderte sich trotzdem bis heute kaum etwas (21, 22). In Abb. 5 werden die Funktionsraten nach Nierentransplantation in Deutschland und im internationalen Vergleich dargestellt. Im Jahr 2012 lag die Fünf-Jahres-Transplantatfunktionsrate in Deutschland insgesamt bei 74,3 %, international bei 79,9 %.

Die Zahlen für die Funktionsrate nach Lebendspende sind traditionell besser. Dies liegt zu einem großen Teil an der Verkürzung der kalten Ischämiezeit, aber auch an einer insgesamt erhöhten Organqualität durch einen planbaren Entnahmepunkt und dem Fehlen vorhergehender Belastungsfaktoren für das Organ, welche mit dem Hirntod und eventueller kardiozirkulatorischer Instabilität beim Postmortalspender einhergehen (23–25). Des Weiteren kann eine detailliertere Spenderuntersuchung im Vorfeld im Lebendspende-Setting durchgeführt werden (26, 27). Außerdem kann die Wartezeit auf ein Organ durch Finden eines geeigneten Lebendspenders deutlich verkürzt werden, was eine möglichst kurze oder gar keine Dialysetherapie im Vorfeld ermöglicht. Meier-Kriesche et al konnten 2002 die Wartezeit an der Dialyse als stärksten unabhängigen Risikofaktor für das spätere Transplantatoutcome ausmachen (28).

Zusätzlich kann bei einer geplanten Lebendtransplantation bereits vor der Operation beim Empfänger mit einer individuell abgestimmten immunsuppressiven Therapie begonnen werden (29).

All dies verbessert schlussendlich die Prognose.

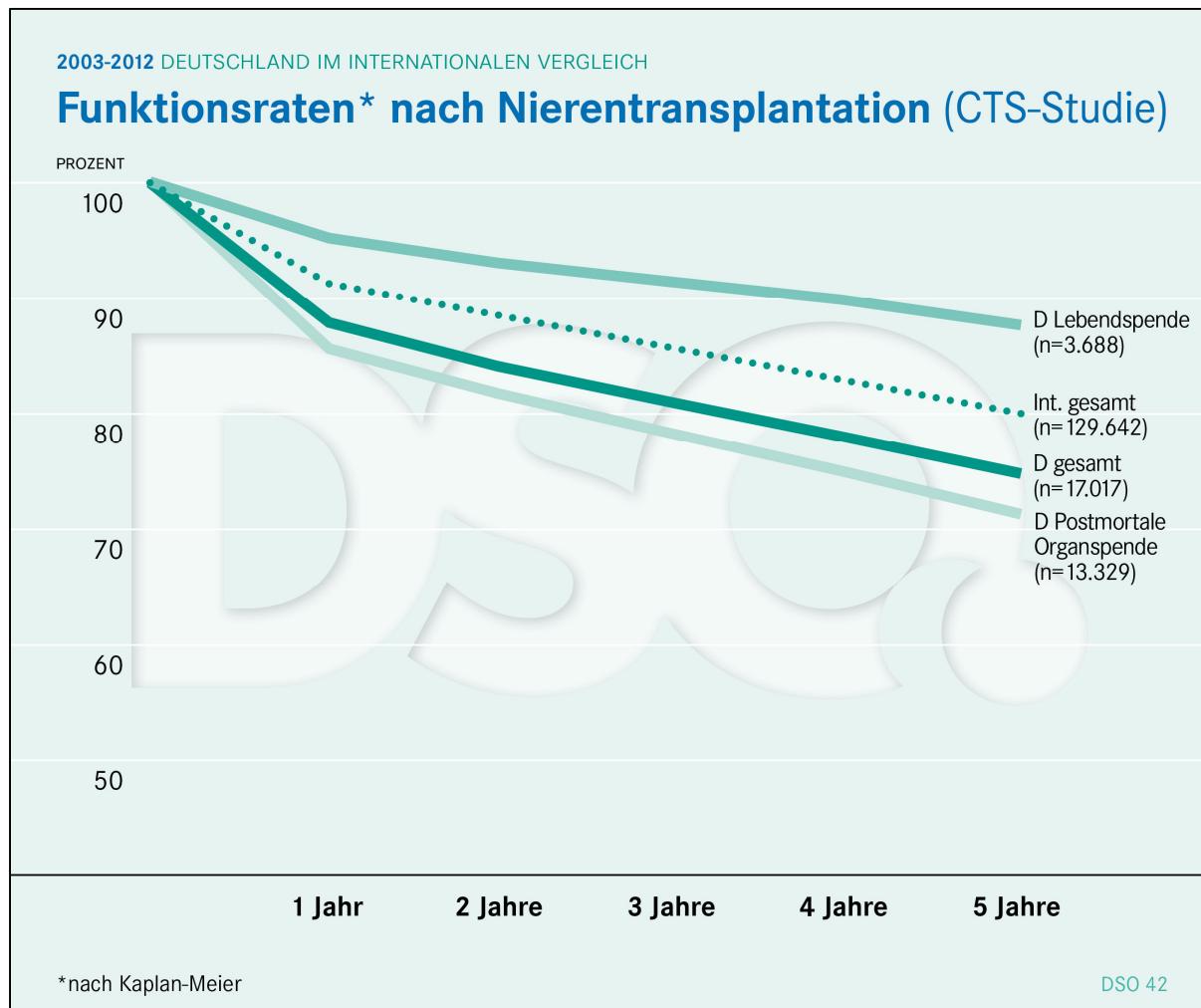


Abbildung 5 Funktionsraten nach Nierentransplantation: 2003 - 2012 Deutschland im internationalen Vergleich (nach Kaplan-Meier) (CTS-Studie; DSO 2014)

Die Arbeitsgruppe um El-Zoghby (30) ging in ihrer Studie den häufigsten Ursachen des Transplantatverlusts von 330 Patienten auf den Grund. Das Ergebnis bestätigt in großen Teilen die in der Literatur bekannten Faktoren: Tod mit funktionierendem Transplantat und Transplantatversagen.

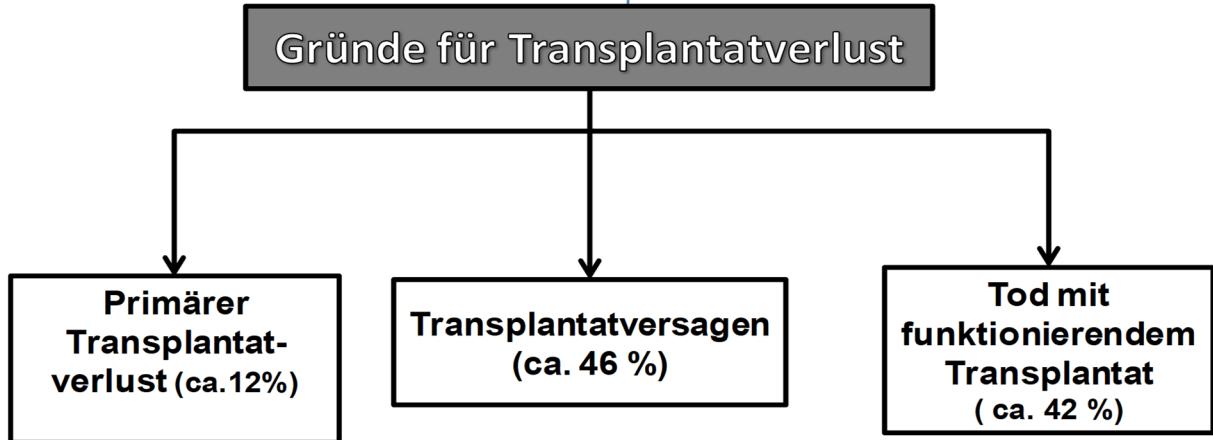


Abbildung 6 Gründe für Transplantatverlust (nach (30, 31))

1.2 TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE

Bei der Übertragung von Gewebe eines genetisch nicht-identischen Spenders auf einen Empfänger der selben Spezies spricht man von Allotransplantation (32, 33). Die Konfrontation des Empfängerimmunsystems mit dem Fremdantigen des Spenders bedingt eine automatisch ablaufende Abwehrreaktion, die die Grundlage für die Transplantatabstoßung bildet.

1.2.1. HLA-SYSTEM UND HISTOKOMPATIBILITÄT

Neben den Blutgruppenantigenen wird bei der Vergabe der Transplantatnieren vor allem das HLA-System (Human Leucocyte Antigen) berücksichtigt. Dies ist die Bezeichnung der MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) des Menschen. Man unterscheidet HLA-Klasse-I-Antigene (A, B und C) von HLA-Klasse-II-Antigenen (DR, DP und DQ). Antigene der Klasse I werden auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert. Klasse-II-Antigene sind hingegen nur auf dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten zu finden. Die HLA-Klasse-II-Moleküle dienen der Präsentation antigener Peptide, dementsprechend werden die genannten Zellen als APCs (Antigen-präsentierende Zellen) bezeichnet. Deren Hauptaufgabe besteht in der Aktivierung von T-Lymphozyten. Aufgrund der immensen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten, ist eine zufällige Histokompatibilität, d.h. eine Übereinstimmung der HLA-Antigene zwischen zwei Individuen extrem unwahrscheinlich.

Je größer der „Mismatch“, d.h. je weniger Gemeinsamkeiten Spender und Empfänger im Bereich der HLA-Antigene aufweisen, desto größer ist die Gefahr eines Transplantatverlusts (34). Auf diesem Zusammenhang fußt u.a. der Allokationsalgorithmus der Organvergabe im

Eurotransplant-Raum. Allgemein werden hier jedoch nur die HLA-Antigene A, B und DR berücksichtigt, da bei diesen die Immunantwort besonders aggressiv ausfällt (18, 32, 33, 35).

Nicht-immunologische Faktoren wie u.a. Alter, Geschlecht und kalte Ischämiezeit bleiben bisher im Vergabeverfahren nachrangig bewertet. Es gibt jedoch Hinweise, dass dies zu Unrecht geschieht (36). Schließlich war die Überlebensrate der lebendgespendeten Nieren durch Ehegatten oder andere nicht-verwandte Spender trotz einer im Vergleich höheren Zahl von HLA-Matches in der Studie von Terasaki et al höher als diejenige der auf HLA-Ebene besser kompatiblen Leichenspender (37). Sicher ist zudem auch, dass eine längere kalte Ischämiezeit direkt mit einem schlechteren Transplantatüberleben assoziiert ist (38).

Andererseits zeigte sich im ET-Senior-Programm (ESP), einem Allokationsprogramm speziell zwischen Spendern und Empfängern > 65 Jahre, wo bisher zu Gunsten einer möglichst kurzen kalten Ischämiezeit und Verkürzung der Wartelistenzzeit keine HLA-Kriterien berücksichtigt wurden, dass es abhängig von Alter und HLA-DR-Mismatch zu einer erhöhten Rate an Abstötungen und damit einem schlechteren Transplantatüberleben kommt (39).

Angesichts einer immer effektiver werdenden Immunsuppression sollte daher der Vorteil des HLA-Matchings gegenüber anderen Einflussfaktoren abgewogen werden (40), wie beispielsweise im ESP geschehen. Somit können überproportional lange Transportzeiten von Organen innerhalb des ET-Raumes und damit lange kalte Ischämiezeiten insbesondere von marginalen Organen vermieden werden (38) ohne ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben in Kauf nehmen zu müssen.

1.2.2. HLA-TYPISIERUNG UND CROSMATCH

Um eine möglichst hohe Kompatibilität zwischen Empfänger und Spender zu erreichen, wird molekularbiologisch eine HLA-Typisierung durchgeführt. Beim Empfänger geschieht dies zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Transplantationsliste. Der potenzielle Organspender wird unmittelbar vor der Organexplantation HLA-typisiert.

Um bereits im Vorfeld das anti-HLA-Antikörper-Profil eines Patienten, der eine Nierentransplantation benötigt bestimmen zu können, wird das Patientenserum gegen eine große Gruppe verschiedener „Panel“-Lymphozyten getestet. Dieses Panel umfasst soweit wie möglich das HLA-Profil der jeweiligen Population. Hierbei werden die Panel-Lymphozyten mit dem Empfängerserum inkubiert. Wenn präformierte Antikörper gegen die HLA-Profile der Lymphozyten vorliegen kommt es zur Bindung. Hierüber wird eine Komplementkaskade initiiert, welche zum Tod der Lymphozyten und einer Farbreaktion führt.

Anhand des Prozentsatzes der lysierten Zellen in diesem *complement dependent cytotoxicity assay* (CDC) kann der Grad der Sensibilisierung abgelesen werden (41–43). Überschreitet der Wert dieser „Panel Reactive Antibodies“ (PRA) 85 % gelten die Patienten als hochimmunisiert. Diese wiesen vor Einführung moderner immunsuppressiver Protokolle überproportional hohe Raten für einen Organverlust nach Transplantation infolge von Abstoßungen auf. Daher war diese immunologische Konstellation historisch eine Kontraindikation zur Transplantation (44, 45).

Dieses Panel-Antikörper-Screening wird alle 3 Monate mit dem sog. Quartalsserum erhoben und sollte zusätzlich nach jedem potenziell immunisierenden Ereignis wie z.B. Schwangerschaft oder Transfusion erfolgen.

Da bei einem konkreten Organangebot Antikörper des Empfängers gegen die HLA-Antigene des möglichen Transplantats ausgeschlossen werden müssen, wird dann ein sogenanntes zytotoxisches Crossmatch durchgeführt. Hierbei werden isolierte Spenderlymphozyten gegen das Empfängerserum getestet. Es können gemischte Lymphozyten des Spenders sowie – meist bei immunisierten Empfängern mit HLA-Klasse II Antikörpern – T- und B-Zellen aus dem peripheren Blut getrennt voneinander getestet werden. Wenn präformierte zytotoxische Antikörper gegen den Spender beim Empfänger vorliegen kommt es zur Zellyse und damit einem positiven Ergebnis.

Ein positiver Crossmatchbefund weist auf eine Alloimmunisierung des Empfängers gegen den Spender und damit auf ein stark erhöhtes Risiko für eine therapeutisch nicht beherrschbare hyperakute Abstoßung hin. Eine Transplantation ist somit kontraindiziert.

Antikörper entstehen durch Sensibilisierung bei früherem Antigenkontakt z.B. durch Bluttransfusionen, Schwangerschaften / Abort oder im Rahmen einer vorangegangenen Transplantation (32, 33).

Patienten mit einem hohen PRA-Wert (85% CDC-PRA) haben auch heutzutage nur eine geringe Chance auf ein Organangebot im regulären Allokationsprogramm, was mit sehr langen Wartezeiten und demzufolge auch hoher Mortalität auf der Warteliste einhergeht. Daher wurde für diese immer weiter wachsende Patientengruppe das eigene Allokationsprogramm „Acceptable Mismatch“ im Eurotransplant-Raum entwickelt, durch welches die Chancen auf ein immunologisch passendes Organ signifikant gesteigert und Wartezeiten verkürzt werden konnten (44, 46).

In Ergänzung hierzu steht die Methode der „Desensibilisierung“ für eine kleine Anzahl von Patienten als Option zur Verfügung. Hier wird versucht den Empfänger von seiner „Antikörperlaster“ durch Immunadsorption, Plasmapherese, intravenösem Immunglobulin (IVIg) oder

Anti-CD20-Antikörper wie Rituximab zu befreien und so eine Transplantation zu ermöglichen. Rituximab wirkt hierbei indirekt über die Reduktion der B-Zellen, wohingegen Plasmapherese / Immunadsorption und IVIg die Antikörper bzw. deren Bindung direkt vermindern (47–49).

Zwar ist das Langzeitresultat nach einer HLA-inkompatiblen Transplantation mit vorangegangener Desensibilisierung bei hochimmunisierten Patienten schlechter als bei vergleichbaren HLA-kompatiblen Transplantationen (50), jedoch ließ sich erst kürzlich zeigen, dass selbst diese risikoreichere Form der Lebendspende einem weiteren Verbleib auf der Warteliste überlegen ist (44, 51).

Dennoch: Besonders bei postmortalen aber auch Lebendspenden über die HLA-Grenzen hinweg zeigen sich erhöhte Raten von Antikörper-vermittelter Abstoßung trotz Desensibilisierung (52, 53). Dies wird einer Re-Sensibilisierung durch DSA-produzierende Zellklone im späteren Verlauf nach Transplantation zugeschrieben.

Angesichts der immer noch unsicheren Langzeitdaten, der oft nicht ausreichenden Effektivität der Antikörperunterdrückung, sowie des hohen Risikos die gesunde Niere eines Spenders zu verlieren sollte auf diese immer noch recht experimentellen Ansätze zu Gunsten einer Transplantation im „Acceptable Mismatch“-Programm wann immer möglich verzichtet werden (54).

1.2.3. ALLOGENETISCHE ERKENNUNG

Das zentrale Problem der Allotransplantation ist die Erkennung des Fremdantigens durch Lymphozyten, primär T-Zellen, des Empfängers mit konsekutiver Ausbildung einer Abstoßungsreaktion (32, 33).

Ganz allgemein werden T-Lymphozyten in verschiedene Subklassen unterteilt. Zu den wichtigsten zählen dabei CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Über die T-Helfer-Zelle werden zwei verschiedene Immunreaktionen ausgelöst, die als Th1- (= direkter Weg) und Th2-Reaktion (= indirekter Weg) bezeichnet werden (siehe Abb.7). Eine APC des Spenders präsentiert der CD4⁺ Th1-Zelle über den MHC II-Rezeptor das Fremdantigen. Die T-Helfer-Zelle aktiviert danach über eine Zytokinausschüttung von u.a. Interferon γ (IFN- γ) die Effektorzellen: die zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen. Dieser Mechanismus ist entscheidend in der Genese der akuten zellulären Abstoßung (55, 56). Empfängereigene APCs hingegen sind es, die das Alloantigen den CD4⁺ Th2-Zellen präsentieren. Dies rekrutiert einerseits Makrophagen und führt zu einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity; DTH) mit ausgeprägter Gewebeentzündung. Außerdem werden B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion angeregt, was die Brücke zur humoralen Abstoßung schlägt. Die

indirekte Antigenpräsentation scheint am Erhalt und Fortschreiten der Rejektion beteiligt zu sein: die permanente Aktivierung einer kleinen Zahl von CD4⁺ Zellen über den indirekten Weg wird immer öfter mit der Genese der chronischen Abstoßung in Verbindung gebracht (33, 57).

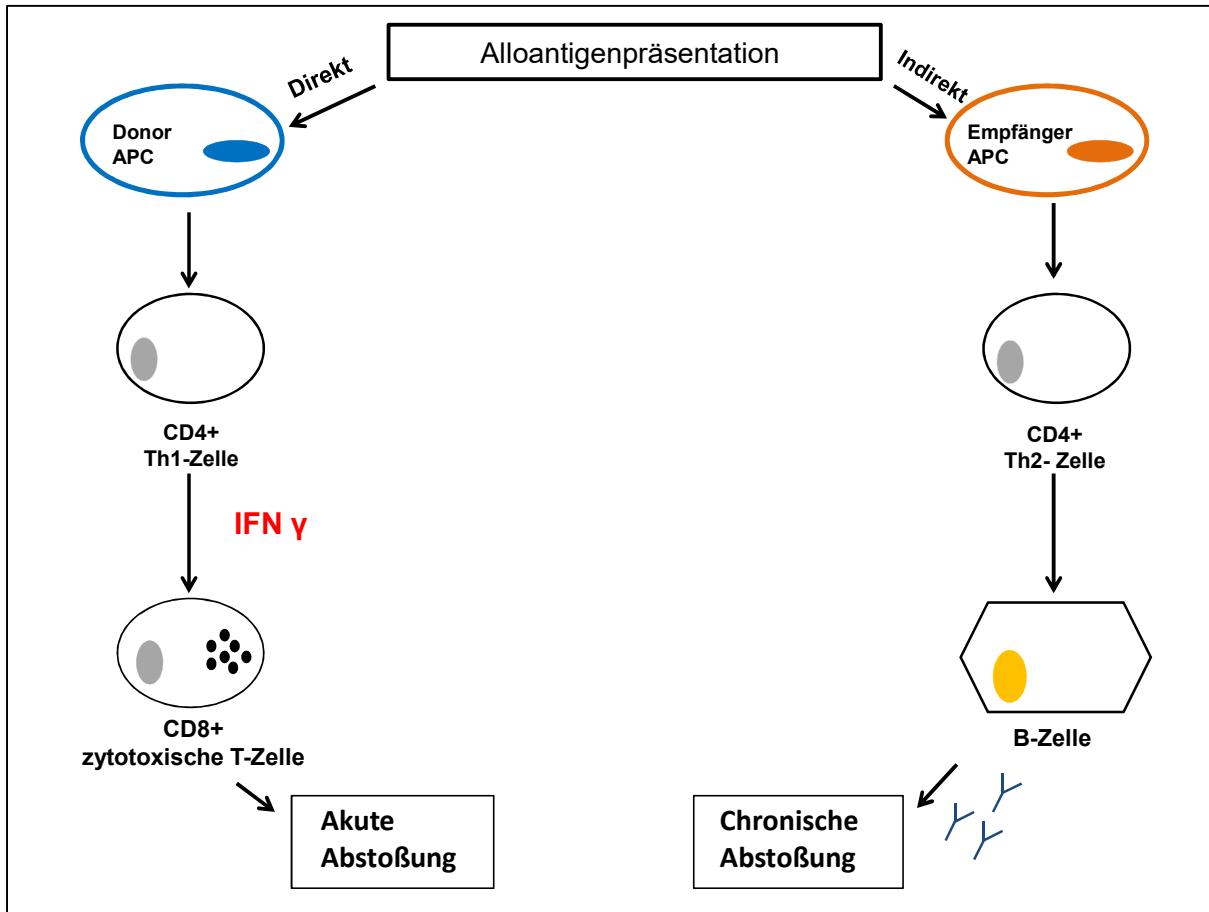


Abbildung 7 Signalwege der Alloantigenerkennung nach (58, 59). IFN γ = Interferon γ

1.2.4. IMMUNSUPPRESSION

Diesem Pathomechanismus entsprechend richten sich die aktuellen immunsuppressiven Standardtherapien zur Abstoßungsprävention insbesondere gegen T-Lymphozyten bzw. deren Zytokine (33).

Man differenziert hierbei zwischen Erhaltungstherapie, Induktions- und Abstoßungstherapie. In den ersten Wochen nach Transplantation ist die Bedrohung durch eine Abstoßungsreaktion besonders hoch, daher umfasst die initiale Induktionstherapie zumeist eine hochdosierte Vierfachtherapie mit Glukokortikoiden, einem nicht-depletierenden Interleukin-2-Rezeptor-Antagonisten (Basiliximab) oder depletierenden Antikörpern (z.B. Antithymozytenglobulin), einem Calcineurininhibitor sowie einer antiproliferativen Substanz Mycophenolat (-Mofetil) (29, 60).

In den letzten Jahren wurde noch ein weiteres Medikament, welches über das Konzept der „Ko-stimulationsblockade“ wirkt für die Induktionstherapie zugelassen: Belatacept unterbindet die T-Zellaktivierung über die Hemmung von CD 80 und CD 86 auf antigenpräsentierenden Zellen und ist Ciclosporin A in der Induktion bei Transplantierten mit Standardrisiko hinsichtlich der erreichten Nierenfunktion – auch im Langzeitverlauf – überlegen (61–64).

Nach dieser initialen Phase wird auf eine Erhaltungstherapie umgestellt, welche zumeist die gleichen Substanzklassen umfasst, jedoch in reduzierter Dosis und mit geringeren Zieltalspiegeln als während der Induktionsphase. Dies hilft dabei, die toxische Wirkung der einzelnen Medikamente zu minimieren ohne jedoch den erwünschten Abstoßungsschutz zu verlieren (31). Außerdem werden die Substanzkombinationen auch nach individuellem Patientenrisiko, z.B. der Entwicklung eines Diabetes mellitus (NODAT) oder Malignomen angepasst (29).

Ein mögliches Schema für die Erhaltungstherapie besteht somit aus Tacrolimus (Tac) (ggf. auch in retardierter Form; dies führt zu stabileren Wirkspiegeln und besserer Patientenadhärenz (65)) Mycophenolat-Mofetil und Steroiden. Diese Kombination erhielten auch die in diese Studie eingeschlossenen Patienten.

Tacrolimus als Calcineurininhibitor, genauso wie die ältere Substanz Ciclosporin A (CsA) verhindert über seinen Wirkmechanismus in erster Linie die IL-2-abhängige T-Zellaktivierung (66, 67). Diese Innovation steigerte die Einjahresüberlebensrate der Organe maßgeblich (68, 69), da diese vorrangig durch das Auftreten von akuter Abstoßung limitiert wird. Allerdings haben Calcineurininhibitoren ungünstige Nebenwirkungen, auf die unter 1.4.2 näher eingegangen wird. Darüber hinaus konnte die Inzidenz der frühen AR durch die Einführung der antilymphozytären Substanz Mycophenolat-Mofetil noch weiter gesenkt werden (70). Als einziger monoklonaler Antikörper in der Erhaltungstherapie von de-novo transplantierten Patienten ist bisher Belatacept (in der Kombination mit MMF und Kortikoiden) zugelassen (64).

Die letzte Substanzklasse im immunsuppressiven Regime sind Glukokortikoide. Sie sind seit Beginn des Transplantationszeitalters bis heute Basis der Therapie (31). Sie beeinflussen sehr erfolgreich die T-Zellfunktion durch u.a. Induktion von Apoptose, Inhibition von Wachstumsfaktoren v.a. Interleukin-1 und -6 und kurzfristige Reduktion zirkulierender Lymphozyten (71–73). B-Zellen werden weniger beeinflusst (74). Steroide sind unentbehrlich in der Therapie der akuten Rejektion sowie, bei erhöhtem immunologischem Risiko des Patienten, auch in der Erhaltungstherapie. Außerdem konnte durch Beibehaltung der Steroid-Therapie eine Rekurrenz bestimmter Erkrankungen im Transplantat, wie z.B. der IgA-Nephropathie nachhaltig reduziert werden (75).

Im Falle einer akuten zellulären Abstoßung wird zunächst eine Steroidstoßtherapie eingeleitet.

Sollte eine Steroidresistenz eintreten, muss bei zellulärer Abstoßung die Therapie z.B. durch Lymphozyten-depletierende Wirkstoffe eskaliert werden. Zur Verfügung steht hierfür zum Einen das polyklonale Antithymozytenglobulin oder Murynomab-CD3 (OKT3).

Bei bioptisch gesicherter Antikörper-induzierter Abstoßung ist die T-Zelle als Angriffspunkt nicht zielführend. Um B- bzw. Plasmazellen und freie Antikörper zu inhibieren, werden verschiedene Therapieverfahren oder die Kombination derer empfohlen. Hierzu zählen zum Einen Verfahren der Antikörperelimination (Plasmaaustausch, Immunabsorption), aber auch der Versuch der Inhibition der Antikörperneubildung, u.a. mittels intravenösem IgG, Rituximab oder Bortezomib (Proteasom-Hemmung) (29).

1.3 FORMEN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG UND BANFF-KLASSIFIKATION

Die Gemeinsamkeit der verschiedenen Formen einer Abstoßung ist das Erkennen des Nierentransplantats als „fremd“. Dieser Prozess erfordert Komponenten des systemischen wie auch des lokalen Immunsystems, was u.a. T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Zytokinausschüttung einschließt, eine lokale Entzündungsreaktion etabliert und letzten Endes zur Verschlechterung der Nierenfunktion und Nekrose des transplantierten Gewebes führen kann.

Rejektionen wurden lange Zeit in hyperakut, akut und chronisch anhand von vorwiegend klinischen Kriterien unterteilt (76, 77). Mit der Einführung der „Banff-Klassifikation“ wurde der Schwerpunkt eher auf ätiologische und histopathologische Unterscheidungsmerkmale gelegt, daher werden die Abstoßungsreaktionen im Folgenden anhand ihrer Pathophysiologie in „humoral“ und „zellvermittelt“ dargestellt. Die Banff-Klassifikation ist die international gültige Einteilung der Pathologien eines Nierenallografts (siehe 7.3 im Anhang).

1.3.1. ZELLULÄRE ABSTOßUNG

Die akute Rejektion stellt die häufigste Komplikation im ersten Jahr nach Transplantation dar (32, 33). Sie tritt zwar typischerweise innerhalb der ersten Tage bis drei Monate nach Transplantation auf, jedoch kann es seltener auch zu einer sogenannten late acute rejection (> 6 Monate) kommen. Diese ist mit einer besonders schlechten Prognose verknüpft und gilt als Risikofaktor für den chronischen Funktionsverlust der Niere (78, 79). Gründe für einen späten Eintritt von AR sind vor allem suboptimale Immunsuppression entweder durch Non-

Compliance des Patienten oder durch eine ärztliche Dosisreduktion, z.B. bei schweren systemischen Infekten oder Unverträglichkeiten (30) (siehe auch Abb. 15).

Histomorphologisch zeichnet sich die akute zelluläre Abstoßung in der Banff-Klassifikation durch die beiden Kriterien Tubulitis und Arteriitis aus. Anhand des Schweregrades der Läsionen unterscheidet man Grad I-III. Grad I meint eine isolierte Tubulitis, Grad III hingegen eine transmurale Arteriitis mit Nekrosen. Die Begriffe „interstitielle (Grad I) bzw. vaskuläre (Grad III)“ Abstoßung sind rein morphologische Bezeichnungen, die zunächst nichts über die genaue Ätiologie aussagen.

In der Mehrzahl der Fälle eines akuten Funktionsverlusts des Transplantats handelt es sich um eine zellvermittelte Immunreaktion, welche zumeist über den direkten Weg der T-Zellaktivierung (siehe Abb.7) verläuft (56). Man spricht von akuter zellulärer Abstoßung bzw. TCMR (T Cell-Mediated Rejection).

T-Lymphozyten sind als Auslöser seit Langem bekannt; sie sind auch Zielstruktur der etablierten immunsuppressiven Therapeutika. Immer klarer wird jedoch auch die Rolle anderer Zelltypen wie beispielsweise von Makrophagen und B-Lymphozyten (80).

Neben der akuten zellvermittelten Abstoßung wird seit der Revision 2005 der Banff-Klassifikation auch der chronisch aktive Verlauf der TCMR erfasst (siehe 1.4.1 „*Chronische Transplantatschädigung – Begriffserklärung*“). Das Hauptmerkmal in der Biopsie ist eine chronische Transplantat-Arteriopathie, was einer arteriellen Intimafibrose mit mononukleärem Zellinfiltrat und Bildung von Neointima entspricht (81).

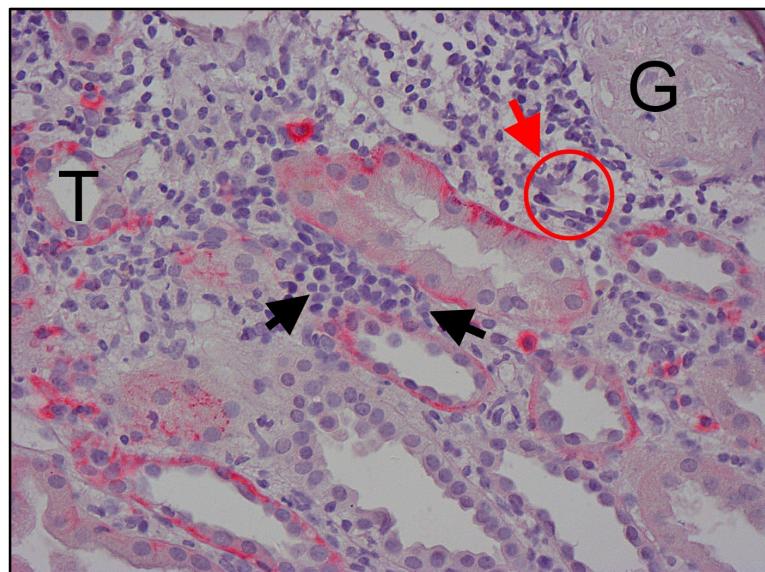


Abbildung 8 Banff 4 I
Akute zellvermittelte Abstoßung mit tubulointerstitiellem Muster (40x).
G = Glomerulum, T = Tubulus.
Interstitielle Infiltration durch mononukleäre Zellen (►), Tubulitis (○).

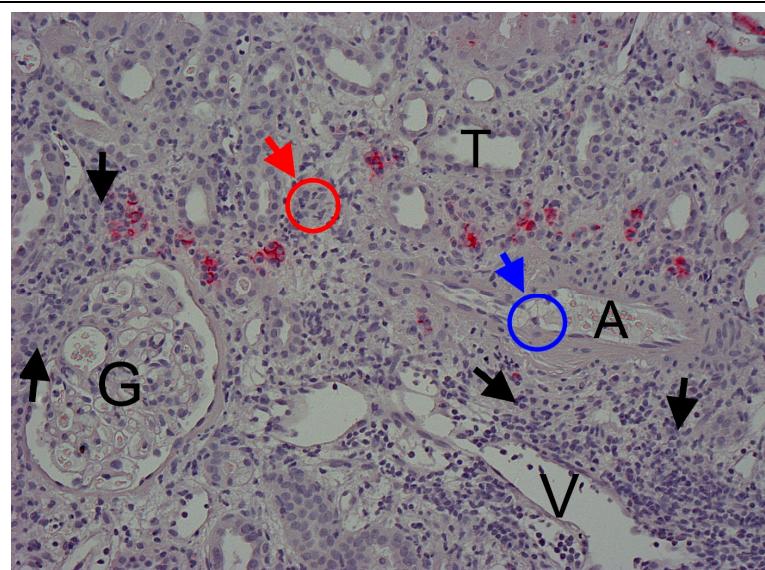


Abbildung 9 Banff 4 II
Akute zellvermittelte Abstoßung mit tubulovaskulärem Muster (20x).
G = Glomerulum, T = Tubulus,
A = Arterie, V = Vene.
Interstitielle Infiltration durch mononukleäre Zellen (►), Tubulitis (○), Endothelialitis (○).

