

AUS DEM DEPARTMENT
FÜR UROLOGIE UND TRANSPLANTATIONSCHIRURGIE DER MAYO CLINIC
UND MAYO MEDICAL SCHOOL DER UNIVERSITÄT VON MINNESOTA IN
ROCHESTER, MINNESOTA, USA

ZUR ALTERATION DER IMMUNOGENITÄT VON NIERENTRANSPLANTATEN
BEIM HUND UND BEIM MENSCHEN

[1]

Habilitationsschrift für das Fach

Urologie

*des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen*

Vorgelegt von

Dr. med.
Horst Zincke

Giessen 1981

Einleitung:

Während der letzten Jahre haben sich keine grossen Fortschritte in der Verbesserung der Überlebensraten von Kadavernierentransplantaten ergeben. Die regelmässigen Berichte des Organtransplantationsregisters des "American College of Surgeons" (1-5) zeigen eine Tendenz zur Verschlechterung der Ergebnisse auf dem Gebiet der Kadavernierentransplantation auf. Zur Zeit funktionieren lediglich etwa 40 % und weniger Kadavernieren noch nach drei Jahren. Terasaki und Mitarbeiter (6) konnten zeigen, dass die Überlebensziffern für Kadavernieren in Nordamerika etwa 32 % nach drei Jahren betragen. Allerdings hat sich die Überlebensrate der Empfänger von Kadavernieren verbessert, was wahrscheinlich auf die vorsichtiger immunosuppressive Behandlung der Empfänger und die verbesserte Hämodialyse zurückzuführen ist. Etwa 61,4 % der Kadavernierenempfänger sind nach drei Jahren noch am Leben. Die Ursachen für die schlechteren Transplantatüberlebensziffern sind mannigfaltig. In den letzten Jahren hat man vorwiegend den Effekt von Bluttransfusionen vor der Transplantation für verbesserte Ergebnisse verantwortlich gemacht (6-11). Der Grad der Sensitivierung des Empfängers (6), Splenektomie (12-13), Nephrektomie (5) und Histokompatibilität (6, 14-18) sind weitere Faktoren, die für den Ausgang der Transplantation von Bedeutung sind. Weiterhin zu berücksichtigen ist, dass eine zunehmende Zahl von hohen Risikopatienten, u.a. Diabetiker (19-21), transplantiert werden, die man noch vor wenigen Jahren von der Transplantation ausgeschlossen hatte.

Die multiplen Faktoren, die zur Auslösung der Abstossungskrise beim Empfänger gegenüber dem Transplantat führen, sind noch nicht alle klar identifiziert (22). Das Abstossungsphänomen schliesst eine komplexe Serie von Ereignissen ein, die sich

durch die Sensitivierung des Empfängers durch Histokompatibilitätsantigene des Spenders ergeben. Die Abstossungskrise, die sich pathogenetisch in einer Zerstörung des Transplantats ausdrücken kann, wenn nicht modifiziert, verhält sich relativ zum Grad der genetischen Unterschiedlichkeit und dem Vorhandensein von zytotoxischen Antikörpern gegenüber Spenderantigenen.

Voraussetzung für die Immunreaktion des Empfängers ist die "Erkennung" von Spenderantigenen durch lymphoide Zellen des Empfängers. Verschiedene Mechanismen sind dafür verantwortlich. Einmal besteht die Möglichkeit, dass die Zellen des Empfängers, die auf einen Immunstimulus reagieren können (nämlich Lymphozyten), in das Transplantat einwandern. Wahrscheinlich geschieht dies aber erst in einer späteren Phase, da die Lymphknoten von Tieren mit Transplantaten eine Immunreaktion entwickeln, bevor signifikante Zahlen von Plasmazellen im Transplantat nachweisbar sind (23). Zum anderen ist es möglich, dass die Freisetzung von löslichen Membranoberflächenantigenen während der Transplantationsperiode zu einer Immunreaktion des Empfängers führt. Eine weitere Möglichkeit zur Sensitivierung des Empfängers besteht in der Freisetzung von Teilantigenen bei der Zerstörung von Gewebe- und Zellmembranveränderungen.

Snell (23) wies schon 1957 darauf hin, dass Spenderlymphozyten wahrscheinlich von besonderer Bedeutung für die Entwicklung der Immunreaktion des Empfängers sind. Beweis dafür sind die fundamentalen Experimente von Steinmuller (24) und Elkins und Guttmann (25). In voneinander unabhängigen Versuchen konnten diese Autoren den Beweis erbringen, dass die Sensitivierung nach Allotransplantation wenigstens zum Teil auf nicht parenchymatöse haemopoetische Zellen, den sogenannten "passenger leucocytes", als wichtige Immunogene zurückzuführen ist. Steinmuller (24) konnte in seinen Versuchen zeigen, dass Hautisotransplantate von Mäusen, die immunologisch tolerant gegenüber

Allotransplantaten waren, isogene Empfänger gegen weitere Hauttransplantate immunisieren konnten. Offensichtlich dienten die isogenen Hauttransplantate der toleranten Mäuse lediglich als Vehikel für Transplantationsantigene von Alloleukozyten (ursprünglich von Milz und Knochenmark), die wiederum in der Lage waren, die Empfänger zu stimulieren. Elkins und Guttman (25) demonstrierten am Rattennierenmodell, dass eine lokale "graft versus host" Reaktion stattfindet, wenn Leukozyten vom Elternstamm unter die Nierenkapsel von toleranten F1-Empfängern injiziert wurden. Die Autoren folgerten, dass Spenderlymphozyten (sogenannte "passenger leukocytes") innerhalb der Kapillaren und des Interstitiums durch zirkulierende Empfängerlymphozyten stimuliert wurden, und dass die Wechselwirkung von Spender- und Empfängerlymphozyten zu einer Zerstörung des Transplantats führen kann. Weitere Untersuchungen von Guttman und Mitarbeitern (26-28) unterstützen diese Behauptung. Sie zeigten anhand von Knochenmarkschimären, dass diese immunogenen Spenderlymphozyten hämopoetischen Ursprungs sind und empfindlich gegenüber zytotoxischen Medikamenten wie z.B. Cyclophosphamid (CY) und Procarbazin HCL (P) sind. Diese Ergebnisse wurden von anderen Autoren bestätigt (29-39), welche zytotoxische Medikamente oder Bestrahlung anwandten, um eine Alteration der Spenderzellen zu erzielen. Obwohl die Eliminierung oder Veränderung der "passenger leukocytes" zu einer Abschwächung der Abstossungsreaktion führt und damit zu einer verbesserten Kontrolle mit den heute verfügbaren Methoden der Abstossungsbehandlung, lässt sich eine immunogene Stimulierung durch parenchymatöse Zellen oder vaskuläres Endothel nicht ausschliessen (35). Andererseits haben die Untersuchungen von Steinmüller (24) und Elkins und Guttman (25) zu einer neuen Beurteilung und/Verständnis des Problems der Abstossungsreaktion geführt.

Die Verminderung oder Änderung der Abstossungsreaktion lässt sich einmal durch die immunsuppressive Manipulation des Empfängers erreichen. Allerdings haben in den letzten Jahren

keine auf dem Markt verfügbaren Medikamente sich als wirksam erwiesen und die Triade von Steroiden, Azathioprin und lokaler Transplantatbestrahlung (an manchen Institutionen auch Antilymphozytenserum) ist seit Jahren unverändert geblieben. Die Erreichung einer vollkommenen identischen Histokompatibilität von Transplant und Leichennierenempfängern ist zur Zeit nicht möglich. Daher scheint die immunologische Modifikation des Leichennierenspenders von besonderer Attraktivität zu sein, da sie mit keiner Gefahr für den Empfänger verbunden ist.

Aufgrund ihrer erfolgreichen Tierversuche (25, 27, 35) haben zuerst Guttman et al (40-43) und dann Zincke et al (19, 21, 44-46) mit Erfolg ihre Versuche auf die Modifikation von Kadavernierentransplantaten beim Menschen ausgedehnt. Mehrere Probleme in Verbindung mit der immunologischen Spendervorbehandlung sollten jedoch gelöst werden. Ist die Vorbehandlung mit zytotoxischen Medikamenten und Steroiden beim Menschen überhaupt wirksam? Welches ist die beste Medikamentenkombination? Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die Hunde- und menschliche Niere hohe Dosen solcher Medikamente toleriert und es zu keinen pathologischen Veränderungen des Transplantats kommt; und ob die so vorbehandelten Nieren eine Präservierung tolerieren, da nur dies eine erfolgreiche Anwendung im Humanbereich möglich macht.

In Anbetracht der excellenten Ergebnisse mit der Spendervorbehandlung in Bezug auf die Überlebensrate der Nierentransplantate ("in vivo" Experimente), sollte diese Vorbehandlung auch auf das "in vitro" Modell ausgedehnt werden. Die Ergebnisse mehrerer veröffentlichter (19, 21, 44-51) und noch unveröffentlichter Studien am Hund und am Menschen (11, 52, 53) sind in dieser Arbeit zusammengefasst. Es wurde bewiesen, dass die Vorbehandlung des Nierenspenders mit zytotoxischen Medikamenten und Methylprednisolon zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate von Nierentransplantaten beim Hund (35, 52) und Menschen führte (44, 45, 46, 11, 19, 21).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Vorbehandlung "in vivo" zu keinen funktionellen und histopathologischen Veränderungen der Nierentransplantate beim Hund und beim Menschen führte (35, 52). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Anwendung der pulsierenden Perfusion mit kryopräzipitiertem Plasma (KPP) bei der Humanniere im Gegensatz zur Hundenniere zu keiner Schädigung führte und damit die klinische Anwendung der Spendervorbehandlung möglich machte (46). Die erfolgreiche Alteration der Immunogenität der Hundenniere "in vitro" mit "vorbehandelten" Plasma konnte anhand von signifikant verlängerten Überlebensraten gezeigt werden (52). Die erfolgreiche "in vitro" Alteration von Spendernieren beim Menschen ist dadurch in den Bereich des Möglichen gerückt.

Material und Methodik

1. Versuche an Hundenieren

In allen Versuchsreihen wurden entwurmte weibliche Bastardhunde von 15-20 kg Gewicht mit Na⁺-Pentobarbital (30 mg/kg i.v.) anästhesiert. Alle Tiere atmeten spontan durch einen Endotrachealtubus 20 % Sauerstoff, der durch den Bird-Respirator vermittelt wurde. Die Narkose wurde durch zusätzliche Gaben von 5 mg/kg/Std. nach zwei Stunden aufrechterhalten. Spender und Empfänger erhielten vor der Nephrektomie und nach der Nierentransplantation 50 ml/kg 0,45 %ige Kochsalzlösung mit 5 %iger Dextrose i.v. Die Nieren wurden während der diuretischen Phase entfernt, mit 200 ml kalter (4° Celsius) Ringer's Lösung mit 10 mval Natriumbikarbonat und 10.000 i.E. Heparin perfundiert. Entsprechend der Versuchsreihe wurden die Nieren entweder sofort implantiert oder nach 24-stündiger pulsierender Perfusion mit den Iliakalgefäßen des Empfängers anastomosiert. Der Harnleiter wurde in die Rückwand der Harnblase implantiert. Eine bilaterale Nephrektomie wurde zur Zeit der Transplantation beim Empfänger durchgeführt. Entsprechend der Versuchsanordnung erhielten die Spendertiere zwischen 50-80 mg/kg Cyclophosphamid (IVCY) und zwischen 50-60 mg/kg Methylprednisolon i.v. (IVMP) 5 1/2 oder 2 1/2 Stunden vor Organentnahme. Bei mehreren Hunden wurde die Leukozytenzahl bestimmt. Die Hunde hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Gewebsentnahme von der Niere wurde zur Zeit der Nephrektomie, nach der Revaskularisierung und zur Zeit der Autopsie durchgeführt und lichtmikroskopisch untersucht.

Nierenfunktion: Serumkreatininwerte wurden bei Spendern und Empfängern vor der Nephrektomie ermittelt und jeden zweiten Tag beim Empfänger. Die tägliche Urinausscheidung wurde gemessen. Der Tod des Empfängers galt als Überlebenszeit des Transplantats.

Kryopräzipitiertes Plasma (KPP) wurde auf standardisierte Weise hergestellt (46). Es enthält 250 mg Methylprednisolon, 2 000 i.E. Heparin, 320 i.E. Insulin, 2 g MgSO_4 , 2 g Dextrose und 250 000 E. Penicillin per 1000 ml. Die Osmolalität betrug 320 M Osmol.

Die Waters Maschine (Mox-100) wurde für die Perfusion verwendet mit einem Maximaldruck von 50 mm Hg bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 7^o Celsius.

2. Versuche an Menschennieren

Patienten (Alter 5-60 Jahre), die von unabhängigen Neurologen und Neurochirurgen als hirntot erklärt worden waren, deren Herz- und Kreislaufsfunktion jedoch intakt war, und deren Angehörige die Genehmigung für die Entnahme von Organen gegeben hatten, erfüllten die Kriterien für die immunologische Vorbehandlung. Blutdruck und Urinausscheidung des Spenders wurde mit Kochsalzlösung, Dopamin und Furosemid aufrechterhalten. IVCY (70-80 mg/kg) und IVMP (50-60 mg/kg) wurden mindestens 5 1/2 Stunden und 2 1/2 Stunden vor der Entfernung der Nieren verabreicht. Die Nieren wurden daraufhin mit blutgruppenspezifischem KPP mit der Mox-100-Maschine perfundiert. Nierenbiopsien wurden durchgeführt zur Zeit der Nephrektomie, nach der Perfusion und nach der Revaskularisierung. In einigen Fällen wurden Seren von Spendern vor der Behandlung, 2 Stunden danach und zur Zeit der Nephrektomie entnommen. Spenderlymphozyten wurden mit Phytohämagglutinin und Concanavallin A stimuliert. Gleichzeitig wurde die Zahl der T-Zellen bestimmt.

Die obere Altersgrenze für die Organempfänger war 68 Jahre. Für die Entscheidung, ob der Patient transplantiert werden sollte oder nicht, war am wichtigsten die Möglichkeit der Rehabilitation und die Aufnahme eines Lebensstiles nach der Transplantation, der für den einzelnen Patienten befriedigend war. Patienten wurden von der Transplantation nicht ausgeschlossen wegen einer Systemerkrankung wie z.B. Lupus Erythematodes, Diabetes mellitus, Koronargefäßerkrankung oder Myocardinfarkt, Magengeschwüre etc. Alle Patienten erhielten postoperativ ein immunsuppressives Standardprogramm (Tabelle 1), das in den ersten drei Wochen vornehmlich aus IVMP und Azathioprin bestand (55). Für Abstoßungskrisen wurden hohe Dosen IVMP (15-30 mg/kg/Tag) verabreicht und lokale Kobaltbestrahlung (bis zu 800 rad / 4 Tage).

Tabelle 1: Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation

1. Azathioprin		
initial bis	5. Tag	5 mg/kg
>	5. Tag	1-3 mg/kg
2. Methylprednisolon		
initial bis	3. Tag	1000 mg
	4. Tag	500 mg
5. -	7. Tag	250 mg
8. -	21. Tag	125 mg
3. Prednison oral		
	> 21. Tag	20 mg/Tag
supplementiert für etwa 2-4 Wochen mit M.P.i.v.		
	> 90 Tagen	0,2-0,4 mg/kg
	> 1. Jahr	15 mg (Kadaver)
		10 mg (Lebend)
	> 2. Jahr	10 mg (Kadaver)
		5 mg (Lebend)
in der akuten Abstossung		
Methylprednisolon i.v.		15-30 mg/kg
	3-4 Tage lang	

Weitere Angaben über die verschiedenen Methoden und statistischen Auswertungen finden sich in den dieser Zusammenfassung zugrundeliegenden Arbeiten (11, 19, 21, 35, 44-55, 62).

