

1. Einleitung

Eine Vielzahl von Darmerkrankungen erfordern im Therapieverlauf eine mehr oder minder ausgeprägte Dünndarmresektion. Intestinale Fehlbildungen und Ganglionosen im Kindesalter, sowie Morbus Crohn und Mesenterialinfarkte im Erwachsenenalter sind Beispiele hierfür^{1,2}. Die Darmresektion führt zu einem Mangel an Resorptionsfläche, dem sog. Kurzdarmsyndrom. Ist eine Adaptation des verbliebenen Darmanteils auf eine vermehrte Nährstoffaufnahme nicht ausreichend, müssen operative Maßnahmen erwogen werden³. Hierzu zählt z.B. die Interposition eines antiperistaltischen Segmentes^{4,5}. Sind diese Maßnahmen erfolglos, bleibt als Ausweg nur die totale parenterale Ernährung. Ihr langfristiger Einsatz aber führt unweigerlich zu Katheterinfektion bis hin zu Sepsis, Thrombosierung und Entwicklung von Leberversagen^{6,7,8}. Um derartige Komplikationen zu vermeiden, kann als chirurgische Therapie des Kurzdarmsyndroms die Dünndarmtransplantation (DDTX) erwogen werden.

Erste experimentelle Versuche der DDTX wurden 1902 von A. Carrel an Hunden durchgeführt⁹. Am Menschen erfolgten erste Versuche erst in den 60er und 70er Jahren, jedoch mit desolaten Ergebnissen^{10,11,12,13,14,15}. Erst nach Einführung von Cyclosporin A (CsA) und später von FK-506 (Tacrolimus[®]) als potente Immunsuppressiva zeigten sich längerfristige Erfolge^{16,17,18,19,20}. Dennoch ist die Überlebensrate nach DDTX (75 % nach 1 Jahr und 42 % nach 5 Jahren)^{18,21,22} schlechter als nach Leber-²³ und Nierentransplantation²⁴ (60 bzw. 69 % nach 5 Jahren). Die Operation an sich ist im Vergleich zur Lebertransplantation technisch weniger anspruchsvoll. Jedoch aufgrund der anatomischen und funktionellen Besonderheiten des intestinalen Gewebes treten Komplikationen auf, die bei anderen Transplantatorganen wie Herz, Leber oder Niere nicht in diesem Maße in Erscheinung treten. Schäden an der Dünndarmwand haben weitreichendere Folgen als beispielsweise Parenchymschäden der Leber oder der Niere, denn sie führen zur Minderung der Dünndarmmotilität^{25,26} und infolge des Ischämie- und Reperfusionsschadens⁷ des intestinalen Epithels zu Resorptionsstörungen. Damit wird der Übertritt potentiell pathogener Keime direkt in die Blutbahn des Empfängers möglich, woraus eine Sepsis resultieren kann²⁷.

Ein weiteres Problem liegt in der starken Immunogenität des Dünndarms (DD). Er besitzt ein sehr komplexes lymphatisches Netzwerk. Zum einen besteht dieses aus lymphoiden Aggregaten in den Peyerschen Plaques und in der Lamina propria. Hier erfolgt der initiale Kontakt der Lymphozyten mit den Antigenen aus dem Darmlumen. Den anderen Teil des lymphatischen Netzwerks bilden diffus verteilte Lymphozyten in der Lamina propria sowie im Epithel als intraepitheliale Lymphozyten bzw. IEL²⁸. Diese sind für die Immunreaktionen an der mukosalen Oberfläche verantwortlich²⁹. Dieses gesamte Netzwerk wird als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe bezeichnet.

Die Transplantatakteptanz wird aber auch durch die besondere funktionelle Rolle des Dünndarms erschwert. Als Teil des Gastrointestinaltraktes kommt das DD-Epithel, genauer gesagt, kommen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL), direkt in Kontakt mit den Fremdanitgenen der Nahrung. Sie werden als Erste mit der Flut von externen, oral aufgenommenen Antigenen konfrontiert. Aktuelle In Vitro-Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Aktivierung der IEL durch die Zottenepithelzellen (ZEE) möglich ist³⁰ (Abb.1.1).

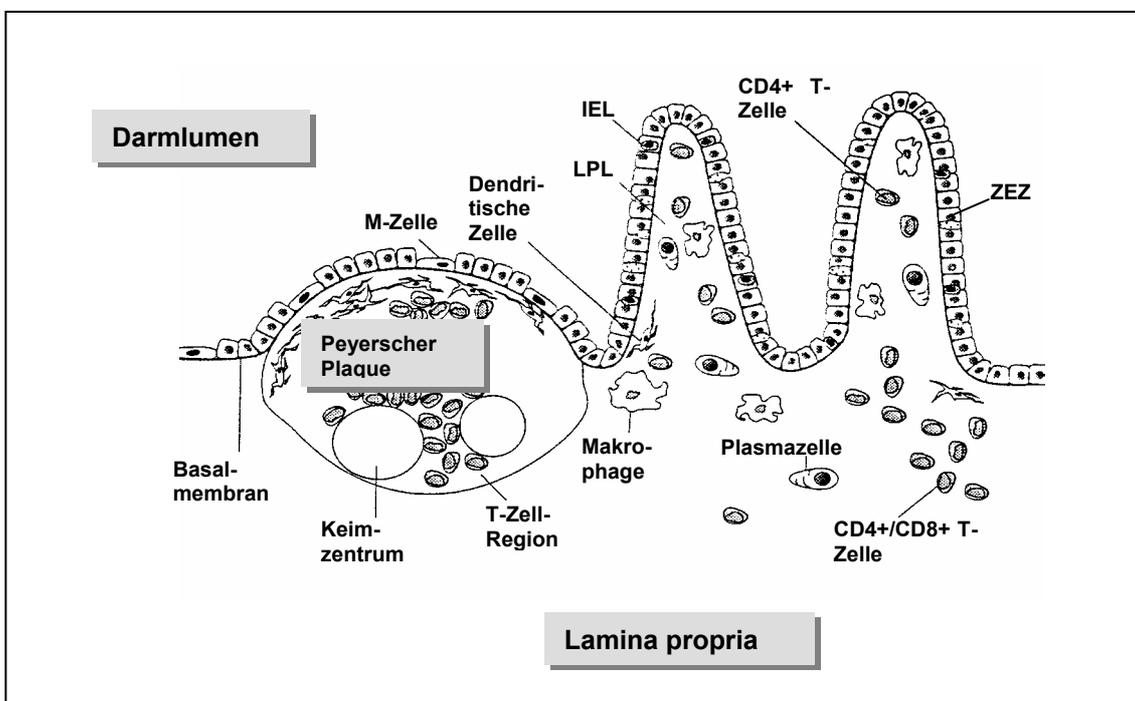


Abb. 1.1 Längsschnitt durch das Dünndarmepithel einer Dünndarmzotte mit Darstellung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL = intraepitheliale Lymphozyten, LPL = Lamina propria-Lymphozyten, ZEE = Zottenepithelzellen, M-Zelle = spezielle Zottenepithelzelle) (aus Current Protocols in Immunology Volume 1. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Strober SW. 1996 by John Wiley & Sons, Inc.).

Dabei unterliegen die IEL hohen Anforderungen. Ihre Reaktion muß sich bewegen zwischen Abwehr der für den Körper gefährlichen Fremdantigene einerseits und Akzeptanz ungefährlicher Antigene bzw. Vermeiden überschießender Reaktionen andererseits. Der transplantierte Dünndarm kommt nach einer Phase der postoperativen parenteralen Ernährung mit einer Überfülle von Fremdantigenen aus der Nahrung in Kontakt und ist somit viel stärkeren Reizsituationen ausgesetzt als zum Beispiel ein transplantiertes Herz. Während für die Lymphozyten der Mesenteriallymphknoten deren Beteiligung an der Immunaktivierung bereits gezeigt wurde, finden sich derzeit nur wenige Daten in der Literatur zur Rolle der IEL in der Dünndarmabstoßung. Weiter ist unklar, was sich im intraepithelialen Kompartiment auf zellulärer Ebene abspielt, wenn das Transplantat seine Funktion verliert. Dazu werden zwei Modelle betrachtet: das **Abstoßungsmodell (AB)** und das **Toleranzmodell (TOL)**. Im Abstoßungsmodell manifestierte sich 100 Tage nach Transplantation die Transplantatabstoßung, während das Toleranzmodell Toleranz zeigte. Zur Isolierung der IEL wurde ein Protokoll mit der Anforderung etabliert, die Kontamination durch Lymphozyten aus anderen DD-Kompartimenten, z.B. aus der Lamina propria, möglichst gering zu halten. Mit diesem Protokoll wurden die IEL beider Modelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation isoliert und ihre Zusammensetzung durchflußzytometrisch analysiert. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit die zur Abstoßung bzw. zur Toleranz führenden zellulären Mechanismen die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments verändern. Mit diesem Vergleich sollten die für die Phase der Abstoßung charakteristischen Zellpopulationen identifiziert werden. Sie könnten Zielstrukturen für eine mögliche therapeutische Intervention zur Vermeidung der Transplantatabstoßung darstellen.

2. Fragestellung

Um den gegenseitigen Einfluß der intraepithelialen Lymphozyten auf die Abstoßungsreaktionen im Dünndarm bzw. vice versa umfassend beurteilen zu können, soll zu folgenden Fragen Stellung genommen werden:

- 1. Welche Subpopulationen charakterisieren das intraepitheliale Kompartiment in einem nicht transplantierten Dünndarm?**
- 2. Unterliegt das intraepitheliale Kompartiment einem Zellaustausch bzw. welche Rolle spielt dieses Phänomen für die Akzeptanz des Transplantates?**
- 3. Welche zellulären Veränderungen des intraepithelialen Kompartimentes zeigen sich im Abstoßungsmodell (AB)?**
- 4. Welche zellulären Veränderungen des intraepithelialen Kompartimentes zeigen sich im Toleranzmodell (TOL)?**
- 5. Welcher Zusammenhang besteht zwischen Klinik, Zellphysiologie und Histologie?**

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten aus kontrollierten Inzuchtstämmen. Folgende Inzuchtstämme wurden verwendet:



Transplantat-Empfänger:	Lewis (LEW)	MHC-Haplotyp RT ^l ; (Charles River, Sulzfeld)
Transplantat-Spender:	Brown Norway (BN)	MHC-Haplotyp RT ⁿ ; (Charles River, Sulzfeld)

In der experimentellen Chirurgie der Universität Würzburg wurden die Tiere jeweils paarweise in Macrolon[®] Käfigen gehalten und erhielten Altromin[®]-Pressfutter und Wasser ad libitum. Der Transplantat-Spender erhielt zwei Tage, der Transplantat-Empfänger einen Tag vor Operation lediglich Wasser. Zu diesem Zeitpunkt waren die Ratten drei bis vier Monate alt und wogen zwischen 220 und 250 Gramm. Nach Transplantation standen die Tiere unter keimarmen Bedingungen in Scantainer[®] Klimaschränken der Firma Scanbur, Køgen, Dänemark unter Beobachtung (Haltungstemperatur: 22±2 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 50-60 %, 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus). Postoperativ erhielten die Tiere am Operationstag Wasser, am 1. Tag p.op. Wasser + 20 % Glucose, am 2. Tag p.op. Wasser + Fresubin und ab dem 3. Tag p.op. Wasser + Altromin[®]-Pressfutter + Haferflocken.

3.2 Immunsuppression

Die postoperative Immunsuppression erfolgte mit FK 506 (Tacrolimus[®]), einem Makrolidantibiotikum, das von Streptomyces tsukabaensis produziert wird³¹. FK 506 inhibiert die Ca²⁺-abhängigen Prozesse der Lymphokin-Synthese in den T-Lymphozyten. Intrazellulär bindet FK 506 an das Bindungsprotein FKBP12 und hemmt als FK 506-FKBP12-Komplex das für die IL-2 Synthese wichtige Enzym Calcineurin³². In diesem Versuch stand eine sterile Trockensubstanz der Firma Fujisawa aus Osaka, Japan (Prograf[®]) zur Verfügung. In Vorversuchen

wurde die therapeutische Dosis ermittelt. Die Ratten erhielten FK 506, verdünnt mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung, intramuskulär (im.) in der Dosierung 2 mg pro kg Körpergewicht.

3.3 Experimentelle Gruppen und immunsuppressives Therapie-schema

Die orthotope Dünndarmtransplantation (DDTX) wurde in der syngenen (LEW→LEW) und in der allogenen (BN→LEW) Kombination durchgeführt. Drei Modelle wurden unterschieden. Zusammen mit den jeweiligen Immunsuppressionsschemata sind diese in Tabelle 3.1 aufgeführt:

Tab. 3.1 Überblick über die drei Modelle KON, AB und TOL und die entsprechende Immunsuppression

Modell	Stammkombination	Tierzahl (n)	Immunsuppression FK 506 im.
KON Kontrolle	LEW→LEW	18	---
AB Abstoßung	BN→LEW	22	2 mg / kg KG Tag 0 - 5 p.op.
TOL Toleranz	BN→LEW	7	2 mg / kg KG Tag 0 - 9 p.op.

Zur Kontrolle dienten ferner unbehandelte, nicht transplantierte LEW- und BN-Ratten (jeweils n = 3). Zur Isolierung der IEL wurden die Tiere von KON und AB an Tag 3, 7, 14, 30, 60 p.op. und zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung um Tag 100 p.op. getötet. Im Toleranzmodell wurden drei Tiere an Tag 100 p.op., vier Tiere an Tag 250 p.op. getötet. Eine Übersicht hierzu findet sich in Tabelle 3.2.

Tab. 3.2 Übersicht über die Zeitpunkte der IEL-Isolierung in den verschiedenen Modellen (zu jedem Zeitpunkt wurden 3 bis 4 Tiere analysiert), (+) = IEL-Isolierung, (-) = keine IEL-Isolierung.

Modell	Tage p.op.						
	3	7	14	30	60	100	250
KON	+	+	+	+	+	+	-
AB	+	+	+	+	+	+	-
TOL	-	-	-	-	-	+	+

3.4 Mikrochirurgische Technik der Dünndarmtransplantation

Die orthotope Transplantation wurde nach dem von Deltz und Thiede beschriebenen Modell³³ in modifizierter Form durchgeführt. Die Operation erfolgte unter aseptischen unsterilen Bedingungen in Isoflurannarkose (Fa. Abbott, Wiesbaden). Als optische Hilfsmittel dienten Operationsmikroskope (Typ Mentor C, Wild M650, Leica, Fa. Codman, Herbruggen, Schweiz) mit 10- bis 25-facher Vergrößerung. Die Gefäßanastomosen erfolgten in Standardnahttechnik mit monofilen, nicht resorbierbaren Fäden der Stärke 8-0 (Prolene[®], Ethilon[®], Fa. Ethicon, Hamburg). Für die postoperative Analgesie stand Tramal[®] (Fa. Grünenthal, Stolberg) zur Verfügung. Nach DD-Entnahme wurden die Spendertiere durch intrakardiale Injektion von T61[®] (Fa. Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim) getötet.

3.4.1 Dünndarmexplantation

Nach Rasur der Spenderratte, Desinfektion und medianer Laparotomie erfolgte die Freipräparation der Vena porta, der Arteria mesenterica superior und der Aorta abdominalis. Anschließend wurde der Dünndarm vom Treitz'schen Band bis ca. 1 cm vor der Ileocoecalklappe mit den Gefäßstielen der A. mesenterica superior, den im Mesenterialstrang liegenden Lymphknoten und der V. portae aus dem Spendertier entfernt. Nach Perfusion der Transplantatgefäße und des Darmlumens mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung (4 °C) wurde das Spenderorgan bis zur Implantation in NaCl-Lösung konserviert. Die kalte Ischämiezeit betrug dabei 1,5 Stunden.

Folgende Abbildung (Abb. 3.1) zeigt das explantierte Organ:

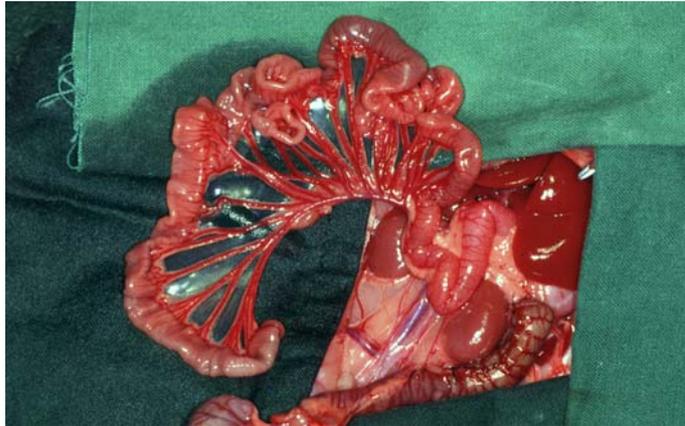


Abb. 3.1 Dünndarm einer LEW-Ratte am Übergang Ileum / Coecum abgesetzt.

3.4.2 Orthotope Dünndarmtransplantation

Nach Längslaparotomie des Empfängers und Explantation des Empfänger-Dünndarms (Kap. 3.4.1) wurde der Spender-Dünndarm orthotop eingesetzt. Die Verbindung der entsprechenden Gefäße (Aorta, Arteria mesenterica superior und Vena portae) erfolgte in End-zu-Seit-Anastomose in fortlaufender Naht mit einem 8-0 Ethilon[®]-Seidenfaden. Die Operationsdauer betrug dabei 1,5 Stunden. Transplantattiere, die innerhalb der ersten drei Tage p.op. starben (<10 %), wurden als technische Versager betrachtet und nicht in die Analyse aufgenommen.

3.5 Nachuntersuchung und Beurteilung des Allgemeinzustandes der transplantierten Tiere

Die Nachuntersuchung der transplantierten Tiere bezüglich Allgemeinzustand, Gewicht, Operationswunden und Transplantatfunktion (Durchfall ja/nein) fand täglich statt. Beurteilungskriterien waren: Vigilanz, Körperhaltung, Weichheit des Abdomens, Beschaffenheit des Fells, Tastbarkeit der Lymphknoten und Veränderungen an Augen und Nase. Die Gewichtsverläufe wurden in Prozent des Ausgangsgewichts dargestellt. Alle anderen Parameter wurden in einer vierstufigen Graduierungsskala (Merkmal 0 = nicht / 1 = leicht / 2 = mittel / 3 = stark ausgeprägt) aufgenommen.

3.6 Obduktion der Versuchstiere und Organgewinnung

Zu den in Kapitel 3.3 genannten Zeitpunkten wurden die Tiere in Isofluranarkose getötet und obduziert. Nach makroskopischer Beurteilung der Bauchorgane erfolgte die Entnahme des Spender-Dünndarms.

3.6.1 Makroskopische Beurteilung der Bauchorgane

Nach Laparatomie wurden die Bauchorgane inspiziert und die Anastomosen auf ihre Durchgängigkeit hin überprüft. Es folgte die Beurteilung des Dünndarms auf Farbe, Konsistenz und Verwachsungen. Entsprechend wurden Spender und Empfänger-Lymphknoten sowie Milz, Leber und Nieren des Empfängers beurteilt.

3.6.2 Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aus dem Dünndarm

Zur Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) wurde in diesem Versuch eine modifizierte Methode von Kearsy und Stadnyk angewendet³⁴. Damit ließen sich die IEL mit großer Reinheit (92 bis 95 % Lymphozyten) und 98 % Vitalität isolieren. Pro Dünndarm betrug die isolierte Lymphozytenzahl circa $3 (\pm 2,5) \times 10^6$.