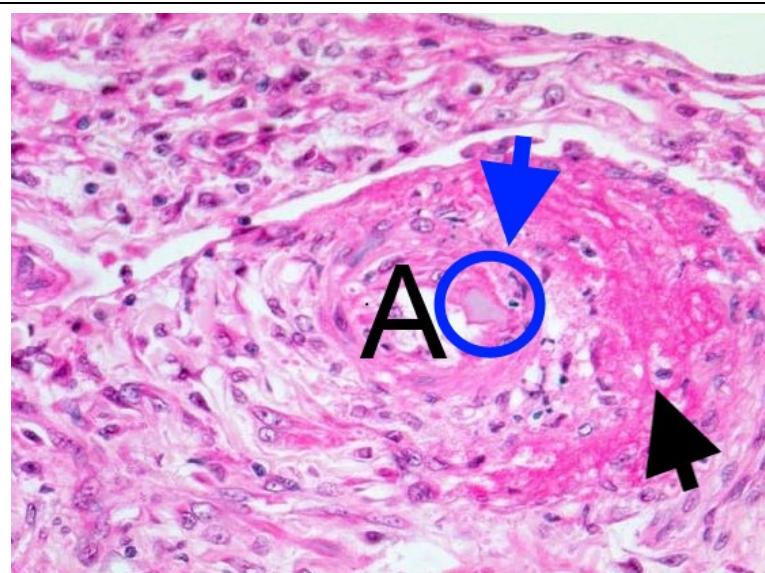


Abbildung 10 Banff 4 III
Akute zellvermittelte Abstoßung mit vaskulärem Muster +/- Nekrose (© PathoPic, 40x).
A = Arterie.
Fibrinoide Medianekrose (►), hyalines Ödem der Intima (○).

1.3.2. HUMORALE ABSTOßUNG

Man unterscheidet drei verschiedene Antikörper-vermittelte Pathologien am renalen Transplantat:

Die hyperakute Abstoßungsreaktion tritt innerhalb der ersten 24 Stunden, meist jedoch schon wenige Minuten nach Öffnung der Gefäßklemmen intraoperativ auf. Es handelt sich hierbei um eine humorale Immunreaktion durch präformierte, d.h. bereits zum Zeitpunkt der Transplantation vorhandene, zytotoxische Antikörper gegen das Transplantat. Diese wurden im Rahmen von vorher stattgehabten Schwangerschaften, Transfusionen oder Transplantationen gebildet. Histologisch zeigen sich fibrinoide Nekrosen der Gefäßwände, Fibrin- und Plättchenthromben sowie eingewanderte neutrophile Granulozyten. Hyperakute Rejektionen führen aufgrund ihrer fast vollständigen Therapieresistenz meist zu einem irreversiblen Transplantatverlust. Durch die moderne HLA-Typisierung und HLA-Antikörper-Diagnostik (siehe 1.2.2 „*HLA-Typisierung und Crossmatch*“) sind hyperakute Abstoßungsreaktionen heute selten geworden (77).

Die akute humorale Abstoßung (Antibody-Mediated Rejection; ABMR) tritt zumeist innerhalb der ersten Wochen nach Transplantation auf. Die Patienten präsentieren sich klinisch mit einem besonders schweren, akuten Funktionsverlust des Organs. Ob es sich letztendlich um eine humorale oder zelluläre Genese handelt, kann allerdings nur biotisch sicher unterschieden werden (82). Lichtmikroskopisch zeigt sich ein relativ variables Bild, jedoch sind neutrophile Granulozyten glomerulär oder in peritubulären Kapillaren (PTC), Mikrothrombosen, fibrinoide Nekrose und Arteritis ein guter Hinweis auf ein Antikörper-vermitteltes Geschehen (83). Feucht HE et al beobachteten 1993 erstmals, dass eine Ablagerung des Komplementfaktors C4d an peritubulären Kapillaren mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist (84). Es gelang im Verlauf den Zusammenhang zwischen C4d und im Serum zirkulierenden Donor-spezifischen Antikörpern (DSA) herzustellen (82). Der Nachweis von DSA und C4d gehört seit dem Banff'97 Update zu den Diagnosekriterien der akuten humoralen Abstoßung (85). Seit der aktuellsten Revision 2013 der Klassifikation werden auch C4d-negative ABMR anerkannt (86).

Die diagnostische Differenzierung der humoralen Rejektion ist zum Einen prognostisch zum Anderen therapeutisch von hoher Relevanz: Da die herkömmliche Abstoßungstherapie hier unwirksam ist, empfiehlt die aktuelle Leitlinie im Falle einer akuten humoralen Abstoßung die Anwendung von Plasmapherese und/oder Therapie mit intravenösen Immunglobulinen, Anti-

CD20-Antikörpern oder Lymphozyten-depletierenden Antikörpern (siehe auch 1.2.4 „*Immun-suppression*“) (29).

Eine ABMR resultiert häufig, vor allem durch verzögerte Diagnosestellung und damit verzögerter Therapieeinleitung, in sofortiger und extensiver Schädigung des Organs und gilt als Initiator von chronischer Transplantatnephropathie (87). Sie nimmt etwa 10% der akuten Rejektionen ein.

In der jüngeren Vergangenheit gewinnt die chronisch aktive humorale Abstoßung zunehmend an Gewicht. Eigentlich wurde bereits 1970 eine Verbindung zwischen DSA und der Entwicklung von chronischen Transplantatschäden hergestellt (88). In Biopsien mit interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie konnte das zusätzliche Auftreten glomerulärer und vaskulärer Veränderungen mit einer humoralen Herkunft in Verbindung gebracht werden. Es bedurfte allerdings noch einiger Jahrzehnte bis die Ablagerung von C4d an peritubulären Kapillaren mit dem Nachweis von DSA, Transplantatglomerulopathie und chronischen Veränderungen verknüpft werden konnten (89). Der Begriff der „chronisch humorale Abstoßung“ floss ab 2005 in die Banff-Klassifikation mit ein (siehe 1.4.1 „*Chronische Transplantatschädigung – Begriffserklärung*“). Lichtmikroskopisch sind die wichtigsten Merkmale die Verdopplung der Basalmembran von Glomerula und PTC sowie eine Intimafibrose der Arterien. Wie schon bei der akuten ABMR sind der Nachweis von zirkulierenden DSA und C4d auch hier diagnostisch relevant (81, 90).

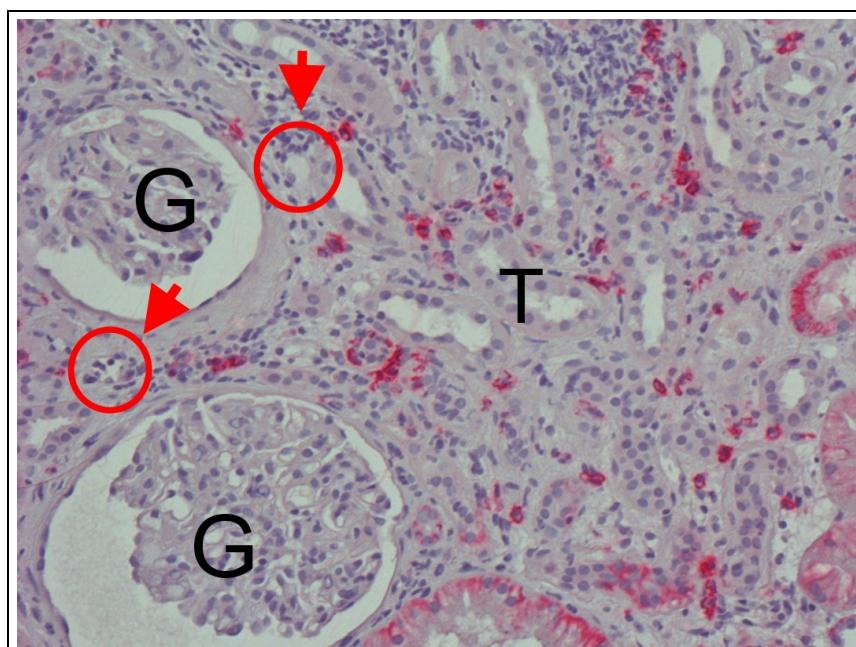


Abbildung 11 Banff 2. Akute Antikörper-vermittelte Abstoßung (20x). G = Glomerulum, T = Tubulus. Peritubuläre Kapillaritis (O). C4d nicht gefärbt.

Zusammenfassung

Sowohl zelluläre als auch humorale Immunität führen klinisch zu Abstoßungsreaktionen und einem möglichen Funktionsverlust des Transplantats. Dennoch unterscheiden sich die beiden Entitäten. Einerseits spielt sich die T-zellvermittelte Abstoßung vornehmlich im Bereich des Tubulus und der Arterien ab, wohingegen die ABMR peritubuläre und glomeruläre Kapillaren schädigt (83). Beide können einen akuten und chronischen Funktionsverlust des Organs verursachen (87).

1.4 CHRONISCHE TRANSPLANTATSCHÄDIGUNG

1.4.1. BEGRIFFSKLÄRUNG

Durch die Verlängerung der Lebensdauer der Organe durch geeignete Immunsuppressiva wurden die chronischen Pathologien am Nierentransplantat zu einem wichtigen Thema. Die Nomenklatur hat sich im Laufe der Zeit jedoch sehr gewandelt.

Vor der ersten Banff-Konferenz wurde in den 90er Jahren der Begriff „chronische Abstoßung“ (chronic rejection; CR) in Abgrenzung zur hyperakuten und akuten Abstoßung verwendet. Unter CR verstand man eine langsam progressive Funktionsminderung der Niere ≥ 3 Monate nach Transplantation. Es war bekannt, dass die zugrundeliegende Pathophysiologie immunologischen aber auch nicht-immunologischen Ursprungs sein kann, genaue histologische Diagnosekriterien fehlten allerdings (90).

Das erste Treffen in Banff 1993 erfüllte diesen Wunsch nach einheitlichen Standards. Dort führte man den Begriff „Chronische Allograft Nephropathie“ (CAN) als Ersatz für CR ein, um ein histopathologisches Korrelat zur klinisch beobachteten, multifaktoriellen chronischen Transplantatdysfunktion zu schaffen. Diese mit Banff 5 nummerierte Diagnose umfasste CR, chronische Calcineurininhibitor (CNI)-Nephrotoxizität, chronisch-hypertensive Veränderungen und chronische Infektion. Die histologischen Merkmale interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IF/TA) sowie Glomerulo- und Vaskulopathie dienten der Schweregradeinteilung (91).

12 Jahre lang galt diese Klassifikation, jedoch führte es in der Praxis zur Annahme, dass es sich bei CAN um eine vermeintlich eigenständige Erkrankung handle, anstatt um einen Sammelbegriff für die gemeinsame Endstrecke verschiedener Schädigungsprozesse am glomerulären, tubulointerstitiellen und vaskulären Kompartiment (90).

Die Reaktion hierauf waren grundlegende Veränderungen der gesamten Klassifikation im Jahr 2005. Trennte die bisherige Einteilung akute von chronischer Abstoßung, so rückte die neue Einteilung die zugrundeliegende Pathophysiologie in den Fokus. Man unterscheidet seither zunächst T-zellvermittelte von Antikörper-vermittelter Abstoßung (TCMR vs. ABMR), und betrachtet dann zusätzlich den akuten oder chronischen Verlauf. Der Begriff „chronische Abstoßung“ ist also nicht mehr der Kategorie Banff 5 untergeordnet sondern meint nur noch rein alloimmune Vorgänge, entweder zellulär oder humoral (Banff 4 bzw. Banff 2). Außerdem wurde die Bezeichnung CAN für die Banff 5-Läsionen gänzlich abgeschafft und durch „chronischen Transplantatschaden“ (chronic allograft injury, CAI) bzw. „interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophe“ (IF/TA) ersetzt und anhand des erfassten Schweregrades der IF/TA (< 25%, 25-50%, > 50%) weiter unterteilt (siehe 7.3 im Anhang).

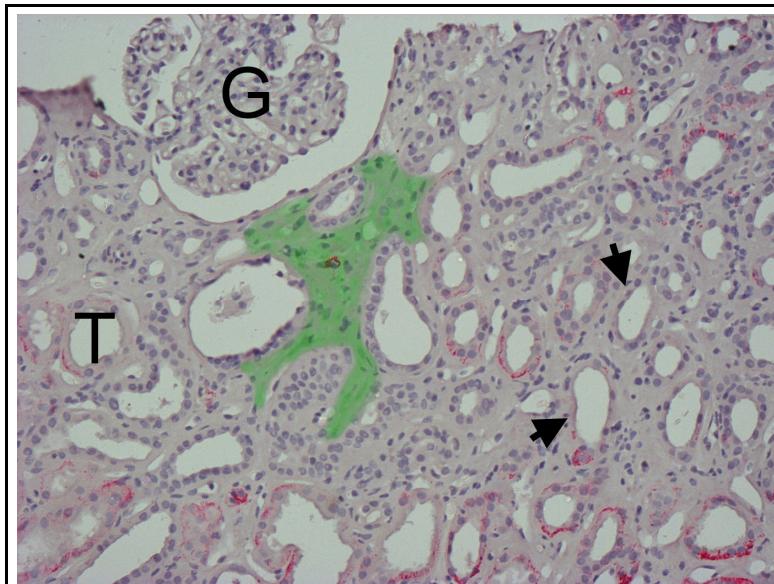


Abbildung 12 Banff 5 (20x)
Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophe
G = Glomerulum,
T = Tubuläre Atrophe (►), interstitielle Fibrose mit erweitertem intertubulärem Raum (grün schraffierte Fläche). Hier keine Glomerulopathie.

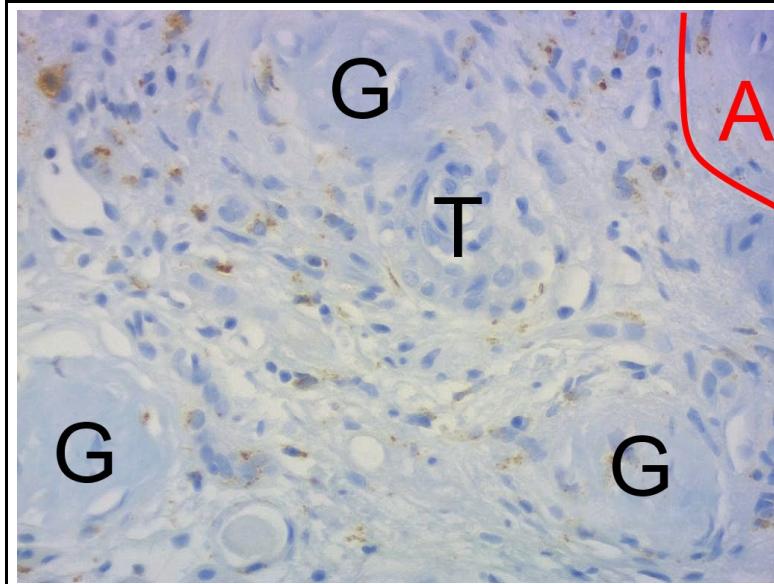


Abbildung 13 Banff 5 (40x)
Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophe
G = Glomerulum, T = Tubulus,
A = Arterie.
Ausgeprägte Fibrose von Glomerula und Gefäßen (Glomerulopathie, Vaskulopathie (A)).
Renale Parenchymarchitektur weitgehend aufgehoben.

Banff 5 sollte als Diagnose von nun an nur noch vergeben werden, wenn der Versuch scheiterte die genaue Ätiologie der chronischen Veränderungen auszumachen (81).

Fassbare nicht-immunologische Gründe, die zu einer chronischen Transplantatdysfunktion führen können sind:

- Chronische CNI-Nephrotoxizität
- Chronische Hypertension
- Virus-Infektion , z.B. BK-Nephropathie , CMV
- Chronische Obstruktion der ableitenden Harnwege
- Akute und chronische bakterielle Pyelonephritis
- Glomerulonephritis / Vaskulitis (rezidivierend oder de-novo)

Sie alle werden unter der Kategorie Banff 6 subsummiert (siehe 7.3 im Anhang).

Dieser Arbeit liegt dennoch die Banff '97 Klassifikation mit dem Update zur humoralen Abstoßung aus dem Jahr 2003 zu Grunde. Dies liegt zum Einen an der besseren Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus der Literatur, da diese Klassifikation dort als Standard gilt. Des Weiteren berücksichtigen die Kriterien von 1997 bereits die Unterscheidung zwischen zellulärer und humoraler akuter Abstoßung, auch die Kategorie Banff 5 umfasste schon damals nicht-immunologische und immunologische Faktoren. In den Folgejahren kam es, wie oben erläutert, hauptsächlich zu Veränderung der Nomenklatur, nicht aber der histologischen Kriterien. Die seit 2005 geltende Differenzierung in eine klar immunologische TCMR bzw. ABMR bereitet in der Praxis durchaus Schwierigkeiten.

1.4.2. EINFLUSSFAKTOREN

Die Genese chronischer Transplantatschädigung ist multifaktoriell; es können ganz allgemein gesprochen einerseits Alloantigen-abhängige, andererseits -unabhängige Ursachen zu IF/TA und dem konsekutiven Funktionsverlust des Organs führen (77). Die Ergebnisse von Nankivell et al. untergliedern den CAI noch weiter. Er wies zwei verschiedene Schadensphasen in unterschiedlichen histologischen Kompartimenten nach. Ein früher Schaden nach Transplantation findet sich demnach am ehesten tubulointerstitiell und ist immunologischen Vorgängen (schwere akute Abstoßung und persistierende subklinische Abstoßung) zuzuschreiben. Spätere Schäden werden durch fortschreitende hyaline Veränderungen der kleinen Arterien und Arteriolen, (ischämische) Glomerulosklerose und fortschreitende interstitielle Fibrose beschrieben (92).

Die wichtigsten Einflussfaktoren, die zur Entwicklung einer interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie führen können zeigt Abbildung 15.

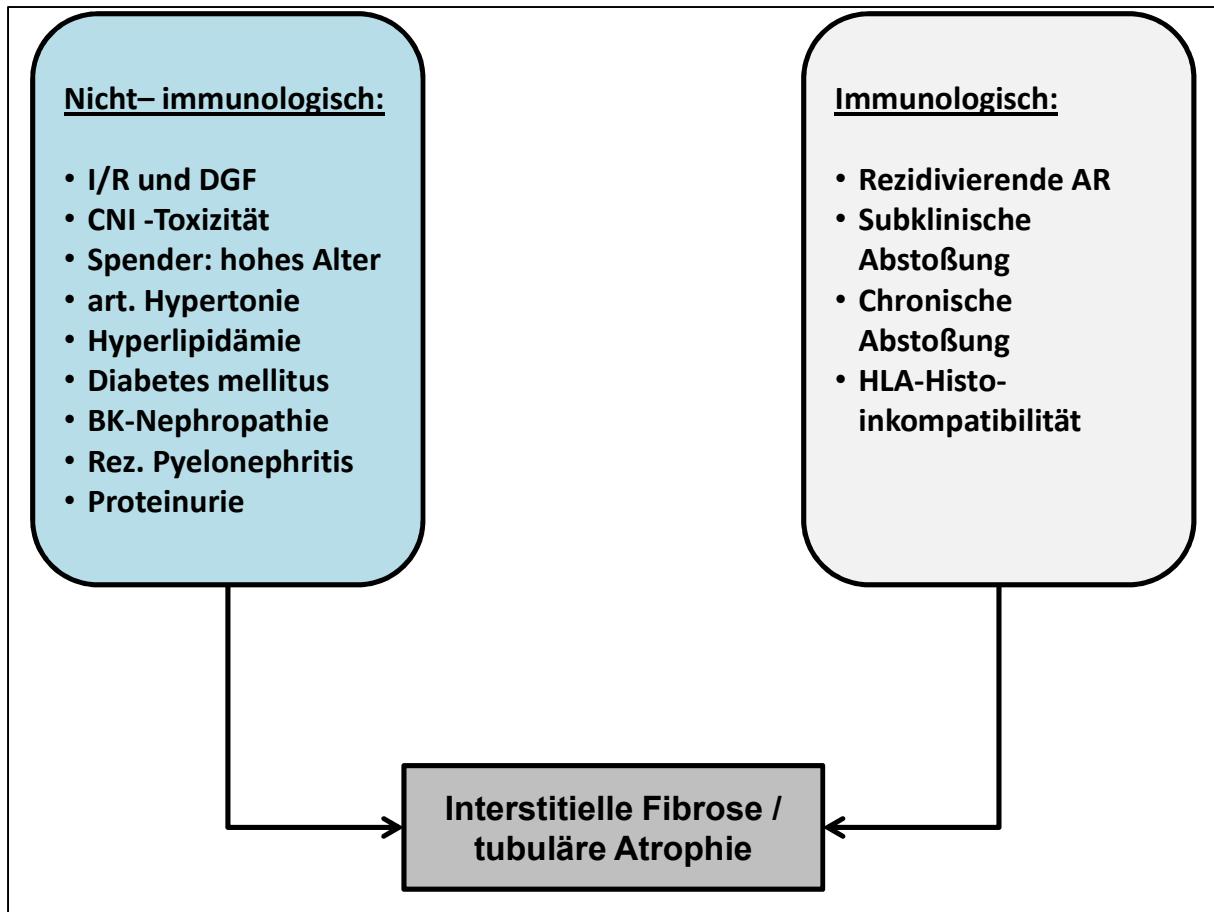


Abbildung 14 Immunologische und nicht-immunologische Einflussfaktoren führen zu IF/TA (nach (30, 77))

Die immunologischen Ursachen wurden bereits unter 1.3 „*Formen der Transplantatabstoßung und Banff-Klassifikation*“ besprochen. Im Folgenden gehe ich näher auf die nicht-immunologischen Faktoren ein.

Nicht-immunologische Einflussfaktoren

Wichtige nicht-immunologische Faktoren, die ein erhöhtes Risiko für chronische Schäden nach sich ziehen sind vielfach erforscht: u.a Ischämie/Reperfusion (I/R), Hirntod des Spenders, ver-spätete Transplantatfunktion (delayed graft function; DGF), hohes Spenderalter, junges Empfängeralter (79, 93–95) sowie Hypertension und Hyperlipidämie des Empfängers (96, 97) und Calcineurininhibitor-Toxizität (98). Auf einige möchte ich näher eingehen:

Ischämie-Reperfusionsschaden

Bei der Organentnahme und -übertragung kommt es zur temporären Trennung des Transplantats von seiner Blutversorgung. Diese Zeitspanne wird als Ischämiezeit bezeichnet. Zunächst wird eine erste warme Ischämiezeit durch das Abklemmen der Aorta eingeleitet. Mit der Lagerung des Organs in gekühlter Flüssigkeit beginnt danach die kalte Ischämiezeit, die für den Transport zum Empfänger benötigt wird. Die zweite warme Ischämiezeit beginnt während der Operationsvorbereitung, sobald die Niere wieder ungekühlt ist und endet mit der Anastomosenöffnung und Reperfusion des Organs (33).

Während das Nierentransplantat nicht durchblutet wird, entsteht ein Mangel an ATP und eine Gewebsazidose. Energieabhängige Transportprozesse, wie z.B. durch die Na^+/K^+ -ATPase fehlen, es kommt zu einem Einstrom von Wasser in die Endothelzellen und zu einer Viskositäts erhöhung des Blutes. Die pH-Senkung führt außerdem zu verminderter Zellverformbarkeit der Leukozyten, was zu zusätzlicher Stase in den Mikrokapillaren führt (18). Aufgrund der beschriebenen Zellschwellung, eingeschränkter Kapillardurchblutung und mikrovaskulärer Thrombose kommt es zu einem Perfusionsausfall, der auch nach Beginn der Reperfusionsphase weiter besteht und zu einer Aggravierung des Ischämieschadens führt

(„no reflow“-Phänomen) (99). Beim Zusammentreffen der ischämischen Metabolite mit dem erneuten Sauerstoffangebot entstehen vermehrt Sauerstoffradikale, die zu toxischer Gewebs schädigung führen. Diese zunächst nicht-immunologischen Vorgänge setzen dann indirekt immunologische Prozesse in Gang. Es kommt zu Leukozytenaktivierung und zur nachfolgenden Freisetzung von Chemo- und Zytokinen, die insgesamt eine akute Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Kapillarpermeabilität (capillary leak) und konsekutivem interstitiellem Ödem hervorrufen. Diese Verschlimmerung der gewebsschädigenden Vorgänge anstatt einer Verbesserung durch die Reperfusion wird als „Reflow-Paradox“ bezeichnet (18). Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung einer chronischen Inflammation, die die Entwicklung eines chronischen Transplantatschadens mit Dysfunktion oder gar kompletten Graftverlust zur Folge haben kann (100).

Der Ischämie-Reperfusionsschadens ist eng mit einem weiteren Problem der frühen Transplantationsnachsorge verknüpft: der „verzögerten Funktionsaufnahme des Transplantats“ (delayed graft function; DGF). Das Risiko für DGF steigt mit der Dauer der kalten Ischämiezeit (101).

Delayed graft function

Der Begriff DGF wird uneinheitlich definiert. Eine der gängigsten Definitionen in der Literatur ist „die Notwendigkeit einer Dialysetherapie innerhalb der ersten Woche nach Transplantation“ (102, 103). Der klinische Aspekt reicht von einem verzögerten Serumkreatininabfall und Diuresebeginn bis hin zur passageren Anurie (104).

Der verzögerte Funktionseintritt ist ein sehr häufiges Problem und betrifft, je nach Definition, 20-50% aller postmortalen Spenden (102). Tritt eine DGF ein, so bedeutet dies automatisch ein erhöhtes Risiko für eine akute Transplantatabstoßung (94, 105). Außerdem sind DGF und eine lange kalte Ischämiezeit wichtige Prädiktoren für ein schlechteres Transplantatüberleben; das Risiko für einen vorzeitigen Transplantatverlust ist erhöht (103, 106).

Aufgrund der hohen Prävalenz und den prognoselimitierenden Effekten einer DGF ist die Prävention von höchster klinischer Relevanz.

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer DGF sind (107):

- Lange kalte Ischämiezeit
- Erhöhtes Spenderalter
- Spender : Serumkreatinin
- Empfänger : Body Mass Index
- Induktionstherapie ohne Antithymozytenglobulin

Calcineurininhibitor-Nephropathie

Wie bereits unter 1.2.4 „*Immunsuppression*“ erläutert sind CNIs eine maßgebliche therapeutische Säule zur Verhinderung der akuten T-zellvermittelten Abstoßung und führen damit zu einer deutlichen Steigerung der Einjahresüberlebensrate der Organe (68, 69).

Allerdings ist die führende Nebenwirkung einer Langzeittherapie mit CNIs, vor allem unter den historisch verwendeten sehr hohen Serumwirkspiegeln, die Nephrotoxizität. Neben dieser ist auch das Auftreten eines Posttransplantations-Diabetes mellitus (NODAT), insbesondere unter Tacrolimus, mit einem schlechteren Transplantatüberleben und einer erhöhten Mortalität assoziiert (108). Auch die Induktion von arterieller Hypertonie, Hyperurikämie und Hyperlipidämie verschlechtern das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten weiter und wirken sich somit indirekt negativ auf die Transplantatfunktion aus (109). Darüber hinaus sind kardiovaskuläre Ereignisse die häufigste Ursache für den Tod mit funktionierendem Transplantat (2, 110, 111).

Es gibt zwei Arten der CNI-Nephropathie. Die akute Form präsentiert sich als reversibles, akutes Nierenversagen, das durch eine renale Vasokonstruktion aufgrund eines Missverhältnisses

vasoaktiver Substanzen bedingt wird und abhängig vom Wirkspiegel auftritt. Eine seltene aber sehr schwere akute Schädigung ist die Entwicklung einer thrombotischen Mikroangiopathie bzw. eines hämolytisch-urämischen Syndroms (112). Eine Verengung der kleinen Gefäße ist auch Komponente der chronischen Form, jedoch entwickeln sich darüber hinaus irreversible strukturelle Schäden. Histologisch lassen sich zunehmend Hyalinose der Arteriolen, IF/TA und fortschreitende ischämische Glomerulosklerose feststellen (92, 98, 113). Daher muss der Wirkspiegel im Rahmen eines Drugmonitoring regelmäßig kontrolliert werden.

2003 stellte eine Langzeitstudie von Nankivell et al die Hypothese auf, dass CNIs wegen dieser chronischen Schäden Grund für die weiterhin eingeschränkte Langzeitprognose der Transplantate sein könnten. Es konnte in dieser Untersuchung nachgewiesen werden, dass fast 100% der mit CsA oder Tac behandelten Patienten nach 10 Jahren typische histologische Zeichen einer chronischen CNI-Nephropathie aufweisen (92).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden eine Vielzahl von Studien (114–116) durchgeführt, in denen die Auswirkung einer Reduktion der CNI-Erhaltungstherapie oder der Ersatz durch andere Substanzklassen untersucht wurden. Abgesehen von wenigen Studien, die in den ersten Monaten nach Transplantation einen Austausch des CNI durch einen mTOR-Inhibitor untersuchten, konnte kein positiver Effekt auf die Transplantatfunktion gezeigt werden. In jenen Studien konnten die Erfolge jedoch nur bei einer kleinen Patientenzahl mit niedrigem immunologischen Gesamtrisiko und guter Ausgangs-GFR gezeigt werden, außerdem war der Beobachtungszeitraum mit maximal drei Jahren zu kurz, um Aussagen über das Transplantatüberleben machen zu können (114, 115). Des Weiteren war die Medikamentencompliance der Patienten aufgrund der erhöhten Nebenwirkungsrate des mTOR-Inhibitor schlechter und es fanden sich z.T. hohe Abbruchraten (117, 118).

Darüber hinaus fanden Stegall et al in Protokollbiopsien, welche 5 Jahre nach Nierentransplantation entnommen wurden, dass die Prävalenz von moderater oder schwerer „arteriolärer Hyalinose“ als bis dahin typisches histologisches Merkmal der CNI-Toxizität in 2/3 aller Patienten völlig unabhängig davon war, ob die Patienten eine CNI-basierte Immunsuppression erhielten oder über Jahre CNI-frei (z.B. mTORi-Regime) behandelt wurden (119).

Nicht zuletzt ausschlaggebend für einen Wandel in der Bewertung der Therapie mit Calcineurinhibitoren war schließlich die großangelegte Langzeit-Beobachtungsstudie DeKAF 2010 (Deterioration of Kidney Allograft Function). Hier wurden Nierenbiopsien von Patienten mit neu aufgetretener Transplantatdysfunktion vor allem im Hinblick auf Zeichen der immer mehr in den Fokus rückenden Antikörper-vermittelten Abstoßung untersucht. 57 % aller Biopsien zeigten die typischen Merkmale der ABMR. Der alleinige histologische Nachweis „typischer“

CNI-Toxizität ohne Nachweis von DSA oder Cd4 hingegen, wies von allen die beste Prognose und am seltensten einen späteren Transplantatverlust auf (120).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse gilt es als wahrscheinlich, dass die chronische Nephrotoxizität von CsA und Tac einen aber nicht den zentralen negativen Einflussfaktor für den Langzeitverlauf einer transplantierten Niere darstellt. Man geht davon aus, dass viele Fälle der früher angenommenen CNI-Toxizität in Wahrheit eine unerkannte chronische humorale Abstoßung waren (118, 120).

1.5 GRÜNDE FÜR TRANSPLANTATVERLUST

Gondos et al. demonstrierten erst 2013, dass in Europa ein Transplantatüberleben im ersten Jahr von etwa 90 % erreicht wird. Nach 5 Jahren sind es noch 77 %. Diesen sehr guten Zahlen zum Trotz sind die Hauptgründe für Transplantatverlust der „Tod mit funktionierendem Organ“ und die „chronische Transplantatnephropathie“. Diese Ereignisse betreffen vornehmlich den Langzeitverlauf, womit sich die schlechte 10-Jahres-Transplantatüberlebensrate von nur mehr 56 % erklären lässt (121).

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse nach Zoghby et al aus dem Jahr 2009 auf. In einer Langzeitstudie wurde der Verlauf von 1317 nierentransplantierten Patienten verfolgt und die Gründe für einen Transplantatverlust in 330 Fällen erforscht (30).

Etwa 30 % der Fälle des Transplantatversagens gingen auf den gerade besprochenen chronischen Transplantatschaden mit interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie zurück. Allerdings führten auch rezidivierende oder de-novo Glomerulonephritiden mit fast 40 % zum Funktionsverlust des Organs. Andere Begleiterkrankungen, wie eine bakterielle Pyelonephritis, die häufig durch EBV-Infektion ausgelöste Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder (PTLD) oder Sepsis mit Hypotension traten vornehmlich im ersten Jahr nach Transplantation auf und sind zum Großteil als Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie zu werten. Auch die akuten Rejektionen waren eine Problematik der Frühphase; im späteren Verlauf sind sie zumeist auf unzureichende Immunsuppression zurückzuführen.

Allerdings nimmt der Tod mit funktionierendem Transplantat ebenfalls fast die Hälfte aller Fälle ein (30, 122). Er trat signifikant häufiger bei Patienten nach einer postmortalen Spende ein als bei Patienten, die eine Lebendspende erhielten. Mit Abstand am häufigsten waren kardiovaskuläre Erkrankungen dafür verantwortlich. Dieses Ergebnis wird mehrfach in der Literatur bestätigt (110, 111). Zwar nimmt die Häufigkeit gegenüber Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nach Transplantation ab, dennoch bleibt das Risiko gegenüber der

Normalbevölkerung deutlich erhöht.

Andere Gründe für den Tod mit funktionierendem Transplantat sind Infektionen und die Entwicklung maligner Erkrankungen.