Ergebnisse

A. Untersuchungen am Hund

1. Der Einfluss von zytotoxischen Medikamenten und Steroiden (in vivo) in der Spendervorbehandlung auf die Überlebenszeit und histologische Struktur von Nierentransplantaten beim Hund (35, 47, 48)

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Wirkung von IVCY, IVP und IVMP auf die Überlebenszeit und auf die histologische Struktur des Allotransplantats ermittelt. Die Spendertiere wurden in 7 Gruppen entsprechend den Medikamentenkombinationen und Zeitabständen eingeteilt (Tabelle 2). Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt lediglich 5%ige Dextrose in 0,45 %iger Kochsalzlösung i.v.. Die anderen Tiere (Gruppen 2-7) erhielten ein oder mehrere Medikamente i.v. wie in Tabelle 2 beschrieben. Weisses Blutbild und Anzahl der Leukozyten wurden vor und nach der Behandlung bestimmt. Nierenbiopsien wurden durchgeführt zur Zeit der Spendernephrektomie, nach der Revaskularisierung und zur Zeit der Autopsie. Die Ergebnisse der Überlebenszeiten und Nierenfunktionen sind in den Abbildungen 1-7 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Experimente und ihre statistische Auswertung sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Überlebenszeit war am besten, wenn IVP allein oder in Kombination mit IVMP zur Anwendung kam. Ebenso signifikant längere Überlebenszeiten wurden erzielt, wenn IVCY mit und ohne IVMP verwandt wurde. Allerdings hatte die Verabreichung von IVCY an den Spender nur 2 1/2 Stunden vor der Entfernung der Niere keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit des Transplantats. Die Zahl der Lymphozyten verminderte sich um 50 % nach der Injektion von IVCY und IVP. Allerdings blieb die Gesamtzahl der Leukozyten unverändert. Lichtmikroskopische Untersuchung der Nierenbiopsie nach der Vorbe-

Tabelle 2: Protokoll für die Vorbehandlung von Spendern

Gruppe	Anzahl der Hunde	Vorbehandlung (50 mg/kg i.v.)	Zeit der Vorbehandlung Std.
1	4	5 % Dextrose in 0,45 %ige Noll-Lösung - Kontrolle	5 V 2
2	8	Cyclophosphamid	5 V 2
3	7	Methylprednisolon	2 V 2
4	8	Procarbazin HCl	5 V 2
5	6	Cyclophosphamid (kurz) + Methylprednisolon	2 V 2
6	12	Cyclophosphamid (lang) + Methylprednisolon	5 V 2 + 2 V 2
7	8	Procarbazin HCl (lang) + Methylprednisolon	5 V 2 + 2 V 2

Tabelle 3: Analyse der überlebenden Hunde in Kontroll- und vorbehandelten Gruppen

Gruppe	Vorbehandlung (50 mg/kg i.v.)	Anzahl der Hunde	Überleben Mittel	Überleben (Tage) Bereich	p ^a
1	Kontrolle	4	7	7-10	
2	Cyclophosphamid	8	12	8-12	0.02
3	Methylprednisolon	7	13	11-14	0.01
4	Procarbazin HCl	8	17	10-40	0.01
5	Cyclophosphamid (kurz) + Methylprednisolon	6	10	9-10	NS ^b
6	Cyclophosphamid (lang) + Methylprednisolon	12	11	7-15	0.01
7	Procarbazin HCl + Methylprednisolon	8	16	12-23	0.01

^a Rank Sum Test (zweiseitige Verteilung)

^b NS, nicht signifikant

Abb. 1:

Überlebenskurven für Gruppe 1
(Kontrolle)

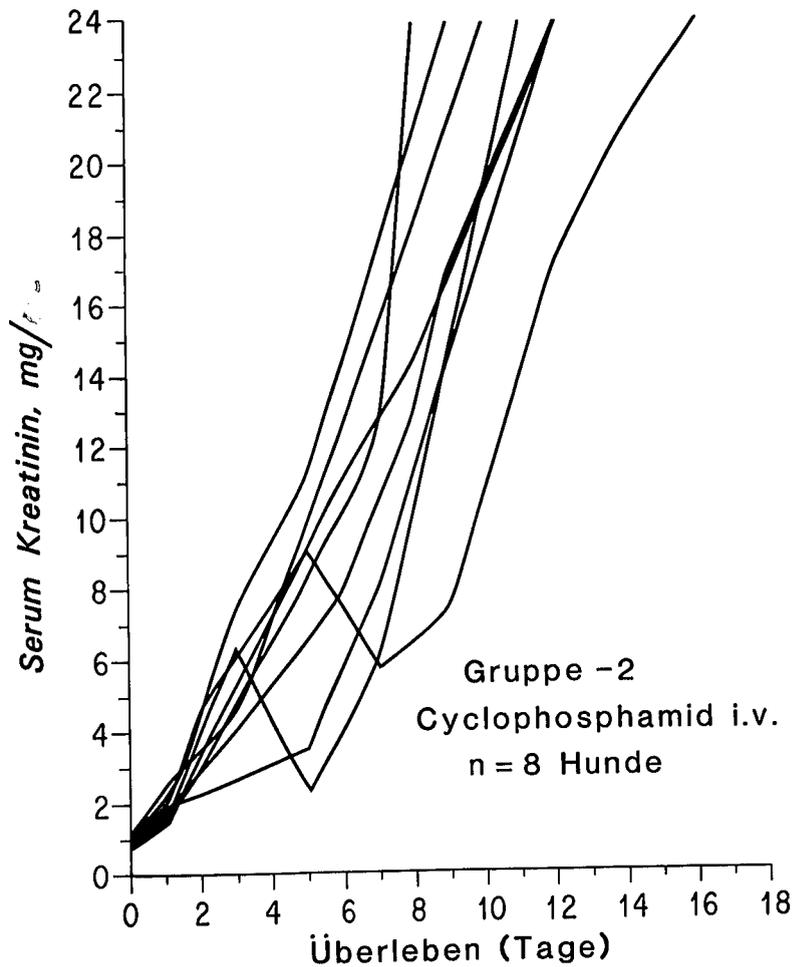
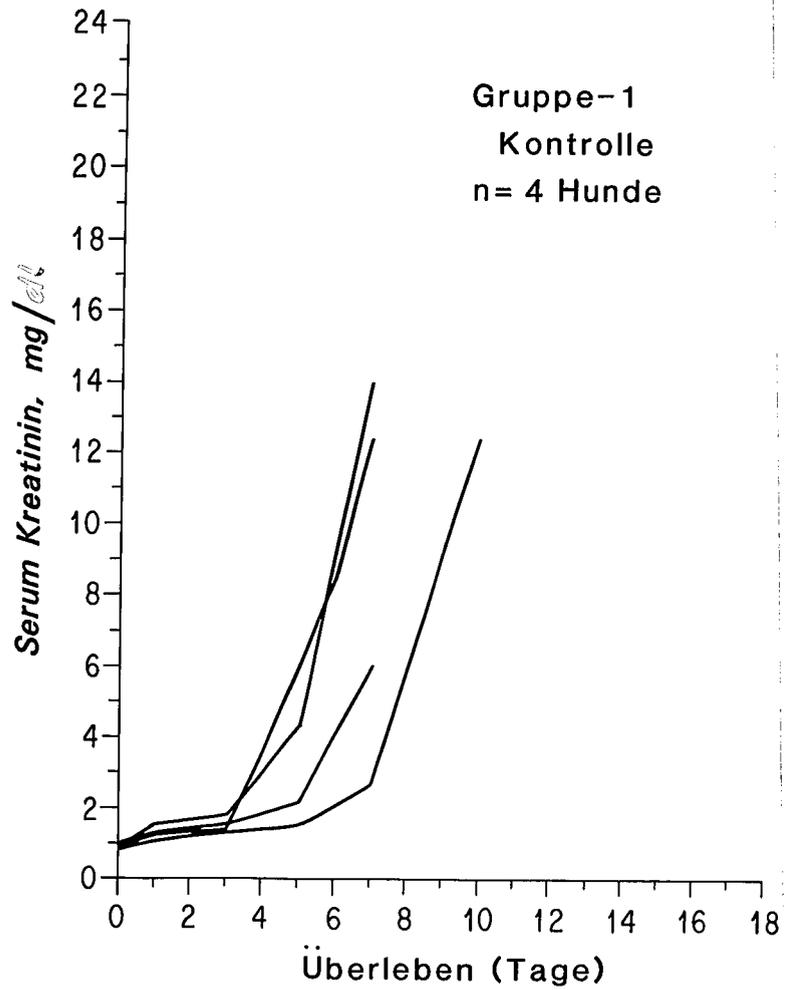


Abb. 2:

Überlebenskurven für Gruppe 2

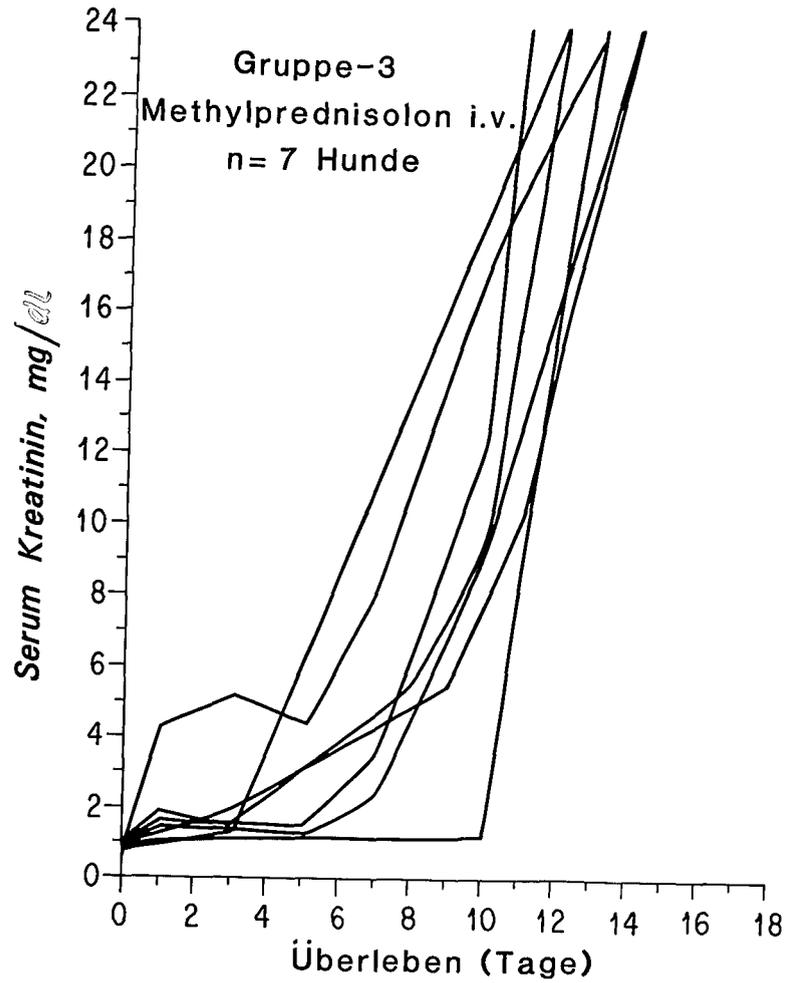


Abb. 3:
Überlebenskurven für Gruppe 3

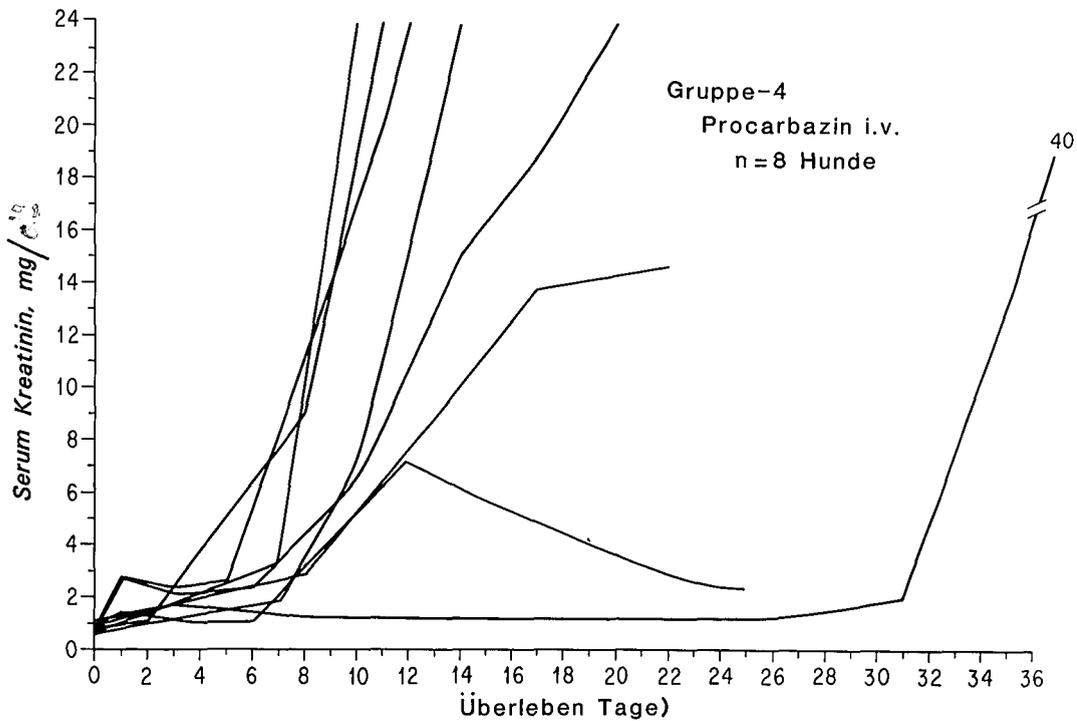


Abb. 4: Überlebenskurven für Gruppe 4

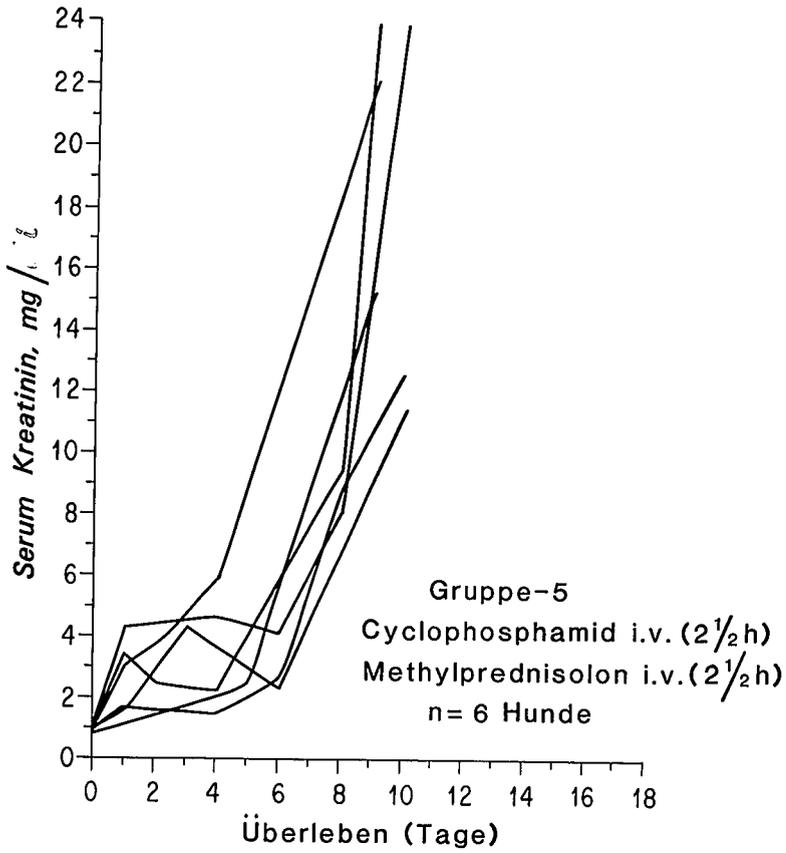


Abb. 5: Überlebenskurven für Gruppe 5

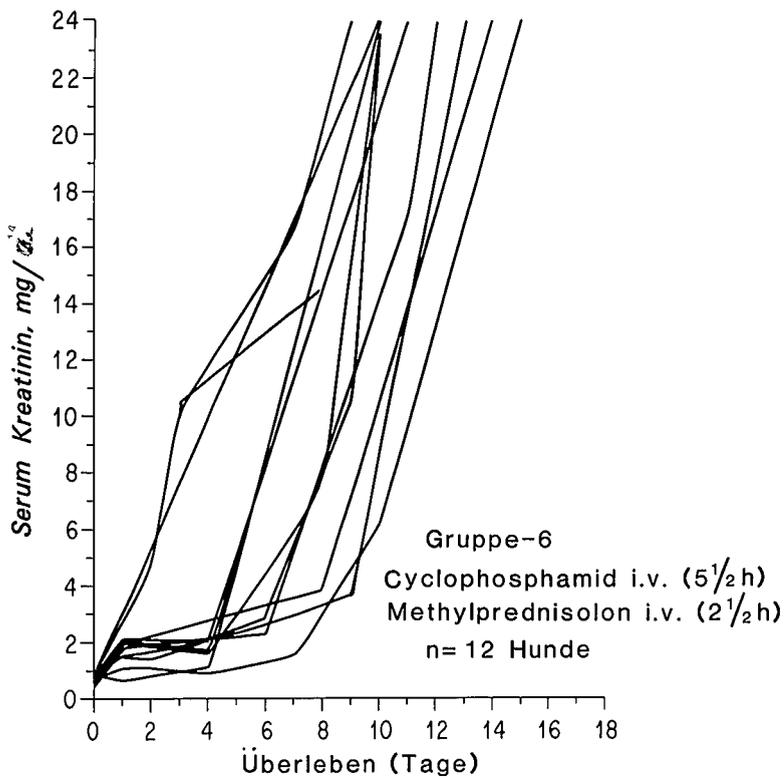


Abb. 6: Überlebenskurven für Gruppe 6

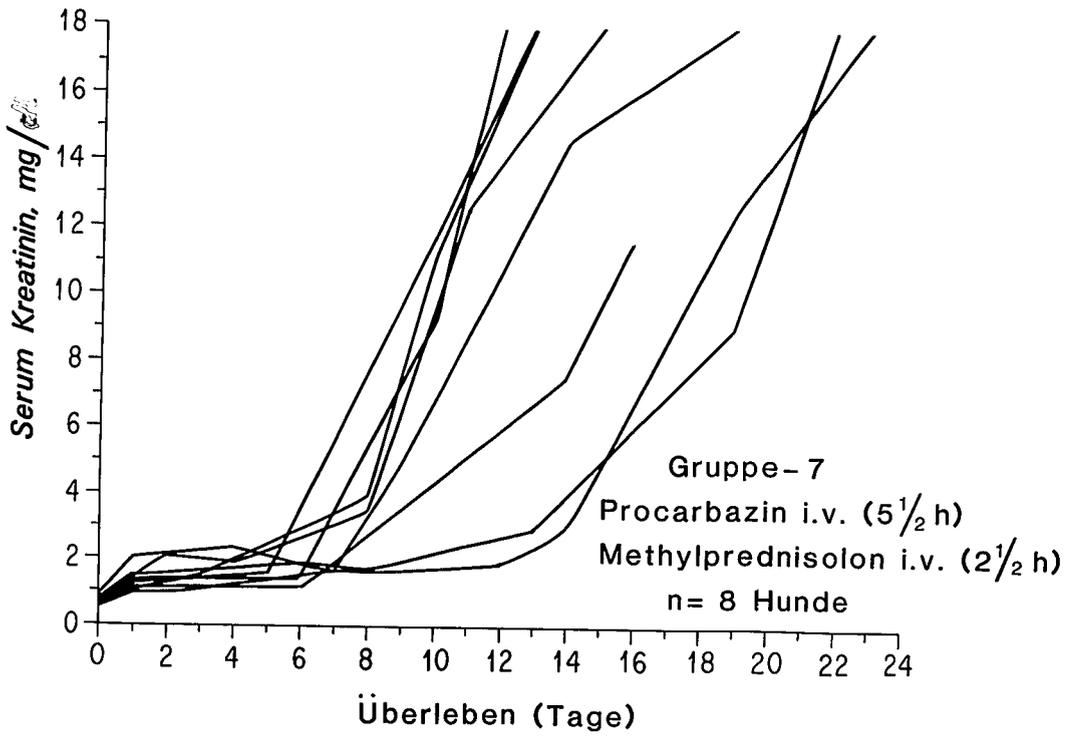


Abb. 7: Überlebenskurven für Gruppe 7

handlung und nach der Revaskularisierung und zur Zeit der Autopsie zeigten, dass die Vorbehandlung keine histopathologischen Veränderungen verursachte. Abbildung 8 zeigt eine nicht vorbehandelte Hundeniere (Kontrolle) nach der Revaskularisierung und Abbildung 9 zur Zeit der Autopsie. Abbildung 10 zeigt die Biopsie einer Niere nach der Vorbehandlung mit IVCY und IVMP und Abbildung 11 zur Zeit der Autopsie nach Vorbehandlung mit IVP. Vorbehandelte und nicht vorbehandelte Nieren zeigten nach der Revaskularisierung normale Glomeruli und Tubuli. Die nicht vorbehandelte Niere zeigt am 10. Tag ausgeprägte periglomeruläre und perivaskuläre Infiltrate mit grossen mononukleären Zellen, Zeichen von Blutungen und vaskulären Veränderungen mit starken ödematösen Veränderungen im Interstitium (Abbildung 9). Am 25. Tag nach der Transplantation einer mit IVP vorbehandelten Niere (Abbildung 11) bestehen noch Inseln von Glomeruli und Tubuli mit minimalen Veränderungen. Allerdings bestehen auch hier Gebiete von glomerulären, tubulären und vaskulären Veränderungen. Es finden sich hier jedoch geringere infiltrative und ödematöse Veränderungen im Vergleich zu den Befunden in Abbildung 9 .