Die Isolierung der IEL verlief wie folgt:

1. Nach Entnahme des Spender-Dünndarms (Ileum und Jejunum) erfolgte die Abtrennung von je 1 cm an beiden Dünndarm-Enden für die histologische Untersuchung. Danach wurde der Dünndarm in vier gleich große Stücke (= „Schläuche“) geschnitten.
 - Jeder „Schlauch“ wurde auf eine 14 G Knopfkanüle (Fa. Braun, Melsungen) aufgezogen.
 - Das Schlauchende an der Kanülenspitze wurde mit einem monofilen Faden der Stärke 1-0 (Prolene[®], Fa. Ethicon, Hamburg) mit vierfachem Knoten verschlossen, wobei die Kanüle dabei im Schlauchinneren blieb.
 - Anschließend wurde vom freien Schlauchende her der Dünndarm wieder rückwärts über das verschlossene Schlauchende gestülpt, so dass die Innenseite d.h. die Epithelseite des Dünndarms außen lag.
 - Das offene Schlauchende wurde ebenfalls mit vierfachem Knoten verschlossen.
 - Über die Kanüle wurde in den Darm PBS (phosphate buffered saline) bis hin zu maximaler Spannung gefüllt. Anschließend wurde der Schlauch mit vierfachem Knoten direkt vor der Kanülenspitze verschlossen.
 - Danach wurde der Schlauch von der Kanüle abgetrennt und bis zur weiteren Verarbeitung in einer Lösung aus PBS und 2 mM Dithiothreitol (DDT, Sigma, Taufkirchen) zwischengelagert.
2. Diese so vorbereiteten „Dünndarmschläuche“ wurden in einem Erlenmeier-Kolben in RPMI 1640 Medium (Fa. Invitrogen life technologies, Pailsley, Karlsruhe) 2 Minuten bei einer Frequenz von 2000 Umdrehungen / min geschüttelt (gevortext). Dabei fielen die intraepithelialen Lymphozyten aus dem Epithel und reicherten sich im RPMI 1640 Medium an.
3. Mit diesem RPMI 1640 Medium, gefiltert über Gaze (Fa. Hartenstein, Würzburg), wurde ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) bis zur 35 ml-Skalierung aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 15 ml Percoll (Fa. Amersham pharmacia biotech, Freiburg).

4. Die in dieser 50 ml Lösung, bestehend aus 35 ml RPMI 1640 Medium und 15 ml Percoll, befindlichen IEL wurden 15 min bei 22 °C und 500 xg zentrifugiert.
5. Das IEL-Pellet wurde mit 5 ml PBS in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen resuspendiert, mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und ein zweites Mal zentrifugiert (5 min, 22 °C, 500 xg).
6. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS gelöst. Hieraus wurde ein 20 µl Aliquot entnommen, mit Trypanblau angefärbt und in der Zählkammer ausgezählt. Im Durchschnitt ließen sich mit dieser Methode ca. $3 (\pm 2.5) \times 10^6$ Lymphozyten pro Dünndarm isolieren (Abb. 3.2).

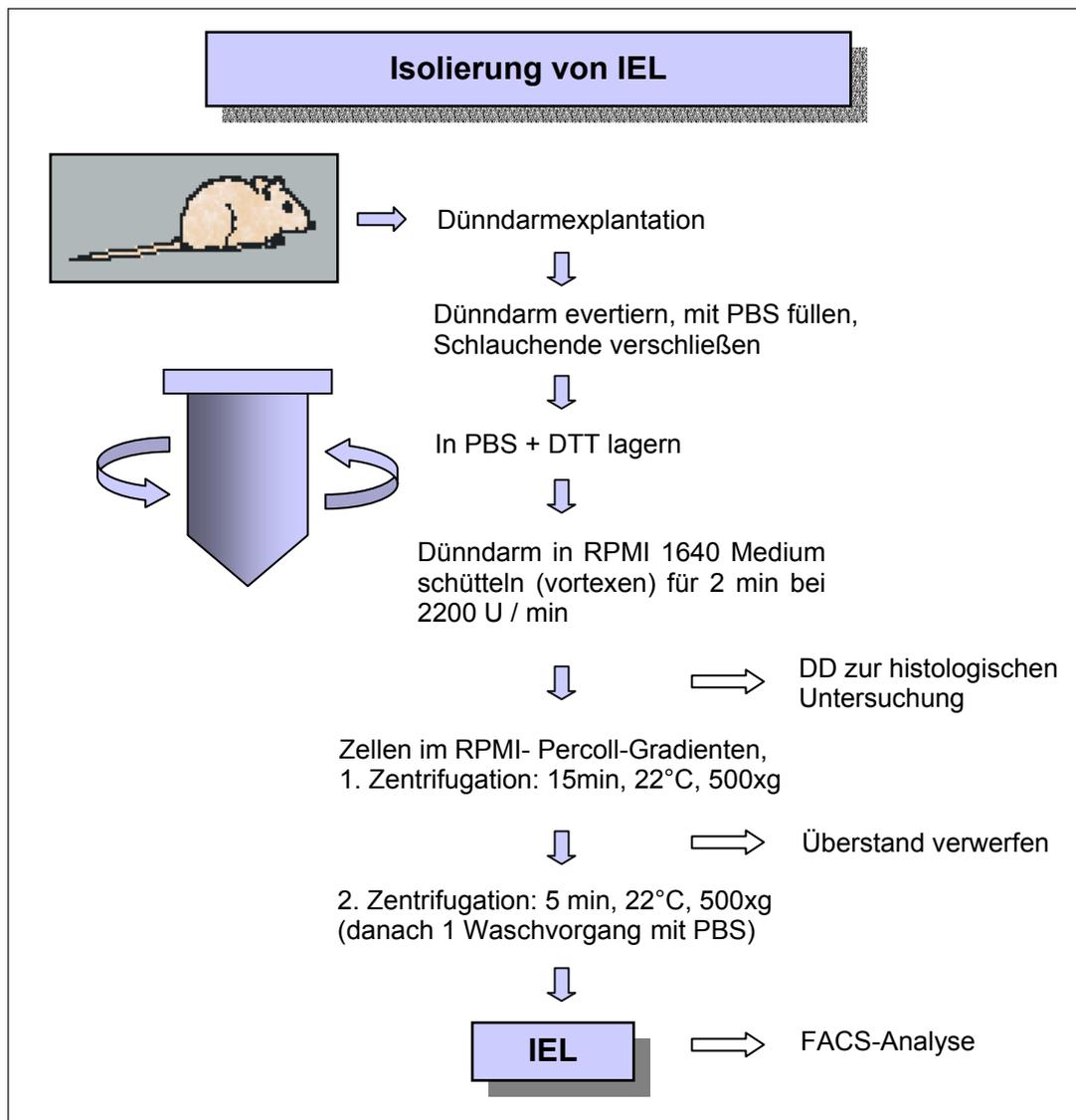


Abb. 3.2 Protokoll zur Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL).

3.6.3 Histologische Untersuchung der Dünndarms

Zu jedem Dünndarm (DD) erfolgte eine histologische Kontrolle des Abstoßungszustandes. Hierzu wurden direkt nach DD-Entnahme an beiden Enden jeweils 1 cm lange Stücke abgeschnitten, diese der Länge nach geöffnet, gewendet und wieder so aufgerollt, dass die Epithelschicht außen zu liegen kam. Anschließend wurde der aufgerollte Dünndarm mit einem monofilen Faden der Stärke 4-0 (Prolene[®], Fa. Ethicon, Hamburg) zusammengebunden, in 4 %-igem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Daraus wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und anschließend beurteilt.

3.7 Färbung mittels monoklonaler Antikörper

In Vorversuchen wurden die Antikörper (Fa. Serotec, England über Fa. Biozol, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um die für die jeweiligen Färbungen optimalen Antikörperkonzentrationen zu ermitteln.

3.7.1 Antikörper

Spender- und Empfängerlymphozyten wurden durch folgende „Rattenstamm“-spezifische Antikörper, die gegen das entsprechende MHC-Klasse-I-Molekül gerichtet waren, voneinander unterschieden (Tab. 3.3):

Tab. 3.3 Monoklonale Antikörper zur Differenzierung zwischen Empfänger- (NDS60) und Spenderlymphozyten (OX27).

Antikörper	MHC Haplotyp	Spezifität	Verdünnung / µl pro Färbeansatz
NDS60	RT1.A ^l	MHC-I-Antigen (LEW)	1 : 50 / 50 µl
OX27	RT1.A ⁿ	MHC-I-Antigen (BN)	keine Verdünnung / 5 µl

Der Antikörper OX27 wurde in der FITC-konjugierten Form verwendet, während NDS60 in der unkonjugierten Form vorlag und deshalb mit einem Phykoerythrin-gekoppelten Sekundär-Antikörper markiert wurde.

Neben der Einteilung in Spender- und Empfängerlymphozyten erfolgte die Aufteilung in die Lymphozytensubpopulationen mittels folgender Antikörper (Tab. 3.4):

Tab. 3.4 Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Differenzierung in Leukozytensubpopulationen mit der jeweiligen Verdünnung pro Färbeabsatz.

	Antikörper	Oberflächenmarker	Spezifität
Lymphozytenmarker	OX1	CD45	„Leukocyte common antigen“ (LCA), Positivkontrolle
CD4⁺ T-Lymphozyten	W3/25	CD4	T-Helfer-Lymphozyten, Makrophagensubpopulation
CD8⁺ T-Lymphozyten	OX8	CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressorzellen (CD8 α -Kette)
$\alpha\beta$ T-Zellrezeptor	R73	$\alpha\beta$ -TCR	$\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (auf fast allen T-Lymphozyten)
$\gamma\delta$ T-Zellrezeptor	V65	$\gamma\delta$ -TCR	$\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (auf CD3 positiven T-Lymphozyten)
B-Lymphozyten	OX33	CD45RA o. A / B	„Leukocyte common antigen“ (LCA) (nur auf B-Zellen)
NK-Zellen	10/78	CD161 NKR-P1A	Natürliche Killerzellen (60 kD Homodimer)
Aktivierungsmarker	OX39	CD25	IL-2-Rezeptor (55 kD, α -Kette) (auf T-Zellen)
Aktivierungsmarker	1A29	CD54	ICAM-1 (90 kD-Kette) (auf T-Zellen) (Adhäsionsmolekül, Ligand für LFA-1)

3.7.2 Doppel- und Dreifachfärbung

Die pro Dünndarm isolierten intraepithelialen Lymphozyten [$3 (\pm 2,5) \times 10^6$ Zellen] wurden in 1 ml PBS resuspendiert und zu je 50 μ l für die Antikörperfärbungen verwendet (entspricht einer Zellzahl von $1,5$ bis $2,8 \times 10^5$ Zellen). Alle Inkubationsschritte wurden im Eisbad bei 4 °C für 25 min durchgeführt. In Tabelle 3.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkombinationen sowie die pipettierten Antikörpervolumina aufgeführt.

Tab. 3.5 Färbeprotokoll, Antikörperverdünnungen und pipettierte Volumina. (F = FITC / PE = Phykoerythrin / DAM = Esel-anti-Maus / MS = Mausserum / AK= Antikörper/ Sek-AK = Sekundär-Antikörper / --- = keine Zugabe von Reagens / X = Zugabe von Reagens).

Färbe-ansatz	1. AK	2. AK	Sek-AK	Maus-serum	3. AK	Streptavidin Tri Colour®
1)	OX8 F	W3/25 PE	---	---	R73 BIO	X
2)	V65 F	OX8 PE	---	---	W3/25 BIO	X
3)	1A29 F	OX8 PE	---	---	W3/25 BIO	X
4)	OX39 F	OX8 PE	---	---	W3/25 BIO	X
5)	OX27 F	NDS60	DAM-PE	MS	R73 BIO	X
6)	OX27 F	NDS60	DAM-PE	MS	OX33 BIO	X
7)	OX27 F	OX8 PE	---	---	W3/25 BIO	X
8)	OX39 F	OX8 PE	---	---	NKRP1 BIO	X
9)	1A29 F	OX8 PE	---	---	NKRP1 BIO	X
10)	OX1 F	---	---	---	---	---

	Verdünnung:		Pipettierte Volumina:
FITC und PE-konjugierte AK	---		1 μ l
biotinylierte AK	---		5 μ l
Mausserum	1:200	in 1800 μ l PBS	50 μ l
Sek-AK (PE)	1:500	in 499 μ l PBS	50 μ l
Streptavidin Tri-Colour®	---		1 μ l
NDS60	1:50	in 980 μ l PBS	50 μ l
OX27	1:10	in 90 μ l PBS	50 μ l
OX33 BIO	1:1	in 150 μ l PBS	50 μ l
OX39 F	1:128	in 1200 μ l PBS	50 μ l

Bis auf NDS60 waren alle Antikörper entweder mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC oder PE konjugiert oder sie waren mit Biotin markiert.

Wurden Biotin-konjugierte Antikörper verwendet, dann wurden die Zellen in einem weiteren Schritt mit Streptavidin (Fa. Caltag Laboratories, Deutschland) inkubiert, welches mit sehr hoher Affinität an das kleine Biotinmolekül bindet. Das Streptavidin war mit dem Fluoreszenzfarbstoff TriColor[®] verknüpft; so daß auch die Bindung solcher Antikörper an Oberflächenmoleküle durchflußzytometrisch analysiert werden konnte.

Waren Primärantikörper, wie der NDS60, weder mit einem Fluoreszenzfarbstoff, noch mit Biotin konjugiert, dann mußte ein sogenannter Sekundärantikörper, hier der mit Phykoerythrin konjugierte Esel-anti-Maus (DAM) Antikörper, hinzugefügt werden. Dieser band an den unkonjugierten Primärantikörper. Sollten weitere Antikörper dem Färbeansatz zugesetzt werden, mußten, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mit Mausserum blockiert werden (siehe auch Abb. 3.3).

Wurden konjugierte Antikörper verwendet, unabhängig davon, ob sie mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Biotin markiert waren, so konnten sie alle zusammen in einem Färbeansatz mit den Zellen inkubiert werden. Waren Biotin-konjugierte Antikörper im Färbeansatz vorhanden, wurde nach einem Waschschrift den in PBS resuspendierten Zellen noch 5 µl Streptavidin zugesetzt.

Wurden Färbeansätze mit NDS60, dem unkonjugierten Antikörper, durchgeführt, so war die Reihenfolge der Inkubationsschritte wie folgt:

1. NDS60;
2. Esel-anti-Maus (DAM);
3. Absättigung freier Bindungsstellen mit Mausserum;
4. weitere konjugierte Primärantikörper;
5. Zugabe von Streptavidin, falls ein Biotin-konjugierter Antikörper eingesetzt wurde.

Zwischen allen Färbeschriften wurde jeweils ein Waschschrift durchgeführt.

Eine schematische Darstellung der Färbe- und Markierungsmethoden zeigt Abbildung 3.3.

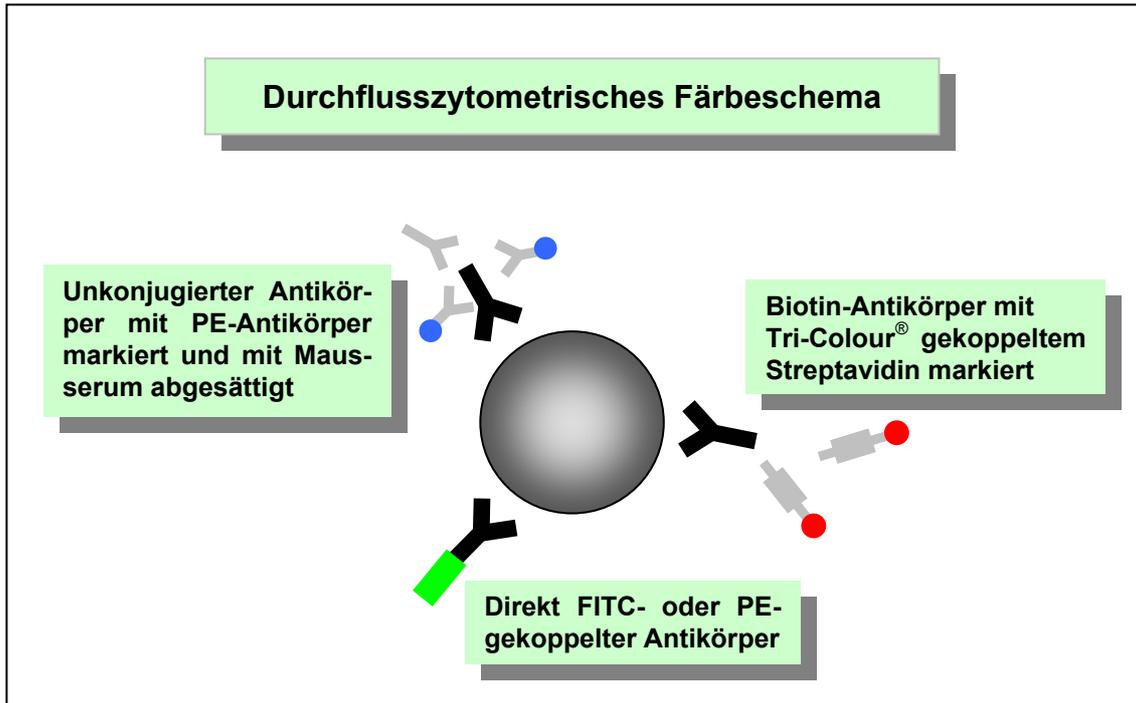


Abb. 3.3 Färbeschema für durchflusszytometrische Analysen.

3.8 Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der markierten Zellsuspensionen erfolgte in einem Durchflusszytometer

(FACScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), in dem die Zellen einen Argon-Laserstrahl von 488 nm Wellenlänge passierten. Die Lichtstreuung, durch die Zelle selbst verursacht, oder die Fluoreszenz, durch an Antikörper gebundene Farbstoffe, ermöglichten eine Auswertung nach fünf Parametern (Zellgröße, Zellgranularität, 1., 2. und 3. Fluoreszenzfarbe). Das Absorptionsspektrum des FITC-konjugierten Antikörpers lag im Grünwellenbereich ($\lambda = 530$ nm), das Absorptionsspektrum des PE-konjugierten Antikörpers im Rotwellenbereich ($\lambda = 570$ nm). Pro Färbeansatz wurden 7.000 - 10.000 Zellen ausgewertet.

3.9 Auswertung und Verarbeitung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen PC-Lysis II (Fa. Becton, Dickinson, Heidelberg) und WinMDI 2.5 (Joseph Trotter) unter Einbeziehung aller fünf Parameter. Die Aufarbeitung der Daten und die

Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Excel 2000 (Fa. Microsoft). In jeder Versuchsreihe wurden unterschiedliche Kontrollansätze verwendet. Als Positivkontrolle diente der Pan-Leukozytenantikörper OX1; als Negativkontrolle und zum Ausschluß von Kreuzreaktivitäten wurde die Eigenfluoreszenz der IEL ohne Antikörperzugabe sowie die jeweils alleinige Inkubation mit dem Sekundär-PE-Antikörper bzw. mit dem Tri-Colour[®]-gekoppelten Streptavidin ohne entsprechende Primärantikörper gemessen. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil an der Lymphozytenpopulation angegeben. In der Regel wurden pro Färbung von den ca. 100.000 Zellen pro Messröhrchen stets 10.000 Zellen ausgewertet, wobei zuvor bei der Einstellung der Zellgröße (FSC-Profil) und der Granularität (SSC-Profil) das Messfenster so gewählt wurde, dass nur lebende OX1-positive Leukozyten erfasst wurden.

3.10 Statistische Auswertung

Alle ermittelten Zahlenwerte, wie Gewichtsverläufe, Laborwerte und durchflußzytometrisch gemessene Prozentwerte wurden der statistischen Analyse unterzogen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe von Excel 2000 (Fa. Microsoft) ermittelt. Die Zahlenwerte wurden gerundet.