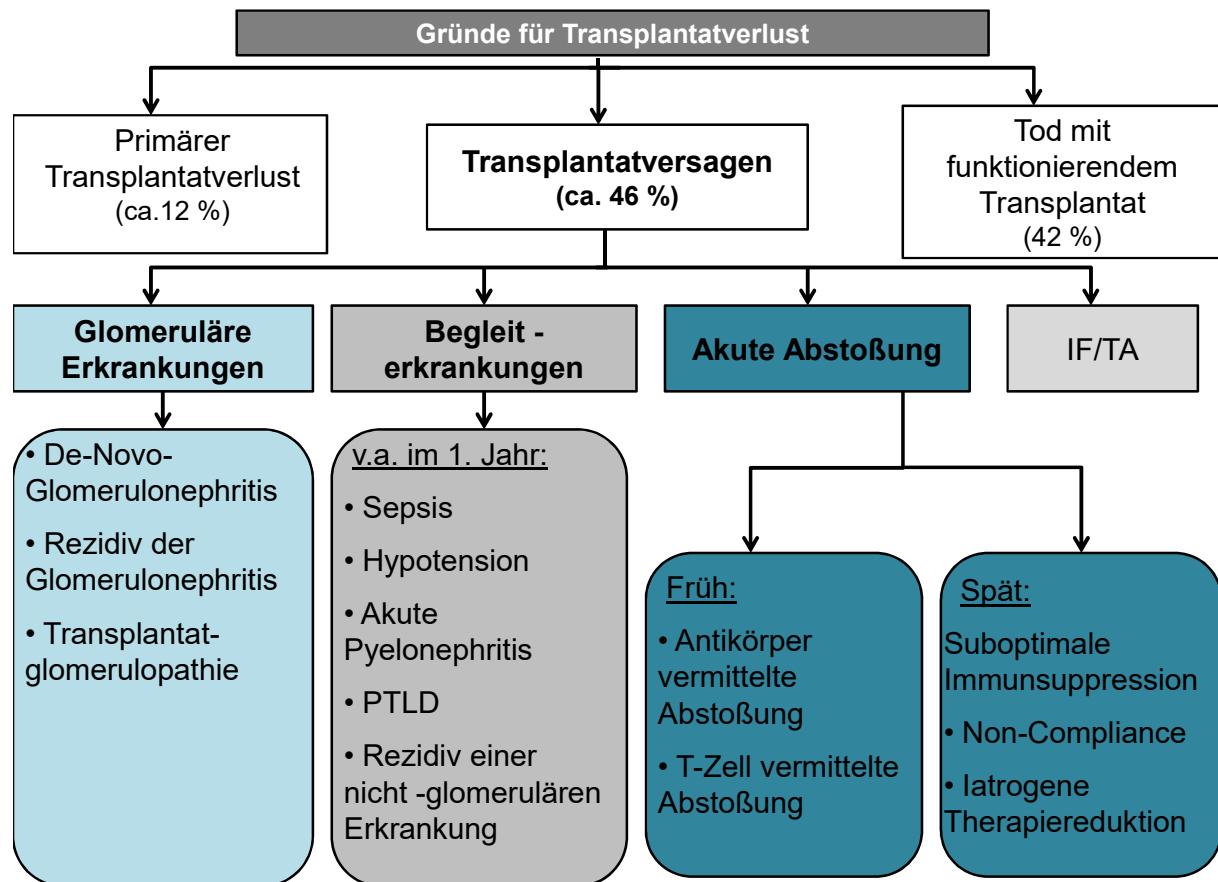


Abbildung 15 Gründe für Transplantatverlust nach (30, 31). PTLD = Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder

1.6 FRAGESTELLUNG

Wie unter 1.4 „*Chronische Transplantatschädigung*“ dargestellt, vollzog sich in den letzten Jahren ein Wandel bezüglich der Nomenklatur der Banff-Kriterien. Dennoch blieben große Errungenschaften, was die Klärung der Pathogenese der IF/TA-Läsionen betrifft, bislang aus. Das größte Problemfeld der gegenwärtigen Transplantationsmedizin ist die schlechte Langzeitprognose der Transplantate. Um hier eine Verbesserung zu erreichen, ist es zwingend notwendig zwischen den verschiedenen Pathomechanismen des CAI zu unterscheiden. Nur so kann eine behandelbare Diagnose gelingen (81).

In der Banff'07 Klassifikation wird auf die Erkenntnisse aus der Studie von Michael Mengel hingewiesen (123). Demnach sind entzündliche zelluläre Infiltrate in Biopsien negative prognostische Indikatoren für die Langzeittransplantatfunktion (124). Außerdem sind sie zusammen mit dem Nachweis von IF/TA mit früherem Transplantatverlust assoziiert (125). Der Einwanderung von Entzündungszellen in das Transplantat wird also große Bedeutung beigemessen.

Die vorliegende Arbeit ermöglicht erstmals eine nähere Betrachtung dieser infiltrierenden Zellen und deren Entwicklung im zeitlichen Verlauf. Zielvorstellung war es die vermeintlich homogene Diagnose „Banff 5“ näher aufzugliedern.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ÜBERSICHT VERWENDETER MATERIALIEN UND GERÄTE

Gerät	Hersteller
Schlittenmicrotom Slide 4003 E	pfm medical, Köln, Deutschland
Decloaking Chamber Plus	Biocare Medical, Concord, USA
Axio Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 1 Liste verwendeter Geräte

Software	Hersteller
HistoQuest 3.0	TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich
Axiovision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
SPSS Statistics 21	IBM, Chicago, USA
Office Excel 2007	Microsoft, USA

Tabelle 2 Liste verwendeter Software

Kits	Hersteller
ABC-AP Vectastain® AK-5000	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Permanent AP-Red Kit	Zytomed Systems inc, Berlin, Deutschland
Lösungen	
Ag-Unmasking-Solution	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Aqua-dest aus Milipore Anlage	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3 Liste verwendeter Kits und Lösungen

2.2 GEWEBEPROBEN/ PATIENTEN

In der Uniklinik Regensburg werden alle Patienten, die eine Nierentransplantation erhielten im Rahmen der Transplantationsnachsorge nach 2 Wochen und nach 100 Tagen nach Transplantation protokollbiopsiert. Darüber hinaus erfolgt bei jeglichem klinischen Verdacht auf Transplantatverschlechterung ebenfalls eine Biopsieentnahme (Biopsy by cause). Alle Proben

werden nach der Banff-Klassifikation (126) histopathologisch bewertet und zusammen mit den klinischen Daten der Patienten archiviert.

Aus dieser Datenbank wählten wir Patienten mit chronischer Transplantatnephropathie (Banff 5) aus und teilten sie nach nachfolgenden zeitlichen und histopathologischen Kriterien in vier Gruppen ein.

Diese Studie erhielt ein positives Votum der Ethikkommission und alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.2.1. ZEITLICHER VERLAUF

		Tage nach NTx		
Gruppe		≤ 100 Tage	≤ 12 Monate	> 12 Monate
oRjt-f	ohne AR frühe IF/TA	keine Abstoßung <i>Banff 1 oder 6</i>	IF/TA <i>Banff 5</i>	
oRjt-s	ohne AR späte IF/TA	keine Abstoßung <i>Banff 1 oder 6</i>		IF/TA <i>Banff 5</i>
Rjt-f	AR frühe IF/TA	Abstoßung <i>Banff 4I, 4II, 4III oder 2</i>	Lösung der Abstoßung <i>Banff 1</i>	IF/TA <i>Banff 5</i>
Rjt-s	AR späte IF/TA	Abstoßung <i>Banff 4I, 4II, 4III oder 2</i>	Lösung der Abstoßung <i>Banff 1</i>	IF/TA <i>Banff 5</i>

Tabelle 4 Einteilung der Gruppen (vertikal); zeitlicher und histopathologischer Verlauf (horizontal).

In Fraktion oRjt (ohne Abstoßung) wurden jene Patienten eingeteilt, die in den ersten 100 Tagen keine akute zelluläre oder humorale Abstoßung, sondern einen Normalbefund (Banff 1) oder anderweitige Läsionen (Banff 6) aufwiesen. Es entwickelte sich dann eine chronische Transplantatnephropathie (Banff 5), entweder in (oRjt-f) oder nach (oRjt-s) den ersten 12 Monaten nach Transplantation.

Die beiden Gruppen mit Abstoßung (Rjt) definieren sich über die Abfolge:

Zellvermittelte oder humorale Abstoßung (Banff 4I, 4II, 4III oder 2) in den ersten 100 Tagen, zwischenzeitliche Lösung der Abstoßung (Banff 1) und schließlich frühe (Rjt-f) bzw. späte (Rjt-s) chronische Transplantatschädigung (Banff 5).

Der Entnahmezeitpunkt, angegeben in „Tagen nach Nierentransplantation“ (Tage nach NTx) spiegelt diesen klinischen Verlauf wieder:

Gruppe	Banff	Tage nach NTx	p
ohne Abstoßung (oRjt)			
oRjt-f: frühe IF/TA	1vs5	20,5 ± 14,63 vs. 103,91 ± 27,84	< 0,001
oRjt-s: späte IF/TA	1vs5	41,59 ± 38,72 vs. 1141,00 ± 711,75	< 0,001
mit Abstoßung (Rjt)			
Rjt-f: frühe IF/TA	4vs1	27,66 ± 24,08 vs. 53,24 ± 33,88	0,01
	1vs5	53,24 ± 33,88 vs. 138,04 ± 94,19	< 0,001
	4vs5	27,66 ± 24,08 vs. 138,04 ± 94,19	< 0,001
	2vs4	21,13 ± 15,43 vs. 27,66 ± 24,08	0,35
	2vs1	21,13 ± 15,43 vs. 53,24 ± 33,88	0,003
	2vs5	21,13 ± 15,43 vs. 138,04 ± 94,19	< 0,001
Rjt-s: späte IF/TA	4vs1	59,39 ± 131,01 vs. 149,20 ± 224,69	0,26
	1vs5	149,20 ± 224,69 vs. 1464,59 ± 859,41	< 0,001
	4vs5	59,39 ± 131,01 vs. 1464,59 ± 859,41	< 0,001

Tabelle 5 Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Gruppen

ohne Abstoßung (oRjt)	Tage nach NTx		p
	oRjt-f: frühe IF/TA	oRjt-s: späte IF/TA	
Banff 1	20,50 ± 14,63	41,59 ± 38,72	0,07
Banff 5	103,91 ± 27,84	1141,00 ± 711,75	<0,001
mit Abstoßung (Rjt)			
	Rjt-f: frühe IF/TA	Rjt-s: späte IF/TA	
Banff 4	27,66 ± 24,08	59,39 ± 131,01	0,26
Banff 1	53,24 ± 33,88	149,20 ± 224,69	0,21
Banff 5	138,04 ± 94,19	1464,59 ± 859,41	<0,001

Tabelle 6 Vergleich der Zeitpunkte zwischen den Gruppen

Zur Einschätzung des zeitlichen Verlaufs ist es nötig den frühesten und spätesten Zeitpunkt innerhalb und zwischen den Gruppen und Fraktionen zu definieren.

Eintritt IF/TA	Gruppen	Tage nach NTx in Banff 1 (oRjt) und Banff 4 (Rjt)	p
früh vs spät	oRjt-f vs. oRjt-s	20,5 ± 14,63 vs. 41,59 ± 38,72	0,07
	Rjt-f vs. Rjt-s	27,66 ± 24,08 vs. 59,39 ± 131,01	0,26
früh vs früh	oRjt-f vs. Rjt-f	20,5 ± 14,63 vs. 27,66 ± 24,08	0,34
spät vs spät	oRjt-s vs. Rjt-s	41,59 ± 38,72 vs. 59,39 ± 131,01	0,54
früh vs spät	oRjt-f vs. Rjt-s	20,5 ± 14,63 vs. 59,39 ± 131,01	0,18
spät vs früh	oRjt-s vs. Rjt-f	41,59 ± 38,72 vs. 27,66 ± 24,08	0,19

Tabelle 7 Frühester Entnahmzeitpunkt

Eintritt IF/TA	Gruppen	Tage nach NTx in Banff 5	p
früh vs spät	oRjt-f vs. oRjt-s	103,91 ± 27,84 vs. 1141,00 ± 711,75	<0,001
	Rjt-f vs. Rjt-s	138,04 ± 94,19 vs. 1464,59 ± 859,41	<0,001
früh vs früh	oRjt-f vs. Rjt-f	103,91 ± 27,84 vs. 138,04 ± 94,19	0,11
spät vs spät	oRjt-s vs. Rjt-s	1141,00 ± 711,75 vs. 1464,59 ± 859,41	0,27
früh vs spät	oRjt-f vs. Rjt-s	103,91 ± 27,84 vs. 1464,59 ± 859,41	<0,001
früh vs spät	Rjt-f vs. oRjt-s	138,04 ± 94,19 vs. 1141,00 ± 711,75	<0,001

Tabelle 8 Spätester Entnahmzeitpunkt

Wie aus Tabelle 7 und 8 ersichtlich, entsprechen die Entnahmzeitpunkte von Banff 1 in den Gruppen oRjt-f und oRjt-s sowie von Banff 4 in den Gruppen Rjt-f und Rjt-s jeweils dem „frühesten Zeitpunkt“. Sie unterscheiden sich untereinander nicht. Gegenüber allen anderen Banff-Klassen und Zeitpunkten unterscheiden sie sich allerdings.

Banff 5 entspricht definitionsgemäß dem spätesten Entnahmzeitpunkt innerhalb der Gruppen. Die frühen Eintritte der chronischen Transplantatnephropathie in den Gruppen oRjt-f und Rjt-f unterscheiden sich statistisch nicht voneinander. Zu den späten Gruppen oRjt-s und Rjt-s gibt es jeweils einen signifikanten Unterschied.

Es wurden 181 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Biopsien von renalen Allotransplantaten in die Analyse miteinbezogen.

2.2.2. AUSSCHLUSS VON PROBEN

Von den zunächst nach den oben genannten zeitlichen und klinischen Kriterien ausgewählten Biopsien, wurden nicht alle in die Analyse miteinbezogen. Zum Einen wurden alle Proben von Patienten, die in der Historie eine Banff 6-Histologie hatten, ausgeschlossen. Diese Läsionen umfassen nicht-immunologische Entzündungsreaktionen wie z.B. eine Pyelonephritis, welche sowohl die Anzahl positiver Leukozyten als auch die Histopathologie beeinflussen können. Außerdem ließen wir zwei Proben mit einer Mischhistologie aus akuter Abstoßung und IF/TA (Banff 5 + 4I) außen vor (jeweils ein Fall in Gruppe Rjt-f und Rjt-s). In Gruppe Rjt-s lagen nur zwei Biopsien mit akuter humoraler Abstoßung vor. Da diese insgesamt nicht für eine statistische Aussage ausreichten, schlossen wir diese nicht in die statistische Auswertung mit ein. Schließlich war bei drei Proben nicht genug Material vorhanden, um auch eine Färbung mit CD138 durchzuführen, daher wurden hier nur 178 Proben analysiert.

2.3 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Die in Paraffinblöcken fixierten Gewebeproben wurden über Nacht bei -20°C gekühlt und konnten im Anschluss daran auf einer Kühlplatte bei -10°C aushärten.

Mit Hilfe des Schlittenmicrotoms wurden 3µm dicke Schnitte hergestellt, die anschließend im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und bei 37° C über Nacht getrocknet wurden.

2.4 GEWEBEVORBEREITUNG

2.4.1. ENTPARAFFINIERUNG

Um die Schnitte für die weitere Färbung vorzubereiten, wurden diese als ersten Schritt 2x 10min in Xylol entparaffiniert, danach in absteigender Alkoholreihe (2x 5min 100% Ethanol, 2x 5min 96% Ethanol und 1 x 5min 70% Ethanol) rehydriert und abschließend 2x 5min in PBS-Puffer gewaschen.

2.4.2. DEMASKIERUNG

Als Nächstes ist eine Demaskierung der Antigenbindestellen erforderlich.

Die Schnitte wurden hierfür in die Antigen-Retrieval-Lösung gestellt und im Falle von CD20 bei 125° C für 30min autoklaviert (Decloaking Chamber™ Plus; Biocare Medical), die Vorbereitung für CD138 erfolgte in der Mikrowelle bei 630 W für 10min. Nach der Abkühlung folgte ein Waschschritt von 2 x 5min in PBS.

Die Schnitte wurden ab jetzt für alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer gelagert, um eine Austrocknung zu verhindern.

2.5 VERWENDETE ANTIKÖRPER

Zielmolekül	Klon	Verdünnung	Firma
CD20	L26	1:400	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
CD68	KP1	1:600	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
CD3	SP7	1:300	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
CD138	B-A38	1:100	AbD Serotec, Düsseldorf, Germany

Tabelle 9 Primärantikörper

Name	Verdünnung	Firma
Donkey a-mouse-biotin	1:500	Dianova GmbH Hamburg, Germany
Multimer-AK aus Kit Ultraview		Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA

Tabelle 10 Sekundärantikörper

2.6 IMMUNHISTOCHEMIE

Die Methode der Immunhistochemie nutzt das Prinzip der Antigen-Anikörper-Bindung aus, um spezifische Strukturen durch farbliche Markierung sichtbar zu machen.

Die gesuchte Antigenstruktur wird durch den spezifischen, primären Antikörper gebunden. Dessen Fc-Teil dient nun wiederrum als Bindungsstelle für den Sekundärantikörper. Letzterer ist farblich markiert. Diese sogenannte indirekte Methode, bei der der Farbstoff an einem zweiten Antikörper gebunden ist, stellt die Weiterentwicklung zur direkten Methode dar. Hierbei wird nur ein Antikörper benötigt, der sowohl das gesuchte Epitop als auch den Farbstoff bindet.

2.6.1. AVIDIN-BIOTIN-METHODE

Um die Signalintensität der indirekten Methode weiter zu steigern, hat sich die Verstärkung durch den enzymgekoppelten Avidin-Biotin-Complex etabliert. Das aus Hühnereiweiß

stammende tetramere Glykoprotein Avidin hat eine extrem hohe Affinität zu Biotin (Vitamin H) und stellt diesem vier Bindungsstellen zur Verfügung. Nachdem der Primärantikörper das Antigen gebunden hat, wird der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugefügt. Im nächsten Schritt wird Avidin hinzugegeben, welches an das Biotinmolekül kovalent bindet. Die übrigen drei Bindestellen werden mit enzymbeladenen Biotin besetzt. In diesem Fall handelt es sich bei dem Enzym um alkalische Phosphatase. Durch die Zugabe eines Chromogens wird die enzymkatalysierte Farbreaktion ausgelöst, welche durch die Bindung an Avidin gleichermaßen spezifisch wie intensiv ist. Abschließend erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun, um die histologischen Strukturen der Umgebung sichtbar zu machen. Diese Methode kam bei der Färbung von CD20 und CD138 zum Einsatz.

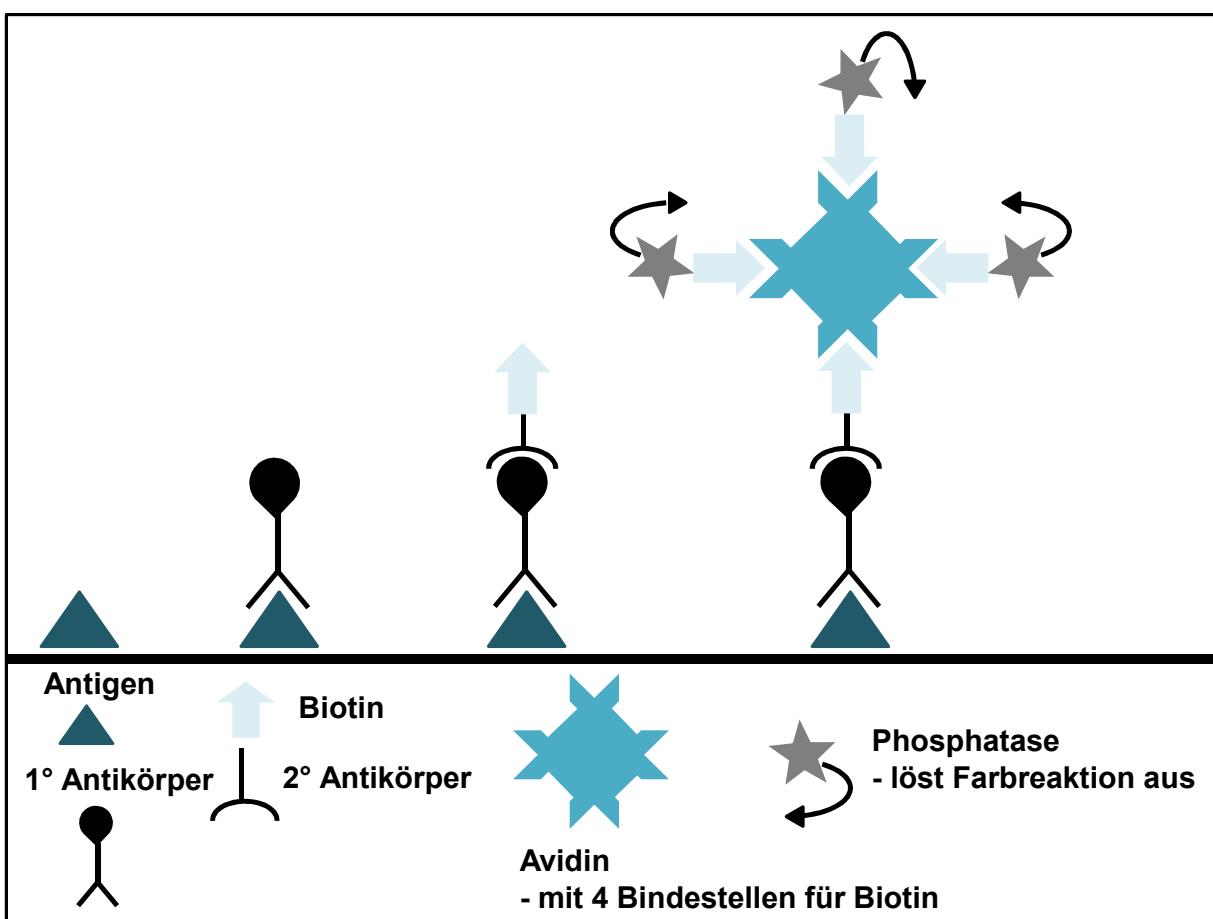


Abbildung 16 Avidin-Biotin-Reaktion Eigene Abbildung nach (127).

2.6.2. MULTIMER-METHODE

Als weitere Verstärkermethode gibt es die Möglichkeit des Einsatzes eines Multimers. Über Verbindungsstücke kommt es pro Sekundärantikörper zur vielfachen Bindung von Farbreaktion-auslösendem Enzym. Die Zugabe des Chromogens führt auch hier zu einem Farbniederschlag, der mikroskopisch auswertbar ist. Der Vorteil liegt im Verzicht auf Biotin, da dieses durch endogenes Biotin zu Hintergrundfärbung führen kann.

Diese Methode wurde bei der Färbung von CD68 und CD3 eingesetzt.

Um eine einwandfreie Funktionsfähigkeit der Antikörper sicherstellen zu können, wurde eine Positiv- wie auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Die Positivkontrolle des Primär-antikörpers wurde an Milz- bzw. Tonsillenpräparaten erstellt. Die Negativkontrolle fand als Test des Gesamtsystems ohne den Primärantikörper statt, somit kann ein unspezifisches Färben an anderen Antigenbindestellen ausgeschlossen werden.

2.6.3. DURCHFÜHRUNG DER FÄRBUNG

Die Präparate werden in der feuchten Kammer je 15 min, unterbrochen von 2x5minütigen Waschschritten mit PBS, mit Avidin, Biotin und Proteinblock (Superblock) behandelt. Diese sättigen unspezifische Antigenbindestellen ab und minimieren so die unerwünschte Anfärbung des Hintergrundes.

CD20 und CD138

1. Primärantikörper in Tabelle 9 angegebener Verdünnung auftragen, Inkubation über Nacht
2. 2 x 5 min in PBS-Puffer waschen
3. Ansetzen der ABC-AP-Lösung nach Produktbeschreibung
4. Biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500 mit PBS) auftragen, Inkubation 30min
5. 2x 5min in PBS-Puffer waschen
6. ABC-AP-Lösung auftragen, Inkubation für 30min
7. 2 x 5min in PBS-Puffer waschen
8. Permanent AP Red Kit nach Produktbeschreibung ansetzen
9. Permanent AP Red Kit auftragen, Inkubation für 10min
10. Spülen für 2 min in Aqua dest.
11. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck) für 10 sec

12. Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min
13. Aufsteigende Alkoholreihe (70%-96%-96%-100%-100%) je 1 min
14. 2 x 5 min Dehydrierung in Xylol
15. Eindecken mit Depex und Deckgläschen

CD68 und CD3

Die Färbungen wurden dankenswerter Weise von der hauseigenen Pathologie übernommen. Durchgeführt wurden diese automatisch am Färbeautomaten BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module nach der Methode U ultraView DAB (v1.02.0018).

2.7 AUSWERTUNG

2.7.1. SOFTWARE-BASIERTE AUSWERTUNG

Die Marker CD20, CD68 und CD3 wurden mit HistoQuest 3.0, einer Software für zytometrische Auswertung von Gewebeproben, analysiert. Diese drei Zellmarker färben sehr spezifisch nur die infiltrierenden Zellen und keine niereneigenen Strukturen, was eine automatisierte Analyse ermöglichte.

Um eine Verarbeitung möglich zu machen, wurden die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop der Firma Zeiss bei 40facher Vergrößerung mit der Microskopkamera AxioCam ERc5s mit Hilfe des Programm AxioVision (Rel. 4.6) fotografiert. Da es sich um jeweils relativ wenig Material handelte, konnte die gesamte Biopsie aufgenommen werden. Die Anzahl der Gesichtsfelder entspricht der Anzahl der Aufnahmen, die Software errechnet daraus eine Gesamtfläche.

HistoQuest erkennt die Hämalaun-gefärbten Zellkerne durch einen benutzerdefinierten Blauton, außerdem konnte u.a. ein minimaler und maximaler Kerndurchmesser genauso wie die Farbstufe, die als falsch positive Hintergrundfärbung definiert werden soll, voreingestellt werden. Auch der Farnton, der als positive Markerfärbung interpretiert werden soll, wird vom Benutzer vorgegeben. Darüber hinaus muss eine gewisse räumliche Nähe zu einem Kern bestehen um nicht falsch positive Anheftungen des immunhistochemischen Systems in die Analyse mit einzubeziehen. Nach diesen voreingestellten Standards analysiert die Software alle Gesichtsfelder; sie erstellt einen DotBlot und eine Ergebnistabelle. In letzterer finden sich u.a. die „Anzahl positiver Zellen pro mm²“ der eingepflegten Gewebeprobe. Mit dieser Angabe generiert HistoQuest eine objektive und vergleichbare Maßzahl.

Zur internen Kontrolle wurden die Einstellungen noch zusätzlich an jede Biopsie speziell

angepasst und die Resultate derer der Standardanalyse gegenübergestellt. Es ergaben sich, wie auch bereits in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt (128) vergleichbare Ergebnisse.

2.7.2. MANUELLE AUSWERTUNG

Das Färbemuster von CD138 war für eine automatische Auswertung durch HistoQuest nicht geeignet, da neben den gesuchten infiltrierenden Plasmazellen auch Tubuluszellen angefärbt werden. Wir entschieden uns daher für eine manuelle Analyse, die zur Objektivierung durch zwei unabhängige Auswerter durchgeführt wurde.

Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung ausgezählt und nach folgenden Aspekten untersucht:

1. Anzahl der Gesichtsfelder
2. Anzahl der Glomerula
3. Anzahl positiver Zellen im Glomerulum
4. Anzahl Arterien
5. Anzahl positiver Zellen in den Arterien
6. Anzahl mittelgroßer bis großer Venen
7. Anzahl positiver Zellen in den Venen
8. Anzahl positiver Zellen im Interstitium
 - „Vereinzelte“ Zellen
 - „Im Cluster“ \triangleq positiven Zellen umgeben von mindestens 10 weiteren infiltrierenden Zellen

Um eine infiltrierende Zelle als positiv zu charakterisieren, definierten wir, dass ein deutlich pinker, durchgängiger zytoplasmatischer Ring vorliegen muss. Anfärbungen der Kernstruktur allein oder Farbtupfer ohne Bezug zu einer Zelle wurden als falsch positiv bewertet.

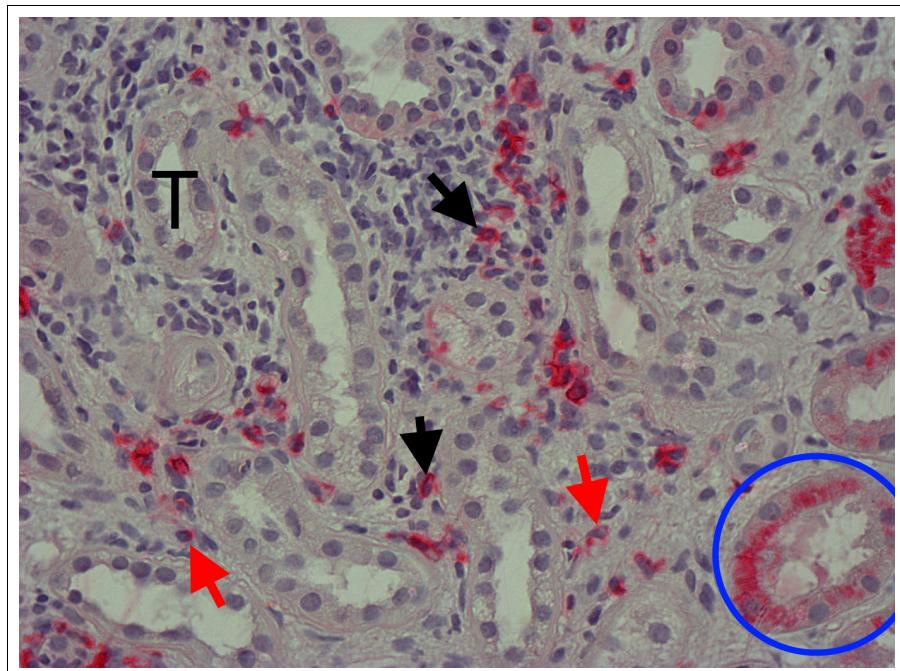


Abbildung 17 Färbung von CD138 (Beispiel). T = Tubulus. Positives Färbeergebnis einer Zelle (►). Falsch positive Färbung einer Zelle (►). Angefärbte Tubuluszellen (○)

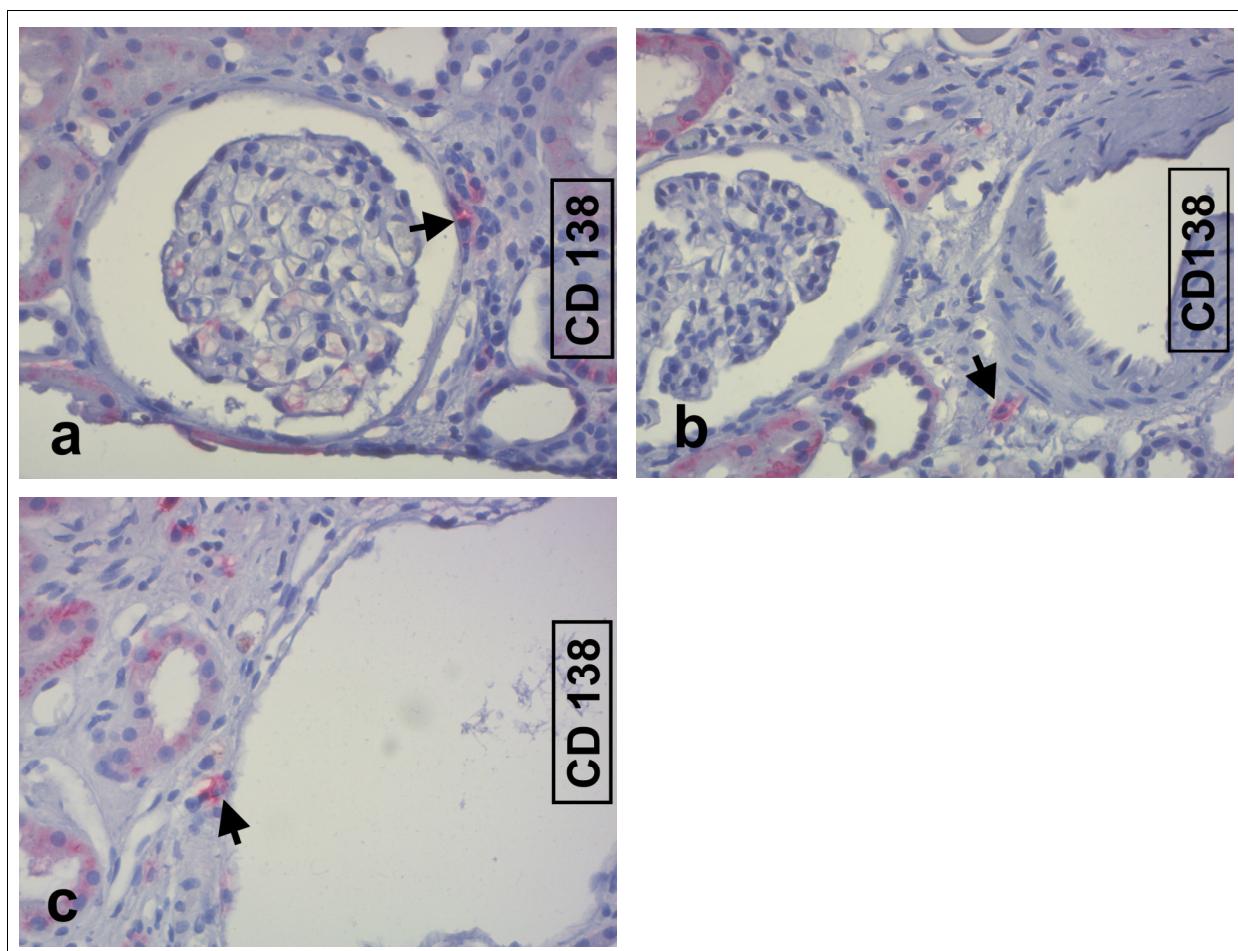


Abbildung 18 Lokalisation CD138-positiver Zellen (►). **a** am Glomerulum **b** an einer Arterie **c** an einer Vene

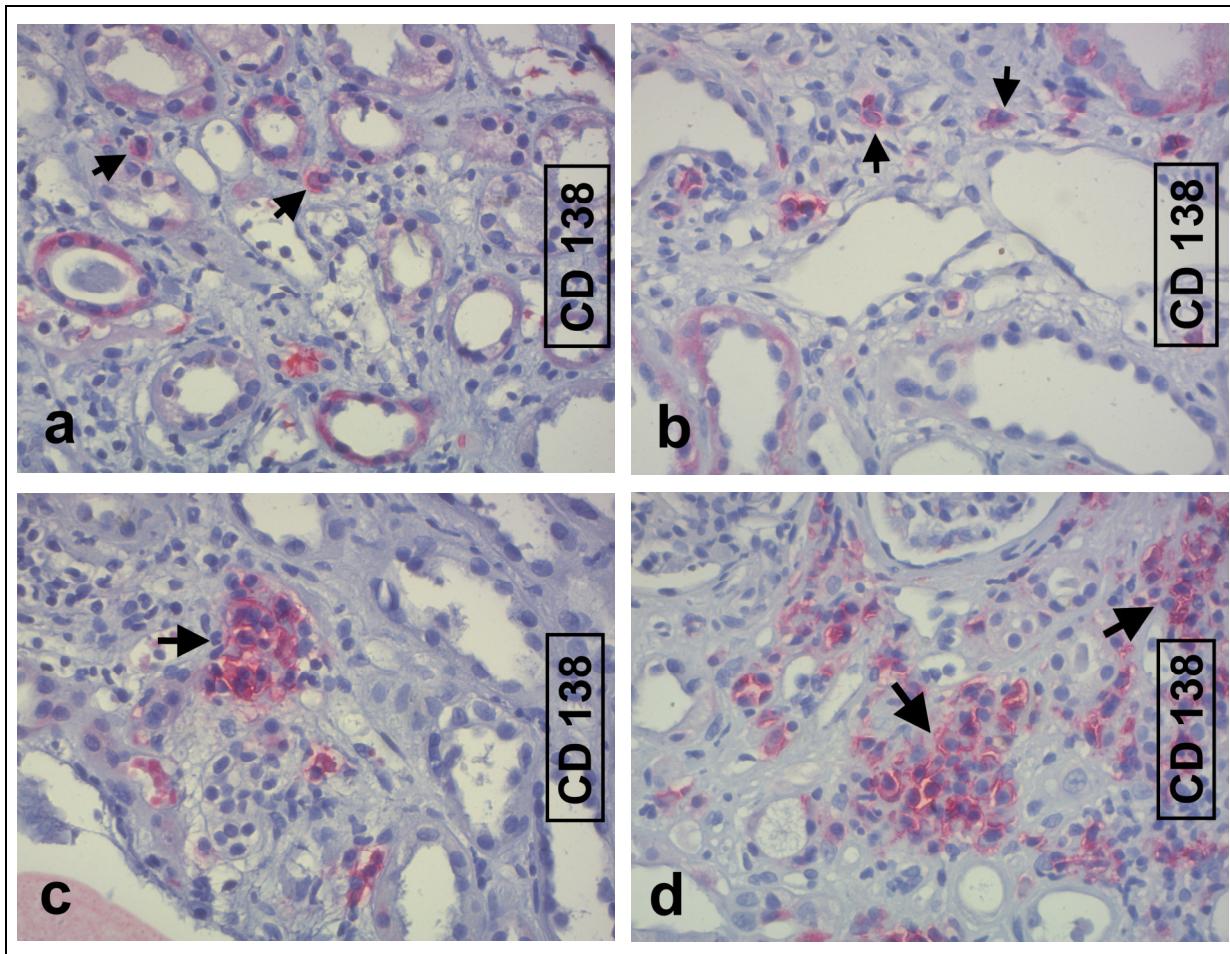


Abbildung 19 CD138 positive, interstitielle Zellen (►). Verteilungsmuster: **a,b** vereinzelt. **c,d** im Cluster.