Diese Ergebnisse am Hund bestätigen die Versuchsergebnisse von Guttman und Lindquist (27) im Rattenmodell, dass Cyclophosphamid nicht zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt, wenn es nur 2 1/2 Stunden vor der Nierenentfernung an den Spender verabreicht wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von IVP allein oder in Kombination mit IVMP oder IVCY allein oder in Kombination mit IVMP 5 1/2 Stunden vor der Organentnahme verabreicht, die erfolgreichsten Kombinationen waren, um eine signifikant längere Überlebenszeit beim nicht modifizierten Empfänger zu erzielen. Wenngleich IVMP in der Kombination zu einem Hinauszögern der Urämie

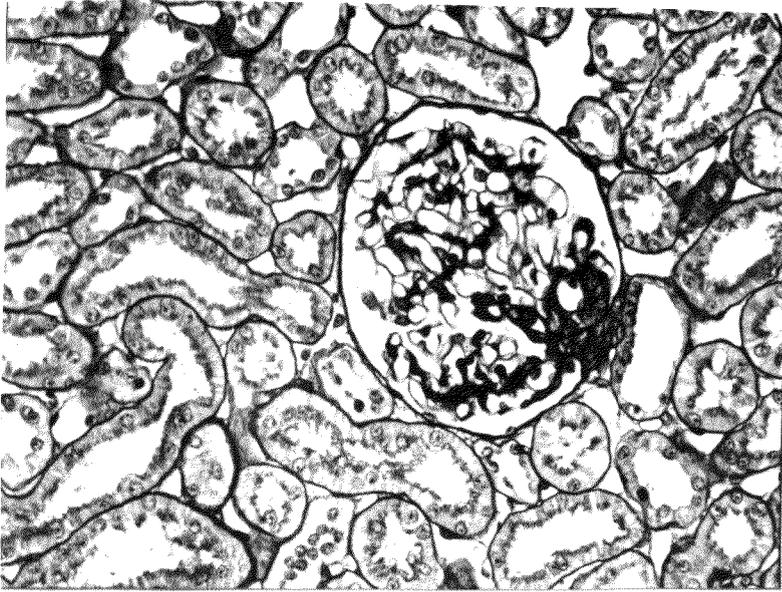


Abb. 8: Nierenbiopsie von einem nicht vorbehandeltem Hund (Kontrolle) nach der Revaskularisierung. Normaler Glomerulus und normale Tubuli. Alcian Blau und PAS, X400.

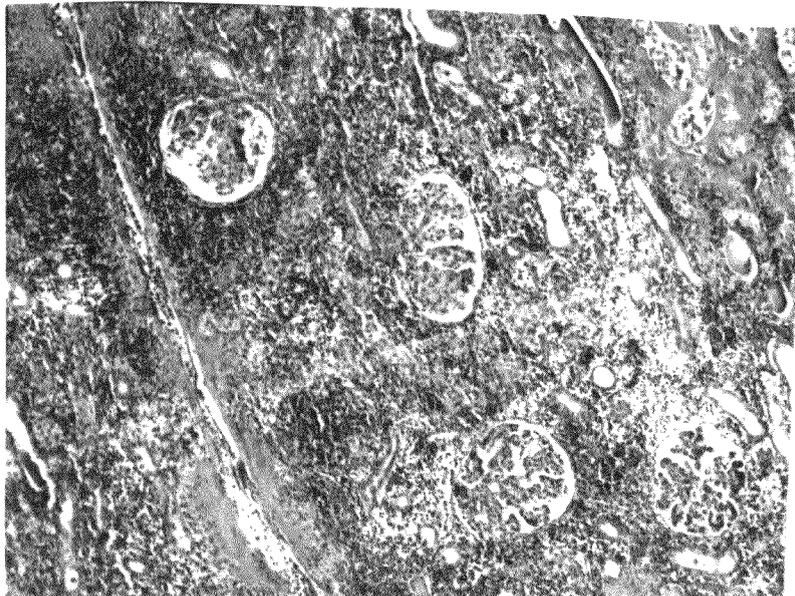


Abb. 9: Nierenbiopsie von einem nicht vorbehandeltem Hund, 10 Tage nach der Nierentransplantation (Autopsie). Hämatoxylin und Eosin. X100. Es liegen intensive periglomeruläre und perivaskuläre Infiltrate mit grossen mononukleären Zellen vor, Zeichen von Hämorrhagien und vaskuläre Veränderungen mit Ödem.

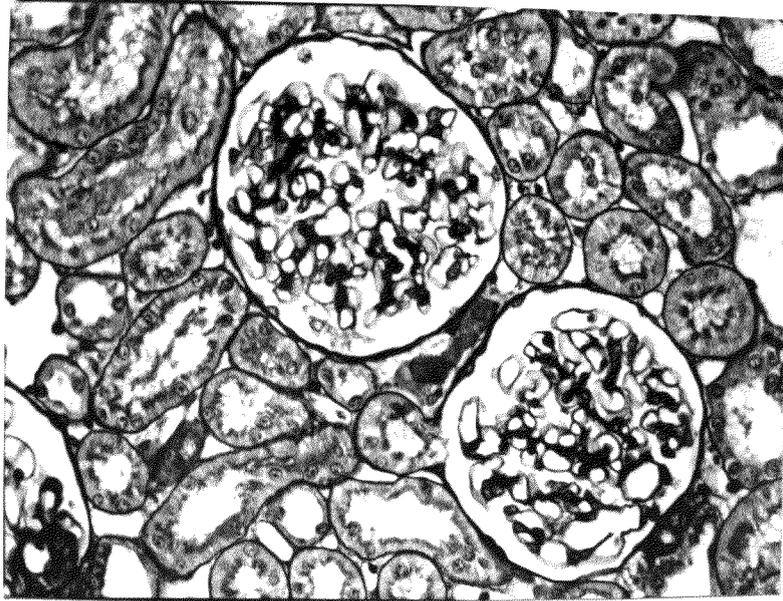


Abb. 10: Nierenbiopsie von einem mit i.v. Cyclophosphamid (50 mg/kg) und i.v. Methylprednisolon (50 mg/kg) vorbehandelten Hund nach der Revaskularisierung. Normale Glomeruli und Tubuli. Alcian Blau und PAS, X400.

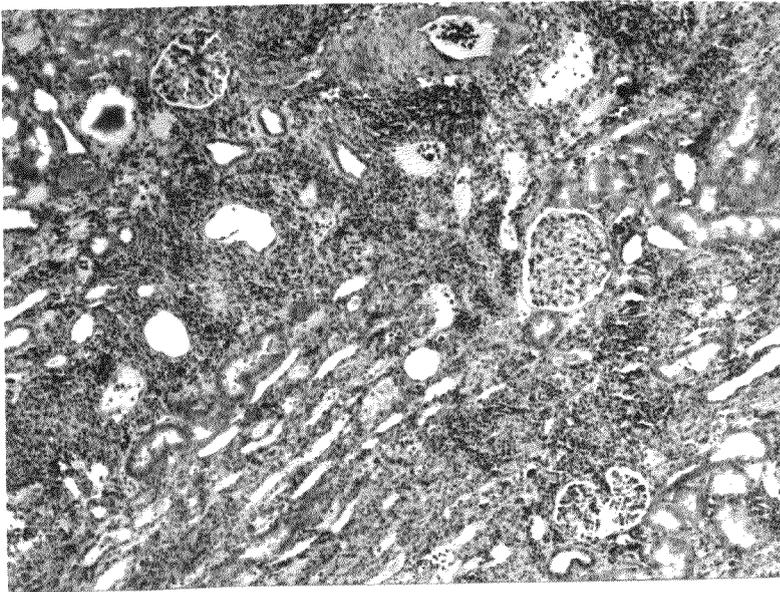


Abb. 11: Nierenbiopsie von einem mit i.v. Procarbazin HCl (50 mg/kg) vorbehandelten Hund 25 Tage nach der Nierentransplantation. Hämatoxylin und Eosin. X100. Es gibt Inseln mit minimal veränderten Glomeruli und Tubuli. Allerdings gibt es auch Gebiete mit intensiven glomerulären und vaskulären Veränderungen; die Infiltrate und ödematösen Veränderungen scheinen weniger ausgeprägt zu sein als in Abb. 9.

führte, war es nicht mit einer verbesserten Überlebenszeit verbunden. Die gute Nierenfunktion in den ersten Tagen nach der Transplantation in der IVMP-Kombinationsgruppe ist wahrscheinlich auf den Schutzeffekt von Methylprednisolon durch seine lysosomenstabilisierende Fähigkeit zurückzuführen (56, 57).

Es konnte weiterhin bewiesen werden, dass die Verabreichung von hohen Dosen, nämlich 50-60 mg/kg von IVCY und IVMP allein oder in Kombination zu keinen histopathologischen Veränderungen der Nierentransplantate führten (35). Dies widerlegt die Auffassung von Tremann (57, 58) und Dvorak (59) und ihren Mitarbeitern, dass hohe Dosen von Steroiden zu histopathologischen Veränderungen des Nierenparenchyms und insbesondere der Glomeruli führen können.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die von uns daraufhin durchgeführten immunologischen Vorbehandlungsversuche des menschlichen Kadavernierenspenders "in vivo".

2. Versuch der "in vitro" Alteration der Immunogenität von Hundenieren ohne und mit suboptimaler Immunosuppression des Empfängers (51)

Diesen Versuchen liegt die Hypothese zugrunde, dass die durch die Leber aktivierten und in Plasma vorhandenen Cyclophosphamidprodukte eine Veränderung der Immunogenität des Transplants "in vitro" bewirken können.

Die Tiere wurden in zwei Hauptgruppen (A und B) aufgeteilt. Entsprechend der Vorbehandlung der Spender oder des Plasmas ergaben sich 4 Versuchsgruppen. Nierenbiopsien wurden nach der Vorbehandlung, nach der Revaskularisierung und zur Zeit der Autopsie durchgeführt.

Gruppe A setzte sich aus Transplantatempfängern zusammen, die keine Immunosuppression erhielten. Die Empfängertiere in Gruppe B erhielten während der ersten 5 Tage 5 mg/kg/Tag Azathioprin und anschliessend 2,5 mg/kg/Tag Azathioprin bis zum Tod. Für Gruppe A und B wurde KPP hergestellt aus dem Plasma einer separaten Spendergruppe. Dieses Plasma wurde zur 24-stündigen Perfusion mit der Waters-Maschine Mox-100 verwendet für die Nieren der Kontrollgruppe (A1 und B1) und für Nieren von Hunden, die mit 80 mg/kg IVCY und 60 mg/kg IVMP 5 1/2 und 2 1/2 Stunden vorbehandelt worden waren (Gruppe A2 und B2). Die Plasmaspendergruppe jeder Gruppe wurde dann ebenso vorbehandelt. Den Tieren wurde Blut abgenommen, KPP davon zubereitet und unbehandelte Nieren mit diesem vorbehandelten Plasma perfundiert (Gruppen A3 und B3). Gruppen A4 und B4 setzten sich aus Hunden zusammen, die vorbehandelte Nieren erhielten und mit ihren eigenen vorbehandelten KPP für 24 Stunden perfundiert worden waren. Folglich wurden Gruppen 1 bis 3 in den Hauptgruppen A und B mit dem Plasma vom gleichen Spenderpool perfundiert. Diese Versuchsanordnung vermied eine zusätzliche Variable in der Methodik unserer Versuche, während die Gruppen A4 und B4 Nieren erhielten,

die mit KPP perfundiert worden waren, das isogen mit den Nieren war.

Die Versuchsreihen und Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Eine signifikante ($p < 0.02$) Verlängerung der Überlebenszeit der Empfänger wurde in Gruppe B₃ beobachtet. In den Gruppen, in denen die vorbehandelten Nieren perfundiert worden waren, kam es zu variablen Ergebnissen, die z.T. darauf zurückzuführen sind, dass es in einigen Fällen schon nach einigen Tagen zu kortikalen Nekrosen der Transplantate kam. Dies wurde jedoch nicht in der Gruppe beobachtet, in der unbehandelte Nieren mit vorbehandeltem Plasma perfundiert wurden (B₃). Histopathologische Untersuchungen der Nieren in dieser Gruppe zeigten eine verzögerte Abstossungsantwort.

Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeit von Chassot und Mitarbeitern (60), zeigen jedoch auch, dass ein Additionseffekt (A₄ und B₄) nicht erzielt werden konnte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die vorbehandelte Hundeniere die Perfusion nur in unberechenbarer Weise toleriert, auch wenn das Plasma isogen mit der Niere ist. Diese Ergebnisse sind die Grundlagen für eine prospektive Studie an unserer Institution bei der Kadavernierentransplantation, bei welcher gruppenspezifisches KPP von vorbehandelten Spendern zur Perfusion von nicht vorbehandelten Kadavernieren zur Anwendung kommt.

Tabelle 4: Überlebenszeiten von "in vitro"
vorbehandelten Hundenieren^a

Gruppe	Anzahl der Hunde	Überlebenszeit (Tage)		
		Median	Minimum	Maximum
<u>Ohne Immunosuppression</u>				
<u>(Gruppe A)</u>				
1 - Kontrolle	6	9.5	9	11
2 - Vorbehandelte Niere	6	8.5	8	11
3 - Vorbehandeltes Plasma	7	12	10	17
4 - Vorbehandelte Niere und Plasma	5	14	10	15
<u>Mit Immunosuppression</u>				
<u>(Gruppe B)</u>				
1 - Kontrolle	9	16.0 ^{b,c}	7	45
2 - Vorbehandelte Niere	7	14.0	6	35
3 - Vorbehandeltes Plasma	8	27.0 ^{b,d}	12	60
4 - Vorbehandelte Niere und Plasma	9	8.0 ^{c,d}	5	30

^a Alle Hunde starben, ausser einem in Gruppe B₃. Dieser Hund wurde nach 60 Tagen getötet. Als Überlebenszeit wurden 60 Tage angenommen, um den medianen Durchschnitt zu kalkulieren.

^b $p < 0.02$

^c $p < 0.04$

^d $p < 0.01$

Die Signifikanz der Differenzen (p) wurde mit Student's t-Test ermittelt, wobei eine zweiseitige Verteilung angenommen wurde.

B. Versuch der "in vivo" Alteration der Immunogenität von Kadavernierentransplantaten

1. Der Einfluss von IVP und IVCY in Kombination mit IVMP als Vorbehandlungsmittel auf die Überlebenszeit von Kadavernierentransplantaten (44)

Aufgrund der signifikant verlängerten Überlebenszeiten im Tierversuch, wenn IVP und IVCY in Kombination mit IVMP als Vorbehandlungsdrogen zur Anwendung kamen, versuchten wir die Wirkung dieser Medikamente in einer prospektiven randomisierten Studie am Menschen zu ermitteln.

Kreislaufintakte hirntote Patienten wurden alternierend mit 4 g IVCY oder 4 g IVP 5 1/2 Stunden und mit 4 g IVMP 2 1/2 Stunden vor Entnahme der Nieren behandelt. Gewebetypisierung für "Human Leucocyte Antigens" (HLA) und "cross matching" wurden vor der Verabreichung der zytotoxischen Medikamente durchgeführt. Der Blutdruck wurde stabilisiert mit Isoproteronol oder Dopamin und hohen Dosen von isotonischer Kochsalzlösung i.v. Die Urinausscheidung wurde aufrechterhalten mit Mannitol und/oder Furosemid. Etwa 5 Minuten vor Abklemmung der Aorta wurden dem Spender 10 000 i.E. Heparin i.v. injiziert. Die Nieren wurden im allgemeinen mit einer "en bloc"-Technik (61) entfernt. Die Nieren wurden sodann mit etwa 500 ml kalter (4^o Celsius) 0.9 %iger Kochsalzlösung mit 10 mval Bikarbonat perfundiert und dann an die Waters-Maschine (Modell Mox-100) zur pulsierenden Perfusion mit KPP angeschlossen. KPP wurde nach einer standardisierten Weise hergestellt mit einer Osmolalität von etwa 310 MilliOsmol. Der Perfusionsdruck wurde auf 40-50 mmHg eingestellt und der p_{H} -Wert auf 7.4. Nierenbiopsien zur histopathologischen Untersuchung mittels Lichtmikroskopie wurden zur Zeit der Nephrektomie durchgeführt (48).