4. Ergebnisse

In dieser Versuchsreihe wurden folgende drei Modelle untersucht:

Kontrolle (KON): Hier wurden LEW-Empfängertiere syngen transplantiert (Stammkombination: LEW→LEW). Wegen der MHC- und Non-MHC-Kompatibilität (MHC = major histocompatibility complex) zwischen Spender und Empfänger war keine Immunsuppression notwendig. In diesem Modell sollte der Einfluß der Transplantation auf die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes untersucht werden. Als weitere Kontrollen dienten nicht transplantierte LEW- und BN-Tiere, um die physiologische Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes zu analysieren.

Abstoßungsmodell (AB): In diesem Modell wurde der BN-Dünndarm orthotop in die LEW-Ratte transplantiert (Stammkombination: BN→LEW). Hierbei handelte es sich um eine allogene Stammkombination, d.h. es bestand keine MHC-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Die zur Verhinderung der Abstoßung notwendige Immunsuppression mit FK 506 wurde in einer Dosierung von 2 mg / kg KG / Tag von Tag 0 bis Tag 5 p.op. verabreicht. In diesem Modell sollte der Einfluss der Abstoßung auf die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes untersucht werden.

Toleranzmodell (TOL): Dieses Modell basierte auf der gleichen Stammkombination wie das Abstoßungsmodell. Der BN-Dünndarm wurde ebenfalls orthotop in die LEW-Ratte transplantiert. Der Unterschied lag ausschließlich in der Dauer der Immunsuppression (ebenfalls 2 mg / kg KG / Tag FK 506), die hier vier Tage länger, von Tag 0 bis Tag 9 p.op., erfolgte. Hier sollte die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes eines MHC-differenten Organs in der Phase der Toleranz untersucht werden. Folgende Kriterien der Toleranz waren erfüllt: (1) Das Dünndarmtransplantat wurde nach Absetzen der Immunsuppression langfristig ohne klinische Zeichen der Abstoßung akzeptiert. (2) Erhielten diese Tiere 60 Tage nach der Dünndarmtransplantation ein heterotop transplantiertes BN-Herz, d.h. das

Immunsystem wurde ein zweites Mal mit Antigenen des BN-Stammes in Kontakt gebracht, kam es nicht zur Abstoßung beider Transplantate. (3) Erhielten die Tiere jedoch zum gleichen Zeitpunkt ein heterotop transplantiertes Drittstamm-Herz, z.B. vom Rattenstamm Dark Agouti (DA), d.h. das Immunsystem wurde mit für ihn unbekanntem Antigenen in Kontakt gebracht, kam es, wie erwartet, zur Abstoßung des Herzens. Dies zeigte, daß das Immunsystem der LEW-Empfängertiere durch die kurzzeitige Immunsuppression die Fähigkeit erwarb, BN-Antigene als selbst zu akzeptieren, während die Reaktivität gegen andere Fremdartigen, hier Antigenen von DA, erhalten blieb.

4.1 Charakterisierung der Versuchsreihen nach Klinik und Histologie

Das **Ausgangsgewicht** der zu transplantierenden Tiere lag zwischen 220 und 250 g. Nach der Dünndarmtransplantation stieg bis Tag 65 das Gewicht der transplantierten Tiere aller drei Versuchsreihen kontinuierlich an. Die Ratten wogen zu diesem Zeitpunkt ca. 350 g. Während die Tiere des Abstoßungsmodells von diesem Zeitpunkt an stark an Gewicht verloren, zeigten die Tiere des Kontroll- und Toleranzmodells weiterhin eine kontinuierliche Gewichtszunahme. An Tag 100 wogen diese Tiere ca. 450 g, die AB-Ratten hingegen nur noch ca. 300 g (Abb. 4.1).

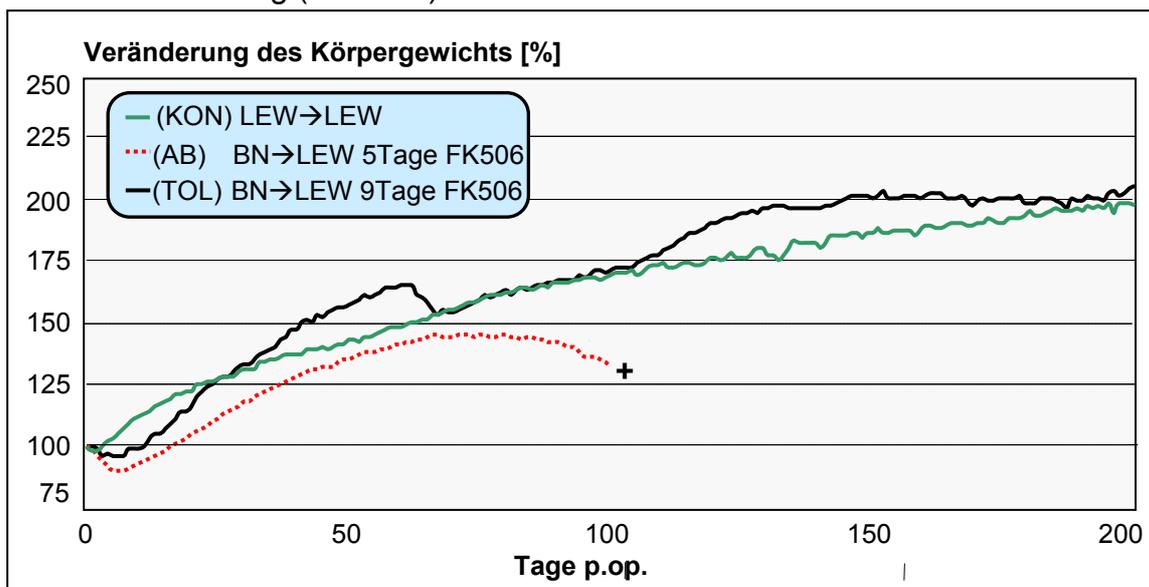


Abb. 4.1 Postoperative Gewichtsverläufe der Modelle KON, AB und TOL. Das Abstoßungsmodell (AB) zeigte bereits 30 Tage vor Ausprägung der klinischen Symp-

tome der Abstoßung eine Gewichtsabnahme. Im Toleranzmodell (TOL) hingegen nahmen die Tiere kontinuierlich an Gewicht zu.

Neben der täglichen Gewichtskontrolle erfolgte eine gründliche Inspektion der Tiere hinsichtlich **klinischer Veränderungen**. So zeigten sich im Abstoßungsmodell ab Tag 80 parallel zum Gewichtsverlauf Symptome der Abstoßung, wie eingeschränkte Vigilanz, gekrümmte Körperhaltung und geblähtes Abdomen. Kurz vor Transplantatabstoßung gegen Tag 100, die mittlere Überlebenszeit dieser Tiere betrug 98 ± 2 Tage (Abb. 4.2), entwickelten sie Diarrhoe und es traten Entzündungen an den Schleimhäuten, besonders an Nase, Augen und Ohren, hinzu. Hingegen ließen sich in der Kontrolle und im Toleranzmodell keine derartigen Erscheinungen beobachten. Wie erwartet, waren die TOL-Tiere auch am Versuchsende, an Tag 250 p.op., ohne Symptome.

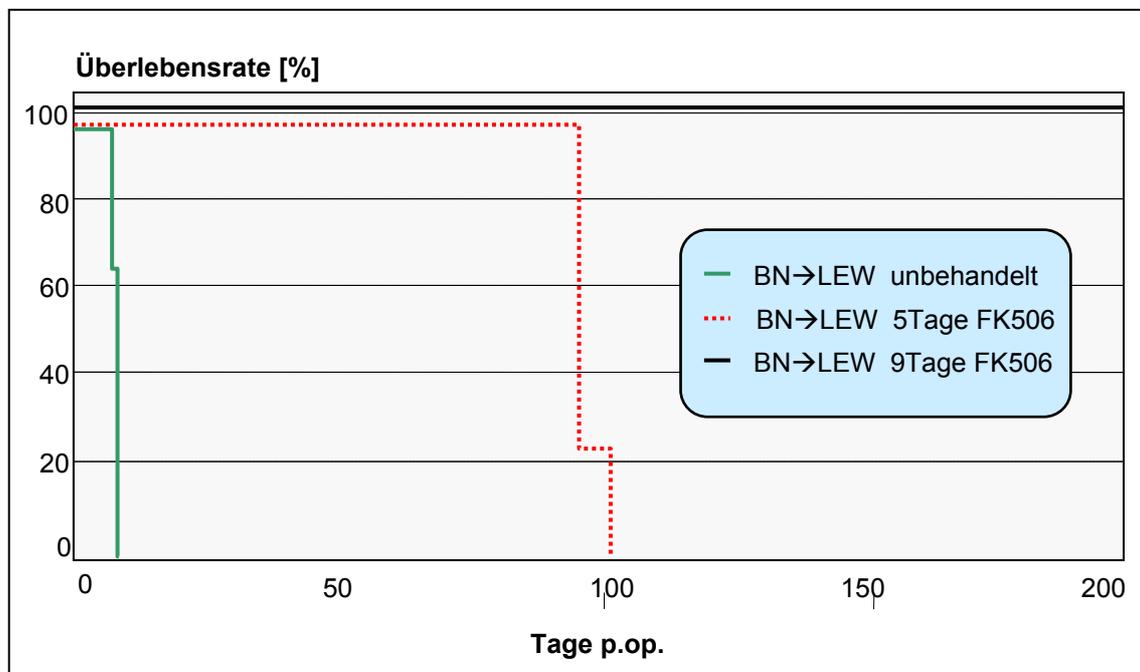


Abb. 4.2 Postoperative Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Modelle Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL). Die Tiere des Abstoßungsmodells verstarben gegen Tag 100, während die Tiere des Toleranzmodells langfristiges Überleben zeigten. Hier wurde der Versuch an Tag 250 beendet.

Die **Histologie** syngen transplantierte Dünndärme zeigte eine dem unbehandelten Dünndarm vergleichbar gut erhaltene Zottenarchitektur. Auch das Epithel war unbeschadet. Bei den allogenen Transplantaten des Abstoßungsmodells (AB) hingegen fanden sich am Tag der Abstoßung folgende Veränderungen: Abgestumpfte, plumpe Villi begleitet von Krypten-Hyperplasie und Kryptenabszessen (nekrotische Zellen in den Krypten). Die

glatte Muskulatur zeigte eine deutliche Dickenzunahme. Letztendlich ließen alle Darmschichten eine starke Infiltration mit Lymphozyten erkennen. Das Toleranzmodell (TOL) hingegen zeigte sowohl an Tag 100 als auch an Tag 250 eine sehr gut erhaltene Zottenarchitektur und ein unbeschädetes Epithel (Abb. 4.3).

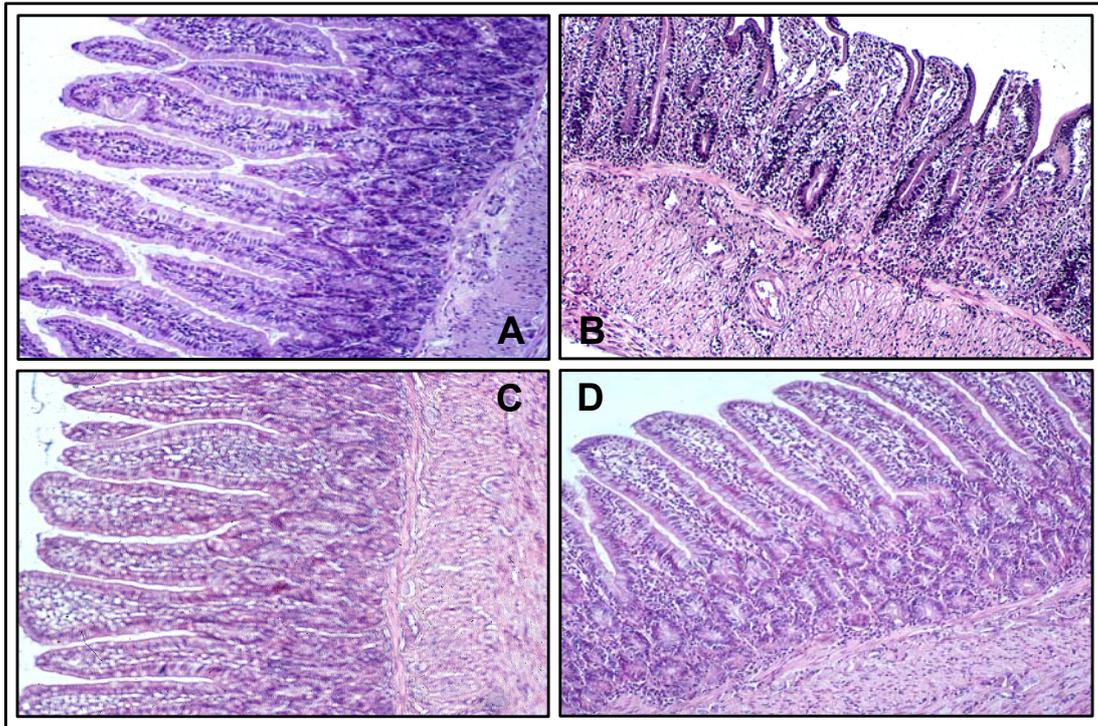


Abb. 4.3 Mikroskopische Darstellung (HE-Färbung / x200) transplanteder Dünndärme in den drei Modellen:

A) KON	= Kontrolle: Tag 100	unbeschädetes Epithel mit sehr gut erhaltener Zottenarchitektur
B) AB	= Abstoßungsmodell: Tag 98	zerstörte Zottenarchitektur: plumpe Villi, Kryptenhyperplasie, Kryptenabszesse, verdickte glatte Muskulatur und Infiltration mit Entzündungszellen
C und D) TOL	= Toleranzmodell: Tag 250:	unbeschädetes Epithel mit sehr gut erhaltener Zottenarchitektur

Zusammenfassung:

Die beiden Modelle Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) unterschieden sich in Abhängigkeit von der immunsuppressiven Gesamtdosis in der Langzeitfunktion ihrer Dünndarmtransplantate. Dies war sowohl klinisch, als auch histologisch zu beobachten. Die Tiere des Abstoßungsmodells (AB) zeigten nach einer unauffälligen postoperativen Phase bis Tag 65 eine kontinuierliche Gewichts-

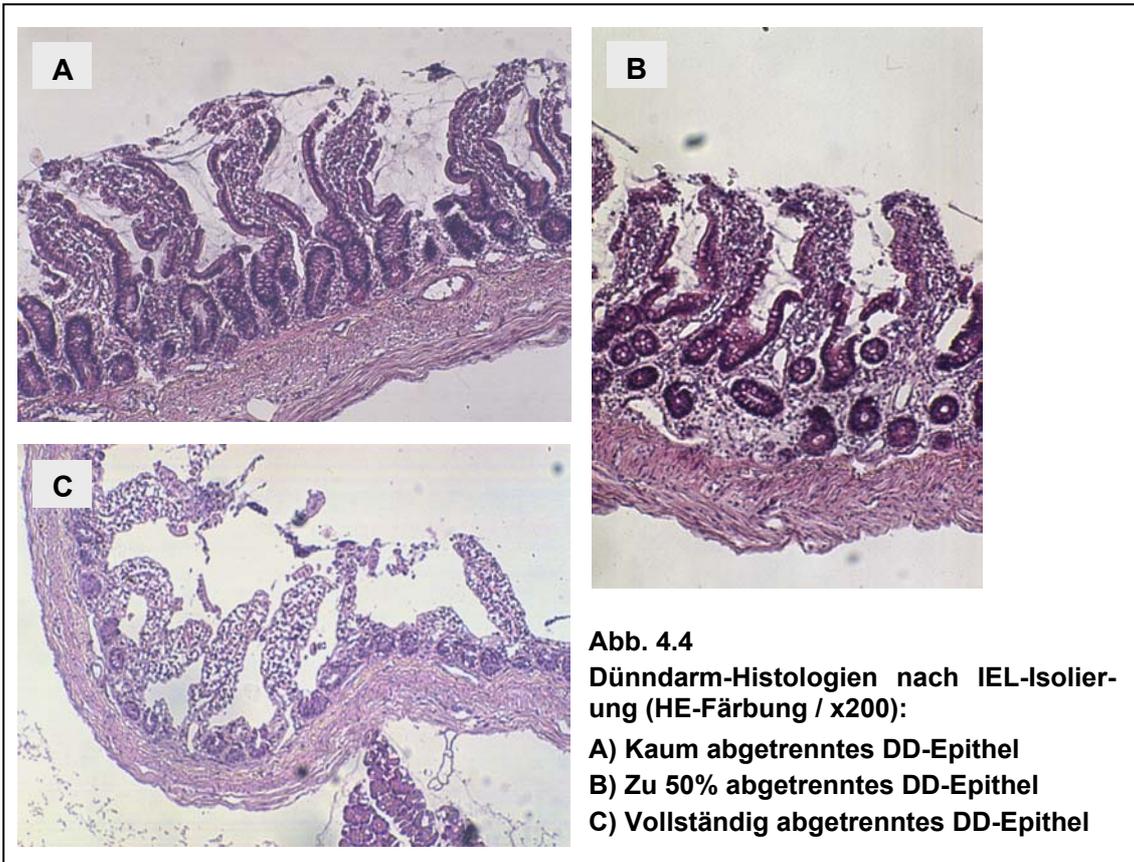
abnahme. An Tag 100 manifestierten sich die klinischen Zeichen der Abstoßung wie Gewichtsabnahme und Diarrhoe. Histologisch wiesen die Transplantate eine starke Zottenatrophie auf. Die Tiere des Toleranzmodells (TOL) waren über den gesamten Beobachtungszeitraum von 250 Tagen klinisch unauffällig und ihre Transplantate zeigten histologisch ein unbeschädetes Epithel.

4.2 Durchflußzytometrische Analyse der intraepithelialen Lymphozyten

Für die durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aus dem Dünndarmepithel, wie in Kapitel 3 beschrieben, isoliert. Die dabei pro Dünndarm gewonnene Zellzahl lag in der Regel bei ca. $3 (\pm 2,5) \times 10^6$ Lymphozyten. Nach Angaben der Erstbeschreiber dieser Methode, Kearsy und Stadnyk³⁵, die darauf beruht, die IEL durch Zentrifugalkraft aus dem Epithel herauszuschleudern, sollte hierbei das Epithel mit den darin befindlichen IEL von der Lamina propria abgetrennt werden. Um dies zu überprüfen, wurde nach jeder IEL-Isolierung ein histologisches Präparat vom Dünndarm angefertigt.

In dieser Arbeit zeigte sich, daß mit dieser Methode in über 50 % der Fälle nicht mehr als die Hälfte des Dünndarmepithels von der Lamina propria abgetrennt war. Dabei wurde keine Beschädigung der Lamina propria beobachtet. Nach diesen Ergebnissen bestand kein Zusammenhang zwischen isolierter Zellzahl und dem Anteil des abgetrennten Epithels. Aus Präparationen mit großflächig abgetrenntem Epithel ließen sich signifikant nicht mehr IEL isolieren als aus Präparationen mit wenig abgetrenntem Epithel.

Die Abbildung 4.4 zeigt repräsentative Histologien:



Um den Anteil der isolierten IEL zu bestimmen, wurden die Lymphozyten mit Trypanblau gefärbt und in einer Zählkammer ausgezählt. Anschließend erfolgte die durchflußzytometrische Phänotypisierung der IEL. Für jede Einzelmessung wurden 7.000 bis 10.000 Zellen im FACScan[®] ausgewertet. Die Abbildung 4.5 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Analysen. In einem ersten Schritt wurde bei diesen Zellen die Expression von CD45 als Lymphozytenmarker bestimmt. Nur CD45 (OX1) positive Zellen, die sich hauptsächlich in der Region R1 befanden, wurden analysiert (Abb. 4.5). Sie stellten somit die Ausgangs- und Bezugspopulation für alle weiteren Auswertungen dar. Der Anteil der in dieser Region R1 liegenden Lymphozyten betrug zwischen 92 und 95 %.