Des Weiteren wurde folgende Regelung zur Definition der Räume und der dazugehörigen Zellen getroffen:

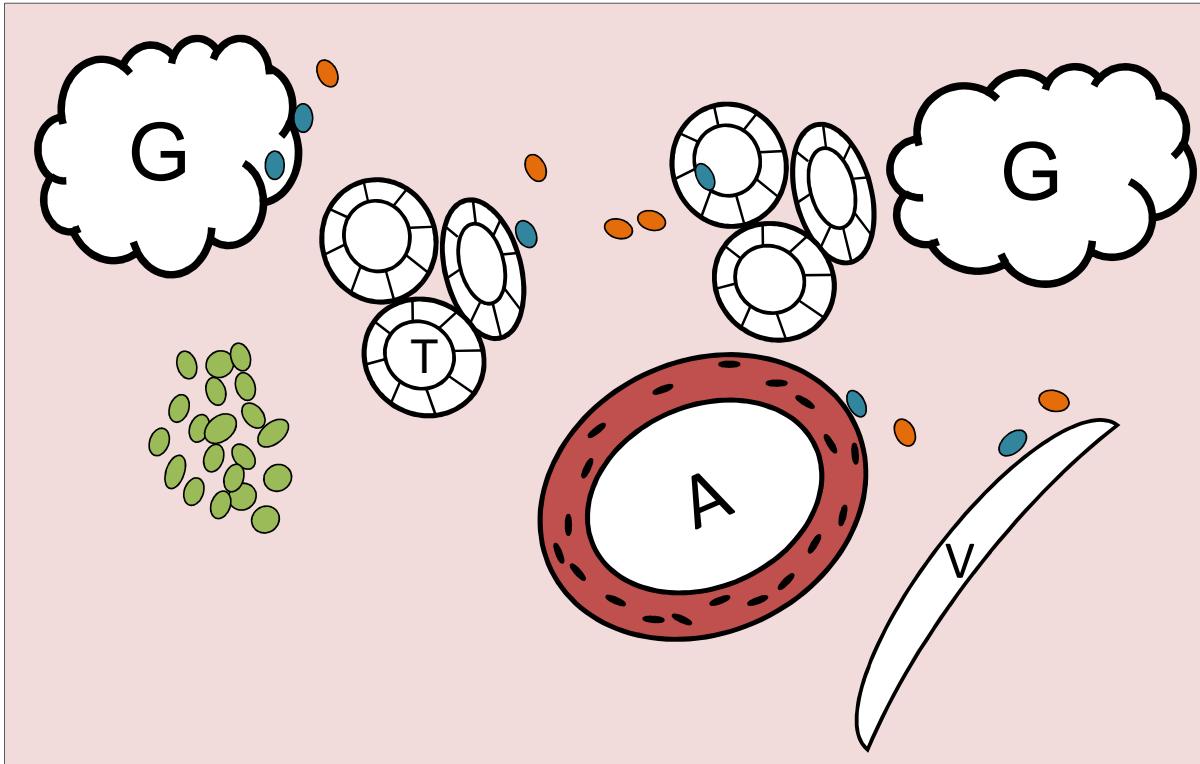


Abbildung 20 Manuelles Auswertungsschema für CD138. Schematische Sicht durch das Mikroskop. G = Glomerulum, T = Tubulus, A = Arterie, V = Vene. Infiltrierende Zellen: **blau** = intra- bzw. peri-glomerulär, -tubulär, -arteriell. **orange** = vereinzelte, interstitielle Zellen. **grün** = interstitielle Zellen im Cluster.

Eine angefärbte, intraglomeruläre Zelle, wird als „positive Zelle im Glomerulum“ gewertet. Liegt die Zelle periglomerulär, d.h. innerhalb der ersten Zellreihe direkt an der Grenzlinie, bewerten wir diese ebenfalls als dem Glomerulum zugehörig. Ab der zweiten Zellreihe gilt die positive Zelle als „interstitiell“. Dieses Prinzip übertragen wir auf alle Strukturen: Glomerula, Gefäße und Tubuli. Besonders bei letzteren ist die Einteilung der Lage in intratubulär, peritubulär und interstitiell von Bedeutung, da ein Großteil der Tubuluszellen ebenfalls positiv angefärbt wird und die Abgrenzung von infiltrierenden, interstitiellen Zellen zum Zwecke der Vergleichbarkeit zwischen den beiden Auswertern einer Standardisierung bedurfte.

2.7.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte über einen Vergleich der Mittelwerte mit dem studentischen t-Test. Die Angabe der Daten erfolgt in MW \pm SEM. Als statistisch signifikant gelten p-Werte $< 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit).

Im Fall von CD68, CD20 und CD3 wurde der Mittelwert über die von HistoQuest generierte „Anzahl der positiven Zellen / mm²“ gebildet.

Bei CD138 hingegen wurde zuerst das arithmetische Mittel über die Ergebnisse der beiden Auswerter gebildet, d.h. beispielsweise über die „Anzahl der positiven Zellen im Cluster“ je von Beobachter 1 und 2. Im nächsten Schritt wurden diese Werte durch den Mittelwert der Gesichtsfelder für die jeweilige Probe dividiert, um analog zur softwaregebundenen Auswertung eine Normierung über die Größe der Fläche zu erhalten. Das Ergebnis entspricht also der „Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld“.

3 ERGEBNISSE

In den nachfolgenden Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung der Nierenbiopsien werden alle Angaben als „Mittelwert der Anzahl der positiven Zellen“ \pm Standardfehler (MW \pm SEM) getätigt.

3.1 MAKROPHAGEN - CD68

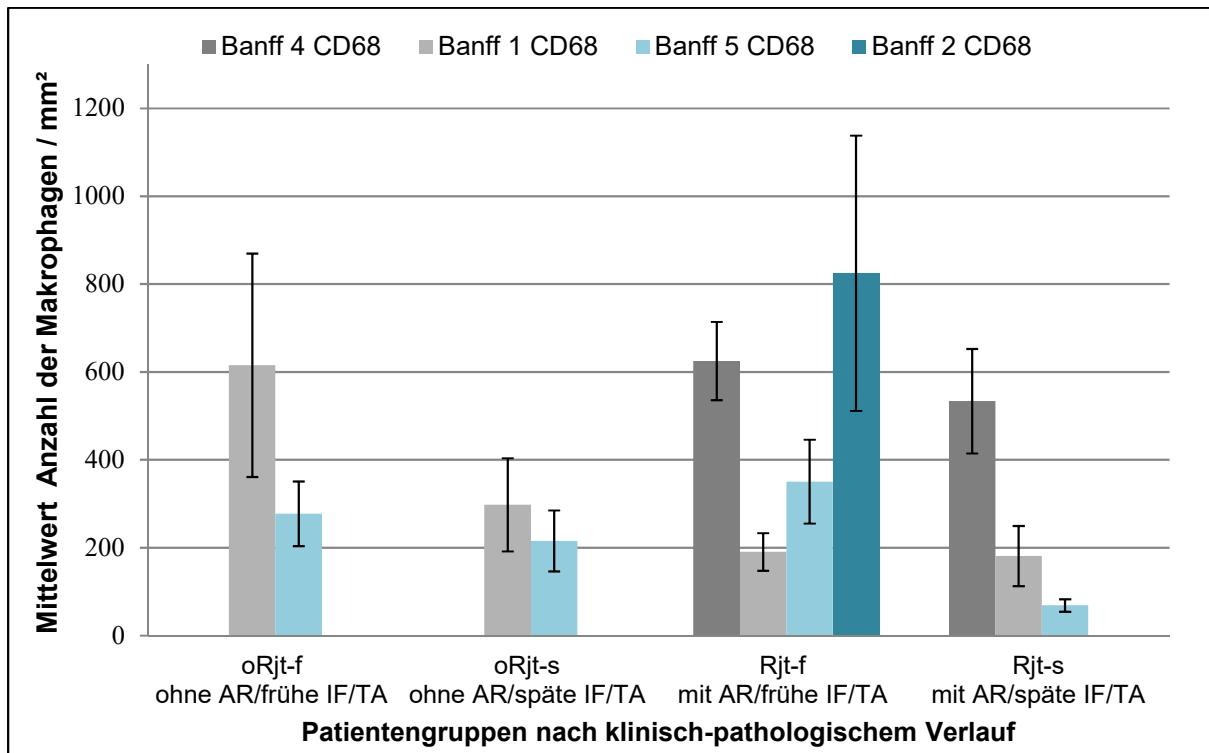


Abbildung 21 Anzahl der Makrophagen im Vergleich

3.1.1. VERLAUF OHNE INITIALE ABSTÖBUNG (ORJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-f

In dieser Untergruppe fällt zum einen die im Vergleich zu den anderen drei Gruppen sehr hohe Anzahl an Makrophagen in Banff 1 auf, des Weiteren beobachten wir dann einen Rückgang in Banff 5, dieser ist nicht signifikant. ($615,24 \pm 254,33$ vs. $277,19 \pm 73,54$; $p = 0,25$).

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-s

Auch hier findet sich ein, wenn auch weniger ausgeprägter, Abfall der Makrophagen von Banff 1 nach Banff 5 ($297,49 \pm 106,07$ vs. $215,47 \pm 69,47$; $p = 0,52$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe oRjt-f und oRjt-s

Vergleicht man die Biopsien mit chronischen Schäden (Banff 5) im Hinblick auf die Anzahl der Makrophagen zu den zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, so ergibt sich kein statistischer Zusammenhang ($277,19 \pm 73,54$ vs. $215,47 \pm 69,47$; $p = 0,55$).

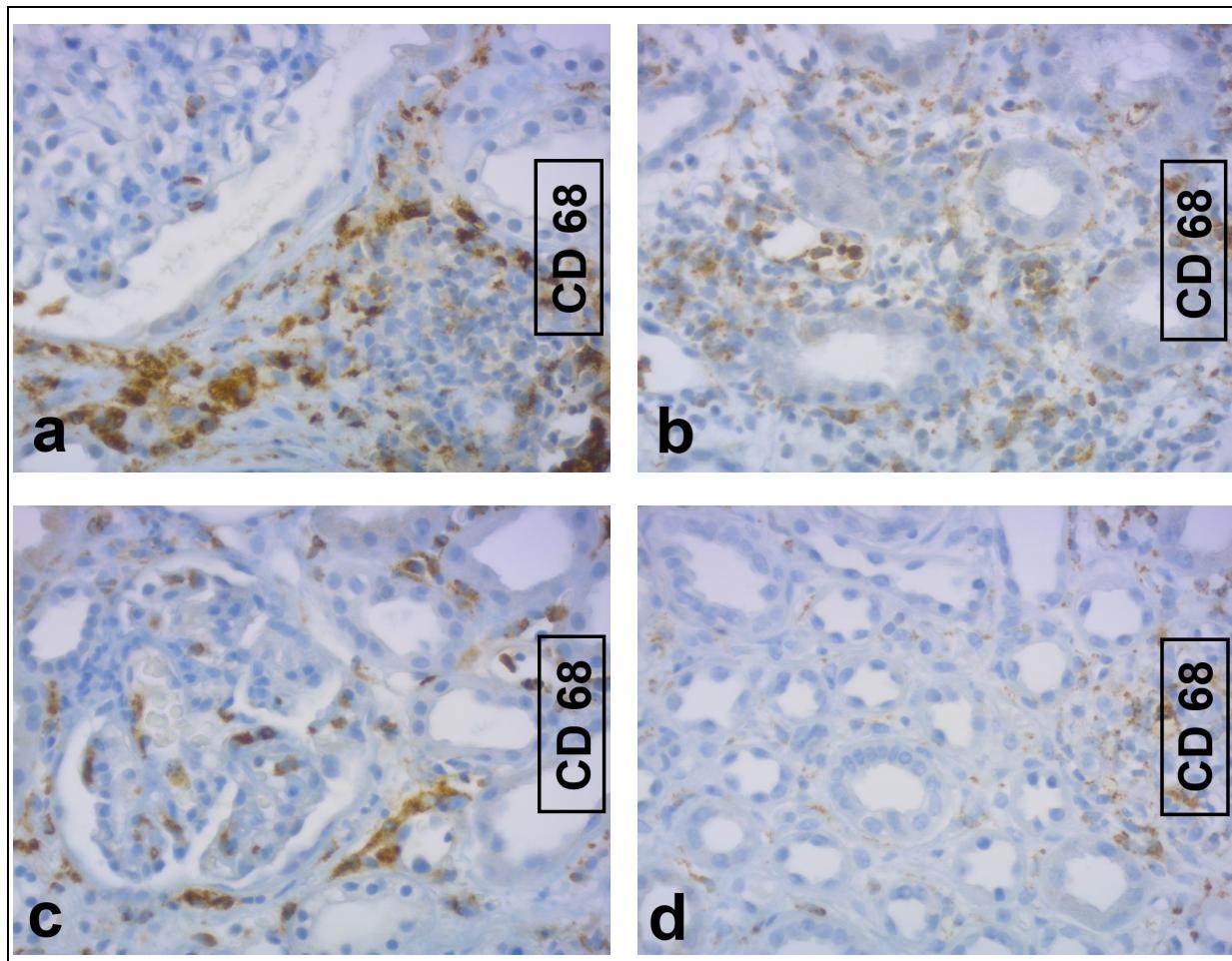


Abbildung 22 Ergebnis CD68 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung **a** Banff 1, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f) **b** Banff 5, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f) **c** Banff 1, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s) **d** Banff 5, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s)

3.1.2. VERLAUF MIT INITIALER ABSTOßUNG (RJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-f

Zum Zeitpunkt der Abstoßung (Banff 4) zeigen sich sehr hohe CD68-positive Zellen, die nach Erholung (Banff 1) signifikant absinken ($624,71 \pm 88,97$ vs. $190,35 \pm 42,91$; $p < 0,001$). Kommt es dann zum chronischen Transplantatverlust (Banff 5) zeigt sich in dieser Gruppe, als Ausnahme, wieder ein nicht signifikanter Anstieg der Makrophagen (Banff 1 vs. Banff 5: $190,35 \pm 42,91$ vs. $350,38 \pm 95,28$; $p = 0,14$). Der Unterschied zu Banff 4 ist dennoch signifikant ($624,71 \pm 88,97$ vs. $350,38 \pm 95,28$; $p = 0,03$).

Zusätzlich kann in dieser Gruppe in dem als Banff 2 klassifizierten Gewebe die höchste Anzahl an Makrophagen gefunden werden ($824,75 \pm 313,43$). Durch den hohen Standardfehler lässt sich allerdings kein signifikanter Unterschied zu den anderen Banff-Klassen 1, 4 oder 5 ($p_1 = 0,08$, $p_4 = 0,56$, $p_5 = 0,18$) zeigen.

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-s

Tritt die chronische Nephropathie zum späten Zeitpunkt auf, so zeigt sich ein kontinuierlicher Abfall der Makrophagenzahl über die drei Stadien. Es kann ein signifikanter Unterschied zwischen Banff 4 und Banff 1 festgestellt werden ($533,52 \pm 118,81$ vs. $181,00 \pm 68,43$; $p = 0,02$), der Abfall von Banff 1 nach Banff 5 ($181,00 \pm 68,43$ vs. $68,47 \pm 14,24$; $p = 0,14$) ist statistisch nicht unterschiedlich. Jedoch erkennen wir auch hier einen Unterschied mit statistischer Signifikanz zwischen Banff 4 und 5, also zwischen dem frühesten und spätesten Zeitpunkt ($533,52 \pm 118,81$ vs. $68,47 \pm 14,24$; $p < 0,001$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe Rjt-f und Rjt-s

Darüber hinaus zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahl in Banff 5 zwischen der frühen und späten IF/TA ($350,38 \pm 95,28$ vs. $68,47 \pm 14,24$; $p = 0,007$).

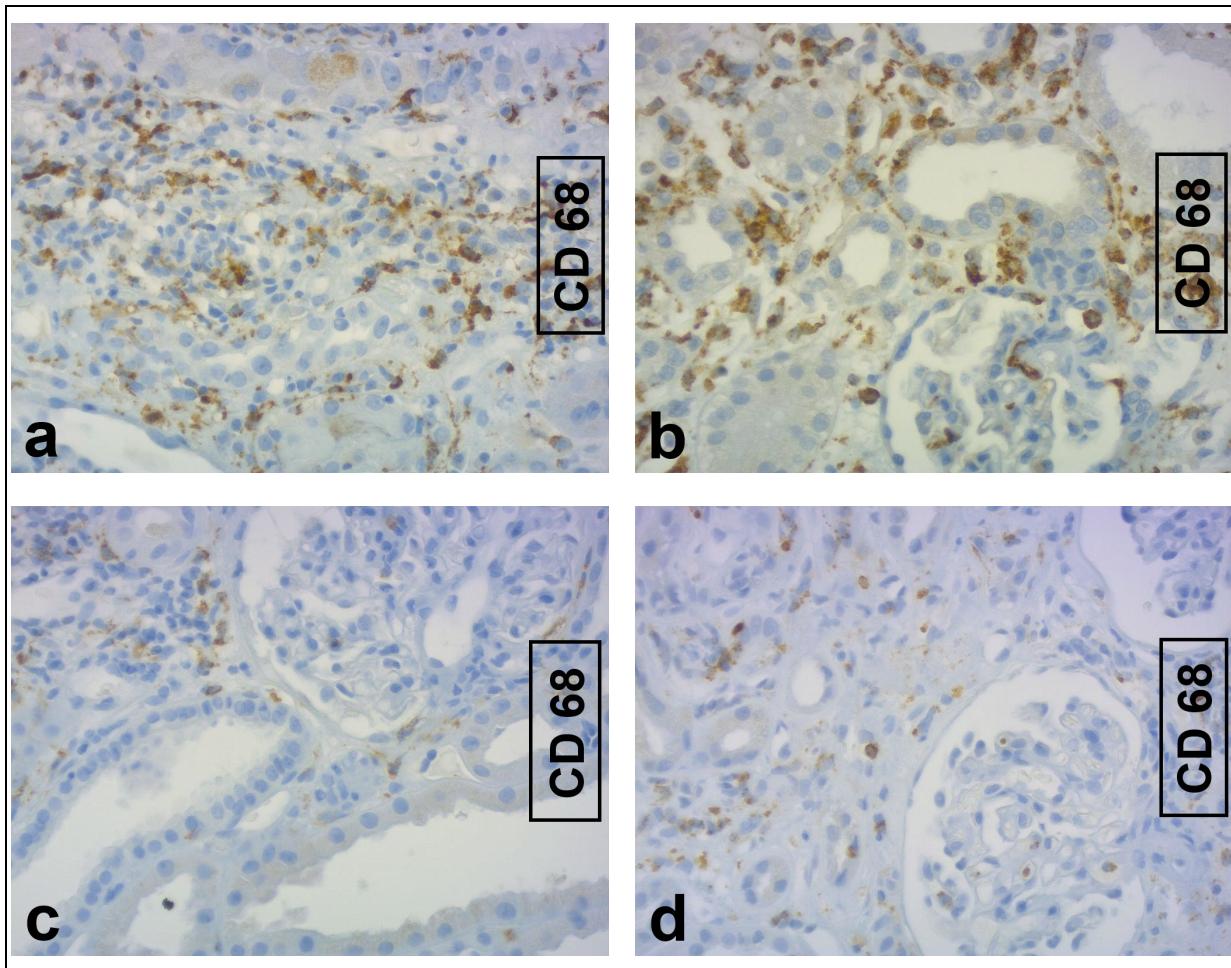


Abbildung 23 Ergebnis CD68 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f) **a** akute zelluläre Abstoßung (Banff 4, Gruppe Rjt-f). **b** akute humorale Abstoßung (Banff 2, Gruppe Rjt-f). **c** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-f) **d** IF/TA \leq 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-f)

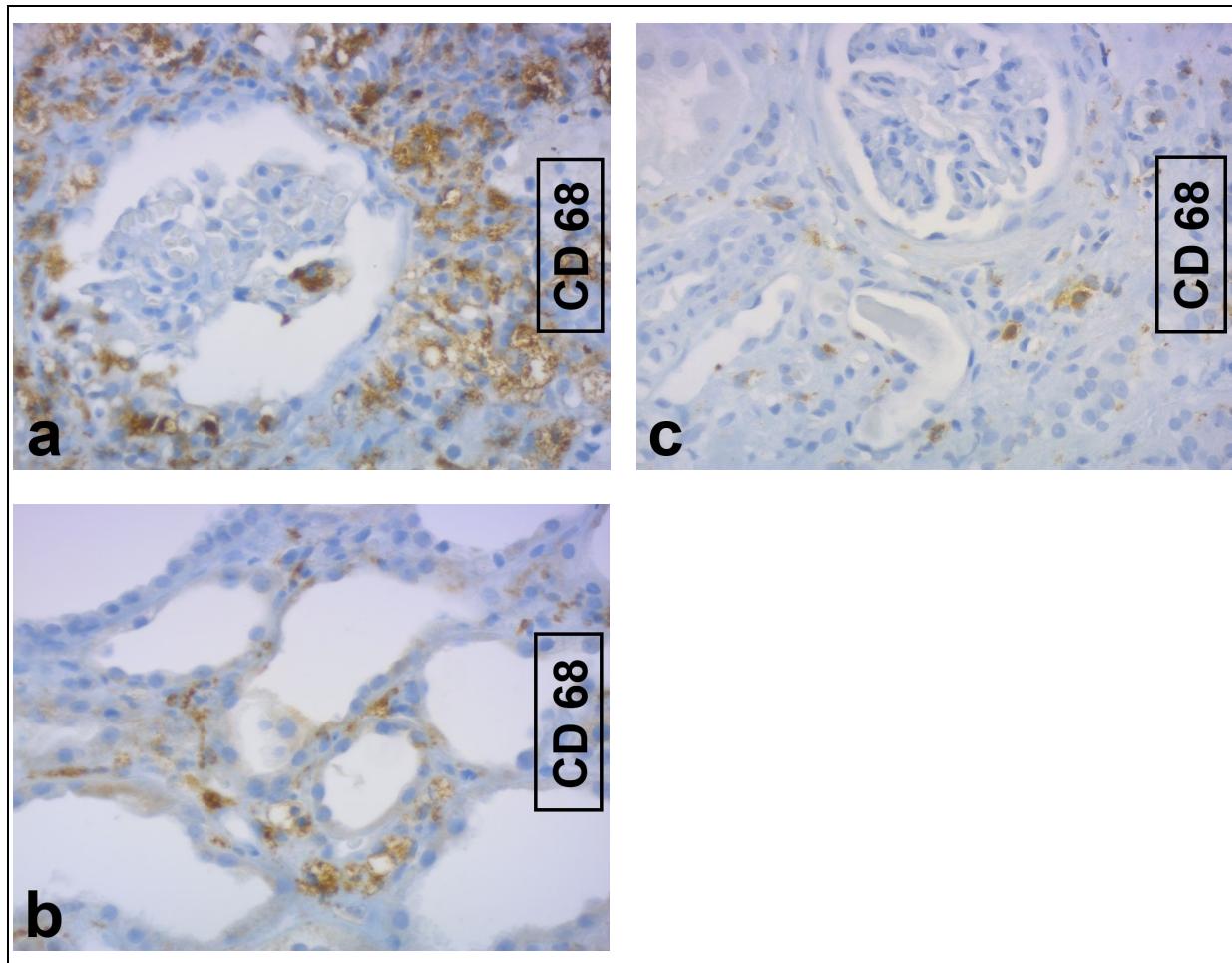


Abbildung 24 Ergebnis CD 68 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s). **a** Akute zelluläre Abstoßung (Banff 4, Gruppe Rjt-s)
b Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-s) **c** IF/TA > 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-s)

3.2 B-LYMPHOZYTEN – CD20

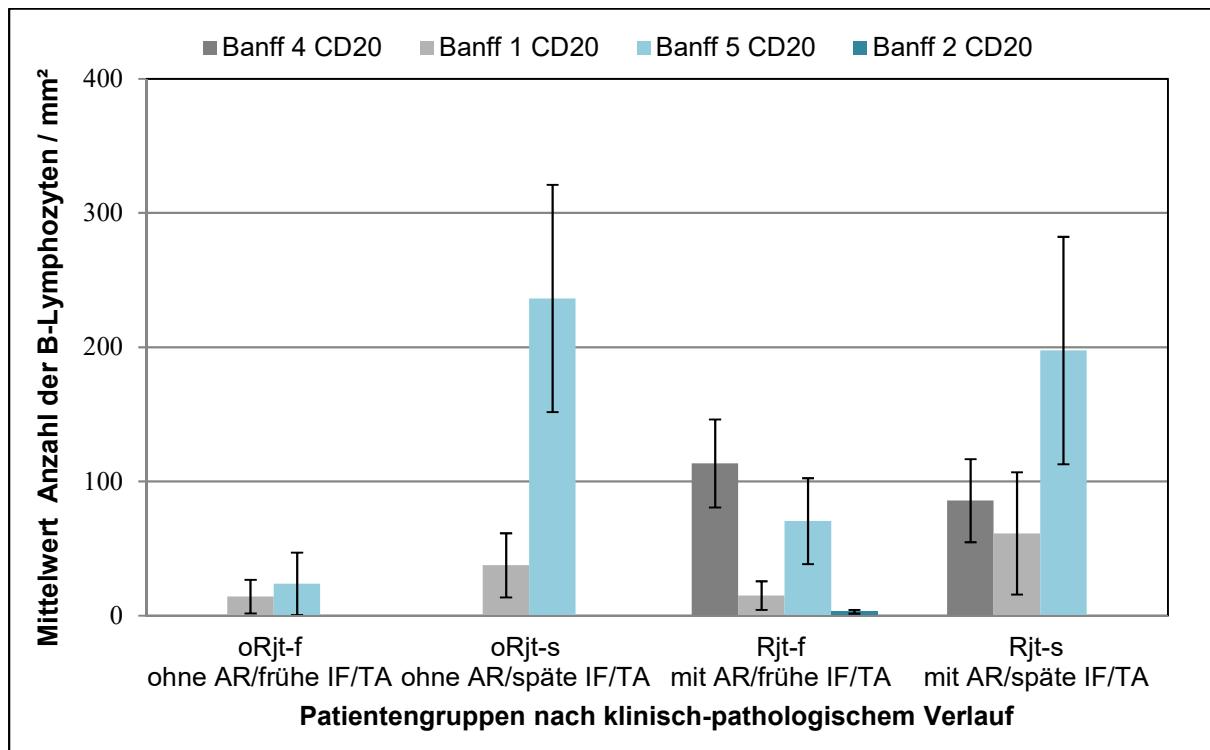


Abbildung 25 Anzahl der B-Lymphozyten im Vergleich

3.2.1. VERLAUF OHNE INITIALE ABSTOßUNG (ORJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-f

Die Zahl der CD20-positiven Zellen verdoppelte sich von Banff 1 auf Banff 5, allerdings nicht signifikant ($14,18 \pm 12,53$ vs. $23,69 \pm 23,21$; $p = 0,72$).

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-s

Es findet sich ein signifikanter Anstieg der B-Zellen ($37,44 \pm 23,89$ vs. $236,23 \pm 84,67$; $p = 0,04$) zwischen Banff 1 und Banff 5.

Vergleich von Banff 5 in Gruppe oRjt-f und oRjt-s

Darüber hinaus ist auch der Unterschied zwischen Banff 5 bei früher gegenüber später IF/TA signifikant ($23,69 \pm 23,21$ vs. $236,23 \pm 84,67$; $p = 0,03$).

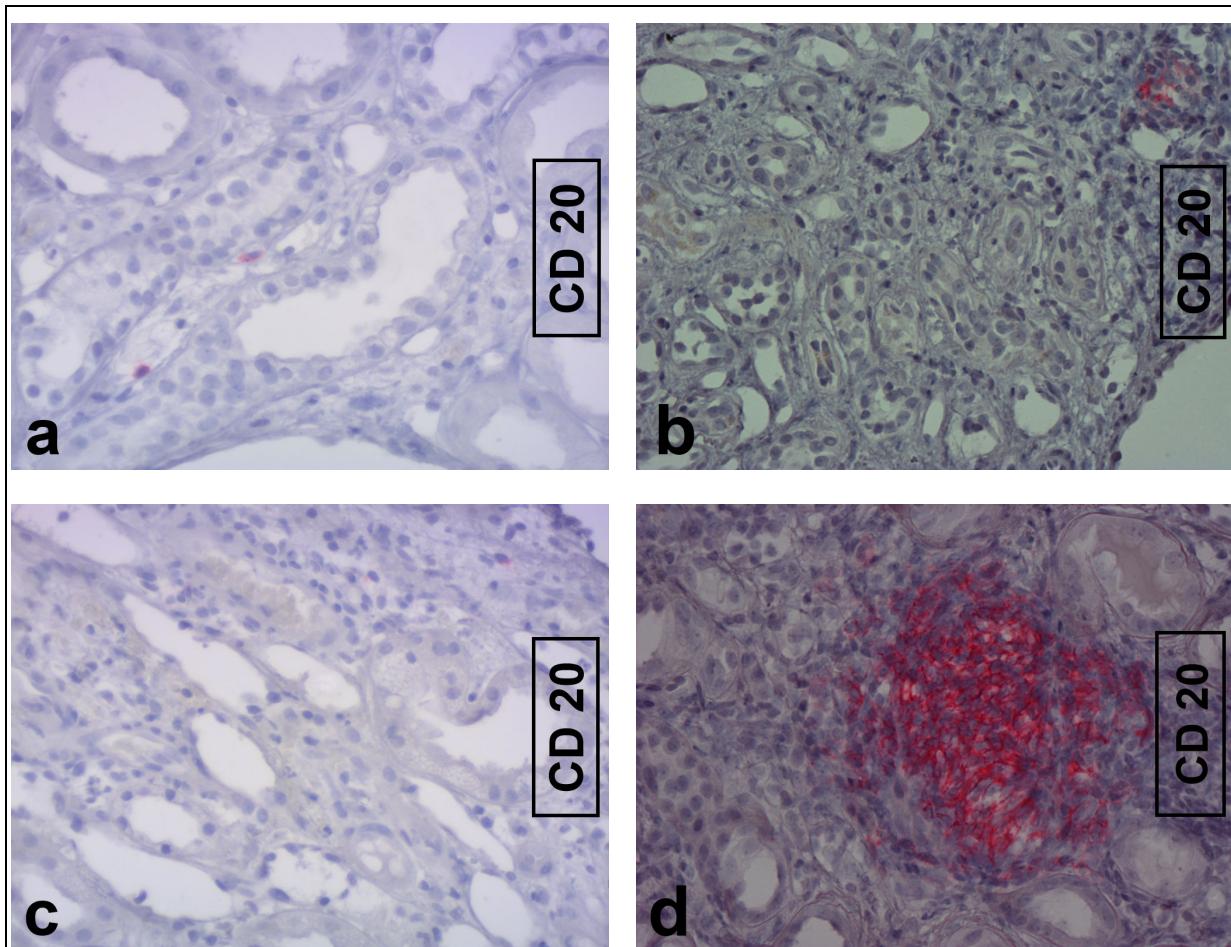


Abbildung 26 Ergebnis CD20 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt).
a Banff 1, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f). **b** Banff 5, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f) **c** Banff 1, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s) **d** Banff 5, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s)

3.2.2. VERLAUF MIT INITIALER ABSTOßUNG (RJT)

Allgemein lässt sich eine hohe Anzahl an B-Lymphozyten während akuter Abstoßung (Banff 4) verzeichnen. Diese geht in beiden Gruppen in Banff 1 klar zurück. Die nachfolgende Erhöhung in Banff 5 tritt analog zu den Beobachtungen in den Gruppen ohne akute Abstoßung auf.

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-f

Hier findet sich ein signifikanter Rückgang der B-Zellen von Banff 4 nach Banff 1 ($113,31 \pm 32,80$ vs. $14,88 \pm 10,73$; $p = 0,007$), sogar unter das Niveau von Banff 1 in der Gruppe ohne vorangegangene Abstoßung (oRjt-f).