Tabelle 5: Vergleich der Transplantat- und Patientenüberlebensraten

Fall	Alter (J.) Geschlecht	Antikörper %	Antigene gemeinsam	Präservierung h	Risiko	Überleben Transplantat/ Patient	Nachunter- suchung (Monat)
Gruppe A [☼]							
1	31/F	88	1	3	hohes	ja/ja	19
2	46/M	0	0	12	hohes	ja/ja	19
3	46/M	48	0	6	hohes	ja/ja	14
4	15/F	0	1	9	normal	ja/ja	19
5	27/M	0	0	6	normal	ja/ja	14
6	35/M	0	0	2 1/2	normal	ja/ja	14
7	29/F	0	1	3 1/2	hohes	ja/ja	16
8+	47/M	1	0	1	hohes	ja/ja	12
Gruppe B ^{☼☼}							
9	24/M	2	1	3 1/2	normal	nein/nein	3
10	27/F	0	2	4	normal	nein/ja	-
11+	30/M	1	1	4	hohes	ja/ja	12
12	42/F	0	1	6	normal	nein/ja	2
13	28/M	0	0	3 1/2	normal	nein/ja	-

☼ Gruppe A: Cyclophosphamid/Methylprednisolon vorbehandelte Nieren

☼☼ Gruppe B: Procarbazin HCl/Methylprednisolon vorbehandelte Nieren

+ : jugendlicher insulinpflichtiger Diabetes mellitus

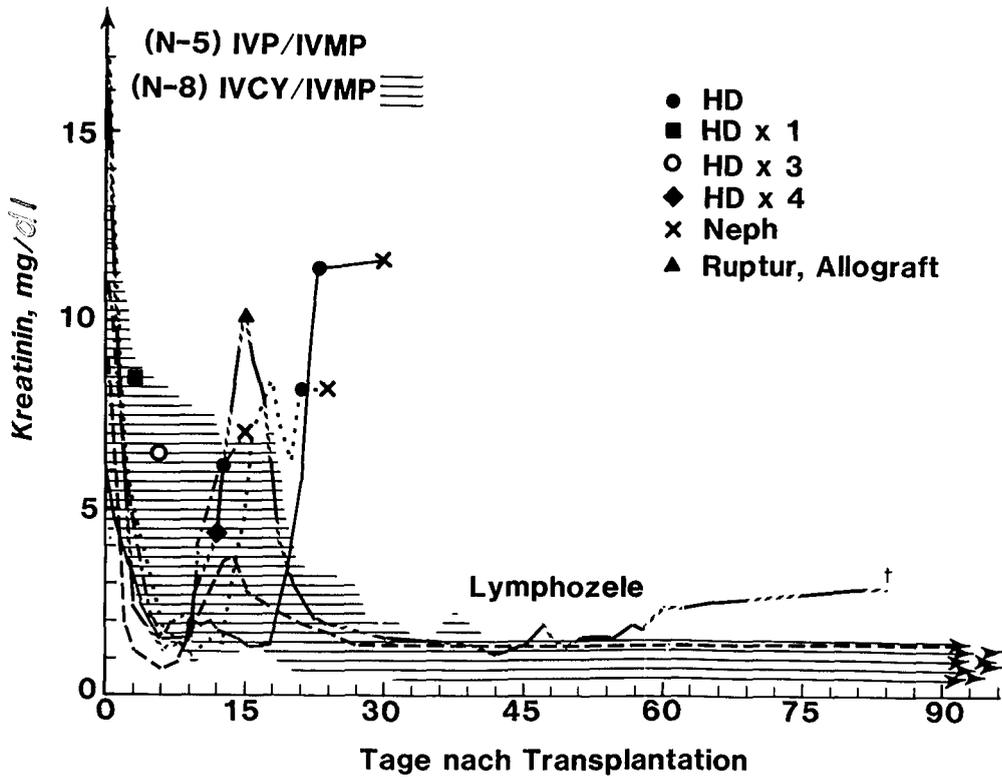


Abb. 12: Serumkreatininspiegel und Allograftüberleben 90 Tage nach der Transplantation von 8 Patienten, die IVCY/IVMP vorbehandelte Nieren (Gruppe A) erhielten und 5 Patienten, die IVP/IVMP vorbehandelte Nieren (Gruppe B) erhielten.

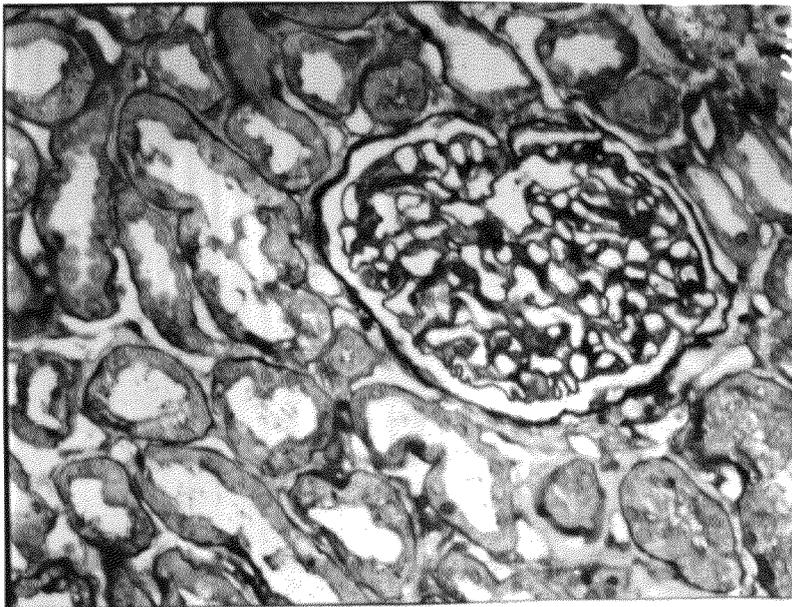


Abb. 13: Nierenbiopsie von einem Kadavernierenspender (Gewicht 75 kg), der mit 4 g Methylprednisolon i.v. 2 1/2 Stunden und 4 g Cyclophosphamid i.v. 5 1/2 Stunden vor der Nierenentnahme vorbehandelt worden war. Die glomerulären Kapillaren sind durchgängig. Die Tubuli zeigen minimale fokale Epithelzellenveränderungen mit intakten Basalmembranen (Alcian Blau und PAS, X400).

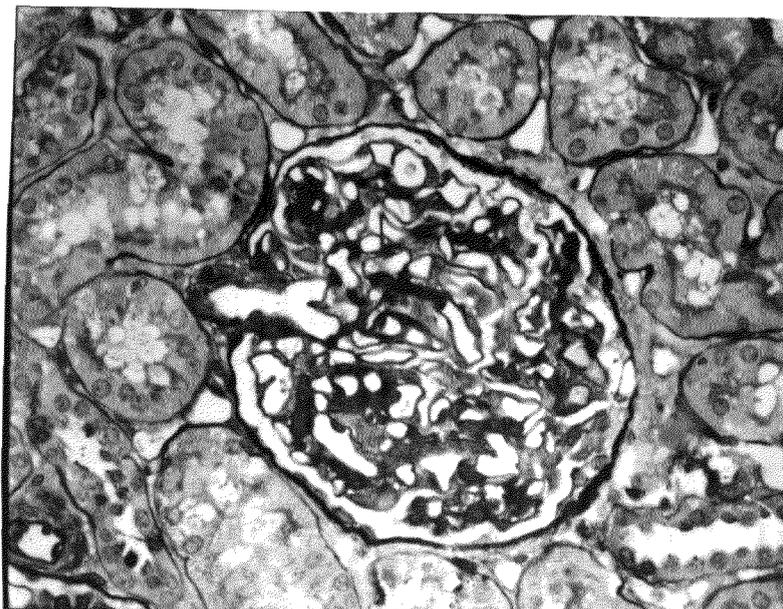


Abb. 14: Ein Beispiel dafür, dass auch höhere Dosen und längere Vorbehandlungszeiten keine wesentlichen Veränderungen verursachen. Dies ist eine Nierenbiopsie von einem Kadavernierenspender (Gewicht 70 kg), der mit 4 g Cyclophosphamid i.v. 18 Stunden und Methylprednisolon i.v. 4 g 16 Stunden und noch einmal mit 2 g 2 Stunden vor der Nierenentnahme vorbehandelt worden war. Es finden sich keine signifikanten tubulären oder interstitiellen Veränderungen.
(Alcian Blau und PAS, X400)

Insgesamt 8 Patienten erhielten mit IVCY und IVMP (Gruppe A) vorbehandelte Nieren und 5 mit IVP und IVMP (Gruppe B) vorbehandelte Nieren. Patientenalter, Prozentsatz der Antikörper, Histokompatibilitätsgrad, Perfusionsdauer, Risikogruppe, Überlebensrate und Nachuntersuchungszeit sind in Tabelle 5 dargestellt.

Eine graphische Darstellung der Nierenfunktionen während der ersten 3 Monate nach der Transplantation findet sich in Abbildung 12. Alle 8 Patienten, die eine IVCY/IVMP vorbehandelte Niere erhielten, sind nach mehr als 12 Monaten am Leben mit funktionierendem Transplantat und ausgezeichneter Nierenfunktion. Von den 5 Patienten, die IVP/IVMP vorbehandelte Nieren erhielten, hat nur ein Patient eine funktionierende Niere. Ein Patient ist verstorben, drei Patienten verloren ihr Transplantat wegen einer akuten zellulären Abstossungskrise.

Die Biopsien der Nieren zur Zeit der Spendernierenentfernung zeigten keine Veränderungen bei der lichtmikroskopischen Untersuchung (Abb. 13 + 14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die immunologische Vorbehandlung des Leichennierenspenders mit IVCY und IVMP in einer Verlängerung der Überlebenszeit des Transplantats resultiert. Die Anwendung von IVP und IVMP führte im Gegensatz zu den Erfahrungen im Hunderversuch zu keinen verbesserten Überlebenszeiten der Nierentransplantate. Diese widersprüchlichen Ergebnisse bei den Tier- und Menschenversuchen sind wahrscheinlich auf einen Speziesunterschied zurückzuführen. Allerdings lässt sich nicht ausschliessen, dass die mit IVP und IVMP vorbehandelte menschliche Niere keine pulsierende Perfusion toleriert, obgleich die Perfusionszeit lediglich 3 1/2 bis 6 Stunden betrug. Es konnte

weiterhin gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Kadavertransplantate mit IVCY und IVP in Kombination mit IVMP zu keiner histopathologischen Veränderung des Nierenparenchyms, insbesondere der Glomeruli führte. Anhand von Lymphozytenzählungen konnte gezeigt werden, dass die Spendervorbehandlung in ihrer Wirkung zeitabhängig ist.

Die Ergebnisse dieser Studie diktierten unsere weiteren Versuche, in denen IVP nicht mehr zur Anwendung kam, und wir uns auf IVCY und IVMP in der Vorbehandlung der Kadavernierenspenden beschränkten.

2. Die Vorbehandlung von Kadavernierenspendern mit IVCY und IVMP (45)

Diese Studie schliesst alle Kadavernierentransplantate ein, die von 1970 bis September 1976 an unserer Institution durchgeführt wurden. Bei allen Patienten wurde vor der Transplantation eine bilaterale Nephrektomie, Splenektomie und Appendektomie ^{ausgeführt.} Unser Standardprogramm für immunsuppressive Therapie (54), nämlich hohe Dosen von IVMP für Abstossungsreaktionen sowie Azathioprin und lokale Röntgenbestrahlung, kam bei allen Patienten zur Anwendung. Bei Patienten, die seit dem 1. Juli 1973 zur Transplantation kamen, wurde 400 mg IVCY an den Tagen 1 bis 3, 7, 14 und 21 anstelle von Azathioprin appliziert.

Gewebetypisierung für "HLA" wurde bei allen Spender- und Empfängerpaaren durchgeführt und der Prozentsatz der Antikörper gegen "HLA" bei jedem Empfänger bestimmt. Die Transplantation wurde nicht durchgeführt, wenn das "cross match" zwischen Spender und Empfänger nach der Mikrolymphozytentoxitätsmethode positiv war. Auf die Histokompatibilität wurde in dieser Serie kein besonderer Wert gelegt. Mehr als 80 % aller Spender- und Empfängerpaare hatten lediglich ein oder kein Antigen gemeinsam (Tabelle 6). Die Empfänger wurden als hohe Risikopatienten angesehen, wenn sie ^{einen} insulinabhängigen Diabetes mellitus hatten, 45 Jahre oder älter waren und mehr als 50 % Antikörper hatten. Die Patienten lassen sich in 3 Gruppen aufteilen.

Gruppe A

Zwischen Juli 1973 und September 1975 erhielten 21 Patienten vorbehandelte Kadavernieren. Nach Feststellung des Hirntodes wurden herzsschlagende Kadavernierenspendern mit 4 bis 6 g IVCY und 4 bis 6 g IVMP 5 1/2 Stunden und 2 1/2 Stunden vor der Organtnahme behandelt. Der Zeitraum zwischen Vorbehandlung und Nierenentnahme

Tabelle 6: Histokompatibilität

Anzahl der gemeinsamen HLA-Antigene	Gruppe		
	A	B	C
0	13	15	10
1	4	5	3
2	4	2	3
3	-	1	-
4	-	-	-
Gesamtzahl der Patienten	21	23	16

Tabelle 7: Perfusionszeit^{*} der Nieren (in Stunden)

Gruppe	
A	11 (2 1/2 - 22)
B	13 (6 1/2 - 18)
C	20 (10 - 33)

^{*} Mittelwert der warmen Ischämiezeit
 <34 Minuten in allen Gruppen

Tabelle 8: Verteilung der hohen Risikopatienten

Gruppe	Anzahl der Patienten	Hohe Risikopatienten	
		Anzahl	%
A	21	17	81
B	23	12	52
C	16	5	31

erstreckte sich von 5 1/2 bis zu 18 Stunden. Die Nieren wurden wie oben beschrieben gehandhabt. Die pulsierende Perfusionszeit an der Mox-100-Maschine mit KPP erstreckte sich von 2 1/2 bis 22 Stunden mit einem Durchschnitt von 11 Stunden. Die Ischämiezeit war in allen Fällen weniger als 34 Minuten (Tabelle 7). Die 15 Männer und 6 Frauen, die diese vorbehandelten Nieren erhielten, waren zwischen 18 und 45 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 35 Jahren.

Insgesamt 17 gehörten zu der hohen Risikogruppe, einschließlich 7 Diabetiker (Tabelle 8). Lediglich 4 Patienten hatten 2 Antigene mit dem Spender gemeinsam (Tabelle 6). Der Prozentsatz der Antikörper erstreckte sich von 0 bis 88 %, durchschnittlich 20 %. Während der ersten 21 Tage nach der Transplantation erhielten die Empfänger zwischen 6 und 21 g IVMP, durchschnittlich 12 g.

Gruppe B

23 Patienten (16 Männer und 7 Frauen) erhielten nichtvorbehandelte Kadavernierentransplantate von 1970 bis Juni 1973. Alle Nieren wurden an unserer Institution entnommen. Alle Empfänger erhielten ein standardisiertes immunsuppressives Programm. Das Alter der Patienten reichte von 23 bis 45 Jahren, mit einem Durchschnitt von 38 Jahren. Insgesamt 12 Patienten, einschliesslich 2 Diabetiker, gehörten zur hohen Risikogruppe (Tabelle 8). Alle Nieren wurden mit KPP an der Mox-100-Maschine perfundiert zwischen 6 1/2 und 18 Stunden, durchschnittlich 13 Stunden. Die warme Ischämiezeit betrug zwischen 26 und 46 Minuten, im Durchschnitt 33 Minuten (Tabelle 7). Eine Niere hatte 3 Antigene mit dem Empfänger gemeinsam, 2 Nieren hatten 2 Antigene gemeinsam und die restlichen 20 Nieren hatten lediglich ein oder kein gemeinsames Antigen mit dem Empfänger (Tabelle 6). Der Prozentsatz der Antikörper bei den Empfängern betrug zwischen

0 und 42 %, durchschnittlich 12 %. Die Patienten erhielten zwischen 6 und 21 g, im Durchschnitt 13,5 g, IVMP während der ersten 21 Tage nach der Transplantation.

Gruppe C

16 Patienten (10 Männer und 6 Frauen) erhielten während des gleichen Zeitraums wie Gruppe A nichtvorbehandelte Nierentransplantate, die von anderen Institutionen an uns geschickt wurden. Das postoperative immunsuppressive Programm war identisch mit dem in Gruppe A. 5 Patienten, davon 2 Diabetiker, gehörten zur hohen Risikogruppe (Tabelle 8). Die Patienten waren zwischen 19 und 43 Jahre, durchschnittlich 38 Jahre. Die Nieren wurden perfundiert mit KPP zwischen 10 und 33 Stunden, durchschnittlich 20 Stunden. Die Ischämiezeit variierte von 21 bis 37 Minuten, durchschnittlich 27 Minuten (Tabelle 7). Die Prozentzahl der Antikörper bei den Empfängern betrug zwischen 0 und 11 %, durchschnittlich 6 %. Drei Nieren hatten mit dem Empfänger zwei gemeinsame Antigene und die restlichen 13 hatten lediglich ein oder kein Antigen mit dem Empfänger gemeinsam (Tabelle 6). Die Patienten erhielten zwischen 8 und 21 g IVMP, durchschnittlich 13 g, während der ersten 21 Tage postoperativ.

Ergebnisse (Tabelle 9 und 10)

Gruppe A

Von den 21 Patienten, die vorbehandelte Leichennieren erhielten und die für eine Mindestzeit von 6 Monaten postoperativ nachuntersucht worden waren, überlebten 19 Patienten (90 %) und 16 Transplantate (76 %) bis zur Zeit der Auswertung nach mehr als 33 Monaten. Serumkreatininwerte reichten von 0,5 mg/dl bis 2,2 mg/dl, durchschnittlich 1,4 mg/dl. Alle 4 normalen Risikopatienten und ihre Transplantate überlebten. Von den 17 hohen Risikopatienten überlebten 15 (88 %) und 12 Transplantate (71 %). Zwei Patienten starben; eine 37-jährige

Tabelle 9: Überlebensrate von Kadavernieren - Transplantaten und Empfängern

Gruppe	Anzahl der Patienten	2 - Jahres-Überlebensrate			
		Transplantat		Empfänger	
		Anzahl	%	Anzahl	%
A	21	16	76	19	90
B [*]	23	13	57	15	65
C	16	7	43	14	88

* Transplantation vor Juli 1973

Tabelle 10: Überlebensrate von Kadavernieren - Transplantaten und Empfängern
(Hohe Risikopatienten/Normale Risikopatienten)

Gruppe	Risiko	Anzahl der Patienten	2 - Jahres-Überlebenswerte			
			Transplantat		Empfänger	
			Anzahl	%	Anzahl	%
A	Hoch [*]	17	12	71	15	88
	Normal	4	4	100	4	100
B	Hoch [*]	11	7	64	7	64
	Normal	12	6	50	8	67
C	Hoch [*]	7	1	14	5	71
	Normal	9	6	67	9	100

* Hohes Risiko: ≥ 45 Jahre und/oder insulinpflichtiger Diabetes mellitus, > 50 % Antikörper

insulinabhängige Diabetikerin mit schwerer Koronargefässerkrankung verstarb 10 Tage nach der Transplantation an einem Myocardinfarkt und ein 35-jähriger insulinabhängiger Diabetiker, der eine zweite Niere erhielt, verstarb 50 Tage nach der Transplantation an einer pulmonalen Sepsis. Drei Nierentransplantate gingen bei 2 Patienten wegen chronischer Abstossung verloren.

Gruppe B

15 (65 %) der Patienten und 14 (61 %) der Transplantate überlebten mindestens 6 Monate (Tabelle 9). Von den 12 hohen Risikopatienten überlebten 8 (67 %) mit funktionierenden Nieren (67 %). Von den 11 normalen Risikopatienten überlebten 7 (64 %) mit 6 (55 %) Nieren (Tabelle 10). Serumkreatininwerte rangierten von 1,1 mg/dl bis zu 1,7 mg/dl, durchschnittlich 1,4 mg/dl.

Gruppe C

14 (88 %) der 16 Patienten überlebten und 7 (43 %) der Transplantate. Von den 5 hohen Risikopatienten überlebten 3, jedoch ohne ihr Transplantat. Alle 11 normalen Risikopatienten sind am Leben, jedoch lediglich 7 Transplantate (64 %) überlebten mindestens 6 Monate und länger (Tabelle 10). Die Serumkreatininwerte erstreckten sich von 0,75 mg/dl bis zu 1,85 mg/dl im Durchschnitt 1,3 mg/dl

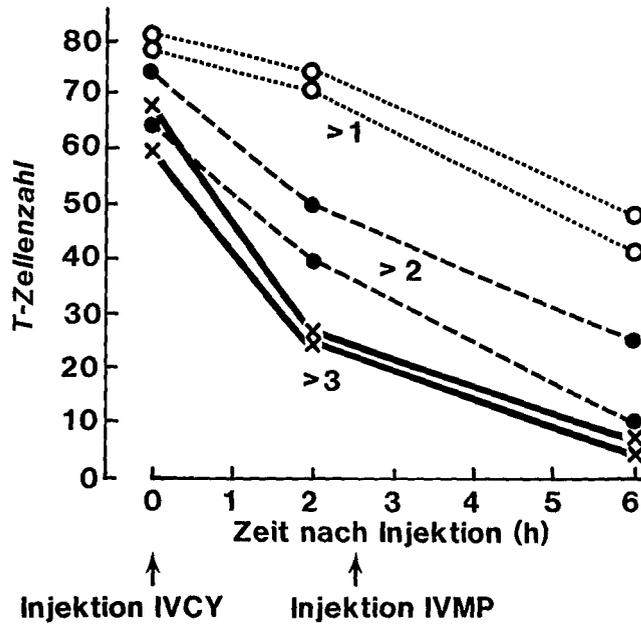
IVCY und IVMP vorbehandelte Nieren (Gruppe A) hatten eine deutlich bessere Überlebensrate als nichtvorbehandelte Nieren der Gruppen B und C, obgleich sich in Gruppe A eine grössere Anzahl von hohen Risikopatienten befanden. Diese Studie stellt keine kontrollierte Untersuchung dar, da wir auf Grund unserer ausgezeichneten Ergebnisse mit IVCY und IVMP im Vergleich zu IVP und IVMP und zu den Ergebnissen des "transplant registry" darauf verzichteten. Wir konnten vor allem beim insulinabhängigen Diabetiker zeigen (19, 21), dass die Transplantation von vorbehandelten

Nieren zu einer Verbesserung der Transplantatsüberlebensraten im Vergleich zu unbehandelten Kadavernieren führte. In der Tat sind die Ergebnisse nahezu vergleichbar mit Resultaten, wie wir sie bei der Verwendung von Lebendspendern erzielen.

Da zur Zeit der Zusammenstellung der ursprünglichen Arbeit und ihrer Veröffentlichung die Bedeutung von Transfusionen nicht erkennbar war, wurde keine Transfusionsanalyse durchgeführt. Auf den Einfluss von Transfusionen auf die behandelten und nichtvorbehandelten Nieren wird später eingegangen werden (11).

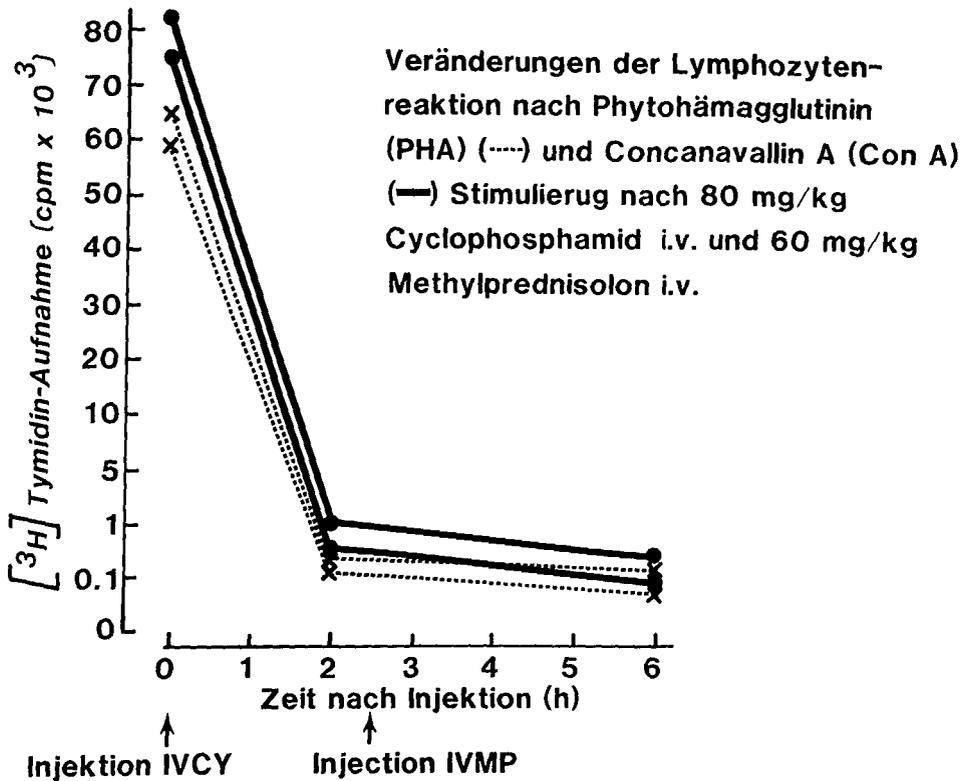
Bei zwei Kadaverniederspendern wurden blastogenetische T-Zellenstudien durchgeführt (Abb. 15a und 15b). Blut wurde entnommen vor der Injektion von IVCY und IVMP, zwei Stunden nach der Injektion und zur Zeit der Nephrektomie. Lymphozyten wurden mit der Ficoll-Hypaque-Technik (63) abgetrennt, in Reagenzgläsern in Kultur gehalten (100 000 Lymphozyten/Glas) (64) mit 10 ug Phytohämagglutinin M (PHA, Difco Company, Detroit, Mi) oder 10 ug Concanavallin A (Con A, Pharmacia Fine Chemicals Inc., Piscataway, N.J.). Nach 4 Tagen Inkubationszeit bei 37° C wurde 1 u Ci ³H Thymidin (2 Ci/mM) hinzugefügt. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen isoliert, mit TCA (Trichlor aceticum acidum) gewaschen und die Radioaktivität des Zellpräzipitats in einem flüssigen Geigerzähler (Beckman Modell 220) gezählt (65).

Wie in Abb. 15b zu sehen ist, kam es sowohl bei den mit PHA als auch bei den mit Con A stimulierten Lymphozyten zu einer stark verminderten Aufnahme von ³H Thymidin, die von der Injektion von IVCY und IVMP zeitabhängig ist.



Ergebnis der T-Zellenzählung (<3, <2, <1) nach 80 mg/kg Cyclophosphamid i.v. und 60 mg/kg Methylprednisolon i.v.

Abb. 15a



Veränderungen der Lymphozytenreaktion nach Phytohämagglutinin (PHA) (.....) und Concanavallin A (Con A) (—) Stimulierung nach 80 mg/kg Cyclophosphamid i.v. und 60 mg/kg Methylprednisolon i.v.

Abb. 15b

T-Zellen wurden identifiziert durch das Phänomen, dass sie mit Schaf-Erythrozyten Rosetten bilden (65). Hierbei wurden die Empfehlungen des technischen Berichtes der Weltgesundheitsorganisation berücksichtigt (66). Wie aus Abb. 15a ersichtlich ist, ergibt sich eine deutliche Verminderung der T-Zellen, die ebenso zeitabhängig ist.

C. Die Vorbehandlung des Leichennierenspenders mit IVCY und IVMP in Kombination mit der pulsierenden Präservierungsmethode (46)

Diese Studie schliesst alle Kadavernierentransplantate ein, die seit Juli 1973 bis einschliesslich März 1977 an unserer Institution durchgeführt wurden. Die Empfängervorbehandlung und -nachbehandlung war standardisiert (55) wie in Studie B. Diese Arbeit analysiert den Einfluss der pulsierenden Präservierungsmethode auf die Funktion und histopathologische Struktur der vorbehandelten Menschenniere.

Eine sorgfältige Analyse unseres Präservierungsprogramms auf die Funktionsfähigkeit der vorbehandelten Leichennierentransplantate war indiziert, da sich im Hundeversuch (51) eine verkürzte Überlebenszeit des Transplantats ergab, wenn die pulsierende Präservierung zur Anwendung kam.

Zum Vergleich kamen 36 Nieren (Gruppe A), die vorbehandelten Spendern (75 mg/kg IVCY 5 1/2 Stunden und 50-60 mg/kg IVMP 2 1/2 Stunden vor der Nephrektomie) an unserer Institution entnommen waren, mit 32 nichtvorbehandelten Nieren (Gruppe B), die entweder an unserer Institution entnommen waren oder von anderen Institutionen an uns geschickt wurden. Alle Patienten und Transplantate in Gruppe A wurden für mindestens 6 Monate und in Gruppe B für mindestens 3 Monate und maximal 48 Monate nachuntersucht.

Die Zahl der hohen Risikopatienten (älter als 45 Jahre und/oder insulinpflichtiger Diabetes) war etwa gleich in beiden Gruppen (Tabelle 11). Eine positive Krankengeschichte für Koronargefässerkrankung, Herzinfarkt, Angina pectoris, Ulcus duodeni, urogenitale Probleme (z.B. supravvesikale Harnableitung etc.), Lupus Erythematoses waren in unserer Analyse keine hohen Risikofaktoren. Ebenso wurde in dieser Studie ein hoher Prozentsatz von Antikörpern nicht als Risikofaktor angesehen.

Zur Auswertung kamen die Ergebnisse der Patienten- und Transplantatsüberlebensziffern, die Länge der Perfusionszeiten, die Menge der Steroiddosen für die ersten 3 Wochen nach der Transplantation, die Zahl der sekundären und tertiären Transplantate und die Serumkreatininwerte. Ein Transplantat wurde als nicht funktionierend angesehen, wenn der Patient Hämodialyse brauchte oder verstarb.

Gruppe A

Von den 35 Patienten, die 36 vorbehandelte Nieren erhielten, waren 26 Männer und 9 Frauen. Ihr Alter reichte von 18 bis 59 Jahren mit einem Durchschnitt von 37 Jahren. 16 Patienten waren hohe Risikopatienten. Etwa 60 % der Transplantate hatten lediglich ein oder kein Antigen mit dem Empfänger gemeinsam (Tabelle 12), während die Antikörper von 0 - 82 %, im Durchschnitt 15 %, reichten. 16 Patienten erhielten ein sekundäres Transplantat. Die durchschnittliche Perfusionszeit der Nieren betrug 11 Stunden (2 1/2 bis 22 Stunden). Die IVMP Gesamtdosis reichte während der ersten 21 Tage nach der Transplantation von 9 - 21 g, im Durchschnitt 11,3 g. Die Serumkreatininwerte erstreckten sich von 0,7 - 4,9 mg/dl mit einem Durchschnitt von 1,8 mg/dl. Die Organentnahme wurde wie in Studie B durchgeführt und die Nieren an eine Mox-100-Maschine zur pulsierenden Präservierung mit KPP angeschlossen. Das Plasma war auf standardisierte Weise hergestellt worden mit dem Zusatz von 250 mg Methylprednisolon, 2000 i.E. Heparin, 230 i.E. Insulin, 2 g Magnesium Sulfat, 2,5 g Dextrose und 250 000 i.E. Penicillin. Die Osmolalität betrug 310 - 320 m Osmol. Nierenbiopsien wurden zur Zeit der Nephrektomie, nach der Präservierung und nach der Revaskularisierung des Transplantats durchgeführt. Die Biopsien wurden in einer 10 %igen Formaldehydlösung fixiert, weiterverarbeitet in Paraffin und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Serienschnitte wurden mit H.-E. gefärbt. Die Mehrheit der Biopsien wurden nach 11 und 18 Stunden durchgeführt, und alle waren normal.

Tabelle 11: Verteilung der hohen^a Risikopatienten

Transplantat	Gesamtzahl	Hoher Risikopatient	
		Anzahl	%
Vorbehandelt	36 ^b	16 (10 ^C)	44 (63 ^C)
Nicht vorbehandelt	32	15 (7 ^C)	47 (47 ^C)
Gesamtzahl	68	31 (17 ^C)	46 (55 ^C)

^a Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus und/oder ≥ 45 Jahre

^b 35 Empfänger und 36 Transplantate

^C Zahlen in Klammern sind Patienten mit insulinpflichtigen Diabetes mellitus

Tabelle 12: Histokompatibilität der Kadavernieren-transplantate

Anzahl der gemeinsamen HLA-Antigene	Anzahl der Transplantate	
	vorbehandelt	nicht vorbehandelt
0	20	11
1	5	3
2	11	14
3	0	4
4	0	0
Gesamtzahl	36	32

Eine repräsentative Biopsiestudie findet sich in der folgenden Biopsieserie (Abb. 16 A - D) und definiert den Effekt der pulsierenden Perfusion auf die vorbehandelte Humanniere. Dieses vorbehandelte Nierenpaar war zur Zeit der Nephrektomie biopsiert worden. Die Nieren wurden an die Mox-100-Maschine angeschlossen und mit KPP perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde auf 50 mm Hg eingestellt, bei einem Flow von 200 ml/Min. und einem pH von 7.4. Nierenbiopsien wurden alle 6 Stunden vorgenommen und lichtmikroskopisch untersucht. Eine der beiden Nieren wurde nach 8 Stunden pulsierender Perfusion transplantiert und eine Biopsie eine Stunde nach der Revaskularisierung vorgenommen. Die andere Niere wurde 48 Stunden perfundiert. Nach 48 Stunden war der Flow unverändert (200 ml/Min.) und der Perfusionsdruck fiel auf 40 mm Hg.

Gruppe B

32 Patienten (20 Männer und 12 Frauen) erhielten nicht-vorbehandelte Nieren, die entweder an unserer Institution oder anderswo entnommen waren. Diese Nieren wurden entweder mit KPP oder Silicagel des Plasmas (University of Minnesota) perfundiert. Es wurde der Versuch gemacht, die bestmögliche Histokompatibilität zu ermitteln; daher hatten 14 Empfänger 2 Antigene gemeinsam mit dem Spender und weniger als die Hälfte hatten lediglich ein oder kein gemeinsames Antigen mit dem Spender (Tabelle 12). Diese Gruppe hatte etwa die gleiche Prozentzahl von hohen Risikopatienten, aber weniger jugendliche Diabetiker (Tabelle 11). Das Alter der Patienten erstreckte sich von 21 bis zu 48 Jahren (durchschnittlich 37 Jahre). Der Prozentsatz der Antikörper betrug zwischen 0 - 95 %, durchschnittlich 14 %. Allerdings erhielten lediglich 4 Patienten sekundäre Nierentransplantate. Die IVMP-Menge für die ersten 21 Tage betrug zwischen 6 - 22 g, mit einem Durchschnitt von 11 g. Die Perfusionszeit betrug zwischen 10 und 48 Stunden, durchschnittlich 22 Stunden. Die Nachbeobachtungszeit erstreckte sich von 3 bis zu 48 Monate.

