

6. Zusammenfassung

Zur immunologischen Charakterisierung von Spender- und Empfängerhunden für eine therapeutische Nierentransplantation gehört die Prüfung ihrer „Transplantationsantigene“, also ihrer MHC-Strukturen. Mangels hinreichender Kenntnisse der Genorte, Allele und Genprodukte im caninen MHC, dem "Dog Lymphocyte Antigen" (DLA) - System und mangels der dafür erforderlichen Nachweisreagenzien, sollten in dieser Arbeit einerseits eigene Alloantiseren gegen polymorphe Zelloberflächenantigene des Hundes entwickelt und charakterisiert werden. Andererseits war deren Verwendbarkeit in ersten klinischen Nierentransplantationen zu prüfen.

Eine wesentliche Starthilfe gewährten Dr. K. Krumbacher und Prof. Dr. H. Grosse-Wilde aus Essen durch die Überlassung von 15 Alloantiseren, deren DLA-Spezifität für Beaglehunde definiert war. Damit wurden - so weit möglich - 9 hiesige Beagle DLA-typisiert und zur gezielten Immunisierung mit allogenen Lymphozytenpräparationen eingesetzt. Die so erhaltenen "Hannoveraner" (H) - Alloantiseren wurden ebenso wie die "Essener" Seren auf ihr polymorphes Reaktionsverhalten gegenüber Lymphozyten von 60 unverwandten Hunden unterschiedlicher Rassen im komplementabhängigen Zytotoxizitätstest (CDC = complement dependent cytotoxicity) untersucht. Dabei zeigte sich, daß ein Teil der an Beaglen definierten "Essener" Seren bei anderen Hunderassen keineswegs mit gleicher DLA-Spezifität reagierten. Von den selbstentwickelten H-Alloantiseren zeigten 87 der insgesamt erzeugten 162 Serumpräparationen eine Reaktionsfrequenz zwischen 5 und 60 %. Damit konnten insgesamt 23 polymorph reagierende Gruppen (Cluster) definiert werden.

Obwohl sich alle Seren, die in der CDC mit den Lymphozyten ihres Immunisierungspartners positiv reagierten, auch in der Membranimmunfluoreszenz als deutlich positiv erwiesen, war mit keinem der Alloantiseren ein biochemischer Nachweis von MHC-Molekülen im Western Blot nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese möglich. Somit steht der direkte Nachweis der DLA-Erkennung durch die hier entwickelten Alloantiseren noch aus. Auf Grund der gezielten Immunisierung von Hunden, die sich nur in wenigen erfäßbaren DLA-Determinanten unterschieden und der Tatsache, daß einige der H-Alloantiseren ähnliche Reaktionsmuster wie DLA-spezifische "Essener" Sera zeigten, dürfte zumindest ein Teil der polymorphen Serumreaktionen in der CDC gegen DLA-Allelprodukte gerichtet sein.

Da mit derartigen Alloantiseren - oder einem anderen Verfahren eine DLA-Typisierung von der Qualität einer HLA-Typisierung beim Menschen bei Hunden so bald nicht möglich sein wird, wurde versucht, eine informative Alternative zur DLA-Typisierung zu entwickeln: Mit den hier charakterisierten polymorphen Alloantiseren wurde ein relativer Reaktionsvergleich

zwischen möglichen Nierenspender- und -empfängerhunden im CDC-Test durchgeführt. Anhand der individuellen Reaktion mit jedem einzelnen Alloantisera wurde einerseits der von SCHUBERTH (1987) entwickelte "zelluläre Similaritätsindex" (ZSI) und andererseits der Grad der wechselseitigen Inklusion des Reaktionsmusters des einen Tieres in dem des anderen ermittelt. Damit war zumindest ein relatives Maß für eine Histokompatibilität zwischen prospektiven Transplantationspartnern gegeben.