Die Zellzahl steigt dann in Banff 5 um das 4,8-fache, allerdings ohne statistischen Zusammenhang ($14,88 \pm 10,73$ vs. $70,38 \pm 32,03$; $p = 0,12$).

Zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs wurde der früheste dem spätesten Zeitpunkt innerhalb der Gruppe gegenüber gestellt, dies entspricht Banff 4 versus Banff 5. Es zeigt sich ein

Rückgang der B-Lymphozyten, welcher nicht signifikant ist ($113,31 \pm 32,80$ vs. $70,38 \pm 32,03$; $p = 0,35$). In Banff 2-klassifizierten Biopsien (humorale Abstoßung) befinden sich kaum B-Lymphozyten, signifikant weniger als in der akuten zellulären Abstoßung (Banff 4) ($2,88 \pm 1,37$ vs. $113,31 \pm 32,80$; $p = 0,002$) und auch weniger als in Banff 1, also Proben ohne jeglichen Hinweis auf akute oder chronische Veränderungen ($2,88 \pm 1,37$ vs. $14,88 \pm 10,73$; $p = 0,28$).

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-s

In dieser Gruppe zeigt sich ebenfalls eine Verminderung der CD20-positiven Zellen von Banff 4 nach Banff 1 ($85,65 \pm 30,99$ vs. $61,20 \pm 45,57$; $p = 0,66$). In Banff 5 erhöhen sich die B-Lymphozyten, analog zur Gruppe Rjt-f, wieder um einen vergleichbaren Faktor (x 3) ($61,20 \pm 45,57$ vs. $197,47 \pm 84,75$; $p = 0,17$). Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppe zeigen Banff 4 gegenüber Banff 5-Biopsien einen Anstieg der CD20-positiven Zellen. ($85,65 \pm 30,99$ vs. $197,47 \pm 84,75$; $p = 0,23$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe Rjt-f und Rjt-s

Stellt man die Zahl der B-Zellen der frühen der spät eingetretenen chronischen Allograftnephropathie (Banff 5) gegenüber (Rjt-f vs. Rjt-s), so zeigt sich eine 2,7-fache Erhöhung ($70,38 \pm 32,03$ vs. $197,47 \pm 84,75$; $p = 0,18$).

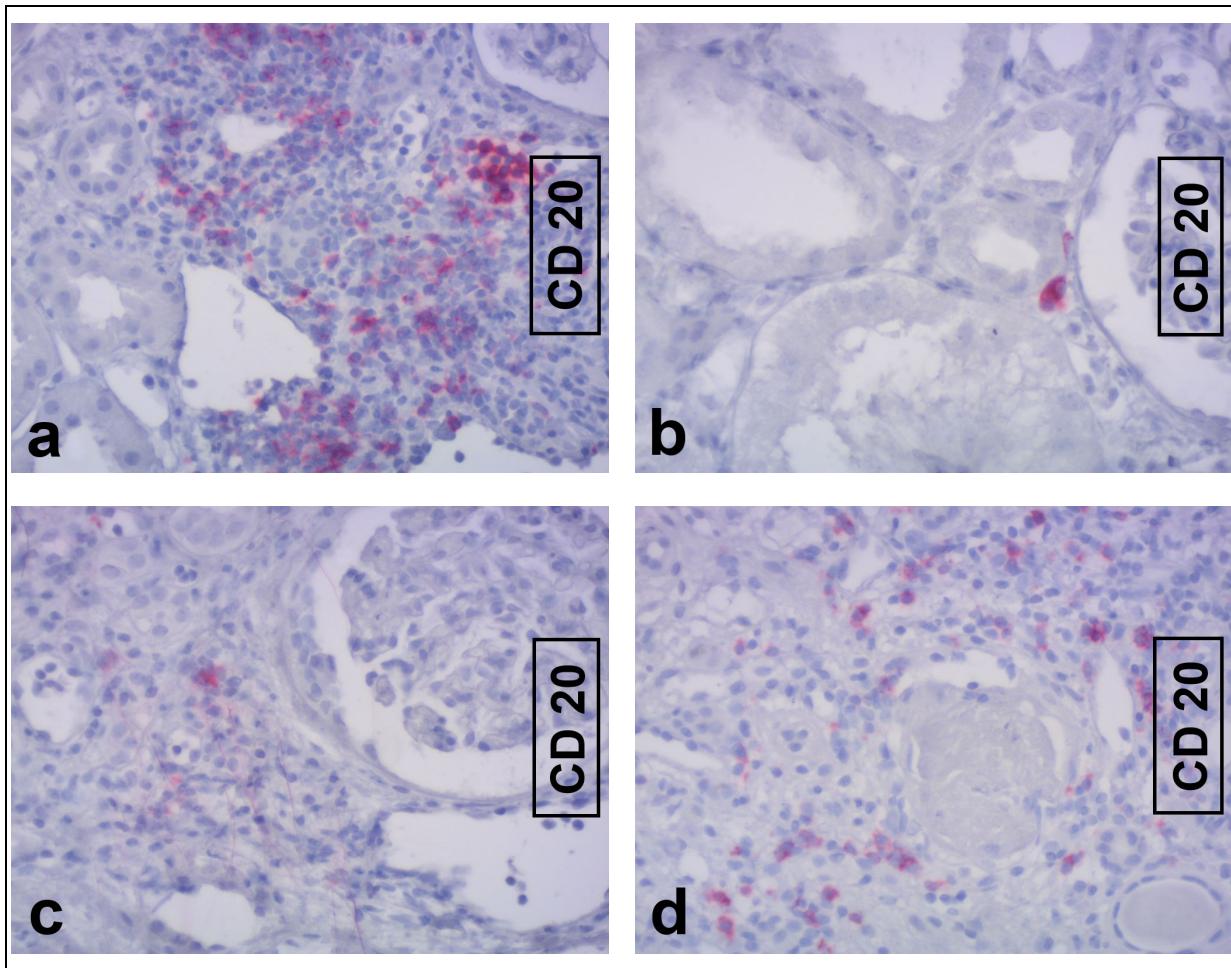


Abbildung 27 Ergebnis CD20 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f) **a** akute zelluläre Abstoßung (Banff 4IA, Gruppe Rjt-f). **b** akute humorale Abstoßung (Banff 2, Gruppe Rjt-f). **c** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-f) **d** IF/TA \leq 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-f)

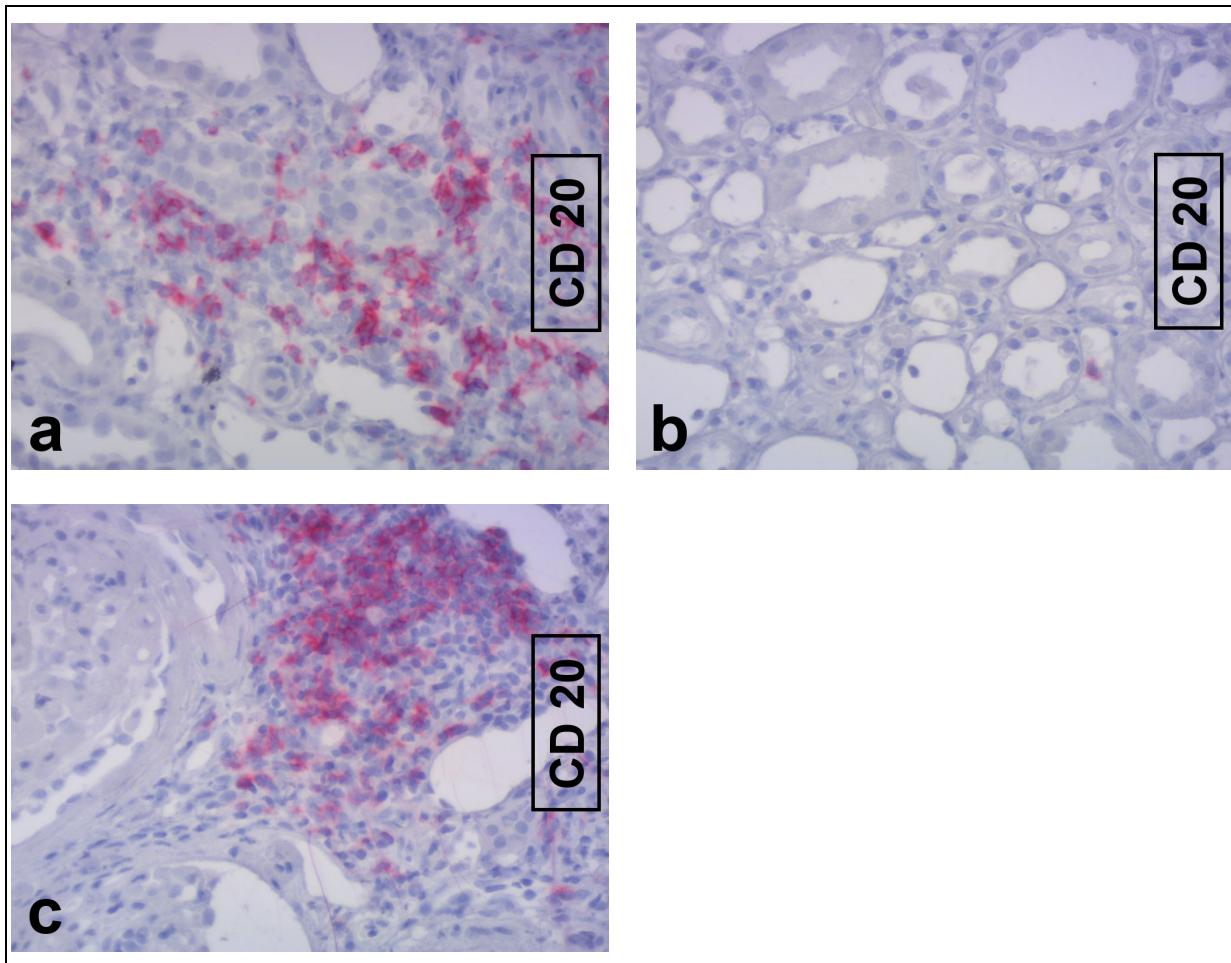


Abbildung 28 Ergebnis CD20 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s) **a** Akute zelluläre Abstoßung (Banff 4IIA, Gruppe Rjt-s) **b** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-s) **c** IF/TA > 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-s)

3.3 T-LYMPHOZYTEN – CD3

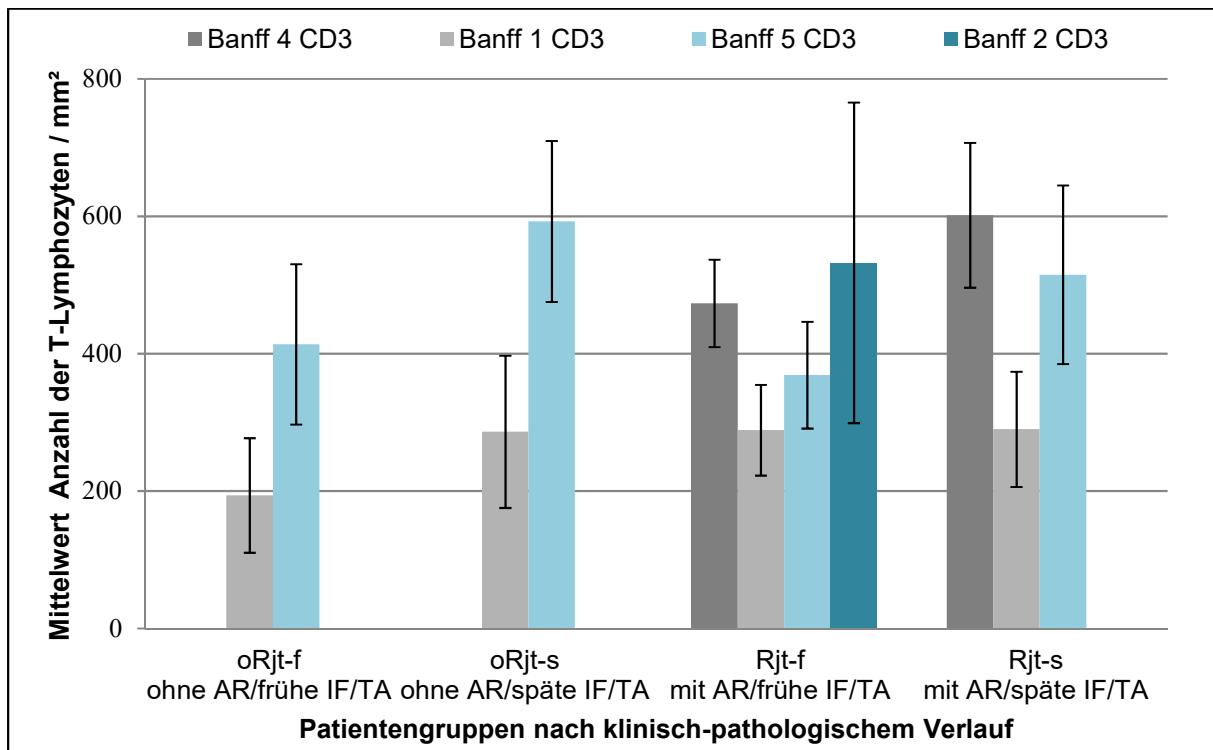


Abbildung 29: Anzahl der T-Lymphozyten im Vergleich

3.3.1. VERLAUF OHNE INITIALE ABSTÖBUNG (ORJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-f

In dieser Untergruppe kann man eine Verdopplung der CD3-positiven Zellen von Banff 1 nach Banff 5 vermerken, diese ist allerdings nicht signifikant ($193,7 \pm 83,36$ vs. $413,44 \pm 116,74$; $p = 0,15$).

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-s

Auch hier kommt es zu einer Verdopplung der T-Zellen, es zeigt sich zusätzlich eine starke Tendenz mit einem $p = 0,07$ ($286,20 \pm 110,72$ vs. $592,33 \pm 117,17$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe oRjt-f und oRjt-s

Betrachtet man die Anzahl der Zellen in Banff 5 zum frühen und späten Zeitpunkt (oRjt-f vs. oRjt-s), so findet sich kein signifikanter Unterschied ($413,44 \pm 116,74$ vs. $592,33 \pm 117,17$; $p = 0,29$).

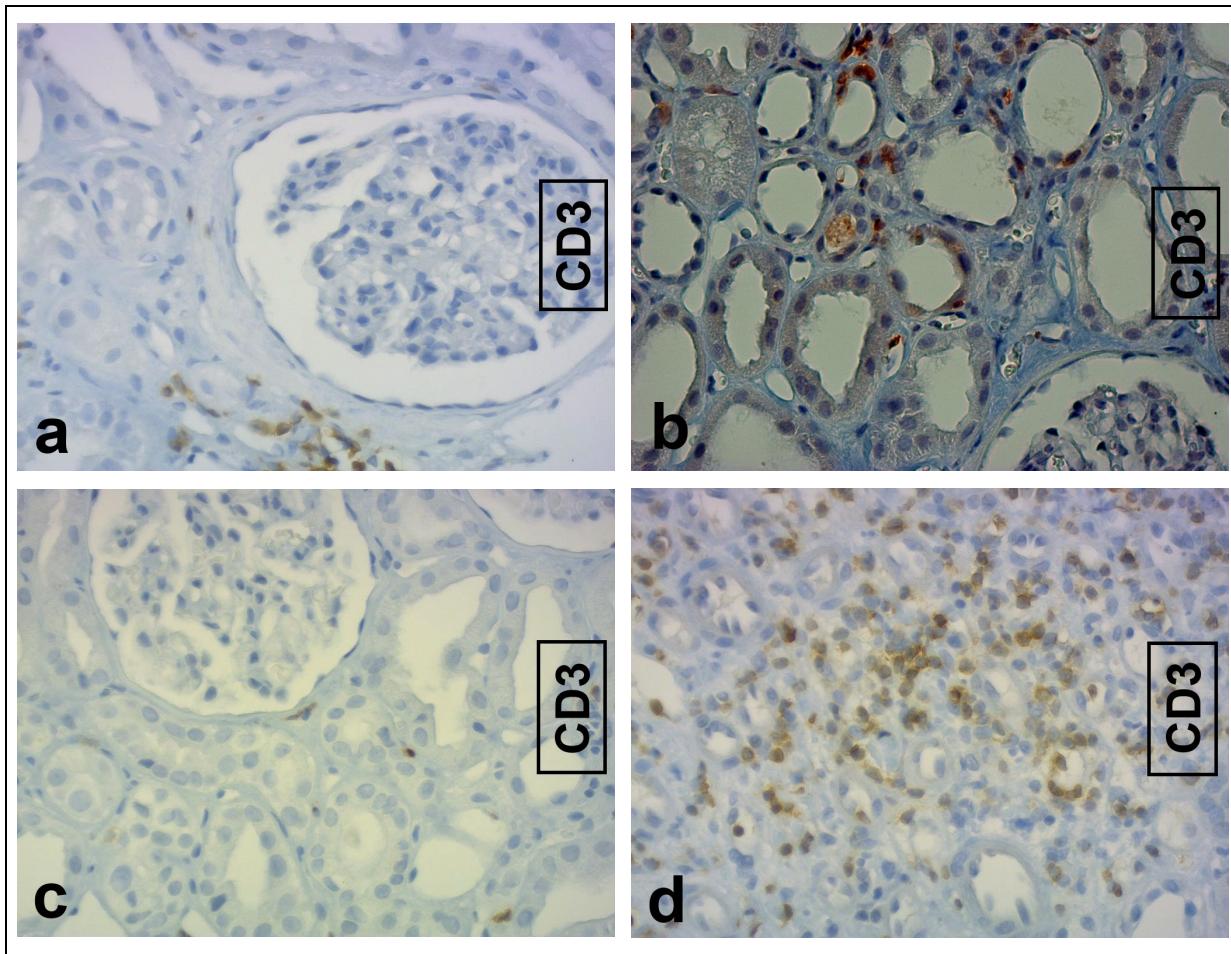


Abbildung 30 Ergebnis CD3 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt)
a Banff 1, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f). **b** Banff 5, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f) **c** Banff 1, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s) **d** Banff 5, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s)

3.3.2. VERLAUF MIT INITIALER ABSTOßUNG (RJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-f

Zum einen beobachtet man eine hohe Zahl an T-Zellen während der akuten Abstoßung (Banff 4). Analog zu den B-Zellen zeigt sich dann ein starker Trend zum signifikanten Rückgang der Zellzahl in Banff 1 ($473,17 \pm 63,64$ vs. $288,53 \pm 65,99$; $p = 0,0504$). Kommt es früh zu Veränderungen, die einer Banff 5-Klassifikation entsprechen, steigen die T-Zellen wieder an ($288,53 \pm 65,99$ vs. $368,65 \pm 77,66$; $p = 0,44$). Zwischen dem ersten Zeitpunkt der Biopsieentnahme, der akuten Abstoßung (Banff 4) und dem letzten Zeitpunkt dieser Gruppe, dem chronischen Allograftschaden (Banff 5), gibt es allerdings keinen signifikanten Unterschied ($473,17 \pm 63,64$ vs. $368,65 \pm 77,66$; $p = 0,30$).

Außerdem verhalten sich T-Lymphozyten bei humoraler Abstoßung ($532,13 \pm 233,23$) nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen Banff-Klassen ($p_1 = 0,34$, $p_4 = 0,81$, $p_5 = 0,52$).

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-s

In dieser Gruppe wird eine sehr hohe Anzahl von Lymphozyten in der akuten Abstoßungsreaktion gemessen, die dann mit der Lösung der Abstoßung in Banff 1 signifikant fällt ($601,26 \pm 105,33$ vs. $289,90 \pm 83,84$; $p = 0,03$). In Nieren, die zum späten Zeitpunkt eine IF/TA erfahren, findet man einen erneuten deutlichen Anstieg der T-Lymphozyten, dieser ist nicht signifikant ($289,90 \pm 83,84$ vs. $514,82 \pm 129,96$; $p = 0,16$). Die Zahl CD3-positiver Zellen in Banff 4 (erster Entnahmzeitpunkt) und 5 (letzter Entnahmzeitpunkt) ist statistisch gleich ($601,26 \pm 505,15$ vs. $514,82 \pm 129,96$; $p = 0,61$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe Rjt-f und Rjt-s

Außerdem lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen früher und später IF/TA (Rjt-f vs Rjt-s) zeigen ($368,65 \pm 77,66$ vs. $514,82 \pm 129,96$; $p = 0,34$).

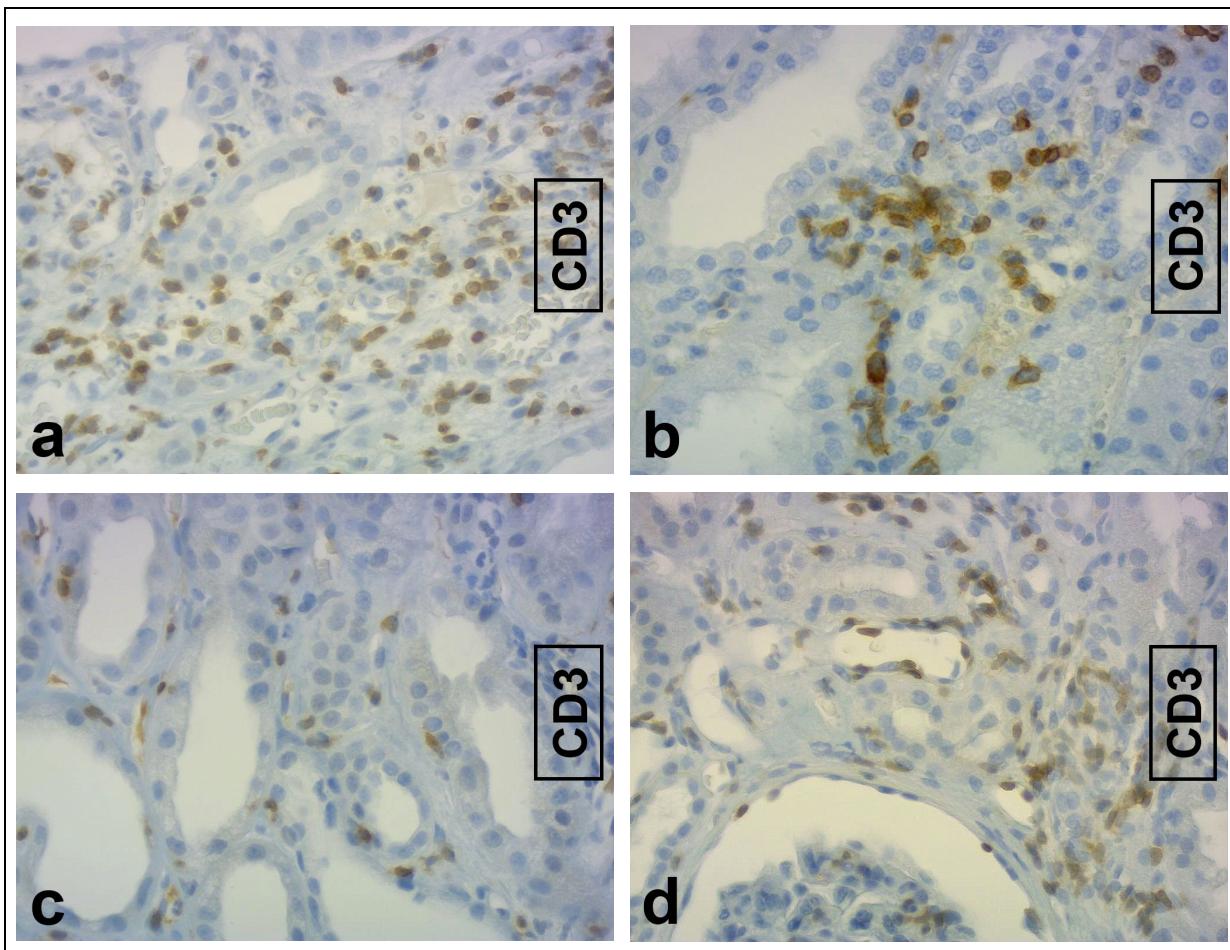


Abbildung 31 Ergebnis CD3 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frische chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f) **a** akute zelluläre Abstoßung (Banff 4II, Gruppe Rjt-f). **b** akute humorale Abstoßung (Banff 2, Gruppe Rjt-f). **c** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-f) **d** IF/TA ≤ 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-f)

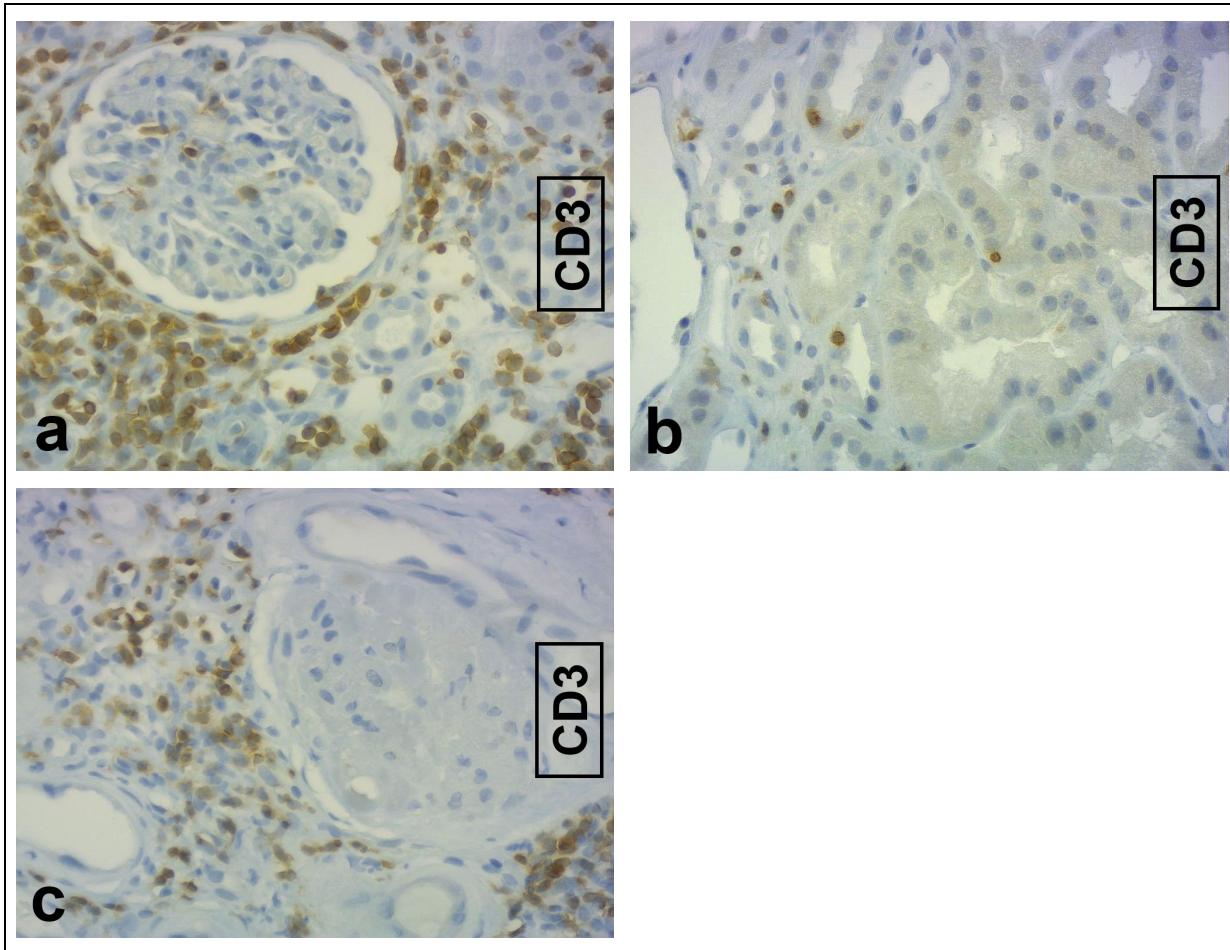


Abbildung 32 Ergebnis CD3 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s) **a** Akute zelluläre Abstoßung (Banff 4IB, Gruppe Rjt-s) **b** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-s) **c** IF/TA > 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-s)

3.4 PLASMAZELLEN – CD138

Die folgende Auswertung bezieht sich auf interstitielle Plasmazellen, welche durch manuelle Auszählung durch zwei Auswerter ermittelt wurden. Es wird in „vereinzelte, positive Zellen“ und „positive Zellen im Cluster“ aufgeschlüsselt. Die Einheit lautet „Anzahl der positiven Zellen pro Gesichtsfeld“.

Die Ergebnisse der Auszählung der periglomerulären, -arteriellen und -venösen Plasmazellen verfolgten wir bei insgesamt kleiner Zahl und nicht aussagekräftigen Ergebnissen nicht weiter.

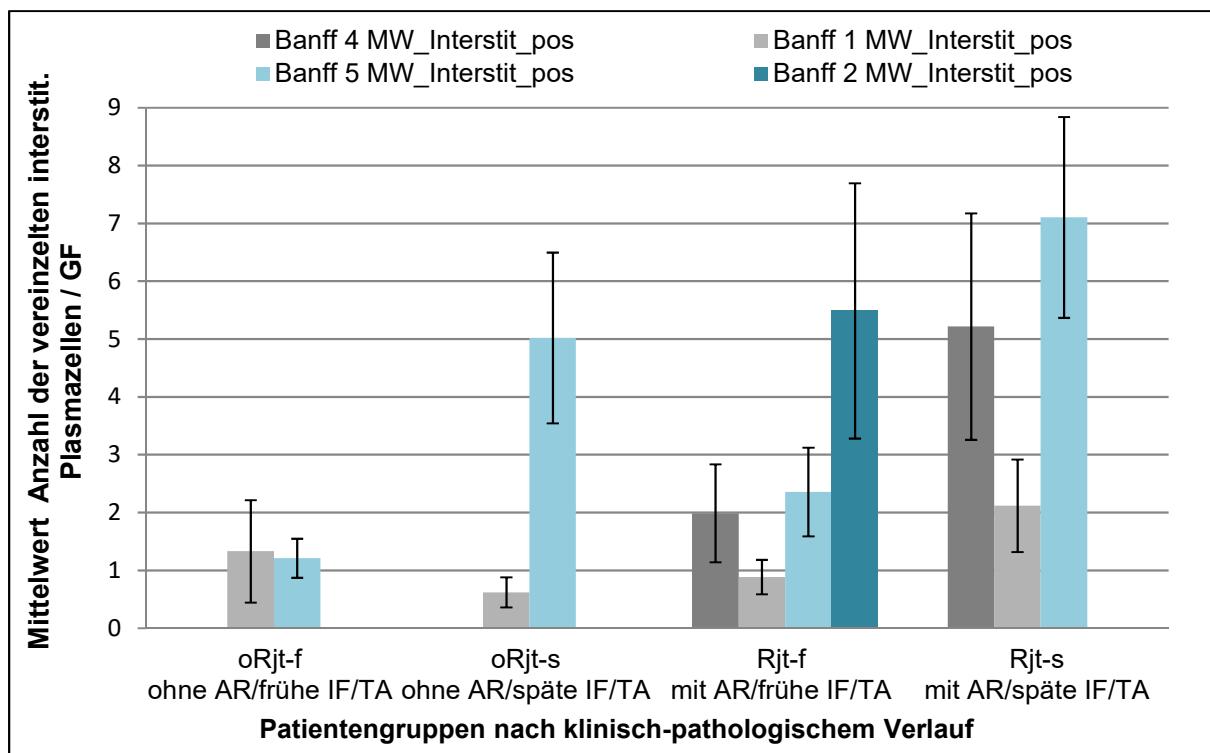


Abbildung 33: Anzahl der vereinzelten interstitiellen Plasmazellen im Vergleich

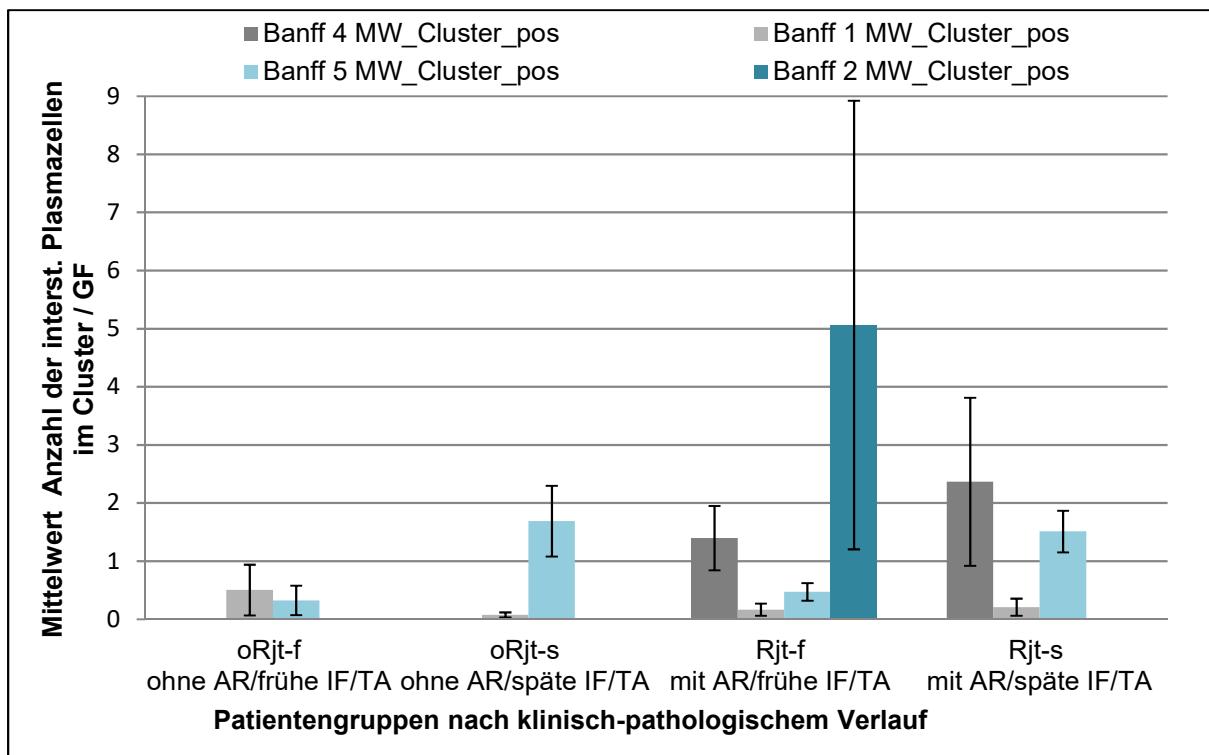


Abbildung 34 Anzahl der interstitiellen Plasmazellen im Cluster im Vergleich

3.4.1. VERLAUF OHNE INITIALE ABSTOßUNG (ORJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-f

Zwischen der Anzahl der CD138-positiven Zellen in Gewebeproben mit Banff 1 und Banff 5 findet sich weder bei den vereinzelten Zellen ($1,33 \pm 0,89$ vs. $1,21 \pm 0,34$; $p = 0,90$) noch im Cluster ($0,50 \pm 0,44$ vs. $0,32 \pm 0,25$; $p = 0,73$) ein signifikanter Unterschied.