Die restlichen Zellen hingegen – eingegrenzt in R2 – waren CD45 negativ und somit keine Lymphozyten. Die beiden Regionen R1 und R2 sind in dem folgenden Contour-Diagramm (Zwei-Parameter-Auswertung / Abb. 4.5), in dem die Zellen nach Größe (Vorwärts-Seitwärts-Streulicht oder FSC) und

Granularität (Seitwärts-Seitwärts-Streulicht oder SSC) aufgetrennt sind, eingezeichnet. Die beiden auf der folgenden Seite abgebildeten Histogramme (Ein-Parameter-Auswertung / Abb. 4.6) zeigen die für jede Region getrennte Fluoreszenzauswertung für den anti-CD45 Antikörper OX1. Dabei zeigt die Verschiebung des Peaks nach rechts, d.h. die Zunahme der Fluoreszenzintensität, die Expression von CD45 an.

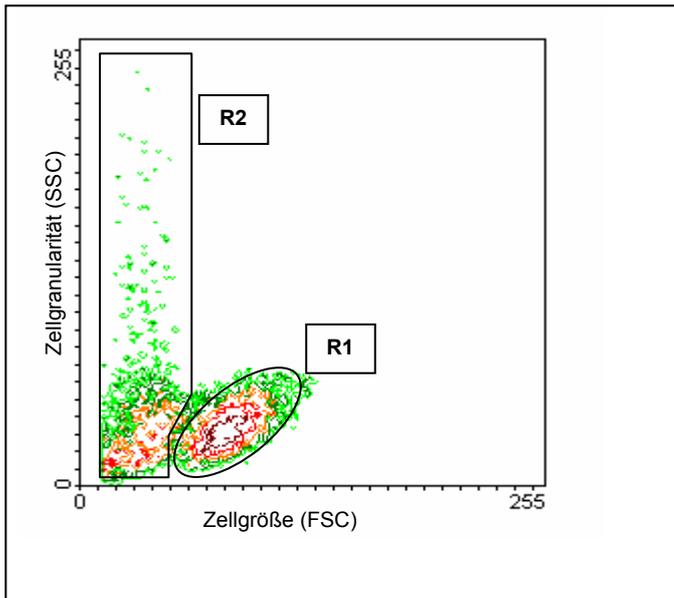


Abb. 4.5

Darstellung der isolierten intraepithelialen Lymphozyten im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht als Contour-Diagramm (Lymphozyten in Region R1, Nicht-Lymphozyten in Region R2).

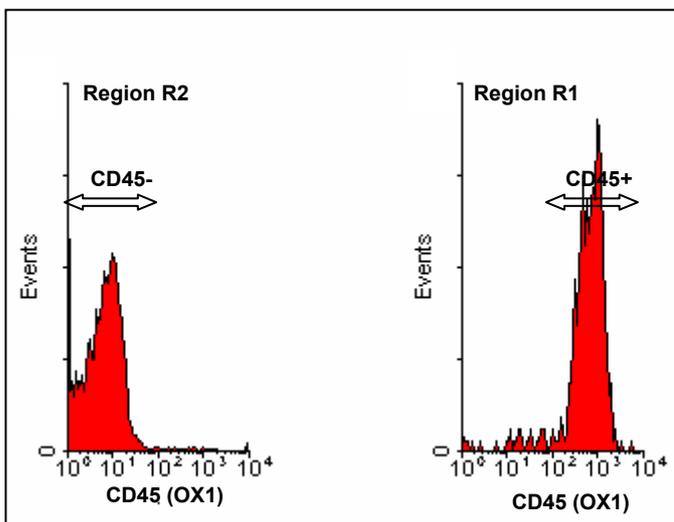


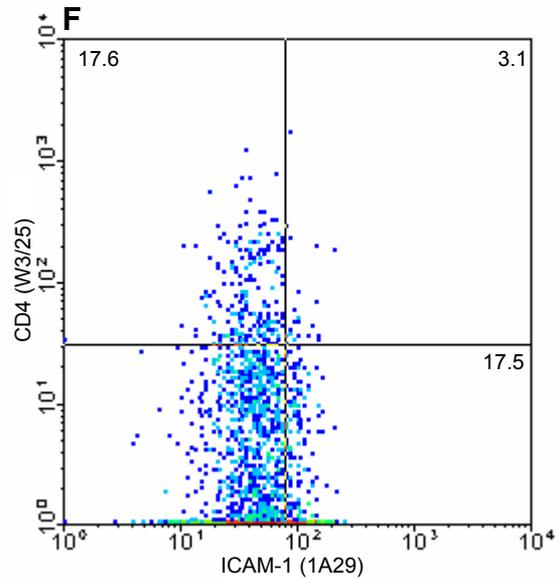
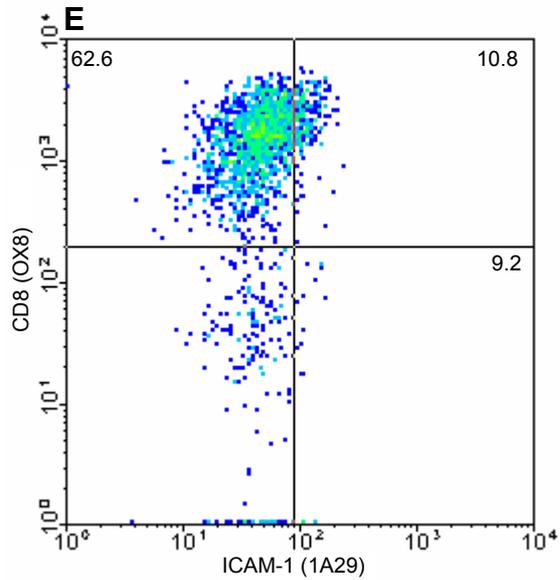
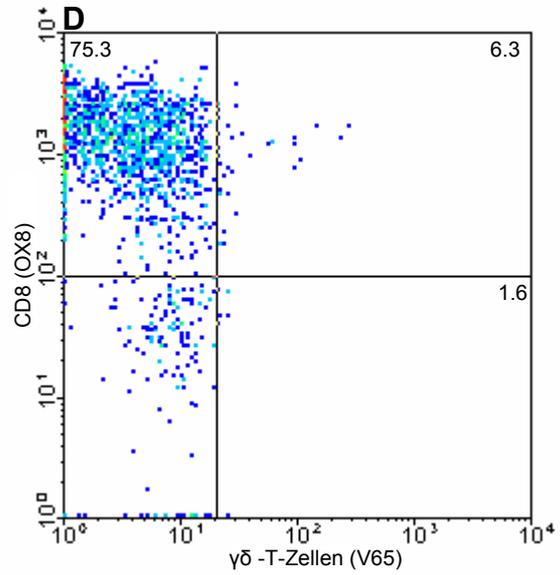
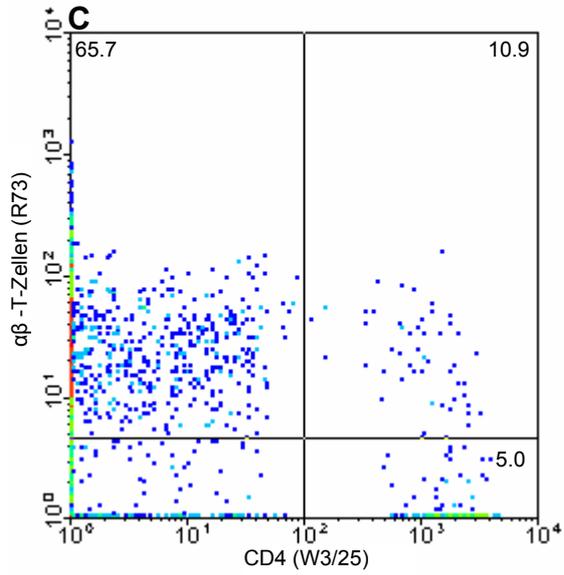
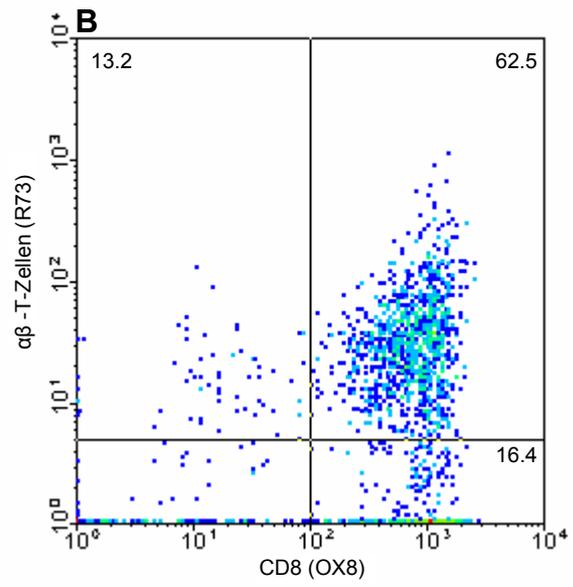
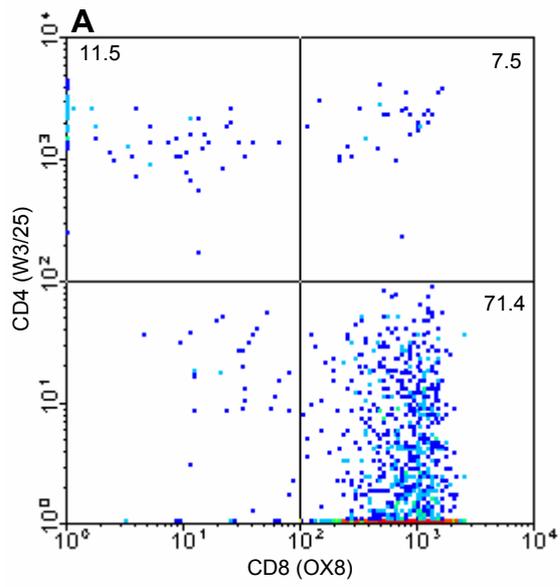
Abb. 4.6

Darstellung der CD45 (OX1)-Expression der in den Regionen R1 (=Lymphozyten) und R2 (=Nicht-Lymphozyten) befindlichen Zellen als Histogramm.

Im Gegensatz zu den Nicht-Lymphozyten exprimieren die Lymphozyten den Lymphozyten-Marker CD45, veranschaulicht durch die Verschiebung der Fluoreszenzintensität nach rechts auf der x-Achse.

In den auf der folgenden Seite dargestellten Abbildungen (Abb. 4.7 A bis L) sind die Fluoreszenzdaten der verwendeten Antikörper als sogenannte Dot-Plot-Analyse (Zwei-Parameter-Auswertung) dargestellt.

Diese Bilder entstammen einem Tier des Abstoßungsmodells (AB) zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100. Die Dot-Plot-Auswertung wird dabei in vier Quadranten unterteilt. So ergibt z.B. die Auswertung für die beiden Antikörper OX8 (anti-CD8) und W3/25 (anti-CD4) folgende Zellverteilung (Abb. 4.7 A): Links unten befinden sich die W3/25-OX8 doppelt-negativen Zellen, links oben und rechts unten die jeweils einfach positiven (W3/25 bzw. OX8 positiven Zellen) und rechts oben die W3/25-OX8 doppelt-positiven Zellen.



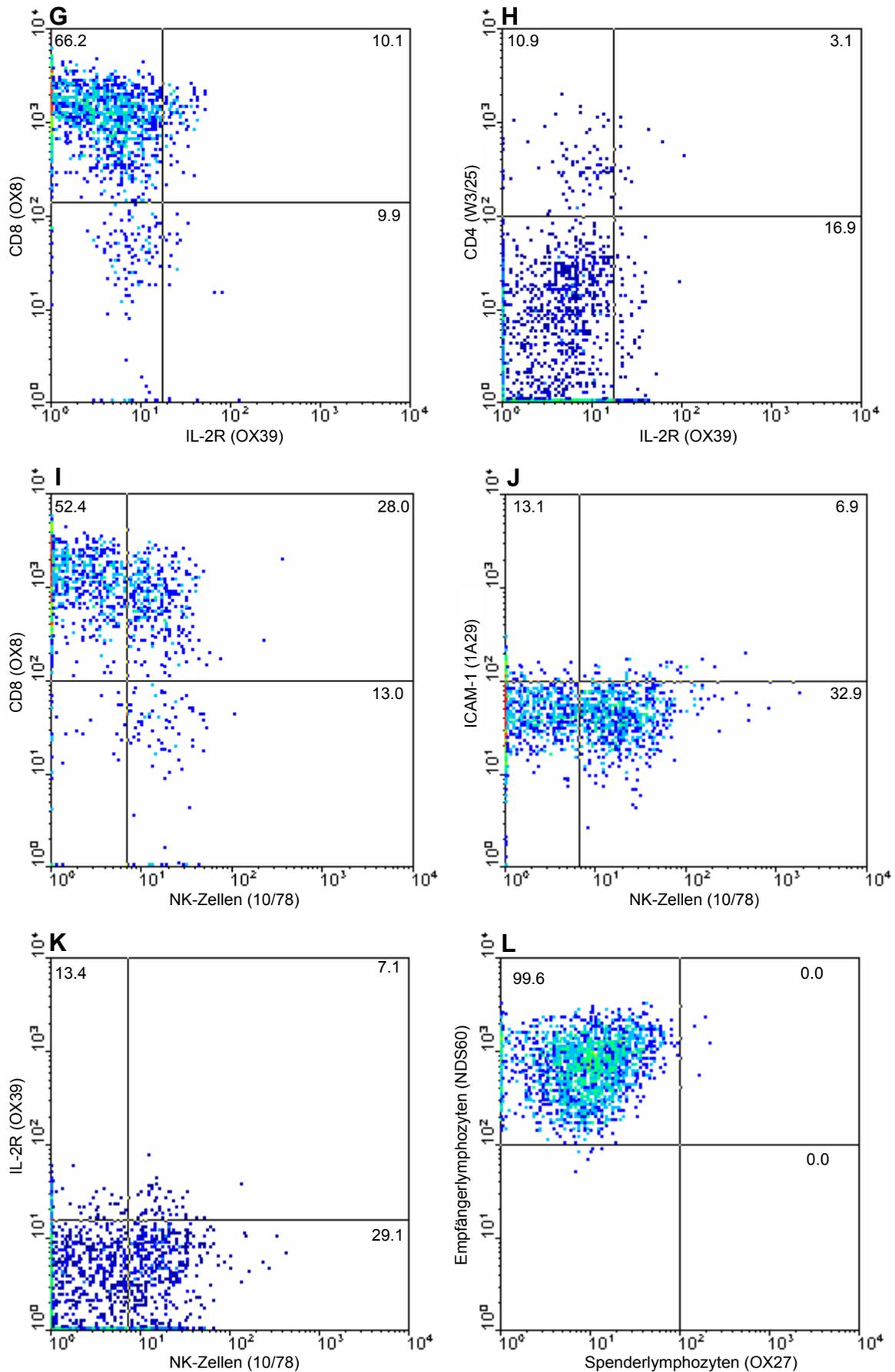


Abb. 4.7 Zwei-Parameter-Auswertung der Lymphozyten-Subpopulationen (Achsenbeschriftung: Antigen, in Klammern Antikörper-Klon) (Anteil in % aus R1/Abb. 4.5).

4.2.1 Physiologische Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments im nicht transplantierten Dünndarm

Im intraepithelialen Kompartiment des nicht transplantierten Dünndarms stellten CD8⁺ αβ T-Lymphozyten (OX8⁺ R73⁺) mit 64 % die dominierende Population des intraepithelialen Kompartiments dar. CD8⁺ γδ T-Lymphozyten (OX8⁺ V65⁺) hingegen waren mit 8,5 % vertreten. Während der γδ-T-Zell-Rezeptor nur von CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert wurde, fand sich der αβ-T-Zell-Rezeptor, den 75 % der IEL exprimierten, auch auf CD4⁺ T-Lymphozyten. Der Anteil dieser CD4⁺ T-Lymphozyten (W3/25⁺ R73⁺ OX8⁻) betrug 10 bis 12 %. Ebenso zur Normalpopulation gehörten Makrophagen (W3/25⁺ R73⁻ OX8⁻) und NK-Zellen (10/78⁺) zu je ca. 5 %. Der Anteil isolierter B-Zellen (OX33⁺) war gering (4 %). Keine dieser Zellpopulationen wies eine signifikante Expression des Aktivierungsmarkers IL-2R (OX39⁺) und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (1A29⁺) auf. Der Anteil aktivierter Zellen lag unter 3 %. Die Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die physiologische Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments.

Tab. 4.1 Physiologische Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5). Die Oberflächenmerkmale sind durch entsprechende Antikörper definiert. Hieraus lassen sich entsprechende Subpopulationen identifizieren.

IEL-Populationen	Oberflächenmerkmale Antikörper-Bezeichnung	Mittelwert ± Standard- abweichung
CD8 ⁺ αβ T-Lymphozyten	OX8 ⁺ R73 ⁺	64 ± 2
CD8 ⁺ γδ T-Lymphozyten	OX8 ⁺ V65 ⁺	8,5 ± 1
CD4 ⁺ T-Lymphozyten	W3/25 ⁺ R73 ⁺ OX8 ⁻	13 ± 2
Makrophagen	W3/25 ⁺ R73 ⁻ OX8 ⁻	5,7 ± 1
B-Lymphozyten	OX33 ⁺	4 ± 3
CD8α-Kette ⁺ NK-Zellen	10/78 ⁺ OX8 ⁺	3,5 ± 2
CD8α-Kette ⁻ NK-Zellen	10/78 ⁺ OX8 ⁻	1,3 ± 1
Summe (IEL)		100

Doppeltpositive CD4⁺CD8⁺-αβ T-Lymphozyten lagen in der Normalpopulation zu 6 % vor. Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ im intraepithelialen Kompartiment betrug 1 : 5 (im Vergleich dazu im Lymphknoten 1 : 0,5).

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation wurden die drei Modelle Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) betrachtet, das Dünndarm-Transplantat entnommen und untersucht. Bei den Modellen KON und AB erfolgte dies an den Tagen 3, 7, 14, 30, 60, 100 p.op., bei TOL an den Tagen 100 und 250 nach Transplantation.

4.2.2 Der Spender- und Empfänger-Zellchimärismus im intraepithelialen Kompartiment

In der Literatur wurde bereits mehrfach das Phänomen des Austausches von Lymphozyten zwischen Spender und Empfänger nach Dünndarmtransplantation im Transplantatlymphknoten beschrieben³⁵. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich auch im intraepithelialen Kompartiment solche Austauschvorgänge beobachten lassen. Die Differenzierung zwischen Spender- und Empfängerlymphozyten erfolgte mittels „stammspezifischer“ Antikörper, die Haplotypen-spezifische Strukturen auf MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen. Dabei erkennt der Antikörper OX27 das MHC-Klasse-I-Antigen RT1.Aⁿ vom Rattenstamm BN (Haplotyp RT1ⁿ), nicht aber von LEW. Der Antikörper NDS60 hingegen bindet nur an das MHC-Klasse-I-Antigen RT1.A^l vom Rattenstamm LEW (Haplotyp RT1^l).