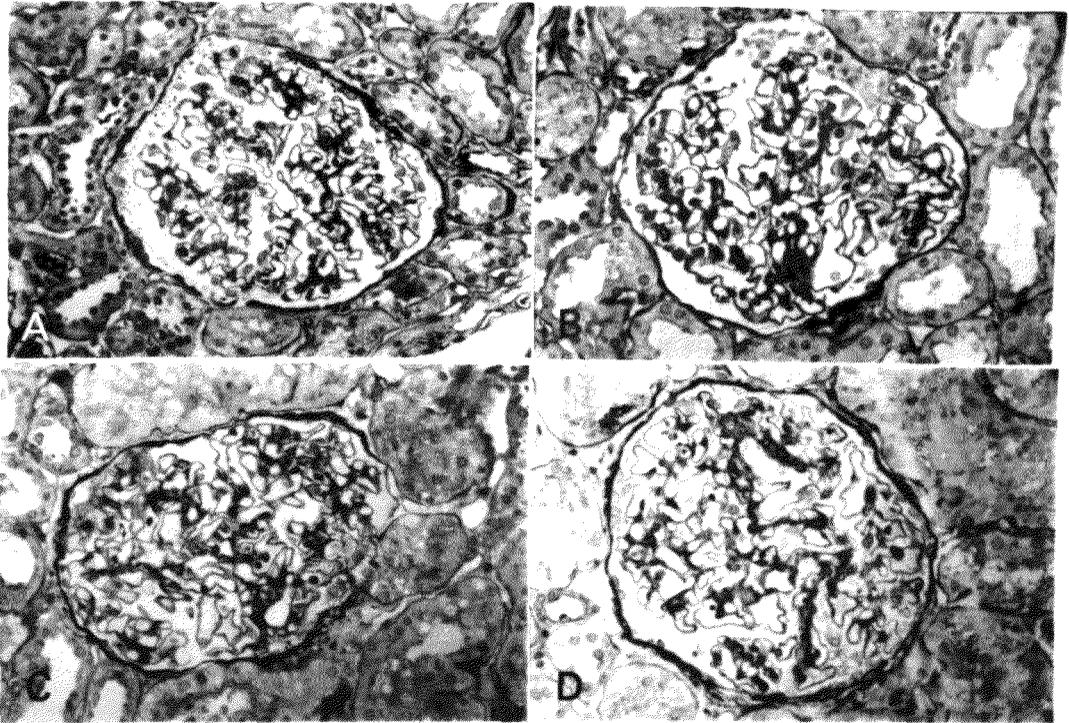


Abb. 16 A, B, C, D:

Serienbiopsien von Nieren zur Zeit der Nephrektomie, während der Perfusion und nach der Revaskularisierung.

A: zur Zeit der Nephrektomie

B: 32 Stunden nach der Perfusion

C: 48 Stunden nach der Perfusion

D: 1 Stunde nach der Revaskularisierung (8 Stunden perfundiert).

Keine signifikanten Unterbrechungen der glomerulären, tubulären oder vaskulären Strukturen. Das Interstitium erscheint normal. Seiten enthält ein Glomerulus etwas granuliertes proteinartiges Material in der Bowman'schen Kapsel; wenige rupturierte parietale oder tubuläre Epithelzellen in der Bowman'schen Kapsel und in den Lumina der Tubuli.

(Alcian Blau, PAS, X250).

Ergebnisse

Die Überlebensraten der Patienten in beiden Gruppen war nach dem Life-Table-Verfahren (67) nicht signifikant unterschiedlich. Die 3-Jahre-Überlebensrate der Patienten in Gruppe A war 83 % und 91 % in Gruppe B (Abb. 17). Allerdings ergab sich nach 1 Jahr ein signifikanter Unterschied bei den Überlebensziffern der Transplantate, nämlich 72 % in Gruppe A gegenüber nur 38 % in Gruppe B ($P < 0,01$) (Abb. 18). Der Unterschied nach 6 Monaten war noch signifikanter ($P < 0,001$). Von Bedeutung ist, dass alle 4 Patienten mit sekundären Transplantaten in der nichtvorbehandelten Gruppe ihr Transplantat verloren (lediglich ein Patient gehörte zur hohen Risikogruppe), während 11 von 16 Patienten in der vorbehandelten Gruppe noch funktionierende Transplantate hatten und die restlichen 5 Empfänger verstorben waren. Von den 16 Patienten gehörten 4 zur hohen Risikogruppe und 12 Patienten hatten ihr erstes Transplantat innerhalb von 60 Tagen verloren.

In Gruppe A gingen 6 Transplantate durch den Tod der Empfänger verloren. Insgesamt 3 Patienten (davon 2 mit jugendlichem Diabetes mellitus) verstarben früh nach der Transplantation an Sepsis. Ein splenektomierter Patient mit einem sekundären Transplantat verstarb 10 Monate nach der Transplantation mit einem Serumkreatininwert von 1,2 mg/dl an einer fulminanten Pneumokokkenpneumonie. Eine 59-jährige Frau mit einem funktionierenden Sekundärtransplantat verstarb 10 Monate nach der Transplantation an einem Schlaganfall und eine jugendliche Diabetikerin verstarb 2 Wochen nach der Transplantation an einem Herzinfarkt. Von insgesamt 10 Transplantationsverlusten der vorbehandelten Gruppe ergaben sich 6 wegen des Todes des Empfängers und lediglich 3 (davon 2 in einem Empfänger) ergaben sich durch Abstossung. Diese Nieren wurden ähnlich dem Bild der humoralen Abstossung verloren. Keine Niere wurde durch eine zelluläre Abstossungskrise verloren.

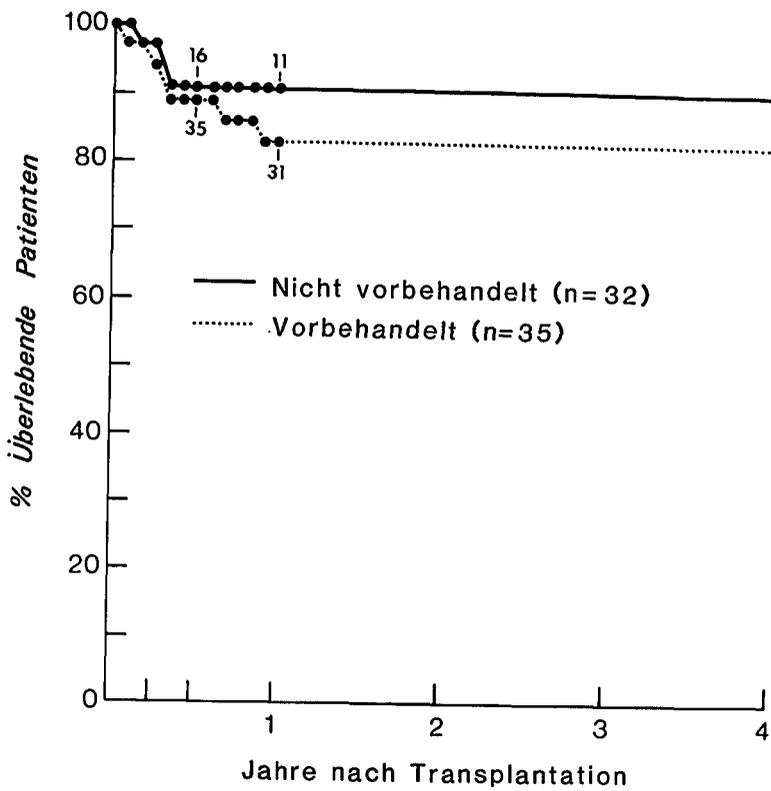


Abb. 17: Überlebensraten der Patienten mit vorbehandelten und nichtvorbehandelten Nieren nach dem Life-Table-Verfahren.

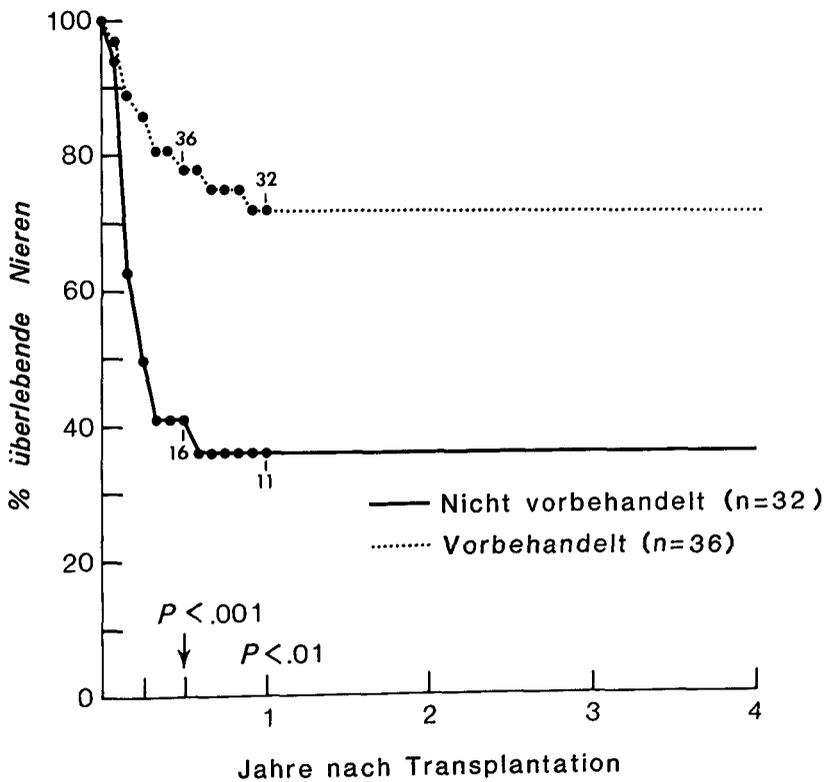


Abb. 18: Überlebensraten der vorbehandelten und nichtvorbehandelten Nieren nach dem Life-Table-Verfahren. Der Unterschied ist signifikant.

In der nichtvorbehandelten Gruppe ergaben sich 3 Todesfälle (1 Patient mit funktionierender Niere); 2 Diabetiker verstarben an Sepsis und 1 Patient an einem Schlaganfall 3 Monate nach erfolgreicher Nierentransplantation. Nahezu alle Transplantate in dieser Gruppe gingen während einer akuten Abstossungskrise verloren. Die Steroiddosen waren in beiden Gruppen vergleichbar. Die Abstossungsphasen in Gruppe A waren verzögert zwischen dem 15. und 18. Tag.

Serumkreatininwerte in beiden Gruppen waren vergleichbar, nämlich 0,7 bis 4,0 mg/dl, durchschnittlich 1,8/dl, in Gruppe A gegenüber 0,6 bis 5,8 mg/dl, durchschnittlich 2,0 mg/dl, in Gruppe B.

Nierenbiopsien, die zur Zeit der Organentnahme (nach der Vorbehandlung) während und nach der pulsierenden Präservierung und nach der Revaskularisierung vorgenommen wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die Anwendung von IVCY und IVMP in der Vorbehandlung des Kadavernierenspenders hat sich besonders beim diabetischen Transplantat-Empfänger günstig ausgewirkt (19, 21). Die Überlebensraten der Empfänger von vorbehandelten Leichen-
nieren sind denen von Lebendspendern vergleichbar (Abb. 19). Die Überlebensraten der vorbehandelten Nieren waren signifikant ($p = 0,024$) besser als die der nicht vorbehandelten Nieren (Abb. 20).

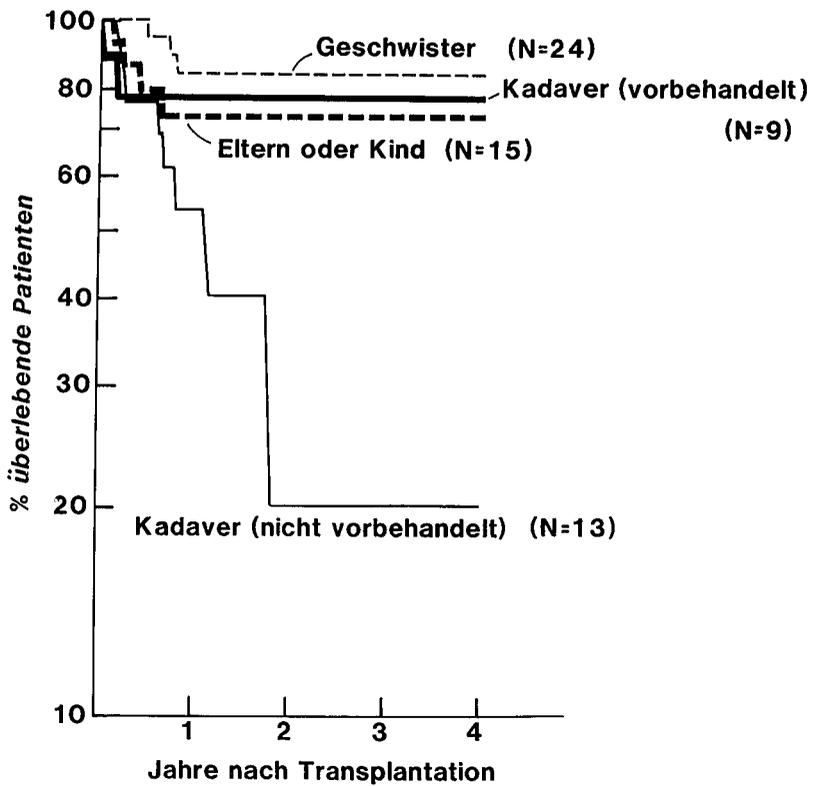


Abb. 19: Überlebensraten von 39 Diabetikern, die Nierentransplantate von Geschwistern, Eltern oder Kindern und 22 Diabetikern, die vorbehandelte und nichtvorbehandelte Kadavernieren erhielten. Analyse nach dem Life-Table-Verfahren.

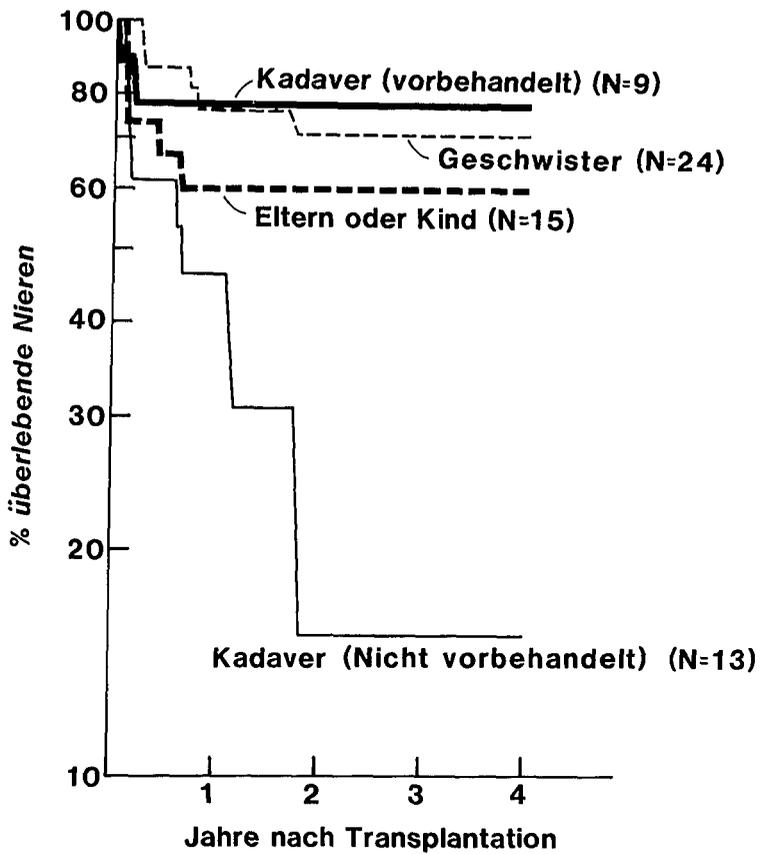


Abb. 20: Überlebensraten von 39 Nieren von Geschwistern, Eltern oder Kindern und 22 vorbehandelten und nichtvorbehandelten Kadavernieren. Die Differenz der Überlebensraten zwischen Nieren von Geschwistern und nichtvorbehandelten Kadavernieren ist signifikant ($P = 0,014$). Ebenso signifikant ist die Differenz zwischen vorbehandelten und nichtvorbehandelten Kadavernieren ($P = 0,024$).

Schlussfolgerungen

Unter der Hypothese, dass "passenger leucocytes", Nierenparenchym- und Endothelzellen einen wesentlichen Faktor beim afferenten Arm der Immunreaktion bilden, halten wir die Vorbehandlung des Organspenders für wichtig. Die Grundlagen für diese Hypothese wurden durch die fundamentalen Arbeiten von Steinmüller (24) und Elkins und Guttman (25) erbracht. Diese Autoren zeigten im Hauttransplantationsmodell der Maus (24) und im Nierentransplantationsmodell der Ratte (25) am Chimärenmodell, dass "passenger leucocytes" von Bedeutung bei der Abstossungsreaktion sind. Zum Beispiel wurden die nichtisogenen Organe immer geschwächt abgestossen, wenn sie mit hämopoetischen Zellen des Empfängers bevölkert waren. Andererseits kam es zu heftigen Abstossungsreaktionen, wenn die isogenen Transplantate mit allogenen "passenger leucocytes" bevölkert waren. In weiteren Versuchen im Rattenmodell konnten dann Guttman und Mitarbeiter (26, 27) zeigen, dass diese "passenger leucocytes" offensichtlich empfindlich auf die Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten reagieren. Die Nieren von Ratten, die mit zytotoxischen Medikamenten vorbehandelt waren, hatten eine signifikante verlängerte Überlebenszeit im nichtisogenen Empfänger verglichen mit einer Kontrollgruppe. Ein ähnlicher Effekt konnte mit Röntgenstrahlen bewirkt werden, jedoch erst nach mehr als 72 Stunden (32, 34), eine Zeitspanne, die in der klinischen Nierentransplantation nicht praktikabel ist. Guttman's Ergebnisse im Rattenmodell wurden von uns (35) am Modell des Bastardhundes bestätigt. Die Vorbehandlungszeiten in unseren Versuchen erstreckten sich über 2 1/2 bis 5 1/2 Stunden für die zytotoxischen Medikamente und 2 1/2 Stunden für die Steroide. Es scheint wichtig zu sein, dass die zytotoxischen Medikamente wenigstens 2 1/2 Stunden vorher und nicht gleichzeitig mit den Steroiden verabreicht werden (46, 68), da diese Kombination bei unseren Hunden zu keiner signifikanten Überlebenszeit führte. Dies wurde von Chatterjee und Kollegen im klinischen Modell bestätigt, da weder mit IVMP (69) noch mit IVCY (70)

allein nach durchschnittlich nur 2 1/2 Stunden Vorbehandlungsdauer eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der vorbehandelten Kadavernieren erzielt werden konnte. Weiterhin kann die gleichzeitige Verabreichung von IVCY und IVMP zu einer Inaktivierung des Metabolisierungsprozesses für Cyclophosphamid führen (46). Die Vorbehandlung des Spenders von weniger als 2 1/2 Stunden mit IVCY ist inadäquat, da dieser Zeitraum für eine genügende Metabolisierung des IVCY zu kurz ist (46, 71). Dies konnte in Lymphozytenstudien von uns und anderen gezeigt werden (41, 72, 73, 39). Die Wirkung des Cyclophosphamids auf die Stimulierbarkeit der Lymphozyten, also auf ihr Antwortpotential zu einer allogenen Substanz wird erst nach mehr als 2 Stunden signifikant reduziert. Die Maximalwirkung für die Unterdrückung des Reaktionspotentials und der maximalen Verringerung der T-Zellen scheint bei mehr als 4 Stunden zu liegen. Diese Ergebnisse sind die Basis für unsere Forderung (46), dass die Vorbehandlung mit IVCY und IVMP nicht simultan erfolgen sollte und das IVCY mehr als 5 Stunden vor der Entfernung der Nieren verabreicht werden muss.

Von Interesse ist, dass in unseren Hunderversuchen (35) die Vorbehandlung der Spender mit IVP zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit von Empfängern mit vorbehandelten Nieren führte. Unsere Versuche im Hundemodell sollten uns den Weg für die optimalen Vorbehandlungsdrogen im klinischen Versuch zeigen, obgleich Guttman (40) zu dieser Zeit schon einen Bericht über die erfolgreiche Vorbehandlung von Kadavernierenspendern mit IVCY, IVMP und Methotrexat gegeben hatte.

In unserer prospektiven randomisierten Studie (44) wurde daher die Kombination IVP und IVMP mit der Kombination IVCY und IVMP verglichen. Die günstigen Ergebnisse im Hundemodell mit IVP konnten im Humanversuch nicht bestätigt werden. Dies lässt sich wahrscheinlich auf einen Speziesunterschied zurückführen. Allerdings konnten wir zeigen, dass die Vorbehandlung

der Hundeniere und der Menschenniere "in vivo" mit IVP oder IVCY in Kombination mit IVMP zu keinen Schädigungen der Nieren führte, was sich aus eingehenden histopathologischen Untersuchungen ergab (35, 46 - 48, 50). Wir konzentrierten uns daraufhin allein auf die Vorbehandlung des Leichennierenspenders mit IVCY und IVMP (45, 46), und zwar in Dosen von 70 - 80 mg/kg Körpergewicht für IVCY 5 1/2 Stunden und 50 - 60 mg/kg Körpergewicht für IVMP 2 1/2 Stunden vor Entfernung der Nieren. In den folgenden Jahren erzielten Guttman und seine Mitarbeiter (40 - 43) und wir (45, 46, 19, 21) ausgezeichnete Ergebnisse mit dieser Methode. Unsere Ergebnisse waren statistisch signifikant mit einer Überlebenszeit nach dem Life-Table-Verfahren (68) von 72 % nach 3 Jahren für vorbehandelte Nieren, verglichen mit 38 % wenn nichtvorbehandelte Nieren zur Verwendung kamen. Diese guten Ergebnisse wurden erreicht, obwohl die vorbehandelten Nieren zu über 70 % nur ein oder kein Antigen mit dem Empfänger gemeinsam hatten und es sich meistens um hohe Risikopatienten handelte, nämlich jugendliche Diabetiker; gleichzeitig hatten die meisten unserer Patienten keine Bluttransfusion erhalten. Die Vorbehandlung alleine erwies sich erfolgreicher als der Bluttransfusions-effekt (11). Die Kombination von Spendervorbehandlung und Transfusionen führte zu einem additiven Effekt. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Es scheint, dass insbesondere der hohe Risikopatient eine grössere Überlebenschance mit einer vorbehandelten Niere hat (52). Ob Splenektomie einen Effekt auf die Transplantatüberlebenszeit hat, lässt sich von dieser Studie nicht klar identifizieren (11).

Ein wesentliches Ergebnis unserer Versuche am klinischen Modell ist, dass wir im Gegensatz zum Hundemodell zeigen konnten, dass die mit IVCY und IVMP vorbehandelten Leichennieren die pulsierende Perfusionsmethode tolerieren. Dies ist von Bedeutung, da die anfänglichen Untersuchungen von Guttman (60) und uns (53) im Hundemodell zeigten, dass die vorbehandelte Niere die pulsierende Präservierung in nur schwer voraussehbarer Weise toleriert. Bei einem Teil der präservierten

vorbehandelten Hundenieren kam es nach wenigen Tagen im Empfänger zu schweren Rindennierennekrosen. Dies wurde in keinem Fall beim Menschen beobachtet. Diese Befunde sind von Bedeutung, da Guttman und Mitarbeiter lediglich eine maximale Präservierung von 6 - 8 Stunden in Ringer'scher Lösung vorgenommen hatten (42). In der Zwischenzeit haben Corry und Mitarbeiter berichtet (74), dass die Vorbehandlung in Kombination mit Collins' Lösung möglich ist, ohne dass sich histopathologische Veränderungen der Glomeruli der Nieren ergeben.

Unsere Untersuchungen demonstrieren, dass hohe Dosen IVCY und IVMP im herzschlagenden Spender zu keinen strukturellen und funktionellen Veränderungen der Niere führen, und dass diese Nieren zusätzlich bis zu 48 Stunden sicher präserviert werden können. Diese Methode macht daher die Vorbehandlung im klinischen Bereich möglich und könnte daher auch in anderen Zentren zur Anwendung kommen. Gleichzeitig widerlegt sie die Überlegung von Dvorak (59) und Tremann (57, 58) und ihren Mitarbeitern, dass hohe Dosen von Cyclophosphamid und Methylprednisolon von Schaden sein können. Diese Autoren hatten hohe Dosen von Cyclophosphamid und Methylprednisolon dem KPP zugefügt, wo es zu keiner nennenswerten Metabolisierung (44, 46) kommen kann, und dann schwere Veränderungen der Nierenglomeruli beobachtet. Unser Modell des herzschlagenden Spenders ist völlig verschieden, da es hier zu einer Metabolisierung dieser Medikamente kommt, die nicht zu einer pathogenetischen Veränderung der Nierenstruktur und -funktion führen kann.

Die Tatsache, dass wir wegen Kadavernierenmangel an unserer Institution auf auswärtige Spender angewiesen sind, die nicht vorbehandelt sind, hat uns weiterhin auf die Suche nach einer Verbesserung dieser Ergebnisse geführt. Ähnlich den vorläufigen Berichten von Chassot und Mitarbeitern (60) konnten wir zeigen, dass der suboptimal immunsupprimierte Empfänger einer Niere, die mit KPP für 24 Stunden perfundiert worden war, das von Hunden gewonnen worden war, die mit IVCY und IVMP

in der üblichen Weise vorbehandelt worden waren, signifikant länger überlebten als die der Kontrollgruppe (51). Allerdings waren wir nicht in der Lage, einen additiven Effekt zu erzielen, indem wir eine vorbehandelte Niere mit ihrem (also isogenen) vorbehandelten KPP perfundierten. Dies geschah unter der Hypothese, dass die vorbehandelte Niere keine pulsierende Perfusion tolerierte, da die modifizierten Transplantatsantigene zusammen mit einem allogenen KPP Immunkomplexe (75 - 77) bildeten, die die Niere zerstörten. Allerdings zeigen unsere Versuche, dass die Modifikation der Antigenität des Transplantats zu Veränderungen führt, die die Hundeniere nur in unberechenbarer Weise zur Präservierung geeignet macht.

Die günstigen Ergebnisse mit dem vorbehandelten Plasma im Hunderversuch eröffnen die Möglichkeit, dass es auch im klinischen Versuch zu einer möglichen Modifikation der Antigenität "in vitro" kommen kann. Die signifikant verbesserten Ergebnisse im Hundemodell sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die aktiven Metaboliten des Cyclophosphamids, u.a. vornehmlich 4-Hydroxycyclophosphamid (78, 79), die im vorbehandelten Plasma vorliegen, eine Modifikation der Antigenität der Niere "in vitro" bewirken, ohne gleichzeitig strukturelle oder funktionelle Schäden zu bewirken. Diese Erkenntnis lässt sich auch auf die Kadavernierentransplantation anwenden.

Unsere Ergebnisse und die von Guttman (19, 21, 40, 41, 44-46) sind von anderen klinischen Studien nicht bestätigt worden (80, 81, 83). Allerdings entsprachen Dosen und Zeitintervalle für die Verabreichung von IVCY und IVMP nicht unseren Versuchen. Corry (74), der unser Protokoll exakt befolgte, erzielte ausgezeichnete Ergebnisse mit der Vorbehandlung. Interessant ist, dass in der Studie von Barry und Benett (81) zum Ausdruck kam, dass eine längere Vorbehandlungszeit eine verbesserte Überlebenszeit des Transplantats ergab.

Für die Zukunft haben sich mehrere Gebiete von Interesse zur weiteren Untersuchung angeboten. Die "in vivo" Vorbehandlung des Leichennierenspenders mit IVCY und IVMP wird in einem Protokoll, das unserem klinischen Protokoll genau entspricht, als eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, kontrollierte Studie von über 40 Zentren in den USA durchgeführt werden (82). Die Ergebnisse dieser Studie werden hoffentlich zur Klärung der Wirksamkeit der immunologischen Vorbehandlung des Kadavernierenspenders im kontrollierten Versuch beitragen.

Zur Zeit versuchen wir in unserem Labor, optimale Zeitintervalle und die Drogenkonzentrationen von Cyclophosphamidmetaboliten als Vorbehandlungsmittel "in vitro" im Hundemodell zu identifizieren. Die Konzentrationen der Cyclophosphamidmetabolite 4-Hydroxy- und 4-Hydroperoxycyclophosphamid werden dabei massenspektrometrisch bestimmt.

Die Ratio hinter diesen Versuchen ist, dass synthetisierbare Abbauprodukte von Cyclophosphamid, z.B. 4-Hydroperoxycyclophosphamid, lediglich dem KPP zugeführt werden müssen, um eine "in vivo" Vorbehandlung mit ihren logistischen Nachteilen zu ersetzen.

Eine "in vitro" Modifikation des humanen Allotransplantats, die mit einer stark verminderten Immunogenität des Organs verbunden ist, ist das Ziel dieser Experimente.

Zusammenfassung

Es wurde der Versuch unternommen, die Immunogenität von Nierenallotransplantaten "in vivo" und "in vitro" im Hunde- und im Humanversuch zu alterieren. Hierbei kam es zu folgenden Ergebnissen:

1. Beim Bastardhund konnten durch die Vorbehandlung des Nierenspenders mit IVCY und IVP (50 mg/kg Körpergewicht) "in vivo" 5 1/2 Stunden vor der Nephrektomie und in Kombination mit IVMP (50 mg/kg Körpergewicht) 2 1/2 Stunden vor der Nephrektomie signifikant ($p = 0.01$) verlängerte Überlebenszeiten der anephrischen Empfänger solcher vorbehandelten Nieren beobachtet werden.
2. Histopathologische Untersuchungen von Biopsien dieser vorbehandelten Nieren zur Zeit der Nephrektomie und nach der Revaskularisierung im Empfänger zeigten keine strukturellen Veränderungen. Gleichzeitig wurde keine funktionelle Einschränkung der "vorbehandelten" Nieren beobachtet. Diese Ergebnisse waren die Basis für die anschliessenden Humanversuche.
3. Im Hundemodell ergab sich eine signifikant ($p \ll 0.02$) verlängerte Überlebenszeit von Nieren, wenn sie mit KPP von Hunden für 24 Stunden präserviert worden waren ("in vitro"), die mit IVCY 80 mg/kg Körpergewicht 5 1/2 Stunden und IVMP 60 mg/kg Körpergewicht vor der Plasmagewinnung vorbehandelt worden waren. Allerdings tolerierten Nieren, die mit IVCY und IVMP "in vivo" vorbehandelt worden waren und die normale histologische Struktur zur Zeit der Nephrektomie aufwiesen, die pulsierende Präservierungsmethode mit KPP nur in inkonstanter Weise. Es kam in manchen Fällen zu kortikalen Nekrosen. Kortikale Nekrosen wurden auch beobachtet, als der Versuch unternommen wurde, einen additiven Vorbehandlungseffekt zu erzielen, indem die vorbehandelte Niere mit ihrem eigenen vorbehandelten KPP perfundiert wurde.

4. In einer prospektiven, randomisierten Studie beim Menschen erwies sich die Anwendung von IVP und IVMP in der Vorbehandlung des Kadavernierenspenders als Versuch der "in vivo" immunologischen Alteration von Kadavernierentransplantaten als nicht erfolgreich. Allerdings wurden ausgezeichnete Ergebnisse in der Verlängerung der Überlebenszeit von Nieren erzielt, wenn die Spender mit IVCY und IVMP vorbehandelt worden waren. Dieser Unterschied zwischen Mensch und Hund ist wahrscheinlich auf einen Speziesunterschied zurückzuführen.
5. In den letzten Jahren konnten wir zeigen, dass Nieren von Kadaverspendern, die mit 70 - 80 mg/kg Körpergewicht IVCY 5 1/2 Stunden und 50 - 60 mg/kg Körpergewicht IVMP 2 1/2 Stunden vor der Nephrektomie vorbehandelt worden waren, signifikant (p 0.001) länger überlebten als Nieren, die nicht vorbehandelt worden waren. Es wurde bewiesen, dass die Vorbehandlung des kreislaufintakten Kadavernierenspenders mit hohen Dosen von IVCY und IVMP zu keinen strukturellen und funktionellen Veränderungen der Nieren führte, und dass im Gegensatz zu Befunden im Tierversuch die vorbehandelte Menschenniere die pulsierende Präservierungsmethode bis zu 48 Stunden ohne Schaden toleriert.

Die Ergebnisse beim Hund und beim Menschen sind Beweis für die Wirksamkeit der immunologischen Vorbehandlung des Nierenspenders "in vivo", die sich in einer verlängerten Überlebenszeit des Nierentransplantats auswirkte. Der Vorbehandlungseffekt ist unabhängig von Bluttransfusionen, er hat sich besonders bei hohen Risikopatienten und bei insulinpflichtigen Diabetikern bewährt. Diese Versuche sind die Basis für eine prospektive, kooperative und kontrollierte Studie.

Die Ergebnisse der erfolgreichen "in vitro" Alteration der Immunogenität von Hundenieren sind vielversprechend. Sie sind die Grundlage für eine mögliche prospektive, kontrollierte Studie im Humanversuch, bei der Nieren "in vitro" mit KPP

perfundiert werden, das vom Plasma vorbehandelter Kadaver-
nierenspender gewonnen wurde.

Das Ziel weiterer Untersuchungen in unserem Labor ist die
Bestimmung der optimalen Vorbehandlungszeit und Drogenkon-
zentration, besonders die Konzentration der aktiven Metabo-
lite von Cyclophosphamid. Diese Ergebnisse werden uns unter
Umständen zu einer logistisch vereinfachten "in vitro" Ver-
änderung des Nierentransplantats bringen, da die aktiven
Metabolite von Cyclophosphamid, die zytotoxische Wirkung
haben, synthetisierbar sind.

Korrektur SGA 1983

perfundiert werden, das vom Plasma vorbehandelter Kadaver-
nierenspende gewonnen wurde.

Das Ziel weiterer Untersuchungen in unserem Labor ist die
Bestimmung der optimalen Vorbehandlungszeit und Drogenkon-
zentration, besonders die Konzentration der aktiven Metabo-
lite von Cyclophosphamid. Diese Ergebnisse werden uns unter
Umständen zu einer logistisch vereinfachten "in vitro" Ver-
änderung des Nierentransplantats bringen, da die aktiven
Metabolite von Cyclophosphamid, die zytotoxische Wirkung
haben, synthetisierbar sind.

- IVCY - Cyclophosphamid
- IVP - Procarbacin HCl
- IVMP - Methylprednisolon i.v.
- KPP - kryopräzipitiertes Plasma

kryopräzipitiertes Plasma

LITERATUR

1. Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: The Ninth Report of the Human Renal Transplant Registry. JAMA, 220:253-260 (1972).
2. Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: The Tenth Report of the Human Renal Transplant Registry. JAMA, 221:1495-1501 (1972).
3. Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: The 11th Report of the Human Renal Transplant Registry. JAMA, 226:1197-1204 (1973).
4. Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: The 12th Report of the Human Renal Transplant Registry. JAMA, 233:787-796 (1975).
5. Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: The 13th Report of the Human Renal Transplant Registry. JAMA, 9:9-26 (1977).
6. Terasaki, P.I., Opelz, G., Mickey, M.R.: Analysis of yearly kidney transplant survival rates. Transplant proc., 8:139-144 (1976).
7. Persijn, G.G., van Hooff, J.P., Kalff, M.W., Lansbergen, Q., van Rood, J.J.: Effect of blood transfusions and HLA matching on renal transplantation in The Netherlands. Transplant Proc., 9:503-505 (1977).
8. Opelz, G. and Terasaki, P.I.: Prolongation effect of blood transfusions on kidney graft survival. Transplantation, 22:380-383 (1976).
9. Persijn, G.G., Cohen, B., Lansbergen, Q. and van Rood, J.J.: Retrospective and prospective studies in the effect of blood transfusions in renal transplantation in The Netherlands. Transplantation, 28:396-401 (1979).
10. Vincenti, F., Duca, R.M., Amend, W., Perkins, H.A., Cochrum, K.C., Feduska, N.J., Salvatierra, O., Jr.: Immunologic factors determining survival of cadaver kidney transplants: The effect of HLA serotyping, cytotoxic antibodies and blood transfusions on graft survival. N. Engl. J. Med., 299:793-798 (1978).
11. Sterioff, S., Zincke, H., Waltzer, W.C., Moore, S.B., Frohnert, P.P. and Offord, K.P.: Factors influencing outcome of kidney allografts from pretreated cadaver donors. Archives of Surgery, 116:73-77 (1981).
12. Kauffmann, H.M., Jr., Lawson, R.K., Adams, M.B. and Sampson, D.: Posttransplant hypersplenism. Transplant Proc., 11:96-99 (1979).

13. Schulak, J.A., Reckard, C.R. and Stuart, F.P.: The role of splenectomy in clinical renal transplantation. *Transplant Proc.*, 11:1217 (1979).
14. Dausset, Jean, Hors, J., Busson, M., Festenstein, H., Oliver, R.T.D., Paris, A.M.I.: Serologically defined HLA antigens and long-term survival of cadaver kidney transplants: A joint analysis of 918 cases performed by France-transplant and the London transplant group. *New Engl. J. Med.*, 290:979-984 (1974).
15. van Hooff, J.P., Schippers, H.M.A., van der Steen, G.J., van Rood, J.J.: Efficacy of HLA matching in eurotransplant. *Lancet*, 2:1385-1388 (1972).
16. Sommer, B.G., Sutherland, D.E.R., Simmons, R.L., Howard, R.J., Najarian, J.S.: Prognosis after renal transplantation: Cumulative influence of combined risk factors. *Transplantation*, 27:4-7 (1979).
17. Ting, A. and Morris, P.J.: The influence of HLA-DR matching in renal transplant outcome. *Transplant Proce.*, 11:1295 (1979).
18. van Rood, J.J., Persijn, G.G., van Leeuwen, A., Goulmy, E. and Gabb, B.W.: A new strategy to improve kidney graft survival: The induction of CML non-responsiveness. *Transplant. Proc.*, 11:736-742 (1979).
19. Zincke, H., Woods, J.E., Palumbo, P.J., Leary, F.J. and Johnson, W.J.: Renal transplantation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA*, 237:1101-1103 (1977).
20. Najarian, J.S., Sutherland, D.E.R., Simmons, R.L., Howard, R.J., Kjellstrand, C.M., Mauer, S.M., Kennedy, W., Ramsay, R., Barbosa, J. and Goetz, F.C.: Kidney transplantation for the uremic diabetic patient. *S.G. & O.*, 144:682-690 (1977).
21. Zincke, H., Woods, J.E., Sterioff, S., Johnson, W.J., Palumbo, P.J., Mitchell, J.C., III, Frohnert, P.P., Anderson, C.F., Service, F.J. and Leary, F.J.: Renal transplantation in patients with diabetes mellitus revisited. *Transplant. Proc.*, 11:55-59 (1979).
22. Tilney, N.L., Garovoy, M.R., Busch, G.J., Strom, T.B., Graves, M.J. and Carpenter, C.B.: Rejected human renal allografts: Recovery and characteristics of infiltrating cells and antibody. *Transplantation*, 28:421-426 (1979).
23. Snell, G.D.: The homograft reaction. *Annual Rev. Microbiol.* 11:439-458 (1957).
24. Steinmuller, D.: Immunization with skin isografts taken from tolerant mice. *Science*, 158:127-129 (1967).
25. Elkins, W.L., Guttman, R.D.: Pathogenesis of a local graft versus host reaction: Immunogenicity of circulating host leukocytes. *Science*, 159:1250-1251 (1968).

26. Guttman, R.D., Lindquist, R.R., Ockner S.A.: Renal transplantation in the inbred rat. IX. Hematopoietic origin of an immunogenic stimulus of rejection. Transplantation, 8:472-484 (1969).
27. Guttman, R.D., Lindquist, R.R.: Renal transplantation in the inbred rat. XI. Reduction of allograft immunogenicity by cytotoxic drug pretreatment of donors. Transplantation, 8:490-495 (1969).
28. Shehadeh, I.H., Guttman, R.D., Lindquist, R.R.: Renal transplantation in the inbred rat. XV. An assay study of three immunosuppressive drugs. Transplantation, 10:66-74 (1970).
29. Billingham, R.E.: The passenger cell concept in transplantation immunology. Cell. Immunol, 2:1-12 (1971).
30. Burde, R.M., Waltman, S.R., Berrios, J.H.: Homograft rejection delayed by treatment of donor tissue in vitro with antilymphocyte serum. Science, 173:921-923 (1971).
31. Stuart, F.P., Garrick, T., Holter, A., Lynch, Alison, Bastien, E.: Delayed rejection of renal allografts in the rat and dog by reduction of passenger leukocytes. Surgery, 70:128-132 (1971).
32. Steinmuller, D., Hart, E.A.: Passenger leukocytes and induction of allograft immunity. Transplant Proc., 3:673-675 (1971).
33. Freeman, J.S., Chamberlain, E.C., Reemtsma, K., Steinmuller, D.: Prolongation of rat heart allografts by donor pretreatment with immunosuppressive agents. Transplant Proc., 3:580-582 (1971).
34. Steinmuller, D., Warden, G., Coleman, M., Lofgreen, Jane, Reemtsma, K., Stuart, F., Garrick, T., Holter, A., Lynch, Alison: Prolonged survival of rat heart and kidney allografts irradiated in vitro. Transplantation, 12:153-156 (1971).
35. Zincke, H. and Woods, J.E.: Attempted immunological alteration of canine renal allograft donors. Transplantation, 18:480-486 (1974).
36. Todd, G.J., Nowygrod, R., Hardy, M.A. and Reemtsma, K.: Donor and donor organ pretreatment in cardiac allografts. Surg. Forum, 29:362-364 (1978).
37. Swistel, A.J., McCabe, R.E., Lorieo, D.R., Wildstein, A. and Fitzpatrick, H.F.: The effect of donor pretreatment and low-dose immunosuppression on the 24-hour preserved canine renal allograft. Transplant. Proc., 11:1673-1675 (1979).

38. Nowygrod, R., Hardy, M.A., Todd, G.J., Oluwole, S. and Reemtsma, K.: Donor pretreatment in cardiac allografts. *Transplant. Proc.*, 11:1462-1464 (1979).
39. Dienst, S.G., MacDonald, R., Toledo-Pereyra, L.H. and Fox, B.: Modification of donor pretreatment prolongs canine renal allograft survival. *Transplant. Proc.*, 11:1465-1466 (1979).
40. Guttman, R.D., Beaudoin, J.G., Morehouse, D.D.: Reduction of immunogenicity of human cadaver renal allografts by donor pretreatment. *Transplant. Proc.*, 5:663-665 (1973).
41. Guttman, R.D., Beaudoin, J.G., Morehouse, D.D., Klassen, J., Knaack, J., Jeffery, J., Chassot, P.G., Abbou, C.C.: Donor pretreatment as an adjunct to cadaver renal transplantation. *Transplant. Proc.*, 7:117-121 (1975).
42. Guttman, R.D.: Manipulation of allograft immunogenicity by pretreatment of cadaver donors. *Urol. Clin. N. Amer.* 3:475-490 (1976).
43. Guttman, R.D., Morehouse, D.D., Meakins, J.C., Klassen, J., Lunack, J., Beaudoin, J.G.: Donor pretreatment in an unselected series of cadaver renal allografts. *Kidney Int (Suppl)*, 8:99-104 (1978).
44. Zincke, H., Woods, J.E., Roses, J., Kimbler, R.W.: The use of procarbazine hydrochloride versus cyclophosphamide in donor pretreatment in cadaveric renal transplantation. *Mayo Clin. Proc.*, 51:693-696 (1976).
45. Zincke, H., Woods, J.E.: Donor pretreatment in cadaver renal transplantation. *Surg. Gynecol & Obstet.* 145:183-188 (1977).
46. Zincke, H., Woods, J.E., Khan, A.U., Holley, K.E., Leary, F.J.: Immunologic donor pretreatment in combination with pulsatile preservation in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*, 26:207-211 (1978).
47. Zincke, H., Woods, J.E., Holley, K.E.: Nonadverse effects of canine and human renal grafts with high doses of methylprednisolone, cyclophosphamide, and procarbazine HCl in pretreatment of the donor. *Vorgetragen, New York, Clinical Dialysis and Transplant Forum*, p. 24, 20. Nov. 1975.
48. Zincke, H., Woods, J.E., Holley, K.E.: Effect of high doses of intravenous methylprednisolone and cyclophosphamide on renal homografts. *Urology*, 10:301-304 (1977).
49. Zincke, H.: Clinical effects of warm ischemia and prolonged preservation on the outcome of transplanted kidneys (Leitartikel). *Minn. Med.*, 59:31, Jan. 1976.

50. Woods, J.E. and Zincke, H.: Steroids and cyclophosphamide dosage in renal allograft perfusion. *Transplantation*, 21:260 (1976).
51. Waltzer, W.C., Zincke, H., Holley, K.E., Sterioff, S., Matsuura, J.: In vitro alteration of canine renal allografts. *Transplantation*, 29:249-259 (1980).
52. Zincke, H., Sterioff, S., Waltzer, W.C., Frohnert, P.P., Ruud, Catherine, Offord, K.P., Leary, F.J.: Pretreatment of the cadaveric renal allograft: beneficial effect in the high-risk patient. *Dial. Transpl.* (im Druck).
53. Waltzer, W.C., Zincke, H., Sterioff, S., Offord, K.P., Frohnert, P.P.: Renal transplantation after primary graft failure. *Surgery, Gyn. & Obstet.*, 152:476 (1981)
54. Woods, J.E., Anderson, C.F., DeWeerd, J.H., Johnson, W.J., Donadio, J.V. Jr., Leary, F.J., Frohnert, P.P.: High-dose intravenously administered methylprednisolone in renal transplantation: A preliminary report. *JAMA*, 223:896-899 (1973).
55. Starling, J.R., Ferguson, W.W., Rudolf, L.E., Wangenstein, S.L.: Lysosomal enzyme release and vascular resistance changes in the isolated perfused kidney: Influence of methylprednisolone. *Surg. Forum*, 23:259-261 (1972).
56. Miller, H.C., Alexander, J.W.: Protective effect of methylprednisolone against ischemic injury to the kidney. *Transplantation*, 16:57-60 (1973).
57. Tremann, J.A., Haines, J.G., Bleifuss, J.H., Agodoa, L.C.Y., Marchioro, T.L.: The effect of high dose steroid and cyclophosphamide on perfused canine renal homografts. *Transplantation*, 19:520-522 (1975).
58. Tremann, J.A., Agodoa, L.C.Y., Cooper, T.P., Striker, G.E., Marchioro, T.L.: The adverse effect of high-dose steroids on renal autografts and homografts. *Surgery*, 79:370-376 (1976).
59. Dvorak, K.J., Braun, W.E., Magnusson, M.O., Stowe, N.T., Banowsky, L.H.W.: Effect of high doses of methylprednisolone on the isolated, perfused canine kidney. *Transplantation*, 21:149-157 (1976).
60. Chassot, P.-G., Beaudoin, J.G., Guttmann, R.D.: Prolongation of kidney allograft survival in dogs with donor pretreatment. *Surg. Forum*, 25:314-316 (1974).
61. Aguilo, J.J., Leary, F.J., Woods, J.E., Buckingham, J.M., Zincke, H., DeWeerd, J.H.: Surgical technic in en block bilateral cadaveric nephrectomy for transplantation. *Am. J. Surg.*, 131:768-771 (1976).

62. Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 Suppl 97:77-89 (1968).
63. Webel, M.L., Briggs, W.A., Ritts, R.E., Jr.: Studies of mitogeninduced lymphocyte transformation by a semi-microtechnic. *Am. J. Clin. Pathol.*, 64:41-47 (1975).
64. Markowitz, H. und Ritts, R.E., Jr.: Tests for immune function of leukocytes. In *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. Edited by JA Wasington II. Boston, Little, Brown and Company, 381-400 (1974).
65. Hepburn, Bonnie, Ritts, R.E., Jr.: Human T lymphocytes: Assay method using permanently fixed slides. *Mayo Clin. Proc.*, 49:866-869 (1974).
66. Aiuti, F., Cerottini, J.-C., Coombs, R.R.A., Cooper, M., Dickler, H.B., Froland, S.S., Fudenberg, H.H., Greaves, M.F., Grey, H.M., Kunkel, H.G., Natvig, J.B., Preud'Lomme, J.-L., Rabellino, E., Ritts, R.E., Rowe, D.S., Seligmann, M., Siegal, F.P., Stjernswärd, J., Terry, W.D., Wybran, J.: Identification, enumeration, and isolation of B and T lymphocyte from human peripheral blood: Report of a WHO/IARC-sponsored workshop in human B and T cells, London, 15-17 Juli, 1974. *Scan J. Immunol.*, 3:521-531 (1974).
67. Kaplan, E.L., Meier, P.: Nonparemetric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat Assoc.*, 53:457 (1958).
68. Hayakawa, T., Kanai, N., Yamada, R., Kuroda, R., Higashi, H., Mogami, H., Jinnai, D.: Effect of steroid hormone on activation of Endoxan (cyclophosphamide). *Biochem. Pharmac.*, 18:129-135 (1969).
69. Chatterjee, S.N., Terasaki, P.I., Fine, S., Schulman, Barbara, Smith, R. and Fine, R.N.: Pretreatment of cadaver donors with methylprednisolone in human renal allografts. *S.G. & O.*, 145:729-732 (1977).
70. Chatterjee, S.N.: Persönliche Mitteilung.
71. Brock, N. and Hohorst, H.-J.: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. *Arzneimittelforschung*, 13:1021-1031 (1963).
72. Guttmann, R.D.: Membrane properties and functional activity of lymphocytes from cyclophosphamide-pretreated rats. *J. Immunol.*, 112:1594-1601 (1974).
73. Jeffery, J.R., Guttmann, R.D., Charpentier, B.: In vitro monitoring of cadaver kidney pretreatment by lymphocyte culture. *Clin. Exp. Immunol.*, 25:437-441 (1976).

74. Corry, R.J., Patel, N.P., West, J.C. and Schanbacher, B.A.: Pretreatment of cadaver donors with cyclophosphamide and methylprednisolone: Effect on renal transplant outcome. *Transplant. Proc.*, 7 Suppl. 2:348-351 (1980).
75. Humphries, A.L., Jr., Stoddard, L.D.: Does preservation injury predispose to rejection injury? *Transplant. Proc.*, 8 Suppl 1:209-213 (1976).
76. Light, J.A., Annable, C., Perloff, L.J., Sulkin, M.D., Hill, G.S., Etheredge, E.E., Spees, E.K., Jr.: Immune injury from organ preservation: a potential cause of hyperacute rejection in human cadaver kidney transplantation. *Transplantation*, 19:511-516 (1975).
77. Filo, R.S., Dickson, L.G., Suba, E.A., Sell, K.W.: Immunologic injury induced by ex vivo perfusion of canine renal autografts. *Surgery*, 76:88-99 (1974).
78. Brock, N.: Comparative pharmacologic study in vitro and in vivo with cyclophosphamide (NSD-26271), cyclophosphamide metabolites, and plain nitrogen mustard compounds. *Cancer Treatment Reports*, 60:301-308 (1976).
79. Jardine, I., Fenselau, C., Appler, M., Kan, M.N., Brundrett, R.B., Colvin, M.: Quantitation by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of cyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and nornitrogen mustard in the plasma and urine of patients receiving cyclophosphamide therapy. *Cancer Research*, 38:408-415 (1978).
80. Dienst, S.G.: Statewide donor pretreatment study. *Transplant. Proc.*, 9:1597-1599 (1977).
81. Barry, J.M. and Bennett, W.M.: Primary cadaver kidney transplant survival after donor pretreatment with cyclophosphamide and methylprednisolone.
82. Zincke, H.: Immunological donor pretreatment in cadaveric renal transplantation (Unveröffentlichte Ergebnisse).
83. Jeffery, J.R., Downs, A., Grahame, J.W., Lye, E., Ramsey, E., Thompson, A.E.: A randomized prospective study of cadaver donor pretreatment in renal transplantation. *Transplantation*, 25:287-289 (1978).