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe oRjt-s

Zum späten Zeitpunkt zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg der Plasmazellen. Es handelt sich um einen signifikanten Unterschied zwischen Banff 1 und Banff 5, sowohl bei den vereinzelten Zellen ($0,62 \pm 0,26$ vs. $5,02 \pm 1,48$; $p = 0,01$) als auch im Cluster ($0,08 \pm 0,04$ vs. $1,69 \pm 0,61$; $p = 0,02$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe oRjt-f und oRjt-s

Vergleicht man die Gewebeproben mit dem histopathologischen Befund „Banff 5“ zum frühen und späten Zeitpunkt so lässt sich einzeln ($1,21 \pm 0,34$ vs. $5,02 \pm 1,48$; $p = 0,03$) eine Signifikanz, im Cluster ($0,32 \pm 0,25$ vs. $1,69 \pm 0,61$; $p = 0,054$) ein starker Trend vermerken.

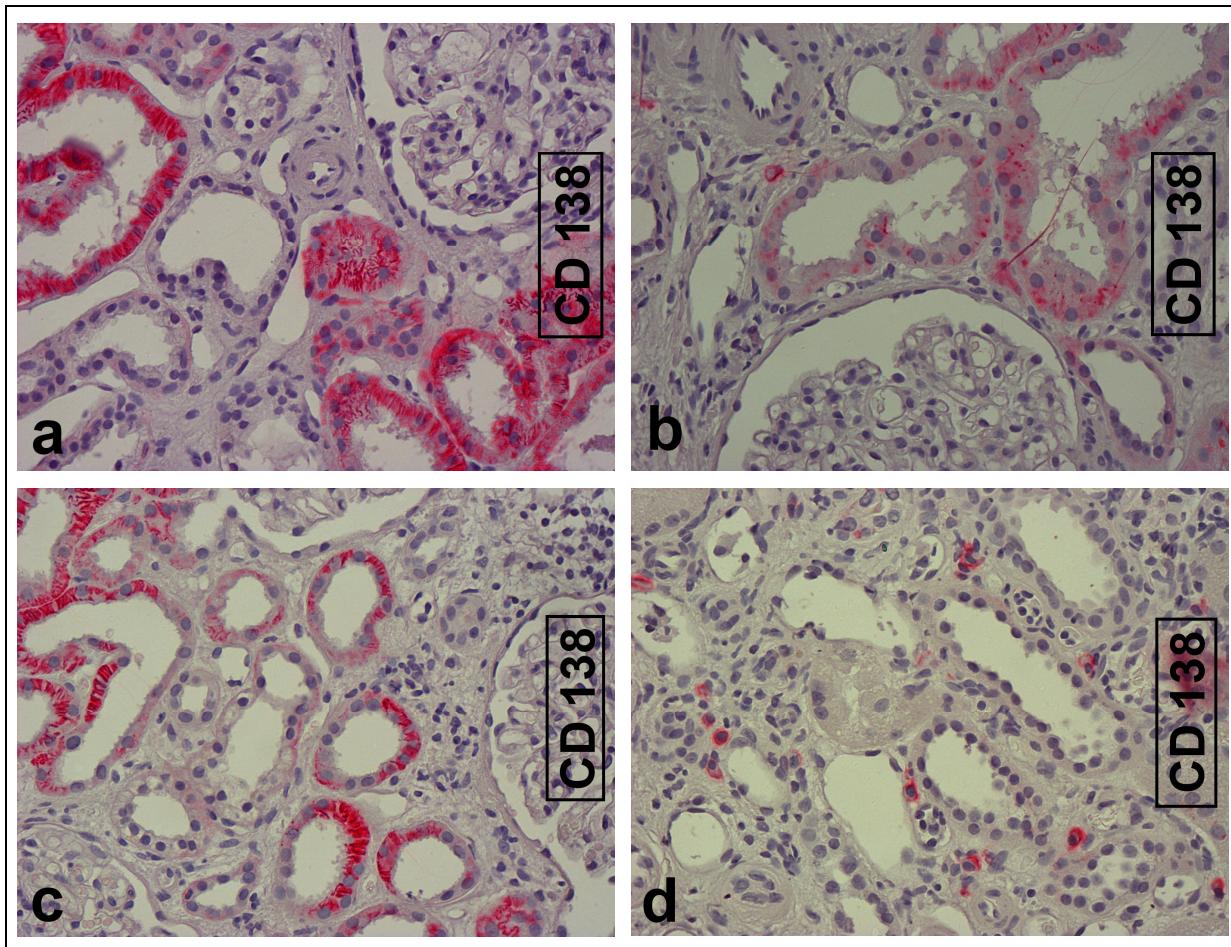


Abbildung 35 Ergebnis CD138 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt)
a Banff 1, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f). **b** Banff 5, frühe IF/TA (Gruppe oRjt-f) **c** Banff 1, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s) **d** Banff 5, späte IF/TA (Gruppe oRjt-s)

3.4.2. VERLAUF MIT INITITALER ABSTOßUNG (RJT)

Frühe IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-f

Die im Moment der akuten Abstoßung (Banff 4) vorhandenen interstitiellen Plasmazellen gehen nach Lösung der Abstoßungsreaktion (Banff 1) im Cluster ($1,40 \pm 0,55$ vs. $0,17 \pm 0,11$; $p = 0,04$) signifikant, bei den vereinzelten Zellen ($1,99 \pm 0,85$ vs. $0,89 \pm 0,29$; $p = 0,23$) ohne statistischen Zusammenhang zurück. In Nieren mit chronischem Transplantatschaden (Banff 5) steigen die CD138-positiven wieder an: bei den vereinzelten Zellen ($0,89 \pm 0,29$ vs. $2,35 \pm 0,76$; $p = 0,08$) zeigt sich ein Trend, im Cluster ($0,17 \pm 0,11$ vs. $0,47 \pm 0,15$; $p = 0,11$) gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen Banff 1 und Banff 5.

Obwohl die Plasmazellen im Mittel am häufigsten in Banff 2 vorkommen (vereinzelt $5,49 \pm 2,21$; im Cluster $5,06 \pm 3,86$) zeigt sich aufgrund des sehr hohen Standardfehlers kein statistischer Zusammenhang zwischen der Zellzahl in der akuten humoralen Abstoßung und den

anderen Banff-Klassen. ($p_{1_vereinz} = 0,08$, $p_{1_Clust} = 0,25$, $p_{4_vereinz} = 0,17$, $p_{4_Clust} = 0,38$, $p_{5_vereinz} = 0,21$, $p_{5_Clust} = 0,27$)

Innerhalb der Gruppe zeigt der früheste (Banff 4) im Vergleich zum spätesten (Banff 5) Biopsiezeitpunkt weder im Cluster ($1,40 \pm 0,55$ vs. $0,47 \pm 0,15$; $p = 0,11$) noch unter den vereinzelten Plasmazellen ($1,99 \pm 0,85$ vs. $2,35 \pm 0,76$; $p = 0,75$) einen Unterschied. Die Zellen im Cluster sinken absolut auf ein Drittel ab, die vereinzelten Plasmazellen steigen leicht an.

Späte IF/TA – Vergleich innerhalb Gruppe Rjt-s

Hier lässt sich sowohl bei den vereinzelten, interstitiellen Plasmazellen ($5,21 \pm 1,96$ vs. $2,12 \pm 0,80$; $p = 0,15$) als auch bei jenen im Cluster ($2,37 \pm 1,45$ vs. $0,21 \pm 0,14$; $p = 0,15$) ein Rückgang der Zellzahl von Banff 4 zu Banff 1 verzeichnen, dieser ist jedoch nicht signifikant. Aus der Situation der gelösten Abstoßung heraus (Banff 1) beobachtet man dann bei einem Eintritt der IF/TA nach > 1 Jahr eine deutliche Erhöhung der CD138-postiven Zellen in Banff 5-Biopsien. Vereinzelte ($2,12 \pm 0,80$ vs. $7,10 \pm 1,74$; $p = 0,02$) und Zellen im Cluster ($0,21 \pm 0,14$ vs. $1,51 \pm 0,36$; $p = 0,003$) steigen signifikant.

Ein signifikanter Unterschied innerhalb dieser Gruppe lässt sich beim Vergleich des frühesten gegenüber dem spätesten Zeitpunkt (Banff 4 versus Banff 5) nicht beobachten: Im Cluster gehen die Plasmazellen zurück ($2,37 \pm 1,45$ vs. $1,51 \pm 0,36$; $p = 0,57$), die vereinzelten infiltrierenden Zellen steigen im Mittel an ($5,21 \pm 1,96$ vs. $7,10 \pm 1,74$; $p = 0,47$).

Vergleich von Banff 5 in Gruppe Rjt-f und Rjt-s

Eine hohe Signifikanz beobachtet man auch beim Vergleich der Banff 5-klassifizierten Biopsien zum frühen bzw. späten Eintritt des Transplantatschadens. Die vereinzelten ($2,35 \pm 0,76$ vs. $7,10 \pm 1,74$; $p = 0,02$), aber auch die interstitiellen Plasmazellen im Cluster ($0,47 \pm 0,15$ vs. $1,51 \pm 0,36$; $p = 0,01$) sind zum späten Zeitpunkt signifikant höher.

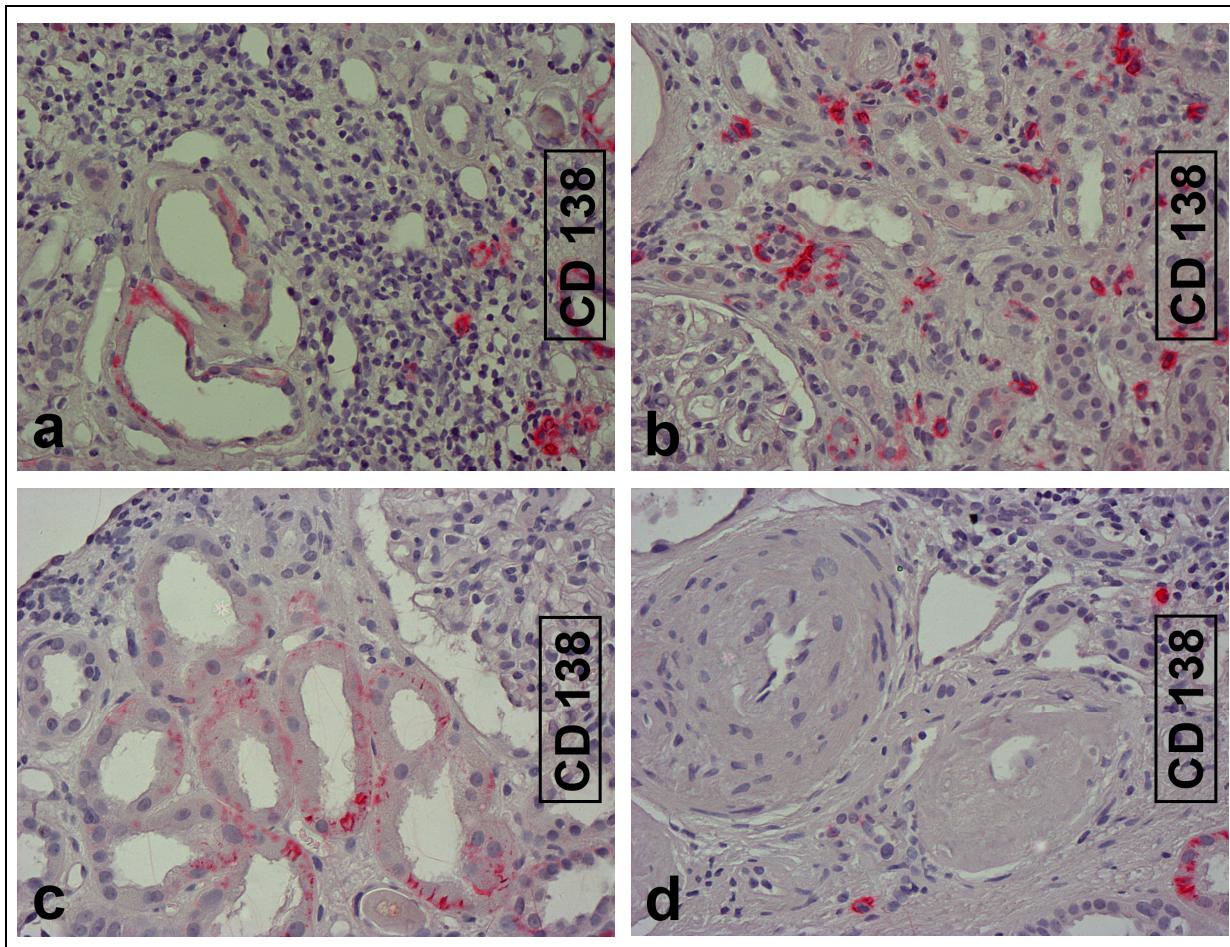


Abbildung 36 Ergebnis CD138 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f). **a** akute zelluläre Abstoßung (Banff 4I, Gruppe Rjt-f). **b** akute humorale Abstoßung (Banff 2, Gruppe Rjt-f). **c** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-f) **d** IF/TA \leq 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-f)

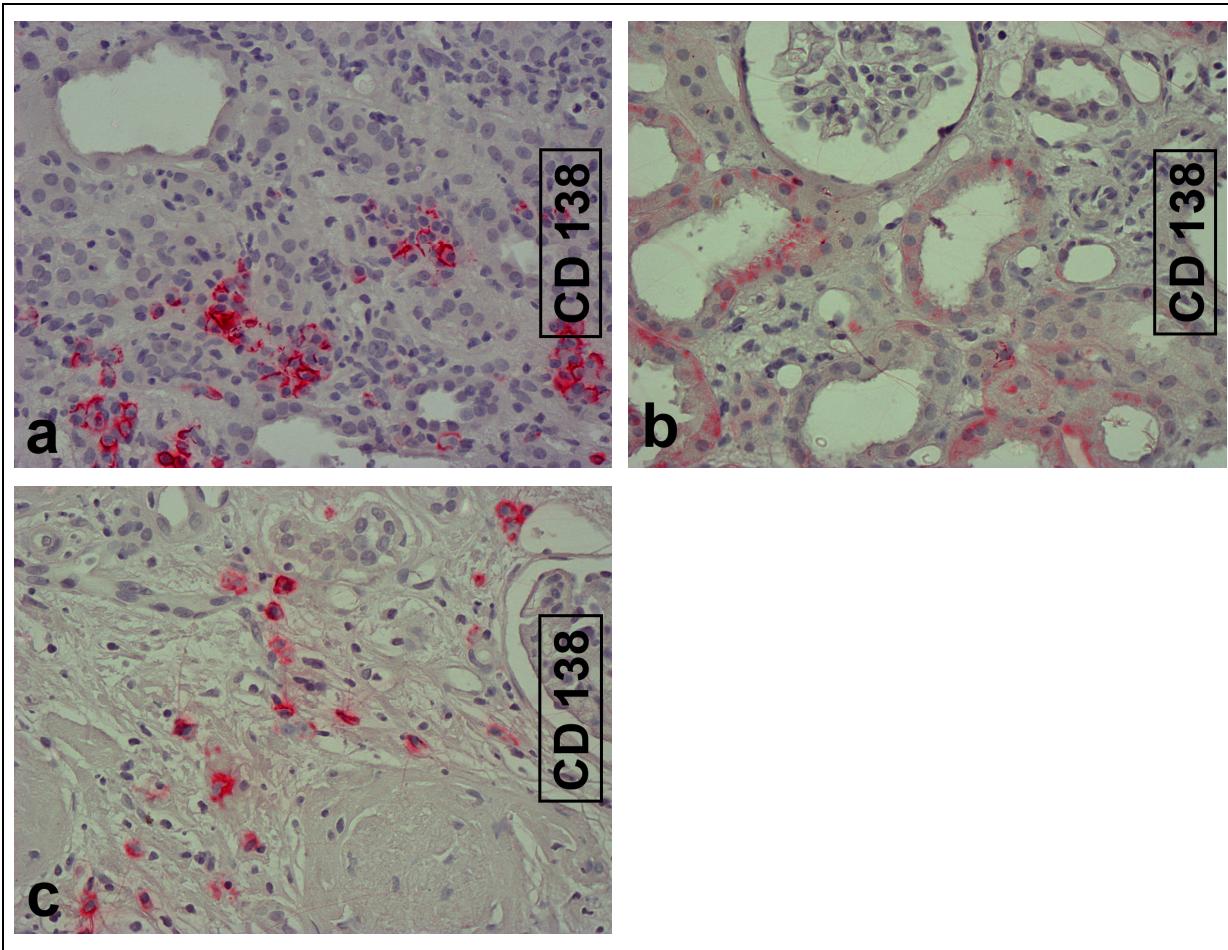


Abbildung 37 Ergebnis CD138 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s) **a** Akute zelluläre Abstoßung (Banff 4IIA, Gruppe Rjt-s) **b** Lösung der Abstoßung (Banff 1, Gruppe Rjt-s) **c** IF/TA > 1 Jahr (Banff 5, Gruppe Rjt-s)

Gruppe	Banff	CD138-positive. Zellen / GF ± SEM	p
interstitiell vereinzelt			
oRjt	ohne Abstoßung		
oRjt-f	frühe IF/TA	1 vs 5 1,33 ± 0,89 vs. 1,21 ± 0,34	0,90
oRjt-s	späte IF/TA	1vs 5 0,62 ± 0,26 vs. 5,02 ± 1,48	0,01
oRjt-f vs. oRjt-s	früh vs. spät	5 vs 5 1,21 ± 0,34 vs. 5,02 ± 1,48	0,03
Rjt	mit Abstoßung		
Rjt-f	frühe IF/TA	4 vs 1 1,99 ± 0,84 vs. 0,89 ± 0,30	0,23
		1 vs 5 0,89 ± 0,30 vs. 2,35 ± 0,77	0,08
		4 vs 5 1,99 ± 0,84 vs. 2,35 ± 0,77	0,75
		2 vs 1 5,49 ± 2,21 vs. 0,89 ± 0,30	0,08
		2 vs 4 5,49 ± 2,21 vs. 1,99 ± 0,84	0,17
		2 vs 5 5,49 ± 2,21 vs. 2,35 ± 0,77	0,21
Rjt-s	späte IF/TA	4 vs 1 5,21 ± 1,96 vs. 2,12 ± 0,80	0,15
		1 vs 5 2,12 ± 0,80 vs. 7,10 ± 1,74	0,02
		4 vs 5 5,21 ± 1,96 vs. 7,10 ± 1,74	0,47
Rjt-f vs. Rjt-s	früh vs. spät	5 vs 5 2,35 ± 0,77 vs. 7,10 ± 1,74	0,02

Tabelle 11 Ergebnisübersicht CD138 positive, interstitielle Zellen: vereinzelt

Gruppe	Banff	CD138-positive. Zellen / GF ± SEM	p
interstitiell im Cluster			
oRjt	ohne Abstoßung		
oRjt-f	frühe IF/TA	1 vs 5 0,50 ± 0,44 vs. 0,32 ± 0,25	0,73
oRjt-s	späte IF/TA	1 vs 5 0,08 ± 0,04 vs. 1,69 ± 0,61	0,02
oRjt-f vs. oRjt-s	früh vs. spät	5 vs 5 0,32 ± 0,25 vs. 1,69 ± 0,61	0,055
Rjt	mit Abstoßung		
Rjt-f	frühe IF/TA	4 vs 1 1,40 ± 0,55 vs. 0,17 ± 0,11	0,04
		1 vs 5 0,17 ± 0,11 vs. 0,47 ± 0,15	0,11
		4 vs 5 1,40 ± 0,55 vs. 0,47 ± 0,15	0,11
		2 vs 1 5,06 ± 3,86 vs 0,17 ± 0,11	0,25
		2 vs 4 5,06 ± 3,86 vs 1,40 ± 0,55	0,38
		2 vs 5 5,06 ± 3,86 vs 0,47 ± 0,15	0,27
Rjt-s	späte IF/TA	4 vs 1 2,37 ± 1,45 vs. 0,21± 0,15	0,15
		1 vs 5 0,21± 0,15 vs. 1,51 ± 0,36	0,003
		4 vs 5 2,37 ± 6,93 vs. 1,51 ± 0,36	0,57
Rjt-f vs. Rjt-s	früh vs. spät	5 vs 5 0,47 ± 0,15 vs. 1,51 ± 0,36	0,01

Tabelle 12 Ergebnisübersicht CD138 positive, interstitielle Zellen: im Cluster

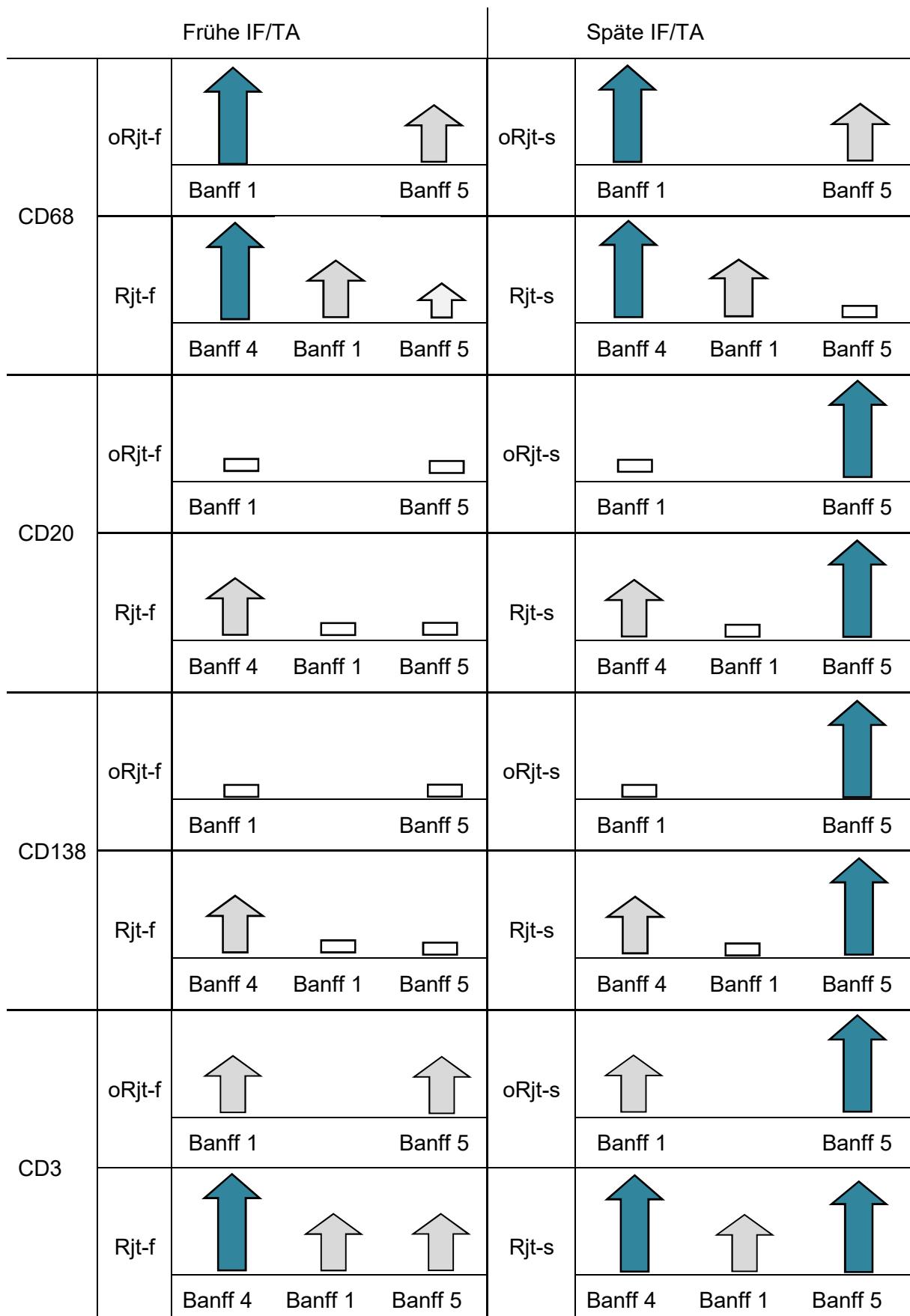


Tabelle 13 Schematische Zusammenfassung aller Ergebnisse. Die Anordnung von links nach rechts deutet den zeitlichen Verlauf an, die Pfeilgröße entspricht der Höhe der Zellzahl. z.B. CD68, Gruppe Rjt-f: zunächst eine hohe Zellzahl in Banff 4 -Biopsien, dann ein stetiger Abfall der Zellen über Banff 1 bis Banff 5.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit werden die Rollen der wichtigsten inflammatorischen Zelltypen und das Ausmaß ihrer Immigration ins Transplantat im Rahmen der Entwicklung eines chronischen Transplantatschadens untersucht. Durch die standardisierte Gewinnung von Protokoll- und Indikationsbiopsien in der Nachsorge nierentransplantiert Patienten in Regensburg war es zum Einen möglich die Bedeutung der immigrierenden Immunzellen in histologisch und klinisch „gesunden“ Transplantaten wie auch in der Situation der akuten Abstoßung zu analysieren.

Zusätzlich ergab sich daraus die Möglichkeit die vermeintlich homogene Gruppe „IF/TA“ nach einem zeitlichen Kriterium näher zu untergliedern. Neben der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs ermöglicht die Unterscheidung der Gruppen anhand von An- oder Abwesenheit einer vorausgehenden akuten zellulären Abstoßung einen Rückschluss auf die Auswirkung von immunologischen und nicht-immunologischen Faktoren auf die Genese des chronischen Transplantatschadens.

4.1 B-LYMPHOZYTEN UND PLASMAZELLEN

Wie bereits unter 1.4.2. „*Einflussfaktoren*“ erläutert, führen sowohl Alloantigen-abhängige als auch -unabhängige Vorgänge zum histopathologischen Befund einer IF/TA (77). Im Folgenden betrachten wir zunächst die Ergebnisse der B-Lymphozyten und Plasmazellen dieser Arbeit in Fraktion Rjt, d.h. in den beiden Gruppen mit stattgehabter akuter Abstoßung, die dann im zeitlichen Verlauf innerhalb (Rjt-f) bzw. nach einem Jahr (Rjt-s) Veränderungen gemäß einer IF/TA entwickeln. Durch die vorausgehende akute Abstoßung kann angenommen werden, dass immunologische Prozesse im Transplantat angestoßen wurden. Im zweiten Abschnitt wird dann Fraktion oRjt besprochen. Hier kam es im Vorfeld zu keiner Abstoßung.

4.1.1. VORANGEGANGENE AKUTE ABSTOßUNG UND IF/TA-ENTWICKLUNG (RJT)

B-Lymphozyten in akuter Abstoßung

In den Biopsien mit akuter zellulärer Abstoßung (Banff 4) fanden wir eine deutlich erhöhte B-Zell-Immigration. In der Gruppe Rjt-f ist dieser Anteil signifikant höher als nach Lösung der Abstoßung (Banff 1) ($p = 0,007$). Fanden B-Lymphozyten lange Zeit keine Beachtung im Rahmen der Entwicklung einer akuten zellulären Abstoßung (129), so arbeiteten Sarwal et al (130) erstmals die Bedeutung dieser Zellen heraus.

Dies wurde seither mehrfach bestätigt, (128, 131, 132). Eine Möglichkeit der Einflussnahme auf die Entstehung einer Abstoßungsreaktion ist u.a. die Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Die aktivierte B-Zelle stimuliert hierüber die Proliferation der CD4⁺ T-Lymphozyten und spielt daher eine Schlüsselrolle in der Genese der akuten zellulären Abstoßung (133). Darüber hinaus konnte sogar ein ganz erheblicher Einfluss der B-Zellen auf Steroidresistenz und insgesamt schlechteres klinisches Outcome nachgewiesen werden (130, 134, 135).

Ungeachtet dessen wird dieses Ergebnis in anderen Studien widerlegt (80), neuere Arbeiten weisen gar auf einen protektiven Effekt der B-Zellen auf das Transplantat hin (136, 137).

Plasmazelle in akuter Abstoßung

Des Weiteren untersuchten wir die Biopsien mit akuter zellulärer Abstoßung (Banff 4) auf die Anwesenheit CD138⁺-Zellen. Anhand der Verteilung der Plasmazellen im Interstitium legten wir eine Unterscheidung in „vereinzelte Zellen“ und „Zellen im Cluster“ (> 10 Zellen) fest.

In den als Banff 4 klassifizierten Proben, fand sich in beiden Gruppen (Rjt-f und Rjt-s) als auch in beiden Verteilungsmustern (vereinzelt/geclustert) eine höhere Zahl an Plasmazellen als in gesunden Nieren (Banff 1). In Gruppe Rjt-f war dieser Unterschied in der Clusteranordnung signifikant ($p = 0,04$).

Das vermehrte Vorkommen von metabolisch aktiven Plasmazellen in AR demonstriert auch die Arbeitsgruppe um Tsai und assoziierte damit eine besonders schlechte Graftfunktion (138). Hauptsächlich wird ihr Vorkommen jedoch mit der akuten humoralen Abstoßung (ABMR) assoziiert. Die Plasmazellen führen dort lokal zu einer Antikörperproduktion (139). In unseren Resultaten bestätigt sich dies: In den Biopsien mit akuter Antikörper-vermittelter Abstoßung (Banff 2), die wir nur für Gruppe Rjt-f untersuchen konnten, zeigt sich eine äußerst hohe Plasmazzahl, etwa dreimal höher als in der Situation einer akuten zellulären Abstoßung (Banff 4). Dieser Zusammenhang ist nicht signifikant, was aber vor allem auf die limitierte Zahl der untersuchten Biopsien zurückzuführen sein dürfte.

Episoden akuter Abstoßung und dabei vor allem die spätauftretende (je nach Autor > 3, > 6 Monate oder > 1 Jahr nach NTx) stellen einen der wichtigsten Risikofaktoren für eine nachfolgende chronische Abstoßungsreaktion dar (140, 141). Dennoch - in einer großangelegten, retrospektiven Studie veränderte sich die Gesamtzahl an Fällen von IF/TA ungeachtet einer stark rückläufigen Rate an AR kaum (142); die akute Rejektion scheint demnach nicht der einzige Einflussfaktor auf die Entwicklung eines chronischen Transplantatverlustes zu sein.

B-Zelle in IF/TA mit vorangegangener AR

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der näheren Betrachtung der infiltrierenden Zellen im Rahmen der Entwicklung eines chronischen Transplantatschadens. Wir untergliederten die Proben mit dem Nachweis einer IF/TA weiter in eine frühe und eine spät-aufgetretene Schädigung. In beiden Gruppen (Rjt-f und Rjt-s) konnten wir einen Nachweis von erhöhten B-Zellen (und auch Plasmazellen) erbringen. Dies wird (für CD20) in früheren Arbeiten bestätigt (131, 132), wobei bei diesen Autoren die B-Lymphozyten in der AR einen höheren Stellenwert einnehmen als in der chronischen Abstoßung. Dies untermauern die Resultate dieser Arbeit für den CAI innerhalb des ersten Jahres (Rjt-f). Hier finden wir zwar ein Auftreten von CD20-Positivität, allerdings ist dieses relativ gering. Anders steht es jedoch um den spät auftretenden chronischen Funktionsverlust: In den Proben, die mehr als ein Jahr nach Transplantation eine IF/TA zeigen, konnten wir einen massiven Anstieg der B-Zellen nachweisen. Aber auf welche Weise beeinflussen B-Lymphozyten die Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung?

Chronisch humorale Abstoßung

Erst seit der 8. Banff-Konferenz im Jahr 2005 wird der Befund „Chronische Rejektion“ in eine *chronisch aktive T-Zell-vermittelte* und eine *chronisch aktive Antikörper-vermittelte* Abstoßung unterteilt (81).

Nachdem schon in den 70iger Jahren der Zusammenhang zwischen Donor-spezifischen Antikörpern (DSA) und chronischer Allograftnephropathie vermutet wurde (88), gelang es zum Jahrtausendwechsel schließlich den Beweis für eine humorale Genese der IF/TA-Veränderungen zu erbringen (89, 143). Die immense, auch prognostische Bedeutung von Antikörpern wurde spätestens durch die Langzeitstudie von Mao, Terasaki et al. und Terasaki, Ozawa et al. 2007 bescheinigt. Transplantatversagen und chronische Abstoßung sind demnach eng mit dem serologischen Nachweis von DSA verbunden (144, 145). Die Rolle der B-Lymphozyten erschließt sich nun über ihre Fähigkeit sich weiter zu Plasmazellen zu differenzieren. Dementsprechend bilden sie durch die Möglichkeit der Antikörperproduktion eine Brücke zur „chronisch humoralen Abstoßung“ (CAMR) (133).