Sowohl im Abstoßungs-, als auch im Toleranzmodell ließ sich ein diskontinuierlicher Austausch beobachten: Die mit dem Dünndarm übertragenen spenderspezifischen Lymphozyten wurden bis Tag 100 fast vollständig durch Empfängerlymphozyten ausgetauscht. Bereits an Tag 3 waren die Spenderzellen im Dünndarmepithel zu 2/3 durch Empfängerzellen ersetzt. Bis Tag 14 war dieser Austausch wieder rückläufig und es lagen 2/3 Spender- und 1/3 Empfängerzellen vor. Danach erfolgte kontinuierlich der endgültige Austausch, so dass ab Tag 100 mindestens 96 % Empfänger- und nur 4 % Spenderzellen vorlagen (Abb. 4.7.L in Kap. 4.2), wobei zu bedenken gilt, dass der Hintergrund in der durchflusszytometrischen Analyse bei knapp 4 % lag. Dieses Phänomen des Zellaustausches wird „intraorganischer Zellchimärismus“

genannt. Die Abbildung 4.8 veranschaulicht diesen dynamischen Austauschvorgang nach Transplantation:

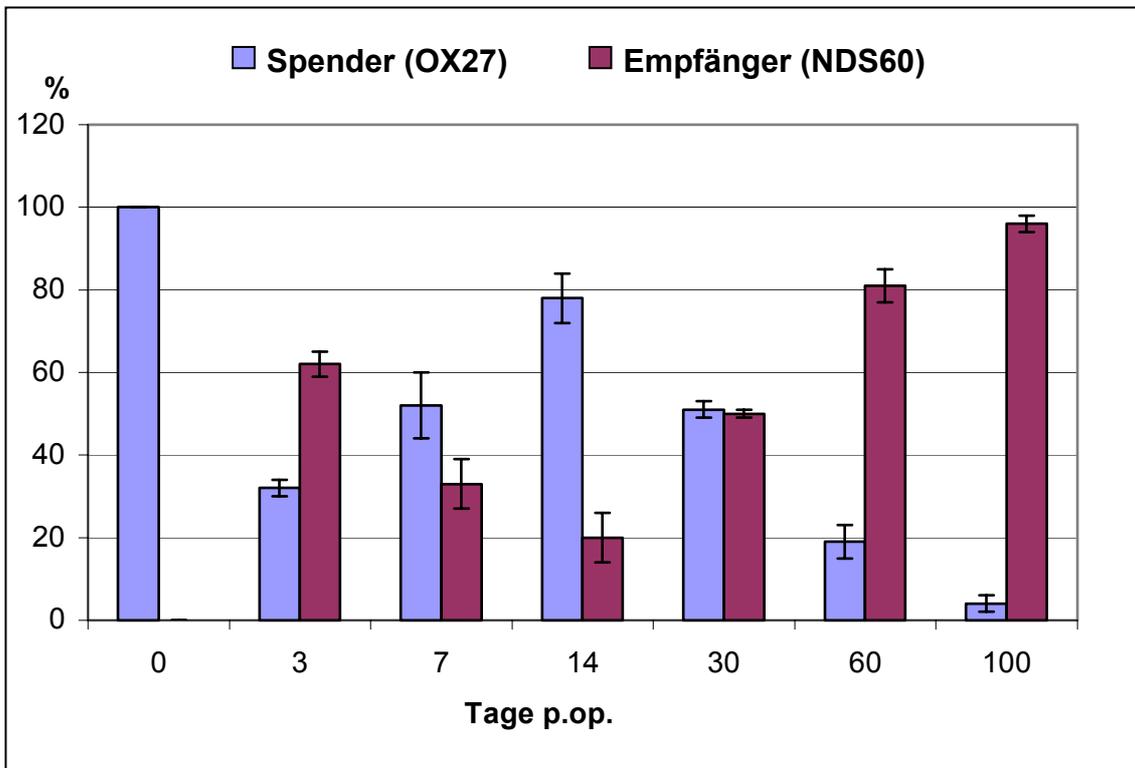


Abb. 4.8 Der Anteil der intraepithelialen Spender- und Empfängerlymphozyten im Abstoßungsmodell (AB) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. An Tag 0, dem Tag der DD-Transplantation sind alle Zellen im Transplantat OX27-positiv (Spenderlymphozyten), an Tag 100 NDS60-positiv (Empfängerlymphozyten).

Auch im Toleranzmodell (TOL) war dieser Zellaustausch zu beobachten. Ab Tag 100 waren auch hier fast ausschließlich Empfängerlymphozyten im Spenderdarm nachzuweisen (Tab. 4.2). Die Tatsache, dass sowohl im Abstoßungs-, als auch im Toleranzmodell dieser Zellchimärismus beobachtet wurde, ließ folgern, dass es sich hierbei um einen physiologischen Vorgang handelte und nicht ein für die Abstoßung charakteristisches Phänomen darstellt.

Tab. 4.2 Der Spender- und Empfänger-Zellchimärismus im Abstoßungsmodell (AB) und im Toleranzmodell (TOL) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

	AB							TOL
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag14	Tag 30	Tag 60	Tag 100	Tag 100
Spender	100	32 ± 2	52 ± 8	78 ± 6	51 ± 2	19 ± 4	4 ± 2	4 ± 2
Empfänger	0	62 ± 3	33 ± 6	20 ± 6	50 ± 1	81 ± 4	96 ± 2	93 ± 3

Zusammenfassung:

Der nach Transplantation stattfindende Zellaustausch geschah unabhängig vom Schicksal des Transplantates – d.h. sowohl im Abstoßungs-, als auch im Toleranzmodell fanden sich an Tag 100 fast ausschließlich Empfängerlymphozyten im Dünndarmepithel. Die Präsenz von Empfängerzellen im Transplantat war somit kein Indiz dafür, ob sich eine Abstoßung manifestierte oder nicht. Andererseits war aber auch nicht auszuschließen, dass dieser Zellchimärismus auf eine immunologische Reaktion hindeutete. Dieser in der Frühphase nach Transplantation nicht kontinuierliche Austausch stabilisierte sich ab Tag 30. Zwischen Tag 30 und Tag 100 war ein kontinuierlicher Anstieg von Empfängerlymphozyten im Transplantatepithel zu beobachten.

4.2.3 Die Aktivierungsmarker IL-2R und ICAM-1

Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren den IL-2 Rezeptor (IL-2R / OX39⁺) und regulieren die Expression des Adhäsionsmoleküls „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1 / 1A29⁺) hoch.

In der Kontrolle (KON) fanden sich kaum aktivierte T-Lymphozyten. Ihr Anteil lag stets unter 3 % (Kap. 4.2.1). Da sich dieser Wert nicht von dem in nicht transplantierten Dünndärmen unterschied, führte die syngene Transplantation – wie erwartet – zu keiner T-Zell- bzw. Immunaktivierung. Auch im Abstoßungsmodell (AB) blieb bis Tag 3 nach Transplantation der Anteil der IL-2R⁺ T-Lymphozyten in diesem Bereich. An Tag 14 jedoch stieg ihr Anteil temporär auf 15 % an, blieb danach bis Tag 60 auf leicht erhöhtem Niveau von ca. 8 %, um zum Zeitpunkt der Abstoßung auf das Maximum von 20 % anzusteigen (vgl.

auch Abb. 4.7 G, H und K in Kap. 4.2). Im Toleranzmodell hingegen waren mit 2 % sowohl an Tag 100, als auch an Tag 250 kaum T-Lymphozyten aktiviert (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 Anteil der IL-2- und ICAM-1-positiven Lymphozyten an den IEL in den drei Modellen Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

	KON	AB						TOL
	Tag 100	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 60	Tag 100	Tag 100
IL-2R⁺	2 ± 1	2 ± 2	8 ± 2	15 ± 1	12 ± 1	10 ± 1	20 ± 1	2 ± 1
ICAM-1⁺	2 ± 1	2 ± 1	6 ± 1	13 ± 1	8 ± 2	8 ± 1	20 ± 2	2 ± 2

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten exprimierten das Adhäsionsmolekül ICAM-1. Da der Anteil der B-Lymphozyten stets bei 4 % lag, waren sie wahrscheinlich nicht an der Abstoßung beteiligt. Der Hauptanteil ICAM-1 positiver Lymphozyten wurde von T-Lymphozyten gestellt. Direkt p.op. und im Toleranzmodell lag ihr Anteil bei nur 2 %. Im Abstoßungsmodell hingegen stieg ihr Anteil an Tag 14 zunächst auf 13 % an und erreichte zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100 ein Maximum von 20 % (Tab. 4.3, vergleiche auch Abb. 4.7 E ,F und J in Kap. 4.2). Während an Tag 14 hauptsächlich Spenderlymphozyten isoliert wurden, handelte es sich bei den 20 % aktivierten Lymphozyten an Tag 100 ausschließlich um Empfängerlymphozyten (Kapitel 4.2.2).

Diese 20 % aktivierten Lymphozyten (IL-2R⁺ bzw. ICAM-1⁺) bestanden zur einen Hälfte aus CD8⁺ αβ T-Lymphozyten (10 %), zur anderen Hälfte aus CD4⁺ T-Lymphozyten (3 %) und NK-Zellen (7 %) (Abb. 4.9).

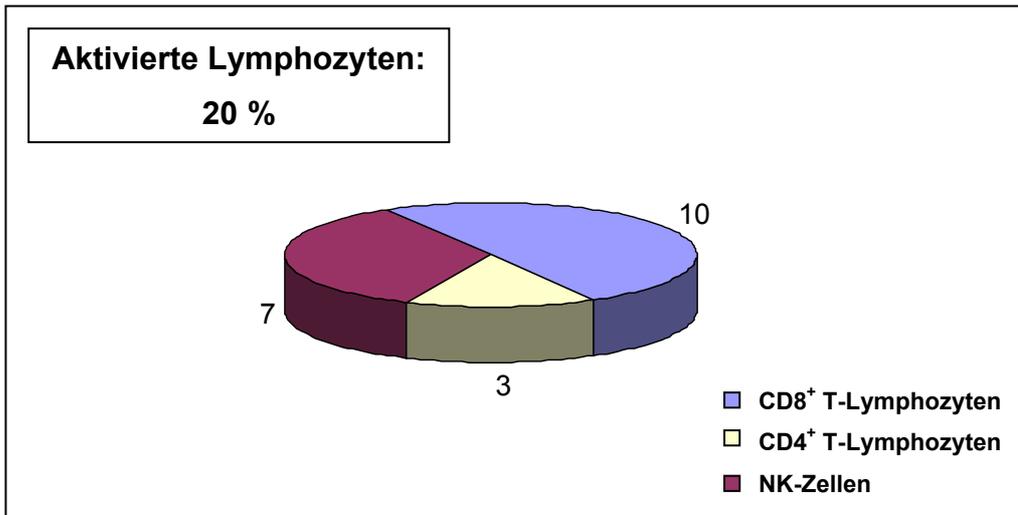


Abb. 4.9 Zusammensetzung der aktivierten Zellen aus CD8⁺ T-Lymphozyten, CD4⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen im Abstoßungsmodell (AB) zum Zeitpunkt der Abstoßung (Angaben in % aus R1/Abb. 4.6).

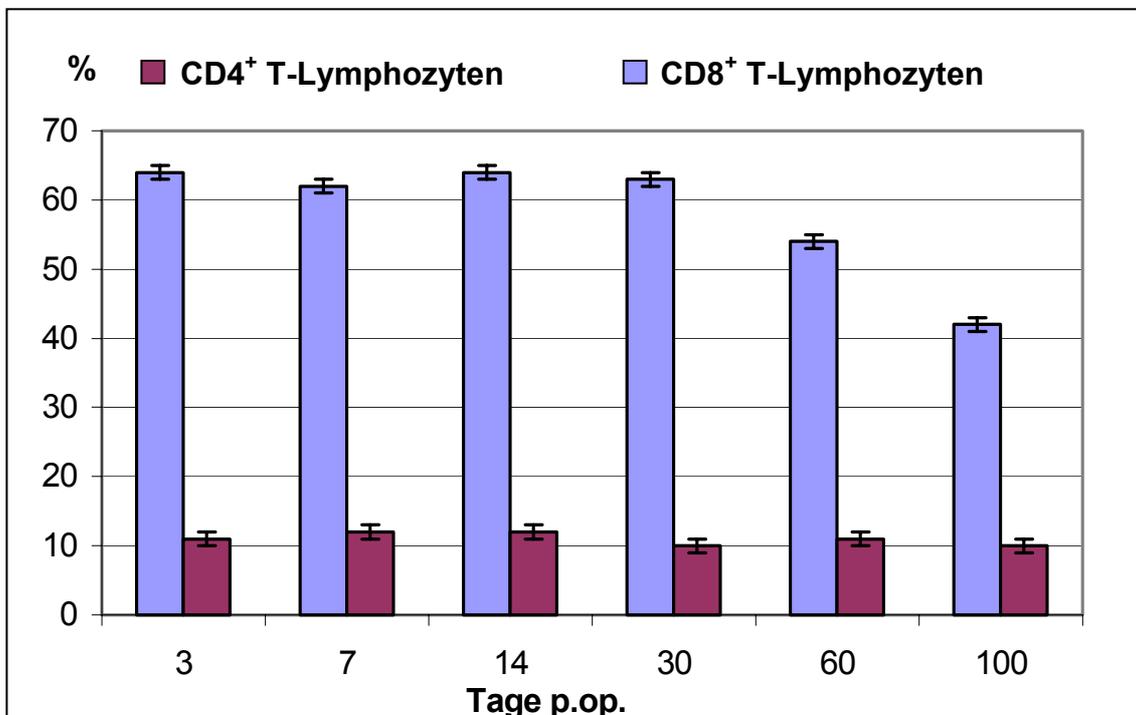
Zusammenfassung:

Während in der Kontrolle (KON) und im Toleranzmodell (TOL) mit 5 % kaum aktivierte Lymphozyten vorlagen, stieg ihr Anteil im Abstoßungsmodell (AB) zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100 auf 20 % an. Diese bestanden zur einen Hälfte aus CD8⁺ T-Lymphozyten, zur anderen Hälfte aus CD4⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen. An Tag 100 stammten fast alle im Transplantat befindlichen Lymphozyten vom Empfänger, sowohl im Abstoßungsmodell, als auch im Toleranzmodell. Im Toleranzmodell waren sie zu 5 %, im Abstoßungsmodell zu 20 % aktiviert. Dies zeigte, dass im Abstoßungsmodell immunologische Reaktionen abliefen, an der alloreaktive CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten und NK-Zellen beteiligt waren.

4.2.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten als charakteristische Population des Dünndarmepithels lassen sich aufgrund ihrer Oberflächenmarker in die beiden Subpopulationen CD8⁺ (OX8⁺) und CD4⁺ (W3/25⁺) T-Lymphozyten einteilen. Da CD8⁺ T-Lymphozyten im aktivierten Zustand (zytotoxische T-Lymphozyten) MHC-inkompatible Zellen zerstören können, sind sie auch direkt am Abstoßungsgeschehen beteiligt. CD4⁺ T-Lymphozyten aktivieren in ihrer Helferfunktion zahlreiche andere Zellen, wie CD8⁺ und B-Lymphozyten, die ihrerseits an der Abstoßung beteiligt sind.

Die vom Antikörper OX8 angefärbte α -Kette des CD8-Moleküls wird außer von $CD8^+$ T-Lymphozyten auch von anderen Subpopulationen exprimiert. Zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100 betrug der Anteil an $OX8^+$ T-Lymphozyten im Abstoßungsmodell 79 %. Diese setzten sich zusammen aus 42 % $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten ($OX8^+ R73^+$), 11 % $CD8^+ \gamma\delta$ T-Lymphozyten ($OX8^+ V65^+$) und 26 % $CD8\alpha\text{-Kette}^+$ NK-Zellen ($OX8^+ 10/78^+$) (vgl. Abb. 4.7 B, D und I in Kap. 4.2). Die $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten stellten in der Kontrolle, wie auch im Toleranzmodell mit 64 % die dominierende IEL-Population dar. Im Abstoßungsmodell lag ihr Anteil bis Tag 30 über 60 %, danach sank er bis zum Tag der Abstoßung auf 42 % (Abb. 4.10 und Tab. 4.4).



len
Lymphozyten im Abstoßungsmodell (AB) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. In dieser Abbildung wurden nur die $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten betrachtet (siehe Tab. 4.1).

Im Abstoßungsmodell (AB) waren an Tag 100 15 % $W3/25^+$ T-Lymphozyten zu isolieren. Auch hierbei handelte es sich um eine heterogene Population, die sich zusammensetzte aus 10 % $CD4^+$ T-Lymphozyten ($W3/25^+ R73^+ OX8^-$) und 5 % Makrophagen ($W3/25^+ R73^- OX8^-$) (vgl. Abb. 4.7 A und C in Kap. 4.2). Der Anteil der $CD4^+$ T-Lymphozyten lag in allen drei Modellen konstant zwischen 10

und 12 % und veränderte sich auch nicht zum Zeitpunkt der Transplantat-abstoßung.

Das Verhältnis der CD4⁺ zu CD8⁺ T-Lymphozyten zeigte somit eine Dynamik von 1 : 6 an Tag 3 zu 1 : 4 an Tag 100 hin (Tab. 4.4 und Abb. 4.11).

Tab. 4.4 Übersicht über die intraepithelialen CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten in den drei Modellen Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

	KON	AB						TOL
	Tag 100	Tag 3	Tag 7	Tag14	Tag 30	Tag 60	Tag 100	Tag 100
CD8⁺ OX8 ⁺ R73 ⁺	64 ± 2	64 ± 1	62 ± 5	64 ± 2	63 ± 1	54 ± 1	42 ± 1	64 ± 2
CD4⁺ W3/25 ⁺ R73 ⁺ OX8 ⁻	12 ± 2	11 ± 1	12 ± 1	12 ± 2	10 ± 1	11 ± 2	10 ± 2	12 ± 2
Summe (CD4+CD8)	76	75	74	76	73	60	52	76
Verhält- nis (CD4:CD8)	1 : 6	1 : 6	1 : 5	1 : 6	1 : 6	1 : 6	1 : 4	1 : 6

Zwei Drittel der T-Lymphozyten trug den αβ-T-Zell-Rezeptor (R73⁺), nur 8 % exprimierten den γδ-T-Zell-Rezeptor (V65⁺). Dies galt für die Modelle Kontrolle und Toleranz (Tab. 4.5). Dabei betrug das Verhältnis von αβ-T-Zell-Rezeptor-zu γδ-T-Zell-Rezeptor-exprimierenden T-Lymphozyten 7 : 1.

Tab. 4.5 Anteil der αβ- und γδ-T-Zell-Rezeptor (TCR) positiven Lymphozyten an den IEL in den drei Modellen Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

	KON	AB						TOL
	Tag 100	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 60	Tag 100	Tag 250
αβ- TCR (R73 ⁺)	76 ± 2	72 ± 5	75 ± 3	76 ± 1	75 ± 1	69 ± 2	52 ± 3	76 ± 5
γδ- TCR (V65 ⁺)	8 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	11 ± 2	8 ± 2

Während die $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im Abstoßungsmodell einen starken Abfall von 72 % an Tag 3 auf 52 % an Tag 100 zeigten, ließ sich bei den $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ein leichter Anstieg von 8 % auf 11 % beobachten. Die 52 % $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten der Kontrolle setzten sich zusammen aus 10 % $CD4^+$ T-Lymphozyten ($W3/25^+ R73^+$) und 42 % $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten ($OX8^+ R73^+$) (vergleiche hierzu auch Tab. 4.4). Die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hingegen exprimierten ausschließlich das CD8-Molekül (Abb. 4.11).

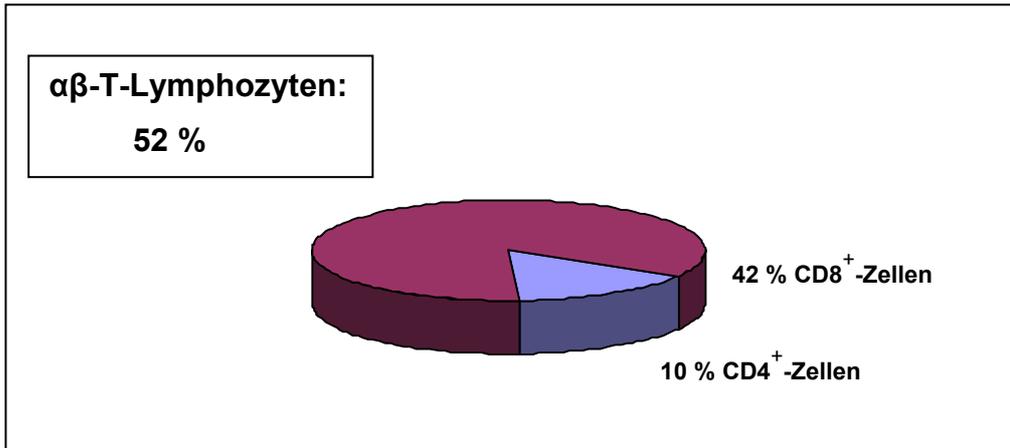


Abb. 4.11 Zusammensetzung der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten aus $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen im Abstoßungsmodell (AB) an Tag 100 (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

Zusammenfassung:

Während der Anteil der $CD4^+$ T-Lymphozyten im intraepithelialen Kompartiment nach Transplantation konstant bei 10 % blieb, zeigten die $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten eine starke Dynamik: Ihr prozentualer Anteil sank im Abstoßungsmodell innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation um ein Drittel auf 42 %. Die $CD8^+$ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hingegen stiegen leicht auf 11 % an. Das zu diesem Zeitpunkt geringe $CD4^+ : CD8^+$ Verhältnis von 1 : 4 kam dadurch zustande, dass sich der Anteil der $CD8^+$ T-Lymphozyten gegenüber den $CD4^+$ T-Lymphozyten stark verringerte.

4.2.5 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Nach eigenen Daten (siehe Kapitel 4.2.1) gehörten die Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) mit einem Anteil von 5 % zur physiologischen Lymphozytenpopulation des intraepithelialen Kompartimentes. Da dieses zur Zeit in der Literatur kontrovers diskutiert wird, wurde diese Zellpopulation im Rahmen der Transplantatabstoßung genauer betrachtet. NK-Zellen sind Lymphozyten, die

weder $\alpha\beta$ - noch $\gamma\delta$ -Rezeptoren tragen und in aktiviertem Zustand Zielzellen lysieren. In dieser Arbeit wurde ihre Anwesenheit mit dem Antikörper 10/78, der an NKR-P1A (oder CD161) bindet, nachgewiesen (Tab. 4.6). Der Anteil der NK-Zellen am intraepithelialen Kompartiment lag sowohl in der Kontrolle (KON), wie auch im Toleranzmodell (TOL) stets bei 5 %. Die NK-Zellen setzten sich zusammen aus CD8 α -Kette-negativen-NK-Zellen (10/78⁺ OX8⁻) und NK-Zellen, die die α -Kette exprimierten (10/78⁺ OX8⁺) (vgl. auch Abb. 4.7 I). Dabei lag das Verhältnis CD8 α -Kette-negativen NK-Zellen zu CD8 α -Kette-positiven NK-Zellen in allen Modellen zu jedem Analysezeitpunkt bei circa 1 : 2.

Tab. 4.6 Anteil der NK-Zellen an den IEL in den drei Modellen Kontrolle (KON), Abstoßung (AB) und Toleranz (TOL) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

	KON	AB						TOL
	Tag 100	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 30	Tag 60	Tag 100	Tag 250
NK-Zellen	5 ± 1	6 ± 0.3	13±0.3	10±0.3	13±0.3	25 ± 1	38 ± 2	5 ± 1

Im Abstoßungsmodell stieg ihr Anteil bereits an Tag 7 auf über 10 %. An Tag 100 jedoch erreichten die NK-Zellen ein Maximum von 38 %, von denen 1/5 aktiviert war. An diesem Anstieg waren beide NK-Zell-Populationen, die CD8 α -Kette-negativen und CD8 α -Kette-positiven NK-Zellen, zu gleichen Teilen beteiligt, so dass auch an Tag 100 ihr Verhältnis konstant bei 1 : 2 blieb (Abb. 4.12).

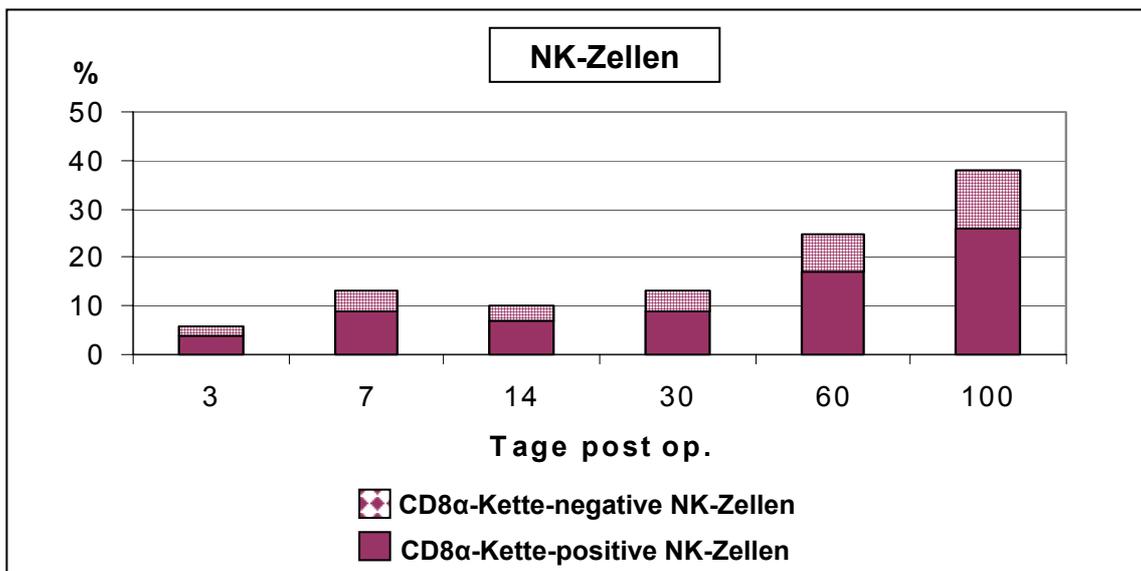


Abb. 4.12 Prozentualer Anteil der intraepithelialen NK-Zellen im Abstoßungsmodell (AB) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

Der Vergleich der Daten zum Zellchimärismus (Kapitel 4.2) zeigte, dass es sich bei diesen NK-Zellen an Tag 100 fast ausschließlich um Zellen des Empfängers handelte, die aus der Peripherie in das Transplantat eingewandert waren. Diese Empfängerzellen waren im Abstoßungsmodell (AB) zum Zeitpunkt der Abstoßung somit zu fast 40 % NK-Zellen. Im Toleranzmodell (TOL) hingegen waren an Tag 100 empfängereigene CD8⁺-Lymphozyten zu 64 % und empfängereigene NK-Zellen zu 5 % zu finden. Dies entsprach exakt den physiologischen Verhältnissen eines nicht transplantierten Dünndarms (Kapitel 4.2.1).

4.2.6 Das intraepitheliale Kompartiment zum Zeitpunkt der Abstoßung

Abbildung 4.13 zeigt die prozentuale Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments zum Zeitpunkt Tag 3 unter Immunsuppression und zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100. Weiter verdeutlicht sie, daß der Anteil der intraepithelialen NK-Zellen zum Zeitpunkt der Abstoßung stark anstieg - von 5 auf 38 %.

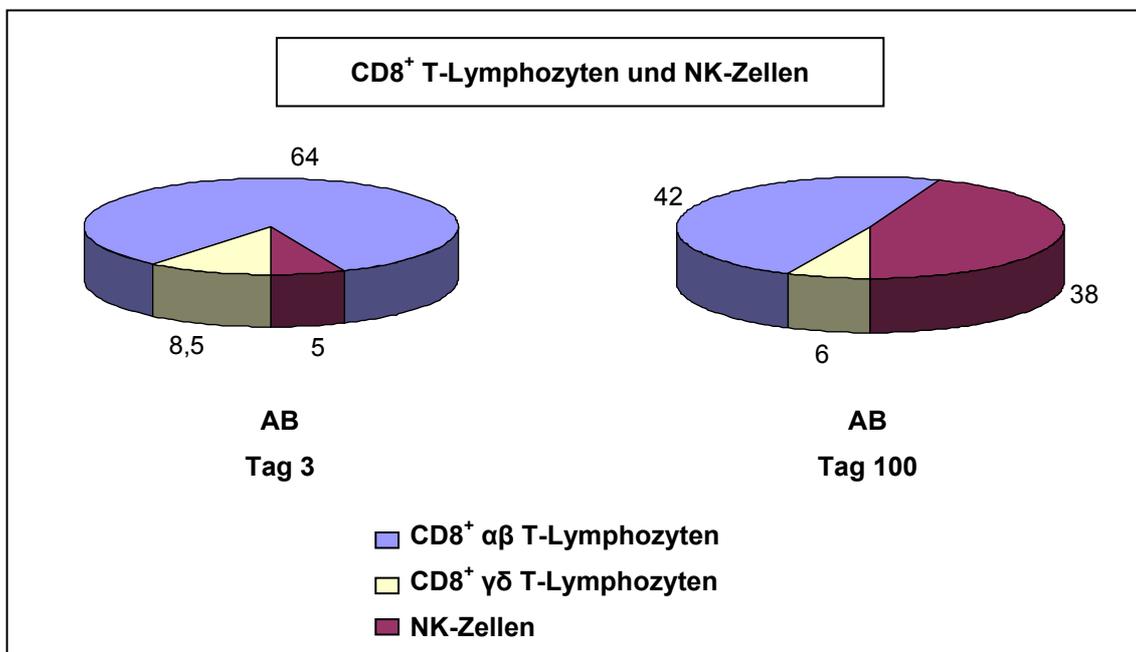


Abb. 4.13 Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments im Abstoßungsmodell (AB) an Tag 3 und Tag 100. B-Lymphozyten und Makrophagen wurden herausgenommen. Die Zusammensetzung der IEL in der Kontrolle (KON) und im Toleranzmodell (TOL) entsprach der des Abstoßungsmodells (AB) an Tag 3 (Angaben in % aus R1/ Abb. 4.5).

Für das Abstoßungsmodell (AB) an Tag 100 ergab sich folgende in Tabelle 4.7 dargestellte zelluläre Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments. Verglichen mit Tag 3 waren die stärksten Veränderungen bei den CD8⁺ T-Lymphozyten und den NK-Zellen zu sehen.

Tab. 4.7 Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments im Abstoßungsmodell (AB) an Tag 3 und Tag 100 (Angaben in % aus R1/Abb. 4.5).

IEL-Populationen	Oberflächen- merkmale Antikörper-Klone	Mittelwert ±Standard- abweichung	Mittelwert ±Standard- abweichung
		Tag 3	Tag 100
CD8 ⁺ αβ T-Lymphozyten	OX8 ⁺ R73 ⁺	64 ± 2	42 ± 3
CD8 ⁺ γδ T-Lymphozyten	OX8 ⁺ V65 ⁺	8,5 ± 1	11 ± 1
CD4 ⁺ T-Lymphozyten	W3/25 ⁺ R73 ⁺ OX8 ⁻	13 ± 2	10 ± 2
Makrophagen	W3/25 ⁺ R73 ⁻ OX8 ⁻	5,7 ± 1	3 ± 1
B-Lymphozyten	OX33 ⁺	4 ± 3	2 ± 3
CD8α-Kette ⁺ NK-Zellen	10/78 ⁺ OX8 ⁺	3,5 ± 2	26 ± 1
CD8α-Kette ⁻ NK-Zellen	10/78 ⁺ OX8 ⁻	1,3 ± 1	12 ± 2
Summe (IEL)		100	100

Die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes des Abstoßungsmodells (AB) an Tag 3 entsprach der der Kontrolle (KON) sowie des Toleranzmodells (TOL) bzw. der physiologischen Zusammensetzung der IEL (vgl. Kapitel 4.1).

Zusammenfassung der Kapitel 4.2.5 und 4.2.6:

NK-Zellen gehörten mit 5 % zur Normalpopulation der IEL. In der Kontrolle und im Toleranzmodell betrug ihr Anteil ebenfalls konstant 5 %. Im Abstoßungsmodell hingegen zeigten die NK-Zellen eine starke Dynamik. Bereits eine Woche nach Transplantation stieg ihr Anteil leicht an. Das Maximum von 38 %, dabei waren 1/5 dieser Zellen aktiviert, erreichten sie in der Phase der Abstoßung an Tag 100. Zu diesem Zeitpunkt, an dem fast ausschließlich Empfängerzellen vorlagen, war der prozentuale Anteil der CD8⁺ αβ T-Lymphozyten auf 42 % gesunken. Die Abstoßung im intraepithelialen Kompartiment schien somit ein NK-Zell-dominierender Entzündungsprozeß zu sein.

5. Beantwortung der Fragen

ad (1) Welche Subpopulationen charakterisierten das intraepitheliale Kompartiment in einem nicht transplantierten Dünndarm?

Das intraepitheliale Kompartiment des nicht transplantierten Dünndarms setzte sich zusammen aus 64 % CD8⁺ αβ T-Lymphozyten, 8,5 % CD8⁺ γδ T-Lymphozyten und 13 % CD4⁺-Lymphozyten sowie NK-Zellen und Makrophagen zu je 5 %. Die Zusammensetzung der IEL wurde durch die Transplantation per se nicht beeinflusst. Somit blieben die CD8⁺ αβ T-Lymphozyten, mit Ausnahme zum Zeitpunkt der Abstoßung, weiterhin die charakteristische Population der IEL.

Ad (2) Unterlag das intraepitheliale Kompartiment einem Zellaustausch bzw. welche Rolle spielte dieses Phänomen für die Akzeptanz des Transplantates?

Nach Dünndarmtransplantation erfolgte im intraepithelialen Kompartiment ein diskontinuierlicher Zellaustausch von Spender- durch Empfängerlymphozyten. Bereits an Tag 3 waren Zweidrittel der Spenderlymphozyten durch Empfängerlymphozyten ausgetauscht; bis Tag 14 kehrte sich dieses Verhältnis jedoch wieder um. Ab Tag 100 lag der endgültige Austausch mit 96 % Empfänger- und 4 % Spenderzellen vor. Dieses Phänomen – Zellchimärismus genannt – erfolgte unabhängig vom Transplantatschicksal; das heißt, sowohl im Abstoßungs-, als auch im Toleranzmodell war dieses Phänomen zu beobachten. Hieraus folgte, dass die Präsenz von Empfängerzellen im Dünndarmepithel kein Indiz dafür war, ob sich eine Abstoßung manifestierte oder nicht.

Ad (3) Welche zellulären Veränderungen im intraepithelialen Kompartiment zeigten sich im Abstoßungsmodell (AB)?

Im Abstoßungsmodell (AB) unterlag die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments einer starken Dynamik. Zum Zeitpunkt der Transplantatabsto-

ßung an Tag 100 sank der prozentuale Anteil der CD8⁺ αβ T-Lymphozyten auf 42 %. Der Anteil der CD4⁺ αβ T-Lymphozyten (11 %), sowie der Makrophagen (5 %) hingegen blieb konstant. Besonderes Verhalten zeigten die NK-Zellen. Diese, die mit 5 % der Normalpopulation der IEL angehörten, stiegen bis Tag 100 auf fast 40 % an, was einer Verachtfachung ihres Ausgangswertes entsprach. Damit stellten sie zu diesem Zeitpunkt, an dem das Tier zunehmend Diarrhoe entwickelte, fast den gleichen Anteil wie die CD8⁺ αβ T-Zell-Population dar. Diese Beobachtungen ließen einen engen Zusammenhang zwischen NK-Zell-Anstieg und Transplantatabstoßung vermuten. Auch der Anteil aktivierter Lymphozyten stieg zum Zeitpunkt der Abstoßung von 3 % auf 20 % an. Alle diese Veränderungen an Tag 100 betrafen fast ausschließlich Empfängerlymphozyten, da bis zu diesem Zeitpunkt nahezu alle Spenderlymphozyten durch Empfängerlymphozyten ausgetauscht worden waren.

Ad (4) Welche zellulären Veränderungen im intraepithelialen Kompartiment zeigten sich im Toleranzmodell (TOL)?

Im Toleranzmodell (TOL) zeigten sich weder an Tag 100, noch an Tag 250 Veränderungen des intraepithelialen Kompartiments im Vergleich zur Normalpopulation. Die CD8⁺ αβ T-Lymphozyten blieben mit 64 % die stärkste Population. Auch der Anteil aller anderen Subpopulationen lag im Normalbereich (ad 1). NK-Zellen blieben auf niedrigem Niveau (5 %), wie auch der Anteil aktivierter Zellen (3 %). Da der Zellchimerismus unabhängig vom Modell erfolgte, waren auch im Toleranzmodell (TOL) direkt p.op. nur spender-spezifische, an Tag 100 und Tag 250 nur empfängerspezifische Lymphozyten vorhanden. Man bedenke, dass ab Tag 100 ein komplett anderer MHC-Haplotyp vorlag und dennoch die physiologische Zusammensetzung der IEL gewahrt blieb.

Ad (5) Welcher Zusammenhang bestand zwischen Klinik, Zellphysiologie und Histologie?

Klinik, zelluläre Veränderungen und Histologie korrelierten in dieser Studie stets miteinander. Sowohl in der Kontrolle (KON), als auch im Toleranzmodell (TOL) fanden sich ein sehr guter klinischer Allgemeinzustand, eine prozentuale Verteilung der IEL-Subpopulationen, die der physiologischen Zusammensetzung (ad 1) entsprach, kaum aktivierte Lymphozyten und histologisch ein unbeschädigtes Epithel.

Noch deutlicher wurde diese Korrelation im Abstoßungsmodell (AB). Der schlechte klinische Zustand an Tag 100 - Gewichtsverlust, Diarrhöe und Entzündung - wies auf die Abstoßung des Transplantates hin. Zu diesem Zeitpunkt, an dem die NK-Zellen auf das Achtfache ihres Ausgangswertes angestiegen waren, und das Maximum an aktivierten Lymphozyten vorlag, zeigte sich in der Histologie ein sehr angegriffenes Epithel mit plumpen Zotten. Krypten-Hyperplasie, Kryptenabszesse, verdickte Muskularis und entzündliche Infiltrationen prägten das Bild. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die klinischen Symptome, als auch die Veränderung der zellulären Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments, insbesondere der Anstieg der NK-Zellen (ad 3), ein Indiz für die Transplantatabstoßung waren, welche auch histologisch beobachtet werden konnte.

6. Diskussion

Der limitierende Faktor und damit das Hauptproblem der klinischen Dünndarmtransplantation stellt derzeit die hohe Abstoßungsrate des Dünndarms dar. Ursache hierfür ist die große Anzahl an Leukozyten im DD-Epithel, die für das Immunsystem des Empfängers einen starken Stimulus darstellt. Die Tatsache, dass das intraepitheliale Kompartiment mehr als die Hälfte aller Lymphozyten aller anderen peripheren lymphatischen Organe bzw. ebenso viele Lymphozyten wie die Milz enthält, zeigt die Bedeutung dieses immunologischen Organs. Der Hauptanteil der Transplantat- oder Spender-Leukozyten befindet sich im intraepithelialen Kompartiment, das durch die Basalmembran von der Lamina propria abgegrenzt wird. Dort liegen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) zwischen den Enterozyten. Da sich dieses Kompartiment über die gesamte Oberfläche des Dünndarms verteilt, stellt es im Gegensatz zum anatomisch begrenzten Lymphknoten ein ungewöhnlich großes spezialisiertes "immunologisches System" dar³⁶. Ihre Lage an der Grenzfläche zwischen externen und internen bzw. körpereigenen Kompartimenten zeigt die besondere Rolle dieser intraepithelialen Lymphozyten für die Erhaltung der Homöostase des intestinalen Mikromilieus³⁷.

Gegenwärtig ist wenig darüber bekannt, wie die Transplantation dieses System beeinflusst. Hierzu wurden in dieser Arbeit die qualitativen und quantitativen zellulären Veränderungen in der Phase der Abstoßung und der Toleranz durchflußzytometrisch analysiert. Ziele dieser Arbeit waren (1) die Analyse der zellulären Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments nach experimenteller Dünndarmtransplantation (2) die Analyse der Austauschvorgänge zwischen dem intraepithelialen Kompartiment des Transplantates und dem Immunsystem des Empfängers; (3) die Analyse der Interaktionen zwischen Zellen des adaptiven (T-Lymphozyten) und nicht-adaptiven (NK-Zellen und Makrophagen) Immunsystems in der Phase der Abstoßung und Toleranz.

6.1 Analyse der zellulären Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments nach experimenteller Dünndarmtransplantation

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL), lokalisiert nicht nur im Intestinaltrakt, sondern auch im Respirations-, Genitaltrakt und in der Haut, sind aufgrund ihrer Lokalisierung zwischen den Epithelzellen der Dünndarmzotten die ersten Immunzellen, die mit externen Antigenen bzw. Pathogenen, die die protektive Mukosaschicht oberhalb des Dünndarmepithels durchdrungen haben, in Kontakt treten³⁸. Ihre Funktion erstreckt sich über T-Helfer-Zell-Aktivität wie Antikörperproduktion, Suppressor-Aktivität, Einfluß auf die Epithelzellregeneration bis hin zu Aufrechterhaltung oraler Toleranz. In mehreren Versuchen bereits wurden diese intraepithelialen Lymphozyten charakterisiert. Die Hauptpopulation der IEL stellen in dieser Arbeit mit 64 % die CD8⁺ T-Lymphozyten dar. Der Anteil der CD4⁺ T-Lymphozyten, der charakteristischen Population der Lamina Propria, am intraepithelialen Kompartiment hingegen, beträgt lediglich 12 %. Diese Dominanz der CD8⁺ T-Lymphozyten wird auch von Kearsy und Stadnyk³⁴ (70 % CD8⁺ T-Lymphozyten, 33 % CD4⁺ T-Lymphozyten) und Camerini³⁹ beschrieben. Im Gegensatz zu Kearsy und Stadnyk gehören neben 4 % B-Lymphozyten und 5,7 % Makrophagen (bei Kearsy und Stadnyk 5 % B-Lymphozyten und 2 % Makrophagen) auch NK-Zellen mit 5 % der Normalpopulation des intraepithelialen Kompartiments an. Diese NK-Zellen unterscheiden sich durch die Anwesenheit grober intrazytoplasmatischer Granula morphologisch von den übrigen feingranulierten IEL³⁸. Diese partielle Anwesenheit von intracytoplasmatischen Granula beschreibt Mayrhofer et al.⁴⁰ als morphologisches Charakteristikum der IEL.

Hinsichtlich der Verteilung der T-Zell-Rezeptoren (TCR = T cell receptor) zeigt diese Arbeit eine Dominanz der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit 75 %, die auch Kearsy und Stadnyk³⁵, Camerini³⁹ und Boll⁴¹ sehen. Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hingegen liegt in den eigenen Ergebnissen bei nur 8,5 %. Camerini³⁹ isoliert 31 % $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und Beagley und Husband³⁸ sprechen sogar von annähernd gleichen Anteilen von $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im intraepithelialen Kompartiment. Die Differenzierung der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die Thymus-unabhängig erfolgt, geht der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten (Thymus-

abhängig) voraus, wobei sich das danach eingestellte Verhältnis von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ zu $\text{TCR}\gamma\delta^+$, außer unter Diät und Altern, nicht mehr ändert. Auch die eigenen Ergebnisse zeigen ein konstantes Verhältnis von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ zu $\text{TCR}\gamma\delta^+$ von 7 : 1. Eine besondere Rolle spielen die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Aufrechterhaltung oraler Toleranz, einem Zustand immunologischer Nicht-Reaktivität gegenüber oral zugeführten Antigenen. Sie bewirken eine Zentralisierung immunologischer Abwehrreaktionen im Darm gegenüber diesen oralen Antigenen, während hingegen das systemische Immunsystem davon unberührt bleibt³⁸.

Diese in dieser Arbeit dargestellte Zusammensetzung der IEL ist charakteristisch für das intraepitheliale Kompartiment und wird auch nicht durch eine Dünndarmtransplantation, mit Ausnahme zum Zeitpunkt der Abstoßung, verändert. Selbst der Austausch der Spender- durch Empfängerlymphozyten, der nach Transplantation im Dünndarm erfolgt und in Kapitel 6.2 diskutiert wird, hat keinen Einfluss auf diese Zusammensetzung. Die Dominanz der CD8^+ T-Lymphozyten, die sich in den eigenen Ergebnissen auch im $\text{CD4} / \text{CD8}$ -Verhältnis von 1 : 5 widerspiegelt und somit eine stärkere Dominanz der CD8^+ T-Lymphozyten aufweist als bei Gorczynski⁴² mit 1 : 3, bleibt stets erhalten. Dies belegt das Toleranzmodell (TOL), welche dieselbe Zusammensetzung der IEL zeigt wie die Kontrolle (KON) oder das Abstoßungsmodell (AB) an Tag 0, obwohl es ab Tag 100 fast ausschließlich empfängerspezifische Lymphozyten enthält.

Bezüglich ihres Aktivierungsgrades sind die IEL bereits mehrfach untersucht worden. Dadurch hat man sich neue Erkenntnisse über Zellinteraktionen und mögliche Einflüsse auf die Transplantatabstoßung erhofft. Gramzinski⁴³ beobachtet dabei, daß Thymus-abhängige IEL eine höhere Proliferations- und Sekretionsrate aufweisen als Thymus-unabhängige IEL. Insgesamt aber sei die Proliferationsrate der IEL niedriger als die der peripheren Lymphozyten⁴⁴. Abhängig von ihrem Aktivierungsgrad seien die IEL auch in der Lage, die Epithelproliferation und -funktion zu beeinflussen. So bewirken das von den IEL in großer Menge produzierte $\text{IFN-}\gamma$, sowie das unter bestimmter IEL-Aktivierung produzierte IL-4 Zeit- und Dosis-abhängig eine Schwächung der Barrierenfunktion des Epithels³⁸. Auch scheinen die IEL daran beteiligt zu sein,

Epithelzellen, die sich aufgrund ihres Regenerationsprozesses an die Spitze der Dünndarmvilli verlagern, zu eliminieren³⁸.

Der vorliegende Versuch konzentriert sich bei der Untersuchung des Aktivierungsgrades der IEL auf die IL-2-Rezeptor- und die ICAM-1-Rezeptor-Expression. Dabei liegen im physiologischen intraepithelialen Kompartiment mit 2 % IL-2R⁺ Lymphozyten kaum aktivierte Lymphozyten vor. Auch die Transplantation per se führt nicht zu einer Aktivierung der IEL. Selbst nach 250 Tagen liegen im Toleranzmodell (TOL) mit 2 % kaum aktivierte IEL vor. Im Abstoßungsmodell (AB) jedoch steigt die IL-2-Rezeptor- bzw. die ICAM-1-Rezeptor-Expression bereits gegen Tag 14 temporär an und erreicht zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100 ein Maximum von 20 %, welches die starken immunologischen Reaktionen zu diesem Zeitpunkt widerspiegelt. Bisher ist in der Literatur nicht darauf eingegangen worden, welche Zellpopulationen genau diese aktivierten Lymphozyten darstellen. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die aktivierten T-Lymphozyten zur Hälfte CD8⁺ T-Lymphozyten und zu ca. je 25 % CD4⁺ T-Lymphozyten sowie NK-Zellen darstellen. Hier wird bereits deutlich, welche Subpopulationen im intraepithelialen Kompartiment an den immunologischen Prozessen während der Abstoßung beteiligt sind.

6.2 Analyse der Austauschvorgänge zwischen dem intraepithelialen Kompartiment des Transplantats und dem Immunsystem des Empfängers

Nach Dünndarmtransplantation unterliegt das intraepitheliale Kompartiment einem kontinuierlichen Austausch von Spender- und Empfängerlymphozyten. Das intraepitheliale Transplantatkompartiment ist bereits an Tag 3 p.op. zu 2/3 durch Empfängerlymphozyten ersetzt, die aus dem Empfänger in das Transplantat eingewandert sind. Auch Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, daß diese Abnahme der Spenderlymphozyten im transplantierten Organ mit dem vermehrten Auftreten dieser Zellen im Blut sowie in peripheren lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz des Transplantatempfängers einhergeht^{35,45,46,47,48,49}. An Tag 100 liegt mit 96 % Empfängerlymphozyten im Transplantatepithel ein nahezu vollständiger Austausch vor. Dieser ist unabhängig davon, ob das Transplantat abgestoßen wird oder nicht,

wie in dieser Arbeit anhand des Abstoßungs- (AB) bzw. des Toleranzmodells (TOL) gezeigt wird. Dieser nach Transplantation zu beobachtende intraorganische Zellchimärismus⁵⁰ ist temporär, d.h. ab Tag 100 befinden sich im intraepithelialen Kompartiment des Transplantats nahezu ausschließlich eingewanderte Lymphozyten. Dieser Einstrom der Empfängerlymphozyten erfolgt nicht kontinuierlich, sondern ist zwischenzeitlich um den Tag 14 rückläufig. Zu diesem Zeitpunkt erhöht sich der Anteil der transplantatspezifischen Spenderlymphozyten erneut (80 %), vermutlich durch Spenderlymphozyten aus den Transplantatlymphknoten oder, wie Schattenfroh⁵¹ zeigt, aus der Spenderzell-Population in der Empfängermilz, in die sie zuvor ausgewandert sind. Danach erst sinkt der Anteil dieser Zellen endgültig. Der an Tag 100 eingestellte Zustand bleibt, wie das Toleranzmodell (TOL) an Tag 250 zeigt, unverändert. So bleiben die CD8⁺αβ T-Lymphozyten, mit Ausnahme in der Phase der Abstoßung, sowohl vor als auch nach Transplantation die dominierende Population. Auch der Anteil der anderen intraepithelialen Subpopulationen, CD8⁺γδ- und CD4⁺ T-Lymphozyten, wird durch den Einstrom empfängerspezifischer Lymphozyten nicht verändert. Es muss eine Art Filter oder übergeordnete Steuerung geben, die bewirkt, dass trotz des Zellaustausches die ursprüngliche Zellverteilung bestehen bleibt. Denn laut Schattenfroh⁵¹ nehmen die CD8⁺ dominierenden IEL ihren Ursprung von der Spender-Population in der Milz, die aber hauptsächlich CD4⁺-T- und B-Lymphozyten enthalten. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Webster⁵² bei der Untersuchung der Lymphozytenpopulationen der Peyerschen Plaques sowie der mesenterialen Lymphknoten des Transplantats.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum Zellchimärismus konzentrieren sich auf die intraorganischen Vorgänge, während zahlreiche andere Arbeiten den Zellchimärismus in den peripheren lymphatischen Organen des Empfängers, wie Milz und Lymphknoten, untersuchen (Abb. 6.1).

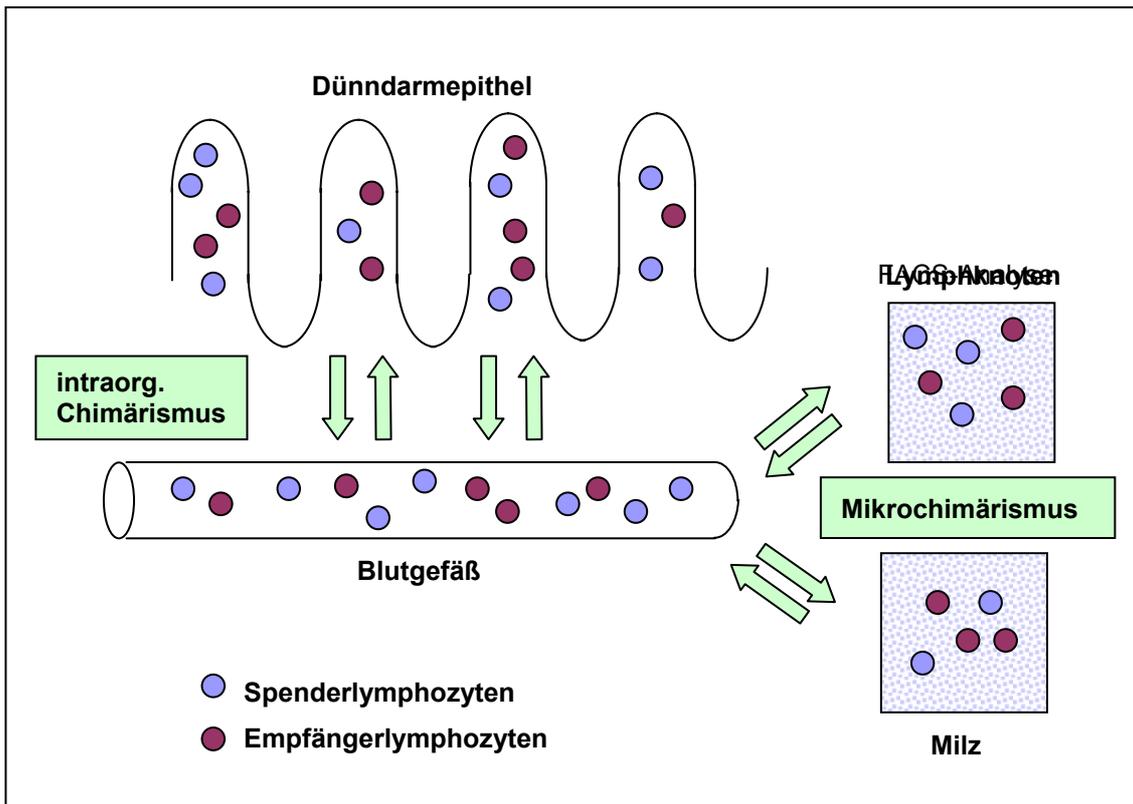


Abb. 6.1 Darstellung des intraorganischen Chimärismus (Einstrom von empfangerspezifischen Lymphozyten in das Transplantatepithel) und des peripheren Chimärismus bzw. Mikrochimärismus (Einstrom von spenderspezifischen Lymphozyten in lymphatische Organe des Empfängers wie Milz und Lymphknoten).

So konzentrieren sich Webster⁵² und Schattenfroh⁵¹ auf die Austauschvorgänge der Lymphozyten in der Empfängermilz. Hinsichtlich der Persistenz der Spenderlymphozyten im Empfängerorganismus finden sich in der Literatur kontroverse Meinungen. So postuliert Starzl et al. in seinen Versuchen bei Lebertransplantation die Persistenz spenderspezifischer Lymphozyten im Empfängerorganismus als Voraussetzung für die transplantatspezifische Toleranz und spricht in diesem Zusammenhang von Mikrochimärismus⁵³. Er differenziert dabei zwischen einer frühen Phase des Zellchimärismus in den ersten Wochen nach Transplantation, in der eine große Anzahl Spenderzellen im Empfängerorganismus zu detektieren ist, und einer späten Phase 3 bis 6 Monate nach Transplantation, in der persistierende Spenderzellen nur noch molekularbiologisch – daher der Begriff „Mikrochimärismus“ - nachzuweisen sind. Diese Beobachtungen erfolgten im Tiermodell nach Leber-TX, wobei die funktionelle Bedeutung dieses Mikrochimärismus noch ungeklärt ist. Möglicherweise ist diese kontinuierliche Präsentation des Alloantigens durch

spenderspezifische antigenpräsentierende Zellen Voraussetzung für ein Langzeitüberleben des Transplantates, um eine chronische Abstoßung zu verhindern^{54,55}.

6.3 Analyse der Interaktionen zwischen Zellen des adaptiven (T-Lymphozyten) und nicht-adaptiven (NK-Zellen und Makrophagen) Immunsystems in der Phase der Abstoßung und Toleranz

In der Literatur wird zwischen adaptivem und nicht-adaptivem Immunsystem unterschieden^{56,57,58}. Dabei stellt das adaptive Immunsystem (B- und T-Lymphozyten) die erworbene Immunität dar, während das nicht-adaptive Immunsystem (NK-Zellen und Makrophagen) angeboren ist. NK-Zellen, die eine wichtige Rolle im nicht adaptiven wie auch im adaptiven Immunsystem spielen, sind strahlenresistente grob-granulierte Lymphozyten („large granular lymphocytes“), mit der Fähigkeit, Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen und hämatopoetische Stammzellen zu lysieren⁵⁹. Ausgestattet mit Ca^{2+} -abhängigen Rezeptoren (NKR-P1) der C-Typ-Lectin-Familie stimulieren sie den Zelltod gebundener Zielzellen⁶⁰.

Beruhend auf der „missing self“-Hypothese⁶¹, die besagt, dass bei mangelnder Expression von „self-MHC molecules“ (eigenen MHC-Molekülen) diese von NK-Zellen lysiert werden, genügt die MHC Klasse-I Molekül-Expression, um die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen und damit die Zelllyse zu verhindern⁶². Diese Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen wird durch IL-2 stimuliert und bewirkt seinerseits zum Einen eine vermehrte Expression von ICAM-1-Molekülen auf den Endothelzellen, zum Anderen die Sekretion von Chemokinen⁶³.

Diese NK-Zellen sind zur Zeit Gegenstand vieler Versuche. Ihre Bedeutung in der Transplantatabstoßung wurde bisher oft unterschätzt. Dabei scheinen gerade sie eine Mediatorrolle im Abstoßungsgeschehen einzunehmen. Sarnacki⁶⁴ beobachtet, dass vom Empfänger tolerierte Transplantate signifikant weniger Makrophagen und NK-Lymphozyten enthalten als abgestoßene Transplantate. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen, die eine Dynamik der prozentualen Verteilung der NK-Zellen im intraepithelialen

Kompartiment zeigen. In der syngenen Gruppe, wie auch bei nicht transplantierten Tieren fanden sich 5 % NK-Zellen. Hiermit ist bewiesen, dass NK-Zellen zur Normalpopulation der IEL gehören. Dies wird in der Literatur bei Beschreibungen der IEL-Normalpopulation oft übersehen oder anderweitig gedeutet. Jedoch nicht nur ihre Zugehörigkeit zur Normalpopulation des intraepithelialen Kompartiments zeigte sich in dieser Arbeit, sondern es ließ sich ferner eine Dynamik dieser NK-Zellen im Abstoßungsprozeß verfolgen. So stieg ihr Anteil im Abstoßungsmodell (AB) bereits ab Tag 7 und erreichte ein Maximum von nahezu 40 % zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100, an dem fast ausschließlich Empfängerlymphozyten vorlagen. Dies wurde so in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Dieser Anstieg der NK-Zellen, von denen 1/5 aktiviert waren, deutete bereits auf zunehmend starke immunologische bzw. inflammatorische Reaktionen im Dünndarmepithel gegen Tag 100 hin. Die Tatsache, dass die NK-Zellen im Toleranzmodell (TOL) hingegen zu nur 5 % isoliert wurden, ist ein deutliches Indiz dafür, dass eine enge Korrelation zwischen der Abstoßungsreaktion an Tag 100 und dem Anstieg der NK-Zellen besteht, denn im Falle einer Transplantattoleranz bleiben die NK-Zellen unberührt. Auch andere Autoren erkennen, dass NK-Zell-Populationen Alloreaktivität besitzen: So wird vermutet, dass NK-Zellen nach erfolgreich abgewendeter akuter Abstoßung eine Mediatorrolle im Verlauf der verzögerten Transplantatabstoßung spielen⁶⁰.

7. Ausblick

Akute und chronische Abstoßung einerseits, Sepsis und Induktion maligner Prozesse andererseits, sind die Grundprobleme der klinischen Dünndarmtransplantation. Mit der Einführung potenter Immunsuppressiva, wie CsA und FK 506, lässt sich die akute Abstoßung, die in den ersten Wochen nach Transplantation erfolgt, verhindern. Eine Verbesserung postoperativer Ergebnisse durch unbegrenzte Steigerung der Immunsuppression ist aber unrealistisch, da sie die Rate postoperativer Infekte und maligner Prozesse erhöhen würde. Die derzeitigen immunsuppressiven Schemata führen zu einer Hemmung der T-Zellantwort des Empfängers, die ein erhöhtes Infektionsrisiko, insbesondere für virale Erreger, nach sich zieht. Ziel einer verbesserten Therapie der Abstoßung muß es daher sein, spezifisch an den für die Transplantatabstoßung verantwortlichen Lymphozyten anzugreifen, ohne die gesamte T-Zellantwort zu blockieren. Um dies zu realisieren, bedarf es weiterer spezifischer Untersuchungen der intraepithelialen Lymphozyten.

Der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg der NK-Zellen auf das Achtfache ihres Ursprungswertes zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen Abstoßung und dieser IEL-Subpopulation hin. Um beurteilen zu können, ob die NK-Zellen eine Mediatorrolle im Abstoßungsgeschehen einnehmen, müssen Protokolle zu ihrer Isolierung etabliert werden. Auch die Untersuchung der Frage, ob sich NK-Zellen des intraepithelialen Kompartiments funktionell von NK-Zellen anderer Organe z.B. der Milz unterscheiden, erfordert aufgereinigte Populationen. Dabei ist von Interesse, die zu ihrer Aktivierung notwendigen Signale und Transkriptionsfaktoren, ihr lytisches Verhalten gegenüber allogenen Zellen, sowie ihr eigenes Expressionsmuster zwischen den verschiedenen NK-Zell-Populationen zu vergleichen.

Mit diesen Analysen soll die Frage beantwortet werden, ob NK-Zellen an der Dünndarmabstoßung beteiligt sind, was aufgrund ihres Anstieges zu erwarten wäre. Sollte dies bestätigt werden, eröffnet sich die Möglichkeit, diese NK-Zellen durch depletierende monoklonale Antikörper zu reduzieren. Bei Erfolg könnte dieser spezifische Einsatz NK-Zell-spezifischer Antikörper mit Immunsuppressiva kombiniert werden und somit die derzeit notwendigen Immunsuppressiva-Dosen reduzieren.

8. Zusammenfassung

Da der limitierende Faktor der humanen Dünndarmtransplantation derzeit in der hohen Abstoßungsrate liegt, wird versucht, die Abstoßungsvorgänge auf allen Ebenen genauer zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Versuchsreihe war es, die immunologischen Reaktionen, die sich nach Dünndarmtransplantation im transplantierten Organ selbst abspielen, auf zellulärer Ebene zu analysieren. Dabei spielen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) einerseits aufgrund ihrer Lokalisierung an der Grenzlinie zwischen externen und körpereigenen internen Kompartimenten, andererseits aufgrund ihrer hohen Anzahl an Lymphozyten und damit ihrer starken Immunogenität, die Mediatorrolle im Abstoßungsgeschehen. Es wurden zwei Modelle, das Abstoßungsmodell (AB) und das Toleranzmodell (TOL), betrachtet, die sich lediglich darin unterschieden, dass die Tiere des Toleranzmodells nach Transplantation vier Tage länger unter Immunsuppression standen als die Tiere des Abstoßungsmodells. Während das Abstoßungsmodell gegen Tag 100 Transplantatabstoßung zeigte, zeigte das Toleranzmodell Langzeitüberleben bis Tag 250, an dem die Versuche beendet wurden.

Das intraepitheliale Kompartiment ist charakterisiert durch die drei Hauptpopulationen: $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten (64 %), $CD4^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten (13 %) und NK-Zellen (5 %). Diese Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartiments wurde durch die Dünndarmtransplantation per se nicht verändert, mit Ausnahme zum Zeitpunkt der Abstoßung. Die Dominanz der $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten, die sich auch im Verhältnis $CD4^+ : CD8^+$ von 1 : 6 widerspiegelte, wie auch die Dominanz der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten (75 %) und das Verhältnis von $TCR\alpha\beta^+ : TCR\gamma\delta^+$ mit 7 : 1 blieben konstant. Auch der Aktivierungsgrad der IEL, der sowohl vor, als auch nach Transplantation bei nur 3 % lag, wurde durch die Transplantation per se nicht beeinflusst.

Nach Dünndarmtransplantation wurde im Transplantat ein Zellaustausch von Spender- durch Empfängerlymphozyten beobachtet. Dieser Austausch, der zwei Wochen nach Transplantation temporär rückgängig war, war ab Tag 100 abgeschlossen und änderte sich danach nicht mehr. An Tag 100, zum Zeitpunkt der Abstoßung, waren somit nahezu alle isolierten intraepithelialen

Lymphozyten empfängerspezifische Lymphozyten (96 % Empfängerlymphozyten und 4 % Spenderlymphozyten). Dieses Phänomen, auch intraorganischer Zellchimärismus genannt, zeigte sich unabhängig vom Schicksal des Transplantats, d.h., sowohl im Abstoßungs- (AB), als auch im Toleranzmodell (TOL) war dieses Phänomen zu beobachten.

Während die Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes kaum äußeren Einflüssen unterlag, veränderte diese Zusammensetzung aber zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung stark ihr Profil. Der prozentuale Anteil der $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten sank auf 42 %, der Anteil der $CD4^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten betrug 10 %. Die einzige Population, die mit einem extremen Anstieg einherging und damit mit der Abstoßung korrelierte, waren die NK-Zellen, die von 5 % auf das Achtfache, auf fast 40 % anstiegen. Zum Zeitpunkt der Abstoßung an Tag 100 waren somit im intraepithelialen Kompartiment $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten und NK-Zellen gleich stark vertreten. Die sich hierbei abspielenden immunologischen und inflammatorischen Vorgänge, die sich an Tag 100 auch im Anstieg der Aktivierungsmarker auf 20 % widerspiegeln, waren auch klinisch anhand des Gewichtsverlustes und des zunehmend reduzierten Allgemeinzustandes zu erkennen.

Die Tiere des Toleranzmodells hingegen zeigten sowohl an Tag 100, als auch an Tag 250 keine Veränderung der Zusammensetzung des intraepithelialen Kompartimentes im Vergleich zu nicht transplantierten Tieren. Die $CD8^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten waren weiterhin die dominierende Population mit 64 % und die NK-Zellen stellten mit konstant 5 % nur einen kleinen Anteil der IEL, die nicht aktiviert waren, dar. Auch klinisch zeigte sich ein guter Allgemeinzustand. Das Immunsystem des Transplantatempfängers sollte so beschaffen sein, dass das Transplantat nicht abgestoßen wird, aber dass es dennoch weiterhin in der Lage ist, für den Körper schädliche Fremdartige zu eliminieren.

Somit scheint die Abstoßung im intraepithelialen Kompartiment des Dünndarmtransplantats ein von NK-Zellen dominierter Entzündungsprozeß zu sein, während die NK-Zellen in toleranten Tieren als normaler Bestandteil der IEL-Subpopulationen unauffällig bleiben.

9. Literatur

- 1 Gundlach M. Untersuchungen zur Manipulation der Immunogenität von Dünndarmtransplantaten im Rattenmodell. Dissertation in der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 1988.
- 2 Mengel W, Schang T. Indications for small-bowel transplantation in children. In: E Deltz, A Thiede, H Hamelmann: Small-bowel transplantation. Experimental and clinical fundamentals. Springer Verlag, Berlin 1986: 262-264.
- 3 Heeckt PF, Bauer AJ, Beger HG, Schraut WH. Surgical therapy of short bowel syndrome. Z Gastroenterol 1995; 33: 15-21.
- 4 Heeckt PF, Klein D, Beger HG. Indications for total parenteral nutrition or small intestine transplantation? - Prognostic factors in short bowel syndrome. Langenbecks Arch Surg Suppl 1996; 113: 389-39.
- 5 Selzner M, Isenberg J, Keller HW. Current status of surgical treatment of short bowel syndrome. Zentralbl Chir 1996; 121: 1-7.
- 6 Beath SV. Small bowel transplantation. Indian J Pediatr 1999; 66: 71-74.
- 7 Hakim NS, Papalois VE. Small bowel transplantation. Int Surg 1999; 84: 313-317.
- 8 Kaufmann SS, Atkinson JB, Bianchi A, Goulet OJ, Grant D, Langnas AN, McDiarmid SV, Mittal N, Reyes J, Tzakis AG; American Society of Transplantation. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. Pediatr Transplant 2001; 5: 80-87.
- 9 Carrel A: La technique operateire des anastomoses vasculaires et la transplantation des visceres. Lyon Med 1902; 98: 859-864.
- 10 Alican F, Hardy JD, Cayirli M, Varner JE, Moynihan PC, Turner MD, Anas P: Intestinal transplantation: Laboratory experience and report of a clinical case. Am J Surg 1971; 121: 150-159.
- 11 Stauffer UG: The present state of small bowel transplantation in animal research and in man. Z Kinderchirurgie 1977; 22: 241-248.

- 12 Largiader F: Stand der Organtransplantation (mit Ausnahme von Niere und Leber). *Chirurg* 1980; 51: 280-282.
- 13 Deltz E: Die allogene Dünndarmtransplantation. Funktionelle und morphologische Untersuchungen der Abstoßungs- und der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GVHR) im Rattenmodell. Habilitationsschrift in der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. W Zuckschwerdt Verlag, München, 1984.
- 14 Schraut WH: Current status of small-bowel transplantation. *Gastroenterology* 1988; 94: 525-538.
- 15 Watson AJM, Lear PA: Current status of intestinal transplantation. *Gut* 1989; 30:1771-1782.
- 16 Deltz E, Schroeder P, Gundlach M, Hansmann ML, Leimenstoll G: Successful clinical small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 2501.
- 17 Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, Mazariegos G, Wu T, Murase N, Sindhi R, Martin D, Colangelo J, Zak M, Janson D, Ezzelarab M, Dvorchik I, Parizhskaya M, Deutsch M, Demetris A, Fung J, Starzl TE. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001; 234: 404-416.
- 18 Sigalet DL, Williams DC, Garola R, Thorne P, Martin G. Impact of FK506 and steroids on adaptation after intestinal resection or segmental transplantation. *Pediatr Transplant* 2000; 4: 12-20.
- 19 Xiao F, Foster PF, Sankary HN, Templeton AC, Kociss K, Williams JW. The role of ultraviolet B-irradiated leukocyte transfusions and cyclosporine in intestinal transplantation. *Transplantation* 1992; 54: 32-37.
- 20 Sigalet DL, Thorne PC, Williams DC, Martin GR, Yatscoff RW. Effect of combined immunosuppressive drug therapy on small intestinal nutrient transport in the rat. *Clin Biochem* 1999; 32: 51-57.

- 21 Reyes J, Bueno J, Kocoshis S, Green M, Abu-Elmagd K, Furukawa H, Barksdale EM, Strom S, Fung JJ, Todo S, Irish W, Starzl TE. Current status of intestinal transplantation in children. *Pediatr Surg* 1998; 33: 243-254.
- 22 Jan D, Michel JL, Goulet O, Sarnacki S, Lacaille F, Damotte D, Cezard JP, Aigrain Y, Brousse N, Peuchmaur M, Rengeval A, Colomb V, Jouvet P, Ricour C, Revillon Y. Up-to-date evolution of small bowel transplantation in children with intestinal failure. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 841-844.
- 23 Soreide O, Husberg B, Bjoro K, Schrupf E. Liver transplantation – development and experiences. *Tidsskr Nor Laegeforen (Norwegian)* 1999; 119: 3310-3314.
- 24 Hata Y, Cecka JM, Takemoto S, Ozawa M, Cho YW, Terasaki PI. Effects of changes in the criteria for nationally shared kidney transplants for HLA-matched patients. *Transplantation* 1998; 65: 208-212.
- 25 Tabasco-Minguillan J, Cicalese L, Weber K, Lee RG, Rakela J. Mucosal perfusion in the rat intestinal allograft during acute rejection. *Transplant Proc* 1996; 28: 2578-2580.
- 26 Tabasco-Manguillan, Cicalese L, Weber K, Lee RG, Rakela J. Mucosal reactivity of the intestinal allograft during acute rejection. *Transplant Proc* 1996 Oct; 28(5): 2576-2577.
- 27 Sileri P, Rastellini C, Dicuonzo G, Gaspari A, Benedetti E, Cicalese. Transplantation of the intestines and bacterial translocation. *G Chir* 2000; 21: 196-204.
- 28 Deltz E, Schroeder P, Gundlach M, Hansmann ML, Leimenstoll G: Successful clinical small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 2501.
- 29 Hänsel S: Expression von Transplantationsantigenen im Rattendünndarm unter dem Einfluss medikamentöser und operativer Behandlungen. Dissertation in der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 1994.

- 30 Kaiserlian D: Murine gut epithelial cells express Ia molecules antigenically distinct from those of conventional antigen-presenting cells. *Imunol Res* 1991; 10: 360-364.
- 31 Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al.: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40: 1256-1265.
- 32 Clardy J: The chemistry of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 56-61.
- 33 Deltz E, Thiede A: Mikrosurgical Technique for small-intestine transplantation. *Microsurgical Models in Rats for Transplantation Research*. Springer 1985: 51-55.
- 34 Kearsey JA, Stadnyk AW. Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods* 1996; 194: 35-48.
- 35 Tykal K, Otto C, Gasser M, Vorwinkel T, Hoppe H, Meyer D, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Flow Cytometric Analysis of Graft- and Host-Specific Cell Migration after Allogeneic Small Bowel Transplantation. *Infus Ther Tansfus Med* 1998; 25: 352-359.
- 36 Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001; 2:997-1003.
- 37 Yoshikai Y. The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol Res* 1999; 20: 219-235.
- 38 Beagley KW, Husband AJ. Intraepithelial Lymphocytes: Origins, Distribution and Function. *Immunology* 1998; 18: 237-254.
- 39 Camerini V, Panwala C, Kronenberg M. Regional Specialization of the Mucosal Immune System. *J Immunol* 1993; 151: 1765-1776.
- 40 Mayrhofer G, Whately RJ. Granular intraepithelial lymphocytes of the rat small intestine. I. Isolation, presence in T-lymphocyte-deficient rats and bone marrow origin. *Int Arch Allergy Immunol* 1983; 71: 317-327.

- 41 Boll G, Rudolphi A, Spiess S, Reimann J. Regional specialisation of intestinal T cells in the murine small and large intestine. *Scand J Immunol* 1995; 41: 103-113.
- 42 Gorczynski RM, Chen Z, Cohen Z, Plapler H, Wojcik D. Phenotypic and functional assessment of intraepithelial lymphocytes (IEL) isolated from rat colon and small bowel. *Immunol Lett* 1996; 50: 131-137.
- 43 Gramzinski RA, Adams E, Gross JA, Goodman TG, Allison JP, Lefrancois L. T cell receptor-triggered activation of intraepithelial lymphocytes in vitro. *Int Immunol* 1993; 5: 145-153.
- 44 Viney JL, MacDonald TT. Lymphokine secretion and proliferation of intraepithelial lymphocytes from murine small intestine. *Immunology* 1992; 77: 19-24.
- 45 Schlitt HJ: Spender-Leukozyten und Chimärismus bei klinischer Leber-, Lungen-, und Herztransplantation – Analyse und Ausblick. *Transplant Med* 1996; 8: 9-32.
- 46 Tashiro H, Fukuda Y, Kimura A, Hoshino S, Ito H, Dohi K: Assessment of microchimerism in rat liver transplantation by polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996; 23: 828-834.
- 47 Kurlberg G, Lycke N, Haglund E. Migration of host and donor T cells in small bowel transplantation. *Transpl Int* 1997, 10: 45-50.
- 48 Hell K, Gundlach M, Schmidt P, Hansmann ML, Schroeder P, Deltz E. Immunohistochemical analysis of immunocompetent cells involved in small bowel rejection in the rat. *Transplant Proc* 1990, 22: 2461-2462.
- 49 Ingham Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RFM, Lear PA. Lymphocyte infiltration patterns in rat small bowel transplants. *Transplant Proc* 1990, 22: 2460.
- 50 Gassel H-J, Otto C, Klein I, Steger U, Meyer D, Gassel A-M, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Persistence of stable intragraft cell chimerism in rat liver allografts after drug-induced tolerance. *Transplantation* 2001; 71: 1848-1852.

- 51 Schattenfroh NC, Hoffman RA, McCarthy SA, Simmons RL. Phenotypic analysis of donor cells infiltrating the small intestinal epithelium and spleen during graft-versus-host disease. *Transplantation* 1995; 59: 268-273.
- 52 Webster GA, Wood RF, Pockley AG. Identification of migratory graft and host cell populations after allogeneic rat small bowel transplantation. *Immunol Invest* 1996, 25: 435-446.
- 53 Schlitt HJ, Ko S, Deiwick A, Hundrieser J. Microchimerism in Organ Transplantation; aus Timmermann W, Gassel H-J, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A. *Organtransplantation in Rats and Mice – Microsurgical Techniques and Immunological Principles*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998; 285-289.
- 54 Demetris AJ, Murase N, Ye Q, Galvao FH, Richert C, Saad R, Pha S, Duquesnoy RJ, Zeevi A, Fung JJ, Starzl TE. Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy. Possible contributions of donor antigen-presenting cells and lymphatic disruption. *Am J Pathol* 1997; 150: 563-578.
- 55 Lu L, Li W, Zhong C, Qian S, Fung JJ, Thomson AW, Starzl TE. Increased apoptosis of immunoreactive host cells and augmented donor leukocyte chimerism, not sustained inhibition of B7 molecule expression are associated with prolonged cardiac allograft survival in mice preconditioned with immature donor dendritic cells plus anti-CD40L mAb. *Transplantation* 1997; 68:747-757.
- 56 Zoller M, Strubel A, Hammerling G, Andrighetto G, Raz A, Ben-Ze'ev A. Interferon-gamma treatment of B16 melanoma cells: opposing effects for non-adaptive and adaptive immune defense and its reflection by metastatic spread. *Int J Cancer* 1988; 41: 256-266.
- 57 Zoller: IFN-treatment of B16-F1 versus B16-F10: relative impact of non-adaptive and T-cell-mediated immune defense in metastatic spread. *Clin Exp Metastasis* 1988; 6: 411-429.
- 58 Rolstad B, Fossum S. Non-adaptive cellular immune responses as studied in euthymic and athymic nude rats. Spontaneous rejection of allogeneic

- lymphoid cell grafts by natural killer (NK) cells. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 215-226.
- 59 Manilay JO, Sykes M. Natural killer cells and their role in graft rejection. *Immunology* 1998; 10: 532-538.
- 60 Fandrich F, Zepernick-Kalinski C, Gebhardt H, Henne-Bruns D, Zavazava N, Lin X. The role of natural killer cell mediated caspases activation in a graft-versus-host disease model of semiallogeneic small bowel transplantation. *Transpl Immunol* 1999; 7: 1-7.
- 61 Ljunggren HG, Kärre K. In search of the „missing self“: MHC molecules and NK cells recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
- 62 Kambayashi T, Michaëlsson J, Fahlén L, Chambers BJ, Sentman CL, Kärre K, Ljunggren HG. Purified MHC class I molecules inhibit activated NK cells in a cell-free system in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31: 869-875.
- 63 Thornton S, Kuhn KA, Finkelman FD, Hirsch R. NK cells secrete high levels of IFN- γ in response to in vivo administration of IL-2. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3355-3360.
- 64 Sarnacki S, Nakai H, Calise D, Azuma T, Brousse N, Revillon Y, Cerf-Bensussan N. Decreased expression of the interleukin 2 receptor on CD8 recipient lymphocytes in intestinal grafts rendered tolerant by liver transplantation in rats. *Gut* 1998; 43: 849-855.