Bei den bisher untersuchten Partnern der ersten 4 therapeutischen Nierentransplantationen wurden ZSI-Werte zwischen 0,40 und 0,61 sowie Inklusionswerte zwischen 36 und 78 % ermittelt. Die Überlebenszeit der ersten 3 Nierentransplantatempfänger lag zwischen 9 und 41 Tagen. Dabei stand bei keinem der Tiere eine immunologische Komplikation als Todesursache im Vordergrund. Der 4. Transplantatempfänger erhielt seine allogene Niere vor inzwischen mehr als 300 Tagen. Bisher sind keine unbeherrschbaren immunologischen Komplikationen aufgetreten.

Neben der Histokompatibilitätsprüfung wurden Spender- und Empfängertiere vor der Transplantation auf präformierte Serumantikörper gegen Zellstrukturen des Transplantationspartners im CDC-Test geprüft. Dabei konnten lediglich beim ersten Transplantatempfängertier, einer 3 jährigen Hündin, solche Antikörper nachgewiesen werden. In den Untersuchungen zu den 3 nachfolgenden Transplantationen waren derartige Antikörper in der CDC nicht nachweisbar, obgleich auch hier bis zu 5 Jahre alte weibliche Tiere beteiligt waren.

Eine weitere immunologische Untersuchung galt der posttransplantären Entwicklung spenderreaktiver Antikörper bei den Empfängertieren: Da das erste Empfängertier bereits 9 Tage nach Transplantation verstarb, kann darüber keine informative Aussage gemacht werden. Alle 3 der nachfolgenden Transplantatempfänger entwickelten nachweisbare Mengen an spenderreaktiven Antikörpern. Sie wurden nicht nur in der CDC, sondern auch in der indirekten Membranimmunfluoreszenz (Mif), differenziert nach den Immunglobulinisotypen IgM und IgG, quantifiziert. Dabei zeigte sich, daß der Nachweis lediglich komplementbindender Antikörper in der CDC oft nicht mit der Menge an zellbindenden Antikörpern in der Mif übereinstimmte. Häufig war die Mif empfindlicher als der CDC-Test. Zudem zeigte die Mif, daß bei positiver Entwicklung spenderreaktiver Antikörper bisher IgM der dominierende Isotyp war.

Vergleicht man den Verlauf des Cyclosporin A Spiegels der Empfänger, so trat meist dann ein deutlicher Anstieg an spenderreaktiven Antikörpern auf, wenn 3 bis 5 Tage zuvor der

Cyclosporinspiegel unter 200 ng / ml Vollblut gefallen war. Nach Korrektur durch höhere Cyclosporin A-Gaben fielen diese Antikörper bisher stets jedoch mehr oder weniger schnell wieder ab, ohne bisher klinisch faßbare Komplikationen zu verursachen.

Die bisherigen Entwicklungsarbeiten und Untersuchungen haben somit gezeigt, daß

- zwar keine DLA-Typisierung wohl aber eine Histokompatibilitätsprüfung zwischen prospektiven Spender- und Empfängerhunden möglich ist.
- die Prüfung einer Entwicklung spenderreaktiver Antikörper nach der Transplantation eine empfindliche Früherkennung für eine sich anbahnende antikörpervermittelte Abstoßungskrise sein könnte.
- der Nachweis spenderreaktiver Antikörper nicht nur im CDC-Test sondern auch mittels Membranimmunfluoreszenz und differenziert nach Immunglobulinisotypen erfolgen sollte. Damit dürfte sich die Bedeutung unterschiedlicher Immunglobulinklassen für Verbleib oder Abstoßung des Transplantates zuverlässiger beurteilen lassen.

7. Summary

Anette Weismann Production and characterization of alloantisera against canine polymorphic cell surface antigens and their application in histocompatibility testing

In order to perform therapeutic kidney transplantations in dogs, tissue typing of „transplantation antigens“ the major histocompatibility complex (MHC) antigens is required for the immunological characterization of donor and recipient. Only insufficient knowledge is available of the genetic structure of the canine MHC system (DLA: dog lymphocyte antigens). Due to that plus the lack of well defined typing reagents it was intended to develop and characterize additional alloantisera recognizing polymorphic cell surface structures in dogs. Beyond that their suitability for histocompatibility testing in renal transplantation had to be checked.

Dr. K. Krumbacher and Prof. Dr. H. Grosse-Wilde from Essen, Germany, provided essential support delivering 15 DLA specific alloantisera, characterized in Beagle dogs. Nine local Beagles, tissue typed with these sera, were used for planned immunizations with allogenic lymphocyte preparations.

The resulting alloantisera together with the already defined sera from Essen were tested for polymorphic reaction patterns in a complement dependent cytotoxicity test (CDC) on mononuclear cells of 60 unrelated dogs of different breeds. It could be demonstrated that part of the „Essen“ sera defined in their Beagles did not react according to their anticipated pattern in the animals tested here.

87 of 162 of the obtained „Hannovarian“ (H-) alloantisera“ ranged in their reaction frequency between 5 - 60 % and were subjected to cluster analysis. As a result a total of 23 polymorphic reacting serumclusters could be defined.

Although binding of serum antibodies to lymphocytes was evident in CDC-testing and membrane immunofluorescence, none of the tested alloantisera showed reactivity with MHC molecules on western blots after SDS-PAGE. Thus, it was impossible to demonstrate whether DLA molecules were in fact recognized.

Based on the selective immunization of dogs differing only in few detectable DLA determinants and because some of the H-Alloantisera showed reaction patterns similar to those of the „Essen“ sera, at least some of the sera should recognize DLA products.

Lacking properly defined anti DLA antisera reacting reliably in different breeds or other techniques for DLA tissue-typing comparable in quality to HLA tissue-typing an alternative approach to conventional DLA typing was established: A relative serological comparison between potential kidney donors and recipients was performed based on the reaction patterns of two individuals with the entire panel of polymorphic alloantisera in the CDC-test.

Taking into account the individual reactivity of each alloantiserum, (1) the „ZSI“ (cellular similarity index, SCHUBERTH 1987) and (2) the mutual degree of inclusion in the serumpattern was determined. This allowed a relative estimation of histocompatibility between potential transplantation partners.

The ZSI values of the partners of the first four therapeutic kidney transplantations ranged between 0.40 to 0.61. Inclusion values ranged from 36 to 78 %, respectively. Survival times of the first 3 recipients of renal allografts were 9, 29 and 41 days. None of the animals died due to immunological complications. The fourth recipient was transplanted more than 300 days ago showing no immunological complications since.

In addition to histocompatibility matching donors and recipients were reciprocally checked for preformed cytotoxic antibodies against cell surface antigens of the opponent. Only in the first recipient - a 3 year old female - preformed antibodies could be detected in CDC although in subsequent pretransplant matchings females up to five years of age were included.

Further immunological studies focused on the posttransplantational development of donorreactive antibodies in the recipient. No information was obtained from the first recipient, since it died already 9 days after transplantation. Of the successive transplantations all recipients developed detectable amounts of donorreactive antibodies. In addition to CDC testing, these antibodies were also quantified for IgG and IgM isotypes in indirect membrane immunofluorescence (Mif). It turned out, that the amount of complement binding antibodies in the CDC did not correlate with the content of membrane binding antibodies in the Mif. Often but not always the Mif was more sensitive than the CDC. Besides the Mif showed that IgM was the predominant isotype in the donor specific antibody response in these 4 cases.

An increase in donorreactive antibodies usually occurred within 3 to 5 days after the recipients cyclosporin A blood level fell below 200 ng/ml. Increasing the cyclosporin A dosage though led to a more or less rapid decline of these antibodies.

This work and the investigations so far have shown that:

- histocompatibility testing, but not DLA typing, is possible for prospective donor and recipient dogs.
- the examination of developing donorreactive antibodies after transplantation may provide a sensitive indicator for diagnosing an early onset of antibody mediated graft rejection.
- the survey of donorreactive antibodies should include CDC-test as well as membrane immunofluorescence comprising differentiation of immunoglobulin isotypes for evaluation of the role of different immunoglobulin isotypes in survival or rejection of renal allografts.