Neben dieser systemischen, humoralen Immunreaktion gegen die Transplantatalloantigene beschreiben Thaunat et al. lokale Vorgänge in der transplantierten Niere. Die Arbeitsgruppe beobachtet die Organisation von entzündlichem Infiltrat, vor allem B-Zell-Clustern, zu Lymphfollikeln in chronisch abgestoßenen Nierentransplantaten. Dieses sog. „tertiäre lymphatische Gewebe“ (TLT), angelehnt an die Morphologie des sekundären lymphatischen Gewebes, wie es beispielsweise in der Milz vorliegt, entwickelt sich in chronisch entzündetem Gewebe. Anders

als gewöhnliche lymphatische Organe hat es keinen Anschluss zu Lymphgefäßen und agiert damit unabhängig von der systemischen Antigen-Präsentation. Der Stimulus, der zum Aufbau und Erhalt des Lymphfollikels nötig ist entsteht im Milieu der chronischen Inflammation durch verschiedene Mediatoren, u.a. BAFF (146). Zusammengesetzt ist es aus einem B-lymphozytären Keimzentrum gemischt mit follikulär-dendritischen Zellen sowie einer Mantelzone aus T-Zellen und reifen dendritischen Zellen. Bemerkenswert ist dabei, dass sich der Fund rein auf chronisch abgestoßene Nieren beschränkt, früh entfernte Kontrollorgane mit Ischämie-Reperfusionschaden, AR oder malignen Veränderungen zeigten diese Umbauvorgänge nicht. Die genannten Keimzentren sind darüber hinaus funktionsfähig, bilden also Alloantikörper. Dies ermöglicht einen lokalen humoralen Prozess, der das Transplantat von innen schädigen kann (147). Weiterhin scheint der Reifegrad des TLT einen Einfluss auf die Dynamik der chronischen Rejektion zu haben. Nieren mit Lymphfollikel, die voll funktionsfähig sind, das heißt Gedächtniszellen und Antikörper ausbilden, zeigen in einer Studie mit explantierten Organen eine besonders kurze Überlebenszeit (148). Bisherige Studien zeigen folglich eine Schlüsselrolle von humoraler Immunität in der Genese der chronischen Schädigung allogen-transplantieter Nieren. Die B-Lymphozyten sind hierbei gemeinsam mit den Plasmazellen als funktionelle Einheit zu bewerten.

Plasmazellen in IF/TA

Wie unter 4.1.1 „*B-Zelle in IF/TA mit vorangegangener AR*“ dargestellt, zeigen Proben mit spätem Eintritt von chronischen Veränderungen eine deutlich stärkere CD20-Positivität als Biopsien mit früh aufgetretener IF/TA. Zwar ist diese Bewegung innerhalb der B-Lymphozyten, vermutlich aufgrund zu geringer Fallzahl, nicht signifikant. Bemerkenswerterweise verhalten sich aber die Plasmazellen in unseren Ergebnissen dazu nicht nur vollkommen analog, sondern zeigen darüber hinaus deutlich signifikante Unterschiede: Unabhängig vom Verteilungsmuster sind die Plasmazellen in Biopsien aus Banff-5-Nieren, die sich nach einem Jahr nach Transplantation entwickelt haben, signifikant zahlreicher als in Banff-5-Nieren aus dem ersten Jahr (CD138 : $p_{Rjt-s_einzeln} = 0,02$, $p_{Rjt-s_Cluster} = 0,01$).

In unserer Untersuchung zeigt sich keine besondere Stellung der Plasmazellen im Cluster (im Vergleich zu vereinzelten Zellen). Rein quantitativ sind sie in der Unterzahl und steigen in Banff 5 zum frühen und späten Zeitpunkt in den Gruppen mit vorangegangener Abstoßung absolut weniger an, wie es die vereinzelten in den entsprechenden Gruppen tun. Die Dynamik insgesamt ist jedoch identisch.

Als Zwischenbilanz aus den vorliegenden Ergebnissen in Zusammenschau mit den Erkenntnissen aus der Fachliteratur lässt sich daher ziehen, dass zum Einen B- gemeinsam mit Plasmazellen als funktionelle Einheit gewertet werden können, vor allem mit Blick auf die chronisch humorale Transplantatschädigung. Zum Anderen nehmen beiden Zellarten offenbar in der frühen Ausbildung von IF/TA-Veränderungen mit vorausgehender Episode von akuter Abstoßung einen deutlich geringeren Stellenwert ein als es in der späten Form der Fall ist.

4.1.2. NICHT-IMMUNOLOGISCHE FAKTOREN UND IF/TA-ENTWICKLUNG (oRjt)

Gruppe oRjt-f und oRjt-s der vorliegenden Arbeit sind durch das Fehlen einer akuten zellulären oder humoralen Abstoßung vor der Entwicklung der IF/TA-Veränderungen gekennzeichnet. Folglich nahmen keine Alloantigen-abhängigen, durchaus aber Alloantigen-unabhängige Faktoren Einfluss auf den posttransplantären Verlauf. Wir beobachten, dass in der früh eingetretenen Banff 5-Situation sowohl B- als auch Plasmazellen vernachlässigbar gering auftreten. Ganz im Gegensatz dazu verhält es sich beim späten Eintritt der IF/TA: Die B- und Plasmazellwerte steigen im Vergleich zum Ausgangswert der gesunden Banff 1-Nieren massiv an. (CD20: $p = 0,04$; CD138: $p_{\text{einzel}} = 0,01$, $p_{\text{Cluster}} = 0,02$). Ferner ist der Unterschied zwischen dem frühen gegenüber dem späten Eintritt von IF/TA in beiden Zellarten deutlich signifikant (CD20: $p = 0,03$; CD138: $p_{\text{einzel}} = 0,03$, $p_{\text{Cluster}} = 0,055$). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, woher all diese B-Lymphozyten stammen, wo doch kein immunologischer Trigger vorausgeht.

Wichtige nicht-immunologische Faktoren, die Risikofaktoren für nachfolgende chronische Schäden darstellen sind vielfach erforscht (siehe 1.4.2 „*Einflussfaktoren*“): u.a Ischämie/Reperfusion (I/R), Hirntod des Spenders, verspätete Transplantatfunktion (delayed graft function; DGF), hohes Spenderalter, junges Empfängeralter (79, 93–95) sowie Hypertension und Hyperlipidämie des Empfängers (96, 97).

Wie unter 1.4.2 „*Einflussfaktoren*“ besprochen, besteht ein Zusammenhang zwischen den nicht-immunologischen Einflüssen, wie Ischämie-Reperfusion und immunologischen Vorgängen. Der durch I/R vermittelte Gewebeschaden führt im Endothel zur Freisetzung freier Radikale und Chemokine, welche wiederrum immunologische Prozesse, wie das Einwandern von Immunzellen, begünstigen (149). Die Zytokinsekretion kann sogar schon vor der Transplantation im hirntoten Spender stattfinden (95). Diese proinflammatorischen Faktoren können im Verlauf zu einer Chronifizierung der Entzündung führen und damit Grundlage für eine chronische Transplantatschädigung sein (100). Andererseits wird die immunologische Komponente des Ischämireizes auch dadurch untermauert, dass I/R eng mit DGF und dies wiederum mit

erhöhtem Risiko für akute Abstoßung vergesellschaftet ist (94). Eine akute Rejektion und hierbei vor allem die späte AR wiederrum, stellt einen wichtigen Risikofaktor für die chronische Allograftdysfunktion dar (78, 79).

Das Auslösen immunologischer Kaskaden durch z.B. Ischämie-Reperfusion könnte also einen potenziellen Ursprung der B-Zellinfiltration darstellen. Dazu passen die Erkenntnisse von Solini und Kollegen: Im Rattenmodell zeigen sie, dass eine verlängerte Ischämiezeit in den Allotransplantaten eine erhöhte B-Zellaktivität mit darauf folgender früherer Entwicklung von typischen Zeichen einer chronisch-humoralen Abstoßung auslöst. Daneben geben erhöhte T-Zellen auch Hinweise auf beschleunigte zelluläre Abstoßung (150). Die B-Zellen formten dabei Cluster, was laut Solini et al. in Verbindung mit der Ausbildung von „tertiär lymphatischem Gewebe“ stehen könnte (147).

Was durch diesen Zusammenhang jedoch noch nicht erklärt wird ist, warum sich die Menge an infiltrierenden B- und Plasmazellen zum frühen und späten Zeitpunkt unterscheiden, obwohl von gleichmäßigen Bedingungen bei der Transplantation etc. auszugehen ist und somit alle Transplantate den gleichen nicht-immunologischen Risikofaktoren ausgesetzt sind. Zum Anderen zeigen auch die Transplantate mit akuter Abstoßung in der Vorgeschichte exakt die gleiche Diskrepanz zwischen früher und später IF/TA. Handelt es sich also beim früh- bzw. spät-eintretenden chronischen Transplantatschaden um zwei komplett verschiedene Entitäten? Die Untersuchung von Makrophagen und T-Lymphozyten geben darauf nähere Hinweise.

4.2 T-LYMPHOZYTEN

Im Folgenden werden zunächst die nicht-immunologischen Faktoren im Zusammenhang mit T-Lymphozyten beleuchtet. Danach gehe ich auf die Wirkung der gängigen Immunsuppressiva auf die T-Zellimmunität ein, um am Ende mit den Ergebnissen aus der CD3-Messung dieser Arbeit einen Zusammenhang herzustellen.

4.2.1. NICHT-IMMUNOLOGISCHE FAKTOREN UND IF/TA-ENTWICKLUNG (oRjt)

In Gruppe oRjt-f und oRjt-s fanden sich in histologisch gesunden Nieren (Banff 1) viele T-Lymphozyten. Da keinerlei Abstoßungsreaktion in der Vorgeschichte in Fraktion oRjt ablief, sind andere Faktoren anzunehmen, die zu dieser Infiltration führen. So schildern verschiedene Quellen den Zusammenhang zwischen T-Zellinfiltration und nicht-immunologischen Einflüssen wie Ischämie-Reperfusion (128, 151). Renale Zellen, vor allem Tubulus- und Endothelzellen exprimieren im Anschluss an den Ischämereiz MHC II-Moleküle, was sie empfänglicher

für Alloantigenerkennung und demzufolge auch T-Zell-Aktivierung macht (152). Laut Ascon et al handelt es sich bei der Einwanderung von T-Lymphozyten nach I/R um keinen kurzfristigen Effekt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese lange Zeit bestehen bleibt und die damit verbundene Zytotoxische und Chemokinausschüttung zu strukturellen Veränderungen führt (153), die im Sinne einer beginnenden IF/TA gewertet werden können. Schließlich ist der Schaden durch Ischämie-Reperfusions ein bekannter Risikofaktor für chronische Transplantatnephropathie (154).

Wenngleich alloantigen-unabhängige Faktoren nicht unerheblich für die Entwicklung von chronischen Schäden an der Transplantatniere sind, gilt der Fokus dennoch der immunologischen Genese. Obata et al. finden in ihren Untersuchungen eine ausgeprägte und gleichwertige T-Zellinfiltration in CAI und AR (56). Auch in der vorliegenden Studie konnten wir hohe Zellzahlen beobachten, die sich in den entsprechenden Biopsien (Banff 4 und Banff 5) nicht signifikant unterscheiden. T-Lymphozyten scheinen in beiden Formen der Abstoßung eine wesentliche Funktion einzunehmen.

4.2.2. VORANGEGANGENE AKUTE ABSTOßUNG UND IF/TA-ENTWICKLUNG

(RJT)

Wie unter 1.2.3 „*Allogenetische Erkennung*“ erläutert, gibt es zwei Signalwege der T-Zellimmunität, den direkten und den indirekten. Über den direkten CD4⁺ Th1-vermittelten Weg werden zytotoxische T-Lymphozyten und Makrophagen aktiviert; es entsteht eine akute T-zellvermittelte Abstoßung (55, 56). Dagegen fördern die CD4⁺ Th2-Zellen die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und bilden darüber die Verbindung zur humoralen Immunantwort. Ob der indirekte Weg eine wesentliche Bedeutung für die Entstehung einer chronischen Transplantatnephropathie hat, ist umstritten. Viele Arbeiten bestätigen diese These (55, 155, 156), nur wenige Untersuchungen kamen zu dem Schluss, dass auch hier die direkte Reaktion und damit die zelluläre Immunität entscheidend sei (56).

Akute Abstoßung

Vorliegende Ergebnisse lassen erwartungsgemäß (123) eine hohe T-Zellinfiltration in der akut-zellulären Abstoßung (Banff 4) erkennen. Allerdings weist auch die akute humorale Abstoßung (Banff 2) in Gruppe Rjt-f dieses Ergebnis auf. Dieser Fund stimmt mit der Annahme überein, dass die aktuellen Banff-Kriterien die akute Antikörper-vermittelte Abstoßung nur unvollständig wiederspiegeln. Es wurde nachgewiesen, dass ein erheblicher Anteil der ABMR durchaus

eine zelluläre Komponente aufweisen, wodurch sich eher die Bezeichnung „mixed AMR“ anbietet (157, 158).

Immunsuppressive Therapie

Die in unsere Studie eingeschlossenen Patienten wurden leitliniengemäß immunsuppressiv behandelt (siehe 1.2.4 „*Immunsuppression*“), im Falle einer akuten TCMR (Banff 4) erhielten sie also eine Steroidstoßtherapie +/- depletierende Therapie, mittels ATG-Fresenius. Die Wirksamkeit dieser Therapie lässt sich im Anschluss an die AR in einem signifikanten Zellzahlabfall in Banff 1 ($Rjt-f p = 0,0504$; $Rjt-s p = 0,03$) abbilden. Dennoch bildet sich der T-Zellanteil hier nach Lösung der Abstoßung nicht unter das Niveau der Banff 1-Proben aus Gruppe oRjt-f und oRjt-s zurück, was der langfristigen Einwanderung ausgelöst durch u.a. Ischämie-Reperfusion entspricht (siehe 4.2.1 „*Nicht-immunologische Faktoren und IF/TA-Entwicklung*“).

Ferner wurde die Erhaltungstherapie mit Tacrolimus, MMF und Steroiden durchgeführt. Wie unter 1.2.4 „*Immunsuppression*“ beschrieben wirken diese Medikamente stark T-zellsuppressiv. Dennoch gelingt die erwünschte T-Zellhemmung in der Erhaltungsphase allem Anschein nach nur unzureichend: Weder vermag die Therapie im Einzelfall eine TCMR, noch die subklinisch stetig ansteigende T-Zellinfiltration zu verhindern. Letzteres manifestiert sich in den chronisch geschädigten Organen (Banff 5). Wie schon andernorts gezeigt (131), kommt es auch bei uns zu einer Vermehrung CD3-positiver Zellen in der Situation der chronischen Transplantatnephropathie. Dabei ist die Zunahme der T-Zellen zum frühen Zeitpunkt noch relativ gering, jedoch beobachten wir in der späten IF/TA der Fraktionen oRjt und Rjt eine deutliche Steigerung ($oRjt-f: p = 0,15$; $oRjt-s: p = 0,07$; $Rjt-f: p = 0,44$; $Rjt-s: p = 0,16$). Eben diese Dynamik beobachten wir auch in der Kategorie der B- und Plasmazellen (siehe 4.1 „*B-Lymphozyten und Plasmazellen*“).

Vor diesem Hintergrund stellt sich nun die Frage, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Grad der T-Zellsuppression und der B-Zellaktivität besteht.

Hierfür konnte in den 90iger Jahren in verschiedenen Arbeitsgruppen der Nachweis am Tiermodell und auch an humanen Nieren erbracht werden (159–162). Die etablierten Medikamente sind demnach effektiv in der Vorbeugung und Behandlung der akuten zellulären Abstoßung, da sie bevorzugt die direkte Th1-vermittelte Immunreaktion hemmen. Die Th2-Reaktion wird demgegenüber jedoch nicht nur unzureichend unterdrückt, sondern gar gefördert. Folglich stimulieren die gängigen Immunsuppressiva die humorale Immunantwort über die Aktivierung der B-Lymphozyten und damit die Entstehung von chronischer Abstoßung. Mit Hilfe einer vollständigen Inhibierung der T-Lymphozyten durch Blockade der Costimulation, konnte die

Entstehung einer IF/TA im Tiermodell allerdings verhindert werden (Azuma 1996). Die unzureichende T-Zellunterdrückung scheint also Schlüssel zum Verständnis der chronischen Transplantatschädigung zu sein.

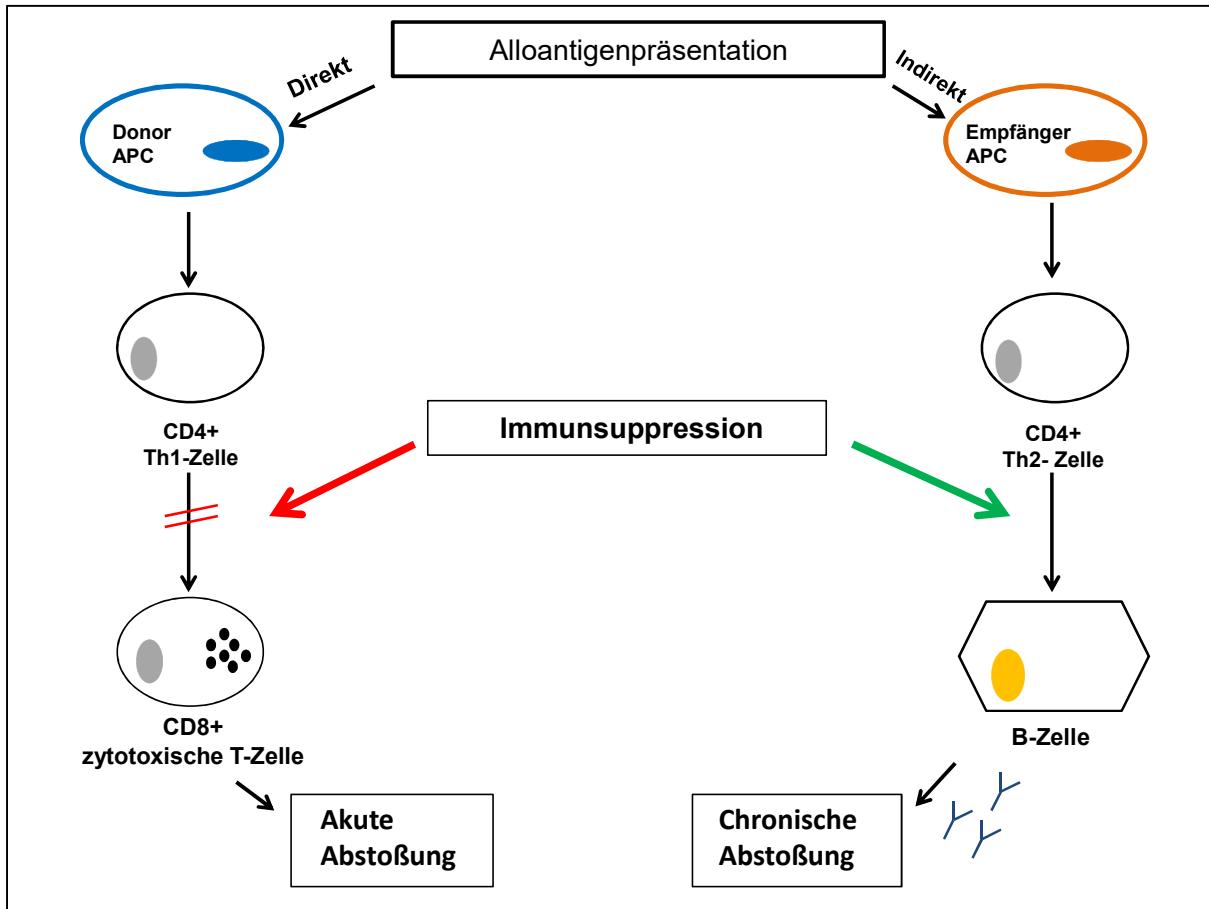


Abbildung 38 Direkte und indirekte Alloantigenpräsentation. Wirkung von Immunsuppressiva. Eigene Abbildung nach (58, 59)

Unsere Daten stützen diese These. B-, T- und Plasmazellen verhalten sich in unseren Ergebnissen analog. Die Zellzahlen in den Nieren mit früher IF/TA sind deutlich niedriger als in später IF/TA und das unabhängig davon, ob vorher ein immunologisches Ereignis in Form einer akuten Rejektion stattfand oder nicht. Dies untermauert die Annahme, dass die bekannten Risikofaktoren für Banff-5-Läsionen zwar initial unterschiedliche Effekte im Transplantat erzeugen. Ungeachtet ihrer Alloantigenabhängigkeit haben sie dann jedoch eine gemeinsame, immunologische Endstrecke (57).

Die im ersten Jahr nach Transplantation entwickelte chronische Transplantatnephropathie scheint sich dennoch auf zellulärer Ebene von der spät-entwickelten zu unterscheiden. Wie eben erläutert führt mangelnde medikamentöse T-Zellsuppression zu indirekter B-Zellaktivierung und damit zu humoraler Immunantwort und chronischer Abstoßung. Wir stellen auf Grundlage

der vorliegenden Resultate die Vermutung an, dass die immunsuppressive Therapie und damit die Blockade des Th2-Wegs in den Gruppen mit spät-eingetretener IF/TA (oRjt-s und Rjt-s) relativ ineffektiv war. Der indirekte Signalweg wurde somit freigegeben und es kam zu ausgeprägter B-Zellaktivierung und Plasmazellbildung. Diese löste nach mehr als einem Jahr nach Transplantation die chronische Abstoßung aus. Bei den Patienten aus den Gruppen oRjt-f und Rjt-f hingegen wirkten die Medikamente gut T-zellsuppressiv, sodass eine B-zellvermittelte Immunreaktion ausblieb. Offenbar handelt es sich, wie unsere Daten zur B- und Plasmazelle schon vermuten ließen, bei der frühen IF/TA nicht um einen B-zellvermittelten Prozess. Es stellt sich dementsprechend die Frage, welche anderen Mechanismen innerhalb des ersten Jahres für die Entstehung der frühen chronischen Transplantatschädigung entscheidend sind.

Um diese Theorie zu überprüfen, müssten weitere Untersuchungen angestellt werden, die in den Gruppen des frühen bzw. späten CAI die T-Zellaktivität im Th1- und Th2-Signalweg quantifizieren.

4.3 MAKROPHAGEN

4.3.1. MAKROPHAGEN UND AKUTE ABSTOßUNG (RJT)

Bereits vor 40 Jahren wurde die Rolle der Makrophagen für die akute zelluläre Abstoßung in der Literatur bekannt (163). Seither ließ sich mehrfach der Nachweis für eine große Zahl an infiltrierenden Makrophagen in der TCMR erbringen (128, 164, 165) (Hoffmann 2013, Zhang 2005, Burkhardt 1990). Auch unsere Ergebnisse zeigen in den Banff 4-Proben aus Gruppe Rjt-f und Rjt-s eine sehr hohe CD68-Positivität. Makrophagen kommt neben der rein quantitativen vor allem eine prognostische Bedeutung zu. Sie stellen einerseits einen höheren Risikofaktor als T-Zellen für die Entwicklung einer Transplantatdysfunktion in akuter zellulärer Abstoßung dar (166), zum Anderen gelten glomeruläre Monozyteninfiltrate als unabhängiger Vorhersageparameter für einen schlechten posttransplantären Verlauf (167).

Darüber hinaus fällt in den Ergebnissen aus der CD68-Messung die im Mittel höchste Makrophagenzahl in der Situation der akuten humoralen Abstoßung (Banff 2) auf. Eine Erklärung hierfür findet sich in der Literatur. In mehreren Studien ließen sich deutlich erhöhte Makrophageninfiltration in der humoralen Abstoßung nachweisen. Diese sind vor allem glomerulär und peritubulär lokalisiert (168, 169). Dieses, als „Transplantat-Glomerulitis“ bezeichnete Phänomen kommt in humoraler, typischerweise aber nicht in zellvermittelter Abstoßung vor und wird als „Surrogat-Parameter“ für akute, antikörpervermittelte Abstoßung gehandelt (168–170).

Aufgrund zu weniger Gewebeproben mit Banff 2 konnten diese bei uns nur sinnvoll in Gruppe Rjt-f untersucht werden.

4.3.2. NICHT-IMMUNOLOGISCHE FAKTOREN UND IF/TA-ENTWICKLUNG (oRjt)

Zunächst fällt in den vorliegenden Ergebnissen auf, dass Makrophagen in histologisch „gesunden“ Nieren (Banff 1) der Gruppen oRjt-f und oRjt-s deutlich erhöht sind. Makrophagen befinden sich auch in anderen Studien bereits wenige Minuten postoperativ in der Transplantatniere (151, 171). Da dies auch in isogenetisch transplantierten Nieren gezeigt werden konnte (128), ist davon auszugehen, dass vorwiegend nicht-immunologische Faktoren wie Ischämie-Reperfusion zum Einwandern der Zellen führen. Makrophagen wirken hierbei vermutlich als Initiator der Transplantatschädigung, schließlich führt eine komplett Depletion von Makrophagen im Rattenmodel zu einer Minimierung der normalerweise mit I/R einhergehenden Inflammation und Zytokinausschüttung (172). Jang et al. hingegen konnten einen protektiven Effekt der eingewanderten Makrophagen feststellen; durch Phagozytose würde der durch I/R entstandene Zelldetritus abgeräumt, eine Erholung des Organs somit gefördert (173). Demnach scheint der Einfluss der Makrophagen nach Reperfusion auf das Spenderorgan variabel zu sein.

M1 und M2 Subtypen

Makrophagen bilden einen essentiellen Teil des angeborenen Immunsystems. Ihre Hauptaufgaben umfassen einerseits Phagozytose von u.a. Erregern, nekrotischem Material oder Zelldetritus und andererseits die Antigenpräsentation. Außerdem gehört die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, etc. genauso zu ihrem Funktionsspektrum wie antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften (174).

Sie gehen aus Monozyten hervor und lassen sich immunhistochemisch mit dem Marker CD68 identifizieren (175). Trotzdem ist die Klasse der Makrophagen keineswegs homogen. Eine der bekanntesten Einteilungen ist jene in „klassisch-aktivierte“ (M1) und „alternativ-aktivierte“(M2) Makrophagen.

Während M1 Makrophagen proinflammatorisch und destruktiv wirken, sekretieren M2 Makrophagen antiinflammatorische Zytokine und begünstigen somit die Reparation geschädigten Gewebes (176). In dem durch u.a. Mantovani et al. vorgeschlagenen Modell grenzen sich die beiden Subtypen durch den Stimulus, der die Ausgangszelle zur Differenzierung anregt voneinander ab. Interferon- γ und Lipopolysaccharide (LPS) oder Tumornekrosefaktor (TNF) führen zu M1-Zellen. M2-Zellen werden hingegen noch weiter unterteilt: Interleukin-4 (IL-4) führt zu M2a, Kontakt mit Immunkomplexen und Toll-like-Rezeptor Liganden zu M2b und IL-10 bzw.

Glukokortikoide zu M2c (177).

In Nieren mit Ischämie-Reperfusionsschaden entwickelt sich, wie bereits unter 4.3.2 erwähnt, zeitnah ein makrozytäres Infiltrat. Dieses umfasst in den ersten 24 Stunden hauptsächlich den M1-Typ, welcher demzufolge eine Entzündung hervorruft. Nach 5-7 Tagen verändert sich das Profil jedoch vorwiegend zum M2-Typ, welcher das tubuläre Epithel dann wiederherstellt (178). Diese Resultate demonstrieren, dass Makrophagen kurzfristig schädigend auf das Transplantat einwirken, sich dann aber ein Wandel zu Gunsten eines regenerierenden Phänotyps vollzieht.

4.3.3. MAKROPHAGEN UND CHRONISCHER TRANSPLANTATSCHADEN

Wie anhand der bisherigen Ausführungen verdeutlicht, ist die Bedeutung der Makrophagen für die akute Abstoßungsreaktion sehr gut erforscht. Ganz anders ist dies beim chronischen Transplantatschaden (179). Betrachtet man in den vorliegenden Daten zunächst Fraktion oRjt (ohne vorangehende akute Abstoßung), so sieht man eine erhöhte CD68-Positivität zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation in Banff 1, die, wie in 4.3.2 besprochen, als Attribut der Ischämie-Reperfusion gewertet werden kann. Danach ergibt sich bei oRjt-f und oRjt-s ein Abfall der Makrophagen in den Biopsien mit chronischer Transplantatnephropathie. Dieser ist aufgrund der hohen Standardfehler nicht signifikant unterschiedlich zwischen dem frühen und späten Zeitpunkt.

Deutlicher wird es jedoch in Fraktion Rjt (vorangehende akute Abstoßung). Hier läuft in der frühen Phase nach Transplantation eine akute zelluläre Abstoßung ab, die die hierfür typische starke Erhöhung der Makrophagenzahl bedingt (siehe 4.3.1 „*Makrophagen und akute Abstoßung (Rjt)*“). Der sich nun anschließende signifikante Abfall der Makrophageninfiltration in Banff 1 (Rjt-f $p < 0,001$; Rjt-s $p = 0,02$) ist vordergründig u.a. der Steroidstoßtherapie der TCMR zuzuschreiben (180).

Eindrucksvoll ist dann allerdings das weitere Absinken der Makrophagenzahlen, obwohl sich eine chronische Transplantatschädigung (Banff 5) entwickelt. Gruppe Rjt-f beinhaltet die Patienten mit früh eingetretener IF/TA. Hier zeigt sich ein signifikanter Rückgang zwischen dem frühesten und dem spätesten Zeitpunkt (Banff 4 vs. Banff 5; $p = 0,03$). Treten die chronischen Veränderungen im Sinne einer IF/TA aber spät nach Transplantation auf (Rjt-s), so sind kaum mehr Makrophagen in Banff 5 nachweisbar (Banff 4 vs Banff 5; $p < 0,001$). Der Abfall der Makrophagen wird umso stärker, je später sich die chronischen Veränderungen einstellen. Vergleicht man Banff 5 gruppenübergreifend, so bestätigt sich dies erneut: CD68 ist zum späten Zeitpunkt signifikant niedriger als zum frühen (Rjt-f vs. Rjt-s $p = 0,007$).

In der Literatur zum Thema „Makrophagen in IF/TA“ finden sich nur wenige Studien. Diese zeigen im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten hohe Makrophagenzahlen in chronischer Allograftnephropathie (181, 182). Die IF/TA-Biopsien im Rattenmodell wurden nach maximal 16 Wochen erhoben, sodass hier von einer zu kurzen Beobachtungszeit auszugehen ist, in der die zeitliche Kinetik der Makrophagen noch nicht erfasst werden kann. Außerdem ist unklar in wieweit das Tiermodell hierbei mit der humanen Abstoßungsbiologie vergleichbar ist.

Frank et al untersuchten humane Nierenbiopsien ebenfalls auf CD68⁺-Zellen. Auch er findet im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine erhöhte Makrophagenpositivität (CD68) in den Proben mit chronischer Transplantatnephropathie. Da die Proben im Durchschnitt 51 Monate nach Transplantation gewonnen wurden liegt der Zeitpunkt also noch später als es bei uns der Fall ist (Gruppe oRjt-s 38 Monate und Gruppe Rjt-s 48 Monate). Wie in unseren Ergebnissen übersteigt die Makrophageninfiltration in akuter Abstoßung die Infiltration in CAN (131).

Wie im Kapitel 4.3.2 „*Nicht-immunologische Faktoren und IF/TA-Entwicklung*“ beschrieben wird, nehmen Makrophagen sowohl in akuter Abstoßung als auch nach I/R-Schaden zwar einerseits eine destruktive hauptsächlich aber eine regenerative Funktion im Transplantat ein. Ferner sind bei uns Makrophagen in chronisch geschädigten Nieren nur in kleiner Zahl vertreten und nehmen mit der Zeit sogar noch weiter ab. Diese Veränderung kann unabhängig von einer vorangehenden Abstoßung in allen vier Gruppen beobachtet werden und ist demzufolge kein rein alloantigen-abhängiges Phänomen. Immunologische Vorgänge sind sicherlich nicht völlig auszuklammern, dennoch überwiegt wohl der Faktor der zeitlichen Kinetik.

Es ist in Zusammenschau all dessen wahrscheinlich, dass Makrophagen als Antwort auf akute immunologische und nicht-immunologische Inflammationsvorgänge kurz nach der Transplantation in das Organ einwandern und diesen nach Beendigung des Abräumvorganges des entzündeten und zerstörten Gewebes wieder verlassen (151, 173).

Man könnte nun zu dem Schluss kommen, dass Makrophagen in keinem Zusammenhang mit der Genese der chronischen Transplantatschädigung stehen. Untersuchungen von Azuma et al. im Rattenmodell zeigen aber unter vollständiger Makrophagenhemmung eine deutliche Reduktion von interstitieller Fibrose, Glomerulosklerose und Proteinurie gegenüber der Kontrollgruppe. Wurde die Hemmung nach kürzerer Zeit wieder aufgehoben, so bildeten sich die genannten chronischen Veränderungen erneut aus (183). Makrophagen sind demnach sogar ganz entscheidend an der Entwicklung von IF/TA beteiligt. Dennoch sind sie laut unseren Erhebungen rein physisch nicht mehr im Organ vorhanden. Wir gehen also davon aus, dass Makrophagen zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation aufgrund eines unspezifischen Entzündungsgeschehens einwandern und dort einen Prozess in Gang setzen, der über kurz oder lang

einen chronischen Transplantatschaden hervorruft. Dies wäre beispielsweise über Zytokine möglich, welche B- und T-Lymphozyten im Hintergrund aktivieren. Die Makrophagen selbst verlassen, wie bereits erwähnt, nach erfolgreicher Phagozytose und Abklingen der Inflammation das Organ. Ein erster Hinweis darauf findet sich bei Pilmore et al., die als prädiktiven Faktor für eine späte chronische Transplantatnephropathie eine signifikant erhöhte Makrophagenzahl in der AR benannten (184).

Frühe chronische Transplantatschädigung

Wie aus der Diskussion der Ergebnisse der B- und T-Zellen (siehe 4.1 und 4.2) ersichtlich wird, entwickeln sich früh bzw. spät eintretende IF/TA auf grundlegend unterschiedliche Weise. Zum späten Zeitpunkt scheinen vornehmlich B-Zellmechanismen zu wirken, die u.a. über Plasmazelldifferenzierung und Antikörperbildung zu einer chronisch humoralen Abstoßung führen können. Zum frühen Zeitpunkt hingegen sieht es so aus, als ob B-Zellen keine gewichtige Rolle spielen. Geht man von obiger These aus, wonach Makrophagen zu einem frühen Zeitpunkt den Trigger für eine sich später ausbildende chronische Abstoßung darstellen, so könnte auf Grundlage der Erkenntnisse aus der B- und T-Zellanalyse eine weitere Schlussfolgerung gezogen werden: entstehen zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation chronische Veränderungen im Transplantat, so könnten für diesen Verlauf eben Makrophagen entscheidend sein.

In Einklang mit dieser Hypothese steht eine Beobachtung, die wir in Gruppe oRjt-f machen konnten. Hier finden sich zum frühen Zeitpunkt (Banff 1) außerordentlich viele Makrophagen, die dann, wie eben ausgeführt, in der frühen chronischen Transplantatnephropathie (Banff 5) deutlich zurückgehen. In Gruppe oRjt-s, bei der sich die IF/TA nach mehr als einem Jahr nach Transplantation entwickelt, sehen wir diese sehr hohen Makrophagenzahlen nicht. In beiden Fällen lief keine akute Abstoßung o.Ä. im Vorfeld ab, sodass hier kein Unterschied bezüglich der Voraussetzungen besteht. Es wäre also durchaus möglich, dass sich die chronischen Veränderungen unter dem Einfluss des erheblichen Makrophageninfiltrats bereits sehr schnell, nämlich innerhalb des ersten Jahres ausgebildet haben. Wir können dieser Theorie nur unzureichend auf den Grund gehen, da wir in den korrespondierenden Gruppen Rjt-f und Rjt-s die Makrophagen vor Eintritt der ersten akuten Abstoßung nicht erfassen konnten. Fände sich hier eine vergleichbar hohe Makrophagenimmigration, so könnte dies als weiterer Hinweis erachtet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit den ersten Nierentransplantationen vor etwa 60 Jahren konnten große Erfolge hinsichtlich der Überlebensrate im ersten Jahr verzeichnet werden. Das Langzeitüberleben hingegen konnte bisher weiterhin nicht wesentlich verbessert werden.

In der Banff-Klassifikation werden die Nierentransplantate anhand histologischer Merkmale in Gruppen eingeteilt. Im Bereich der akuten Abstoßung kann bereits seit längerer Zeit näher in zellulär- und humorale-vermittelte Abstoßung unterteilt werden. Der chronische Transplantatschaden hingegen, nach seinem histopathologischen Bild kurz IF/TA genannt (interstitial fibrosis and tubular atrophy), wurde bisher weitestgehend als homogene Gruppe bewertet. Ziel dieser Arbeit war es, diese näher zu analysieren und ggf. Untergruppen nach einem zeitlichen Kriterium ausfindig zu machen. Neben den genannten immunologischen Faktoren (akute zelluläre und humorale Abstoßung mit infiltrierenden Immunzellen) spielen auch nicht-immunologische Phänomene wie Ischämie / Reperfusion eine große Rolle in der Entwicklung der akuten Abstoßung und der chronischen Allograftnephropathie.

In dieser Arbeit werden die Rollen der wichtigsten inflammatorischen Zelltypen – Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen – und das Ausmaß ihrer Immigration ins Transplantat immunhistochemisch untersucht. Durch die standardisierte Gewinnung von Protokoll- und Indikationsbiopsien in der Nachsorge nierentransplantieter Patienten in Regensburg war es möglich, die Bedeutung der immigrierenden Immunzellen in histologisch und klinisch „gesunden“ Transplantaten, in der Situation der akuten Abstoßung und in IF/TA zu analysieren. Trat der IF/TA-Schaden im ersten Jahr nach der Transplantation auf, so wurde diese Probe der frühen Untergruppe zugeordnet, trat er erst nach Ablauf des ersten Jahres auf, wurde sie in die späte Gruppe eingeteilt. Neben der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs wurden die Gruppen nach An- oder Abwesenheit einer vorausgehenden akuten Abstoßung (in den ersten 100 Tagen nach NTX) aufgegliedert; dies erlaubt einen Rückschluss auf die Auswirkung von immunologischen und nicht-immunologischen Faktoren auf die Genese des chronischen Transplantatschadens.

In Übereinstimmung mit älteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Makrophageninfiltration entlang einer zeitlichen Kinetik abnimmt. Makrophagen scheinen früh nach der Transplantation aufgrund eines Entzündungsgeschehens (immunologisch oder nicht-immunologisch ausgelöst) ins Transplantat einzuwandern und dort das geschädigte Gewebe zu phagozytieren. Nach erfolgreichem Abräumvorgang und Abklingen der Inflammation verlassen sie

das Organ und sind somit zum späten Zeitpunkt in keiner der Gruppen mehr in relevanter Zahl nachweisbar. Dies entspricht dem reparativ wirkenden Subtyp M2.

Darüber hinaus nimmt die Anzahl der infiltrierenden T-, B- und Plasmazellen in den jeweiligen Gruppen einen gleichartigen Verlauf. Dies lässt einige Rückschlüsse zu: Zum Einen sind die Zellzahlen in den Nieren mit früher IF/TA deutlich niedriger als in später IF/TA, was unabhängig davon ist, ob ein immunologisches Ereignis in Form einer akuten Abstoßung vorangegangen oder nicht. Dies zeigt, dass die bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Allograftnephropathie (u.a. rezidivierende akute Abstoßung, Ischämie / Reperfusionsschaden) zwar initial unterschiedliche Effekte im Transplantat erzeugen. Unabhängig von ihrer Alloantigenabhängigkeit folgt dann jedoch eine gemeinsame, immunologische Endstrecke. Zum Anderen bestehen starke Hinweise, dass es sich bei der frühen bzw. spät eintretenden IF/TA um zwei unterschiedliche Entitäten handelt. Zum späten Zeitpunkt befinden sich sehr viele B-Lymphozyten im Transplantat, sodass sich u. a. über die Differenzierung zur Plasmazelle mit Antikörperbildung eine chronisch-humorale Abstoßung entwickelt. Möglicherweise trägt hierzu die unzureichende T-Zell-Suppression der uns zur Verfügung stehenden immunsuppressiven Therapie erheblich bei; der direkte T-Zell-Signalweg über CD4⁺ Th2-Zellen und somit die B-Zell-Proliferation und Differenzierung zur Plasmazelle scheint medikamentös sogar gefördert anstatt unterdrückt zu werden. Zum frühen Zeitpunkt hingegen spielen die B-Zellen keine entscheidende Rolle. Unsere Resultate ergeben jedoch den Hinweis, dass Makrophagen kurz nach der Transplantation als entscheidender Trigger z.B. durch Zytokinausschüttung B- und T-Lymphozyten aktivieren und somit eine frühe IF/TA auslösen könnten. Es handelt sich dabei am ehesten um den eher destruktiv wirkenden Makrophagen-Subtyp M1.

Zusammenfassend gehen wir daher davon aus, dass sich früh- und späteintretende chronische Allograftnephropathie hinsichtlich ihrer Genese vollständig unterscheiden und somit zwei unterschiedliche Entitäten mit ggf. auch der Chance auf unterschiedliche und damit effektivere Therapieansätze darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pippas M, Jager KJ, Kramer A, Leivestad T, Sánchez MB, Caskey FJ et al. The changing trends and outcomes in renal replacement therapy: data from the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2015.
2. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers B, Gilbertson D, Ishani A et al. US Renal Data System 2012 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 2013; 61(1 Suppl 1):A7, e1-476.
3. van Walraven C, Manuel DG, Knoll G. Survival trends in ESRD patients compared with the general population in the United States. *Am J Kidney Dis* 2014; 63(3):491–9.
4. Tattersall J, Greenwood R, Farrington K. Urea kinetics and when to commence dialysis. *Am J Nephrol* 1995; 15(4):283–9.
5. Bonomini V, Feletti C, Stefoni S, Vangelista A. Early dialysis and renal transplantation. *Nephron* 1986; 44(4):267–71.
6. Cooper BA, Branley P, Bulfone L, Collins JF, Craig JC, Fraenkel MB et al. A randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis. *N Engl J Med* 2010; 363(7):609–19.
7. US Renal Data System. USRDS 1994 Annual Data Report. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 1994.
8. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Ishani A et al. US Renal Data System 2013 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 2014; 63(1 Suppl):A7.
9. Academic Medical Center, Department of Medical Informatics. ERA-EDTA Registry Annual Report 2014. Amsterdam, Netherlands; 2016.
10. Kramer A, Pippas M, Stel VS, Bonthuis M, Abad Diez JM, Afentakis N et al. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2013 ERA-EDTA Registry Annual Report with a focus on diabetes mellitus. *Clin Kidney J* 2016:svf151.
11. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, van der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(11):2135–41.
12. Oniscu GC, Brown H, Forsythe, John L R. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(6):1859–65.
13. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2093–109.

14. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341(23):1725–30.
15. Yildirim A. The importance of patient satisfaction and health-related quality of life after renal transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38(9):2831–4.
16. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet* 2010; 375(9722):1296–309.
17. Eurotransplant International Foundation, Branger P, Samuel U. Annual Report 2015; 2016.
18. Neuhaus P, Pfitzmann R. Organtransplantation. In: Siewert JR, editor. Chirurgie. 9. überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
19. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346(8):580–90.
20. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342(9):605–12.
21. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11(3):450–62.
22. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4(8):1289–95.
23. Ghoneim MA, Bakr MA, Refaie AF, Akl AI, Shokeir AA, Shehab El-Dein, Ahmed B et al. Factors affecting graft survival among patients receiving kidneys from live donors: a single-center experience. *Biomed Res Int* 2013; 2013:912413.
24. Roodnat JI, van Riemsdijk IC, Mulder PGH, Doxiadis I, Claas FHJ, IJzermans JNM et al. The superior results of living-donor renal transplantation are not completely caused by selection or short cold ischemia time: a single-center, multivariate analysis. *Transplantation* 2003; 75(12):2014–8.
25. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2013. Frankfut / Main; 2014.
26. Araújo AM, Santos F, Guimarães J, Nunes CS, Casal M. Living-donor kidney transplantation: Predictive factors and impact on post-transplant outcome. *Transplant Proc* 2015; 47(4):938–41.
27. Issa N, Stephany B, Fatica R, Nurko S, Krishnamurthi V, Goldfarb DA et al. Donor factors influencing graft outcomes in live donor kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 83(5):593–9.

28. Meier-Kriesche H-U, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis. *Transplantation* 2002; 74(10):1377–81.
29. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 2010; 77(4):299–311.
30. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9(3):527–35.
31. Feldkamp T, Linkermann A. Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation. *Nephrologe* 2013; 8(3):217–25.
32. Hauser IA, editor. Nierenerkrankungen. Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Stuttgart (u.a.): Schattauer; 2003.
33. Geiger, Jonas, Lenz, Kramer. Nierentransplantation. In: Hauser IA, editor. Nierenerkrankungen. Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Stuttgart (u.a.): Schattauer; 2003.
34. Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative transplant study. *Rev Immunogenet* 1999; 1(3):334–42.
35. Siewert JR, editor. Chirurgie. 9. überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
36. Chertow GM, Milford EL, Mackenzie HS, Brenner BM. Antigen-independent determinants of cadaveric kidney transplant failure. *JAMA* 1996; 276(21):1732–6.
37. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 1995; 333(6):333–6.
38. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int* 2004; 65(2):713–8.
39. Halleck F, Khadzhynov D, Liefeldt L, Schrezenmeier E, Lehner L, Duerr M et al. Immunologic outcome in elderly kidney transplant recipients: is it time for HLA-DR matching? *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(12):2143–9.
40. Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL, Chertow GM. Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(9):1501–8.
41. Bray RA, Tarsitani C, Gebel HM, Lee J-H. Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection. *Methods Cell Biol* 2011; 103:285–310.
42. Terasaki PI, McCleland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204:998–1000.
43. Mytilineos J, Seidl C, Holzberger G. Aktueller Stand der transplantationsimmunologischen Diagnostik. *DRK Hämotherapie* 2006; (08/2006):4–15.

44. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, Kraus ES, Kucirka LM, Locke JE et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med* 2011; 365(4):318–26.
45. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280(14):735–9.
46. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* 2004; 78(2):190–3.
47. Rogers NM, Eng HS, Yu R, Kireta S, Tsiopeles E, Bennett GD et al. Desensitization for renal transplantation: depletion of donor-specific anti-HLA antibodies, preservation of memory antibodies, and clinical risks. *Transpl Int* 2011; 24(1):21–9.
48. Thielke J, DeChristopher PJ, Sankary H, Oberholzer J, Testa G, Benedetti E. Highly successful living donor kidney transplantation after conversion to negative of a previously positive flow-cytometry cross-match by pretransplant plasmapheresis. *Transplant Proc* 2005; 37(2):643–4.
49. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai C-H et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359(3):242–51.
50. Bentall A, Cornell LD, Gloo JM, Park WD, Gandhi MJ, Winters JL et al. Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant* 2013; 13(1):76–85.
51. Orandi BJ, Luo X, Massie AB, Garonzik-Wang JM, Lonze BE, Ahmed R et al. Survival benefit with kidney transplants from HLA-incompatible live donors. *N Engl J Med* 2016; 374(10):940–50.
52. Schwaiger E, Eskandary F, Kozakowski N, Bond G, Kikić Ž, Yoo D et al. Deceased donor kidney transplantation across donor-specific antibody barriers: predictors of antibody-mediated rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(8):1342–51.
53. Bartel G, Wahrmann M, Regele H, Kikić Z, Fischer G, Druml W et al. Peritransplant immunoabsorption for positive crossmatch deceased donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10(9):2033–42.
54. Becker LE, Süsal C, Morath C. Kidney transplantation across HLA and ABO antibody barriers. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18(4):445–54.
55. Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH et al. Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(2):417–22.
56. Obata F, Yoshida K, Ohkubo M, Ikeda Y, Taoka Y, Takeuchi Y et al. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl Immunol* 2005; 14(1):21–5.

57. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338(25):1813–21.
58. Joosten SA, van Kooten C, Paul LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003; 16(3):137–45.
59. Shirwan H. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 1999; 68(6):715–26.
60. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357(25):2562–75.
61. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanchard G et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353(8):770–81.
62. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (Benefit-ext study). *Am J Transplant* 2010; 10(3):547–57.
63. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (Benefit study). *Am J Transplant* 2010; 10(3):535–46.
64. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaite L et al. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2016; 374(4):333–43.
65. Kuypers, Dirk R J, Peeters PC, Sennesael JJ, Kianda MN, Vrijens B, Kristanto P et al. Improved adherence to tacrolimus once-daily formulation in renal recipients: a randomized controlled trial using electronic monitoring. *Transplantation* 2013; 95(2):333–40.
66. Flanagan WM, Corthésy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991; 352(6338):803–7.
67. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357(6380):692–4.
68. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321(25):1725–38.
69. Merion RM, White DJ, Thiru S, Evans DB, Calne RY. Cyclosporine: five years' experience in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med* 1984; 310(3):148–54.
70. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995; 60(3):225–32.
71. Ramdas J, Harmon JM. Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells. *Endocrinology* 1998; 139(9):3813–21.

72. Bloemena E, Weinreich S, Schellekens PT. The influence of prednisolone on the recirculation of peripheral blood lymphocytes in vivo. *Clin Exp Immunol* 1990; 80(3):460–6.
73. Gillis S, Crabtree GR, Smith KA. Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1979; 123(4):1624–31.
74. Slade JD, Hepburn B. Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets. *J Lab Clin Med* 1983; 101(3):479–87.
75. Clayton P, McDonald S, Chadban S. Steroids and recurrent IgA nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11(8):1645–9.
76. Gabriel M. Danovitch MD, editor. *Handbook of Kidney Transplantation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
77. Bertram L. Kasiske. Long-term posttransplantation management and complications. In: Gabriel M. Danovitch MD, editor. *Handbook of Kidney Transplantation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
78. Gwinner W, Hinzmann K, Erdbruegger U, Scheffner I, Broecker V, Vaske B et al. Acute tubular injury in protocol biopsies of renal grafts: prevalence, associated factors and effect on long-term function. *Am J Transplant* 2008; 8(8):1684–93.
79. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M et al. Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(3):482–7.
80. Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Loos C, Rowshani AT, van Donselaar-Van der Pant, KAMI, Idu MM et al. B cells in cluster or in a scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008; 86(6):772–8.
81. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE et al. Banff 2005 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7(3):518–26.
82. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolokoff-Rubin N et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(10):2208–14.
83. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(4):1046–56.
84. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43(6):1333–8.

85. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3(6):708–14.
86. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014; 14(2):272–83.
87. Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation* 1999; 67(9):1222–30.
88. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1970; 282(3):111–7.
89. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(3):574–82.
90. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian J Nephrol* 2010; 20(1):2–8.
91. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44(2):411–22.
92. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen, Richard D M, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349(24):2326–33.
93. Yilmaz S, McLaughlin K, Paavonen T, Taskinen E, Monroy M, Aavik E et al. Clinical predictors of renal allograft histopathology: a comparative study of single-lesion histology versus a composite, quantitative scoring system. *Transplantation* 2007; 83(6):671–6.
94. Humar A, Johnson EM, Payne WD, Wrenshall L, Sutherland DE, Najarian JS et al. Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival. *Clin Transplant* 1997; 11(6):623–7.
95. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(11):2474–81.
96. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998; 53(1):217–22.
97. Guijarro C, Massy ZA, Kasiske BL. Clinical correlation between renal allograft failure and hyperlipidemia. *Kidney Int Suppl* 1995; 52:S56–9.

98. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1(2):162–79.
99. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992; 263:H1892-900.
100. Szabo A, Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1998;4281–4.
101. Lebranchu Y, Halimi JM, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritzsche L et al. Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome-results from MOST, A Multinational Observational Study. *Transplant Proc* 2005; 37(1):345–7.
102. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; 59(7):962–8.
103. Quiroga I, McShane P, Koo, Dicken D H, Gray D, Friend PJ, Fugle S et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(6):1689–96.
104. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63(7):968–74.
105. Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, Schiff J, Cattran DC, Cole EH et al. Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1):153–61.
106. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(3):1039–47.
107. Chapal M, Le Borgne F, Legendre C, Kreis H, Mourad G, Garrigue V et al. A useful scoring system for the prediction and management of delayed graft function following kidney transplantation from cadaveric donors. *Kidney Int* 2014; 86(6):1130–9.
108. Gosmanov AR, Dagogo-Jack S. Predicting, managing and preventing new-onset diabetes after transplantation. *Minerva Endocrinol* 2012; 37(3):233–46.
109. Olyaei AJ, de Mattos, A M, Bennett WM. Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf* 1999; 21(6):471–88.
110. Kahwaji J, Bunnapradist S, Hsu J-W, Idroos ML, Dudek R. Cause of death with graft function among renal transplant recipients in an integrated healthcare system. *Transplantation* 2011; 91(2):225–30.

111. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 2000; 57(1):307–13.
112. Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC, editors. *Nephrologie: Pathophysiologie, Klinik ,Nierenersatzverfahren*. 5th ed.: Georg Thieme Verlag KG; 2008.
113. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol* 2007; 293(1):F2-9.
114. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011; 377(9768):837–47.
115. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, Westeel PF, Etienne I, Thervet E et al. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study. *Am J Transplant* 2009; 9(5):1115–23.
116. Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, Vanrenterghem Y, Vincenti F, Voulgari A et al. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the Casesar study. *Am J Transplant* 2007; 7(3):560–70.
117. Hanto DW, Chudzinski R. What does the CONVERT trial really tell us about conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus? *Transplantation* 2009; 87(2):164–5.
118. Salvadori M, Bertoni E. Is it time to give up with calcineurin inhibitors in kidney transplantation? *World J Transplant* 2013; 3(2):7–25.
119. Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, Sethi S et al. The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11(4):698–707.
120. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC et al. Evidence for anti-body-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010; 90(1):68–74.
121. Gondos A, Döhler B, Brenner H, Opelz G. Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes. *Transplantation* 2013; 95(2):267–74.
122. Fellström B. Risk factors for and management of post-transplantation cardiovascular disease. *BioDrugs* 2001; 15(4):261–78.
123. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8(4):753–60.
124. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Bröcker V et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 2007; 7(2):356–65.

125. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 2005; 5(10):2464–72.
126. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2):713–23.
127. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H, editors. *Pathologie*. 5th ed. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2012.
128. Hoffmann U, Bergler T, Jung B, Steege A, Pace C, Rümmele P et al. Comprehensive morphometric analysis of mononuclear cell infiltration during experimental renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 2013; 28(1):24–31.
129. Platt JL, LeBien TW, Michael AF. Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J Exp Med* 1982; 155(1):17–30.
130. Sarwal M, Chua M-S, Kambham N, Hsieh S-C, Satterwhite T, Masek M et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; 349(2):125–38.
131. Frank K, Zeier M, Gross M-L, Waldherr R, Ritz E, Amann K. Comprehensive immunohistological analysis of the endothelin system in human kidney grafts. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1365–72.
132. Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc* 2007; 39(2):432–4.
133. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwok S, Hsieh S-C, Salvatierra O et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008; 74(5):664–73.
134. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5(9):2248–52.
135. Hwang HS, Song JH, Hyoung BJ, Lee SY, Jeon YJ, Kang SH et al. Clinical impacts of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ B cells in renal allograft. *Transplantation* 2010; 89(12):1489–95.
136. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol* 2011; 41(1):89–96.
137. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 2010; 78(5):503–13.

138. Tsai EW, Wallace WD, Gjertson DW, Reed EF, Ettenger RB. Significance of intragraft CD138+ lymphocytes and p-S6RP in pediatric kidney transplant biopsies. *Transplantation* 2010; 90(8):875–81.
139. Xu X, Shi B, Cai M, Han Y, Wang Q, Xu L et al. A retrospective study of plasma cell infiltrates in explanted renal allografts. *Transplant Proc* 2008; 40(5):1366–70.
140. Tejani A, Sullivan EK. The impact of acute rejection on chronic rejection: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Transplant* 2000; 4(2):107–11.
141. Joseph JT, Kingsmore DB, Junor BJ, Briggs JD, Mun Woo Y, Jaques BC et al. The impact of late acute rejection after cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15(4):221–7.
142. McDonald S, Russ G, Campbell S, Chadban S. Kidney transplant rejection in Australia and New Zealand: relationships between rejection and graft outcome. *Am J Transplant* 2007; 7(5):1201–8.
143. Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9):2371–80.
144. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 2007; 7(4):864–71.
145. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7(2):408–15.
146. Thaunat O, Patey N, Gautreau C, Lechaton S, Fremeaux-Bacchi V, Dieu-Nosjean M-C et al. B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* 2008; 85(11):1648–53.
147. Thaunat O, Field A-C, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch M-F et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41):14723–8.
148. Thaunat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y et al. Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intragraft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *J Immunol* 2010; 185(1):717–28.
149. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83(2):162–70.
150. Solini S, Aiello S, Cassis P, Scudeletti P, Azzollini N, Mister M et al. Prolonged cold ischemia accelerates cellular and humoral chronic rejection in a rat model of kidney allotransplantation. *Transpl Int* 2012; 25(3):347–56.

151. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 74(7):916–23.
152. Bidmon B, Kratochwill K, Rusai K, Kuster L, Herzog R, Eickelberg O et al. Increased immunogenicity is an integral part of the heat shock response following renal ischemia. *Cell Stress Chaperones* 2012; 17(3):385–97.
153. Ascon M, Ascon DB, Liu M, Cheadle C, Sarkar C, Racusen L et al. Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int* 2009; 75(5):526–35.
154. Heemann U, Lutz J. Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(10):2438–46.
155. van der Leij J, van den Berg A, Albrecht EWJA, Blokzijl T, Roozendaal R, Gouw ASH et al. High expression of TIAF-1 in chronic kidney and liver allograft rejection and in activated T-helper cells. *Transplantation* 2003; 75(12):2076–82.
156. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001; 167(12):7199–206.
157. Nickeleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: where do we stand? *Kidney Int* 2007; 71(1):7–11.
158. Gaughan A, Wang J, Pelletier RP, Nadasdy T, Brodsky S, Roy S et al. Key role for CD4 T cells during mixed antibody-mediated rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2014; 14(2):284–94.
159. Cramer DV, Shirwan H. The importance of humoral immune responses in chronic rejection. *Transplant Rev* 1998; 12(4):166–76.
160. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB et al. Indirect allore cognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 1997; 64(6):795–800.
161. Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW. Indirect T cell allore cognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transpl Immunol* 1993; 1(1):77–81.
162. Almawi WY, Melemedjian OK, Rieder MJ. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant* 1999; 13(5):365–74.
163. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Engl J Med* 1975; 292(24):1257–63.

164. Zhang PL, Malek SK, Prichard JW, Lin F, Yahya TM, Schwartzman MS et al. Acute cellular rejection predominated by monocytes is a severe form of rejection in human renal recipients with or without Campath-1H (alemtuzumab) induction therapy. *Am J Transplant* 2005; 5(3):604–7.
165. Burkhardt K, Sorg C, Andreesen R, Mues B, Hammer C, Land W et al. Analysis of macrophage subsets in renal allograft biopsies with new monoclonal antibodies. *Transplant Proc* 1990; 22(4):1844–5.
166. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford EAS, Wright EC, Mannon RB et al. Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *Am J Transplant* 2008; 8(3):600–7.
167. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int* 2005; 68(4):1866–74.
168. Magil AB, Tinckam K. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 2003; 63(5):1888–93.
169. Magil AB. Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. *Am J Kidney Dis* 2005; 45(6):1084–9.
170. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996; 61(11):1586–92.
171. Bajwa A, Kinsey GR, Okusa MD. Immune mechanisms and novel pharmacological therapies of acute kidney injury. *Curr Drug Targets* 2009; 10(12):1196–204.
172. Jo S-K, Sung S-A, Cho W-Y, Go K-J, Kim H-K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1231–9.
173. Jang H-S, Kim J, Park Y-K, Park KM. Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys. *Transplantation* 2008; 85(3):447–55.
174. Ross JA, Auger MJ, Burke B, Lewis CE. The biology of the macrophage. *Macrophage* 2002; 2:16–23.
175. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81(6):1607–13.
176. Wang Y, Harris, David C H. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(1):21–7.
177. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25(12):677–86.
178. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi B-S et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(2):317–26.

179. Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23(4):199–208.
180. Rinehart JJ, Sagone AL, Balcerzak SP, Ackerman GA, LoBuglio AF. Effects of corticosteroid therapy on human monocyte function. *N Engl J Med* 1975; 292(5):236–41.
181. Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WM et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56(3):643–50.
182. Heemann UW, Tullius SG, Tamatami T, Miyasaka M, Milford E, Tilney NL. Infiltration patterns of macrophages and lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transpl Int* 1994; 7(5):349–55.
183. Azuma H, Nadeau KC, Ishibashi M, Tilney NL. Prevention of functional, structural, and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 1995; 60(12):1577–82.
184. Pilmore HL, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW, Eris JM. Early up-regulation of macrophages and myofibroblasts: a new marker for development of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69(12):2658–62.

7 ANHANG

7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten. Alle Altersklassen	8
Abbildung 2 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten. Patientenalter < 65 Jahre	9
Abbildung 3 Verteilung der Grunderkrankungen, die 2014 zu Nierenersatztherapie führten. Patientenalter ≥ 65 Jahre	9
Abbildung 4 Verhältnis zwischen aktiver Warteliste und Nierentransplantationen in Deutschland in den Jahren 2005 bis 2014.....	10
Abbildung 5 Funktionsraten nach Nierentransplantation: 2003-2012 Deutschland im internationalen Vergleich	12
Abbildung 6 Gründe für Transplantatverlust	13
Abbildung 7 Signalwege der Alloantigenerkennung	17
Abbildung 8 Banff 4 I	21
Abbildung 9 Banff 4 II	21
Abbildung 10 Banff 4 III.....	21
Abbildung 11 Banff 2.....	23
Abbildung 12 Banff 5 (20x).....	25
Abbildung 13 Banff 5 (40x).....	25
Abbildung 14 Immunologische und nicht-immunologische Einflussfaktoren führen zu IF/TA	27
Abbildung 15 Gründe für Transplantatverlust	32
Abbildung 16 Avidin-Biotin-Reaktion	40
Abbildung 17 Färbung von CD138 (Beispiel)	44
Abbildung 18 Lokalisation CD138-positiver Zellen.....	44
Abbildung 19 CD138 positive, interstitielle Zellen	45

Abbildung 20 Manuelles Auswertungsschema für CD138. Schematische Sicht durch das Mikroskop	46
Abbildung 21 Anzahl der Makrophagen im Vergleich.....	48
Abbildung 22 Ergebnis CD68 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung.....	49
Abbildung 23 Ergebnis CD68 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f)	51
Abbildung 24 Ergebnis CD 68 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s).	52
Abbildung 25 Anzahl der B-Lymphozyten im Vergleich.....	53
Abbildung 26 Ergebnis CD20 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt).....	54
Abbildung 27 Ergebnis CD20 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f)	56
Abbildung 28 Ergebnis CD20 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s).....	57
Abbildung 29: Anzahl der T-Lymphozyten im Vergleich	58
Abbildung 30 Ergebnis CD3 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt)	59
Abbildung 31 Ergebnis CD3 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f)	60
Abbildung 32 Ergebnis CD3 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s).....	61
Abbildung 33: Anzahl der vereinzelten interstitiellen Plasmazellen im Vergleich	62
Abbildung 34 Anzahl der interstitiellen Plasmazellen im Cluster im Vergleich	63
Abbildung 35 Ergebnis CD138 Gruppen ohne vorausgehende akute Abstoßung (oRjt).....	64
Abbildung 36 Ergebnis CD138 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, frühe chronische Transplantatnephropathie (Rjt-f)	66
Abbildung 37 Ergebnis CD138 Vorausgehende akute Abstoßung, Lösung der Abstoßung, späte Transplantatnephropathie (Rjt-s)	67
Abbildung 38 Direkte und indirekte Alloantigenpräsentation. Wirkung von Immunsuppressiva.....	79

7.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Liste verwendeter Geräte	34
Tabelle 2 Liste verwendeter Software	34
Tabelle 3 Liste verwendeter Kits und Lösungen	34
Tabelle 4 Einteilung der Gruppen	35
Tabelle 5 Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Gruppen	36
Tabelle 6 Vergleich der Zeitpunkte zwischen den Gruppen	36
Tabelle 7 Frühester Entnahmezeitpunkt	37
Tabelle 8 Spätester Entnahmezeitpunkt	37
Tabelle 9 Primärantikörper	39
Tabelle 10 Sekundärantikörper	39
Tabelle 11 Ergebnisübersicht CD138 positive, interstitielle Zellen: vereinzelt	68
Tabelle 12 Ergebnisübersicht CD138 positive, interstitielle Zellen: im Cluster	69
Tabelle 13 Schematische Zusammenfassung aller Ergebnisse	70
Tabelle 14 Banff'97 Klassifikation, Update 2005 (81)	104
Tabelle 15 Banff'97 Klassifikation, Update 2005 (Fortsetzung)	105

7.3 BANFF'97 KLASSEFIKATION, UPDATE 2005

Banff 1	Normalbefund
Banff 2	Antikörper vermittelte Rejektion (Überschneidung mit Banff 3-6 möglich)
2a	<i>Akute Antikörper-vermittelte Rejektion</i>
Typ	Histopathologischer Befund
I	Tubulusschaden, Cd4 positiv, minimale Entzündung
II	Kapilläre Adhärenz und/oder Thrombosierung, C4d positiv
III	Schwere arterielle Veränderungen (Nekrose /transmural. Arteritis), C4d positiv
2b	<i>Chronisch aktive Antikörper-vermittl. Rejektion</i>
	Histopathologischer Befund Doppelkonturierung der Glomerula und / oder interstitielle Fibrosierung / tubuläre Atrophie und / oder fibröse Intimaverdickung der Arterien; C4d positiv
Banff 3	Borderline Changes : „Verdächtig“ für akute T-zell vermittelte Rejektion
	Histopathologischer Befund Kein Anhalt für Arteritis, jedoch Tubulitis (nicht alle Diagnosekriterien für Rejektion erfüllt)
Banff 4	T-Zell vermittelte Rejektion (Überschneidung mit Banff 2, 5 und 6 möglich)
4a	<i>Akute T-Zell vermittelte Rejektion</i>
Typ	Histopathologischer Befund
IA	Signifikante interstitielle Infiltration (>25% des Parenchyms) und Foci moderater Tubulitis
IB	Signifikante interstitielle Infiltration (>25% des Parenchyms) und Foci schwerer Tubulitis
IIA	Milde bis moderate Arteritis
IIB	Schwere Arteritis mit Beeinträchtigung des Lumens von > 25%
III	Transmurale Arteritis und / oder fibrinoide Veränderungen und Nekrosen glatter Muskelzellen der Media mit begleitender lymphozytischer Entzündung

Tabelle 14 Banff'97 Klassifikation, Update 2005 (81)

Banff 4	T-Zell vermittelte Rejektion (Überschneidung mit Banff 2, 5 und 6 möglich)			
	<i>4b Chron. aktive T-Zell vermittelte Rejektion</i>			
Histopathologischer Befund				
„Chronische Allograft Arteriopathie“ (art. Intima-fibrosierung mit Infiltration mononukleärer Zellen, Bildung einer Neointima)				
Banff 5	Interstitial Fibrose und tubuläre Atrophie ohne Hinweis auf eine spezifische Ätiologie (IF/TA)			
	Typ	Histopathologischer Befund		
	I	Milde interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (<25% des Kortex)		
	II	Moderate interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (26-50% des Kortex)		
	III	Schwere interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie/Verlust (>50% des Kortex)		
Banff 6	Sonstige Veränderungen, nicht durch Rejektion hervorgerufen			
	Diagnose	Histopathologischer Befund		
	Chronische Hypertension	Fibrotische Intimaverdickung mit Duplikation der Elastika		
	Calcineurin Toxizität	Arterielle Hyalinose mit peripheren Hyalinknoten. Beeinträchtigung der Tubuluszellen mit isometrischer Vakuolisierung		
	Chronische Obstruktion	Tubuläre Dilatation. Ausgeprägte Ummauerung mit Tamm-Horsfall Protein, Extravasation in das Interstitium und / oder das Lymphsystem		
	Bakt. Pyelonephritis	Intra- und peritubuläre Ansammlung von Neutrophilen, Formation von Lymphfollikeln		
	Virale Infektion	Histologisch sichtbare virale Einschlüsse		

Tabelle 15 Banff'97 Klassifikation, Update 2005 (Fortsetzung)

8 ERKLÄRUNG

Die Dissertation wurde von Herrn PD Dr. med. T. Bergler angeregt und überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Tobias Bergler für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die immerzu positive Arbeitsatmosphäre bedanken.

Wesentlich beigetragen zum Gelingen der Arbeit hat zudem Frau Stefanie Ellmann, die mich als MTA der Arbeitsgruppe bei der Durchführung und Auswertung der Färbungen stets unterstützte und mir mit Rat und viel Tat zur Seite stand. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Alexandra Müller und der gesamten Arbeitsgruppe.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die Ermöglichung des Medizinstudiums sowie die emotionale und finanzielle Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Eva, die durch detailliertes Korrekturlesen und Überarbeitung der Formatierung eine große Hilfe war.

Abschließend gilt mein ganzer Dank meinem Ehemann Christof, der mit unermüdlicher Geduld und viel Zuspruch die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglichte.