

Aus der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie
und Transplantationschirurgie
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan FACS, FRCSC
Pädiatrische Hepatologie und Lebertransplantation
Prof. Dr. med. Rainer Ganschow

Immunologisches Monitoring nach pädiatrischer Lebertransplantation

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Alexander Sebastian Leuschner
aus Heidelberg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 27.09.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Prof. Dr. R. Ganschow
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:	PD Dr. J. Pollock
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:	PD Dr. J. Oh

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Pädiatrische Lebertransplantation.....	3
1.2 Indikationen für eine pädiatrische Lebertransplantation.....	5
1.3 Immunsuppression nach pädiatrischer Lebertransplantation	6
1.3.1 Immunsuppressive Medikamente.....	6
1.3.2 Nebenwirkungen der Medikamente	8
1.4 Komplikationen nach pädiatrischer Lebertransplantation	10
1.5 Transplantatabstoßung	11
1.5.1 Klinischer Verlauf.....	11
1.5.2 Histologische Definition einer Abstoßung.....	12
1.5.3 Therapie einer Abstoßung.....	12
1.6 Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung.....	13
1.7 Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ	16
1.8 Darstellung des bisherigen Wissensstandes.....	17
1.9 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	19
2. Patienten, Material und Methoden	20
2.1 Übersicht der Versuchsausführungen.....	20
2.2 FACS-Messungen: regulatorische T-Zellen und Basis-Panel.....	21
2.2.1 Material, Geräte, Reagenzien und verwendete Antikörper	22
2.2.2 Durchführung der Treg Messung.....	23
2.2.3 Auswertung der Treg Messung.....	24
2.3.4 Basispanel-Messung (BD Multitest)	25
2.3 Sandwich-ELISA: Zytokinbestimmung.....	26
2.3.1 Material, Geräte, Reagenzien und verwendete Antikörper	26
2.3.2 Quantifizierung von Zytokinkonzentrationen.....	26
2.4 Durchführung der Leberbiopsie.....	28
2.5 Statistische Auswertung	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Patientencharakteristika	30
3.2 LTx-Indikationen der Studienteilnehmer.....	31
3.3 Operationstechniken bei Lebertransplantation	32
3.4 Immunsuppression.....	33

3.5 Biopsieergebnisse der Kontrollgruppe.....	34
3.6 Ergebnisse der FACS-Messungen	35
3.6.1 Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut.....	35
3.6.2 Verhältnis von CD4 ⁺ Zellen zu CD8 ⁺ Zellen im peripheren Blut.....	36
3.6.3 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut.....	37
3.6.4 B-Lymphozyten und T-Lymphozyten im peripheren Blut	38
3.7 Ergebnisse der Zytokinbestimmungen.....	39
3.7.1 Interleukin 2 sR α im peripheren Blut.....	39
3.7.2 Interferon γ im peripheren Blut	40
3.7.3 Interleukin 6 im peripheren Blut.....	41
3.7.4 Interleukin 4 und TGF- β im peripheren Blut	41
3.7.5 TNF- α und Interleukin 10 im peripheren Blut	42
4. Diskussion	43
4.1 Patientenkollektiv und Methode.....	45
4.2 Operationstechniken bei Lebertransplantation	48
4.3 Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut.....	48
4.4 Verhältnis von CD4 ⁺ Zellen zu CD8 ⁺ Zellen im peripheren Blut.....	48
4.5 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut.....	49
4.6 B-Lymphozyten im peripheren Blut	51
4.7 Interleukin 2 sR α und Interferon γ im peripheren Blut.....	52
4.8 Interleukin 4, Interleukin 10 und TGF- β im peripheren Blut.....	54
4.9 Ausblick.....	55
5. Zusammenfassung	57
6. Abkürzungsverzeichnis	59
7. Literaturverzeichnis	61
8. Danksagung.....	70
9. Lebenslauf	71

1. Einleitung

1.1 Pädiatrische Lebertransplantation

Thomas E. Starzl führte im Jahre 1963 die erste orthotope Lebertransplantation (LTx) bei einem dreijährigen Kind durch. In gleicher Weise operierte er noch im selben Jahr vier erwachsene Patienten, wobei die maximale Überlebenszeit allerdings höchstens 23 Tage betrug (Starzl et al. 1963). Da Starzl aber besonders bei leberkranken Kindern mit infauster Prognose unter dem großen Druck stand, ein erfolgreiches Therapieverfahren zu entwickeln, unternahm er nach einer vierjährigen Pause erneut bei einem Kind mit einer Gallengangsatresie eine orthotope LTx als letzten Rettungsversuch (Starzl et al. 1968). Mit einer Überlebenszeit von 13 Monaten war diese 1967 durchgeführte LTx die erste erfolgreiche pädiatrische Lebertransplantation.

In den folgenden Jahren entwickelte sich jedoch vor allem der Erfahrungsschatz bei erwachsenen LTx-Patienten weiter. Als Hauptgrund ist hier der Mangel an passenden Organen für Kinder zu nennen, was eine hohe Mortalität pädiatrischer Patienten auf der Warteliste zur Folge hatte. Zunächst versuchte man dieses Problem mit der Entwicklung der Größenreduzierten LTx anzugehen. In Form einer Verkleinerung durch Resektion, etwa des rechten Leberlappens („reduced size liver“), wurden so Transplantationen bei Kindern durchgeführt (Brölsch et al. 1984 und Bismuth et al. 1989). Allerdings ging dies zu Lasten der Lebertransplantationen bei Erwachsenen, da die restlichen Leberteile nicht verwendet werden konnten (Pichlmayr et al. 1995). Erst durch die 1988 erstmals in Hannover (Pichlmayr et al. 1988) und unabhängig davon kurze Zeit später in Paris (Bismuth et al. 1989) entwickelte Splitlebertechnik wurde es möglich mit einer Leber ein Kind und einen Erwachsenen zu versorgen (Pichlmayr et al. 1995).

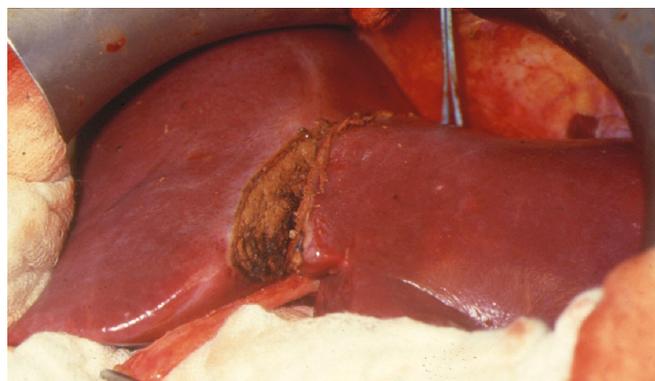


Abbildung 1: Splittechnik bei Leberlebenspende bzw. intraoperativer Situs

mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. Dieter Bröring

Diese auf Basis der segmentalen Anatomie der Leber beruhende Technik lieferte die Voraussetzungen für die Leberteilspende von lebenden Verwandten.

Im Jahre 1988 wurde in Brasilien die erste Operation dieser Art durchgeführt, eine weitere folgte in Australien. Nach der Genehmigung dieses Verfahrens durch die Ethikkommission operierte Christoph E. Brölsch schließlich die dritte Lebendspende-Lebertransplantation 1989 in Chicago.

Mit der Splittechnik gelang es letztlich nicht nur, die Sterblichkeit auf der Warteliste zu reduzieren (heutzutage bei Kindern unter 1%), sondern auch den Langzeiterfolg nach LTx deutlich zu verbessern (Brölsch et al. 1994, Otte et al. 1990).

Bezogen auf die pädiatrische Lebertransplantation wird derzeit in den bundesdeutschen Zentren die Splitlebertransplantation in etwa 40-60% der Fälle realisiert, bei welcher ein Transplantat für zwei Empfänger, meist ein Kind und ein Erwachsener, chirurgisch in situ (noch im Körper des Spenders) oder ex situ (nach Entfernen des Transplantats aus dem Körper des Spenders) präpariert wird.

In etwa 20-30% der Fälle erfolgt die Leberlebendspende, wobei in der Regel der linke Leberlappen eines Elternteils für einen Säugling oder ein Kleinkind verwendet wird (Ganschow 2007).

Eurotransplant, eine im Jahre 1967 von Jon van Rood gegründete Stiftung mit Sitz in Leiden (Niederlande), fungiert dabei als Vermittlungsstelle für Organspenden in den Benelux-Ländern, Deutschland, Österreich, Slowenien und Kroatien. Vorrangiges Ziel ist die optimale Verfügbarkeit von Spenderorganen bzw. -geweben. 122.000 Menschen hat Eurotransplant zwischen 1967 und 2007 durch die Vermittlung eines Spenderorgans helfen können (Eurotransplant International Foundation 2008). In diesen 40 Jahren wurden im Eurotransplantgebiet mehr als 21.000 Lebertransplantationen durchgeführt.

Die Erfahrungen mit der Lebendspende begannen in Europa im Oktober 1991 im Hamburger Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Bereits zwei Jahre zuvor erfolgte im UKE die erste LTx bei einer 16jährigen Patientin.

Diese umfangreichen Erfahrungen machen das Hamburger Transplantationszentrum zu einem der größten Zentren für pädiatrische Lebertransplantationen Europas. So wurden seit der Einführung des Kinder-Lebertransplantation-Programms im Jahre 1991 bis 2012 646 Lebertransplantationen (inklusive Re-LTx) bei 525 Kindern durchgeführt. Das Fünfjahresüberleben beträgt aktuell mehr als 90 %. Damit liegt das UKE über der international angegebenen Einjahres-Überlebensrate von 88% bei pädiatrischer LTx (Whittington et al. 2002, Ng et al. 2008).

1.2 Indikationen für eine pädiatrische Lebertransplantation

Verschiedene Erkrankungen im Kindesalter führen zu einem chronischen oder akuten Leberversagen, beeinträchtigen damit die Lebensqualität des Kindes in erheblichem Maße und sind im Endstadium sogar lebensbedrohlich, so dass eine LTx in diesen Fällen unumgänglich wird. Auf der Liste der Indikationen zur pädiatrischen LTx dominiert mit über 50% die extrahepatische Gallengangsatresie (Ganschow 2007), die einen Verschluss der extrahepatischen Gallengänge mit progredienter Cholestase und Leberzirrhose darstellt, deren Ätiologie bis heute jedoch weitgehend ungeklärt ist.

Bezogen auf das Hamburger Patientenkollektiv stellt die Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase (PFIC) mit etwa 10% die zweithäufigste Erkrankung dar, welche zu einer pädiatrischen LTx führt (Ganschow 2007). Diese autosomal-rezessive Erkrankung ist eine Form der zellulären Gallentransportstörung (Cholestase), die aufgrund ihrer zugrunde liegenden Transportdefekte in 3 verschiedene Typen eingeteilt wird. Typische Symptome sind eine Cholestase mit Ikterus, ausgeprägtem Pruritus und Gedeihstörung, wobei sich bei Typ 1 und 2 diese Symptome bereits im ersten Lebensjahr zeigen und im Verlauf meist zu einer terminalen Leberzirrhose führen.

Eine Gallengangshypoplasie kann isoliert oder häufiger im Rahmen des autosomal-dominant vererbten Alagille-Syndroms vorkommen. Neben einer für dieses Krankheitsbild typischen Gesichtsform, Wirbelsäulenfehlbildungen sowie einem Embryotoxon posterior (heller Trübungsring an der Kornea), stehen Herzfehler (v.a. periphere Pulmonalstenose) sowie eine Cholestase im Vordergrund dieses mit einer Inzidenz von ca. 1:100.000 seltenen Syndroms.

Während die Autoimmunhepatitis (AIH) und primär sklerosierende Cholangitis (PSC) weitaus häufiger bei erwachsenen Patienten zu beobachten sind, stellt die neonatale Hepatitis eine bedeutende Indikation für eine LTx im Säuglingsalter dar. Auch metabolische Erkrankungen wie der homozygote α 1-Antitrypsin-Mangel und Morbus Wilson können zu einer fortgeschrittenen Leberzirrhose führen und somit letztlich eine Indikation für eine LTx darstellen.

Eine Autoimmunhepatitis und der Morbus Wilson können auch zu einem akuten Leberversagen führen. Dieses kann ebenfalls durch virale Infektionen, Pilzvergiftungen und Intoxikationen wie z.B. durch Paracetamol ausgelöst werden.

Bei der neonatalen Hämochromatose, einer seltenen Eisenspeichererkrankung, muss häufig eine frühzeitige LTx durchgeführt werden. Obwohl Säuglinge nach wie vor als spezielles Patientenkollektiv gelten, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass bei Lebertransplantationen im Säuglingsalter ähnlich gute Ergebnisse wie bei älteren Kindern erreichbar sind (Grabhorn et al. 2004). Die Mehrzahl der Kinder und Jugendlichen nach LTx zeigt eine nahezu uneingeschränkte

Lebensqualität und eine altersentsprechende psychosoziale Entwicklung. Regelmäßige klinische, sonographische und laborchemische Verlaufskontrollen sind allerdings unabdingbar.

1.3 Immunsuppression nach pädiatrischer Lebertransplantation

1.3.1 Immunsuppressive Medikamente

Zur Erhaltung und zum Schutz der Organfunktion nach Lebertransplantation ist die tägliche Einnahme von Immunsuppressiva notwendig. Diese verhindern eine Abstoßung des transplantierten Organs durch das körpereigene Immunsystem, sind jedoch mit einer nicht zu vernachlässigenden Komorbidität verbunden. Beispielhaft seien hier die Nephrotoxizität der gängigsten Immunsuppressiva sowie kosmetisch stark beeinträchtigende Nebenwirkungen erwähnt (siehe unten).

Die initiale Immunsuppression nach pädiatrischer LTx erfolgt derzeit am Hamburger Transplantationszentrum mit Corticosteroiden, einem Calcineurininhibitor sowie einem Interleukin 2-Rezeptorantagonisten.

Corticosteroide sind stark entzündungshemmende Medikamente. Pharmakologisch leiten sie sich von Steroidhormonen der Glucocorticoidfamilie ab, wobei Prednison ein synthetisches Analogon von Cortisol ist und zu den am häufigsten angewandten Steroiden gehört. Cortisol entfaltet seine Wirkung über intrazelluläre Rezeptoren, die in nahezu jeder Körperzelle exprimiert werden und die Transkription spezifischer Gene regulieren (Cronstein et al. 1992). Steroide wirken durch die Blockade der Freisetzung von Interleukin-1 und damit der Hemmung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort.

In Hamburg wird nach erfolgreicher, multizentrischer Pilotstudie bei allen Kindern standardmäßig nach intraoperativer Steroidbolusgabe eine niedrigere Steroidtherapie durchgeführt. Wurde früher noch mit einer Startdosis von 60 mg Prednison/m² Körperoberfläche (KOF) pro Tag (d) begonnen, so gibt man aktuell postoperativ nur noch 15 mg Prednison/m² KOF/d; gefolgt von einer wöchentlichen Reduktion auf die Enddosis von 2,5 mg bzw. 1 mg für insgesamt ein Jahr. Hiermit hofft man, den negativen kumulativen Effekt der Steroide insbesondere auf Wachstum und Infektionsneigung zu reduzieren, ohne Nachteile in der Effektivität in Kauf nehmen zu müssen (Grabhorn et al. 2007).

Als Calcineurininhibitoren werden Ciclosporin A (Sandimmun Optoral[®]) oder Tacrolimus (Prograf[®]) angewandt. Ciclosporin A (CSA) ist im Hamburger Transplantationszentrum das Immunsuppressivum der ersten Wahl für Säuglinge und Kinder, da langjährige Erfahrungen in der Anwendung vorliegen, es als Saftform applizierbar und aufgrund der vergleichsweise kurzen

Halbwertszeit gut zu steuern ist. Durch Calcineurininhibition hemmt CSA die Interleukin 2 Produktion und Freisetzung aus den T-Helfer-Zellen. Dies wiederum hat eine gehemmte Aktivierung der T-Lymphozyten sowie bevorzugte Unterdrückung der zellulären Immunantwort zur Folge.

Während in einigen internationalen Transplantationszentren in den vergangenen Jahren eine eher intensive Immunsuppression mit Talspiegeln für CSA von 250-350 µg/l angestrebt wurde (Gross et al. 1998), wird in den meisten bundesdeutschen Zentren traditionell eine niedrigere Immunsuppression mit initialen CSA-Talspiegeln von 130-170 µg/l in einer Dualtherapie mit Steroiden bevorzugt, wobei die CSA-Zielspiegel nach mehreren Jahren bei 50-80 µg/l liegen.

In asiatischen und einigen angloamerikanischen Zentren wird anstelle von CSA häufig Tacrolimus in der initialen Immunsuppression eingesetzt (Gross et al. 1998, Cacciarelli et al. 1997, Jain et al. 2002). Das aus *Streptomyces tsukubaensis* isolierte Makrolid wirkt ähnlich dem Ciclosporin durch Hemmung der IL-2 Produktion und der damit verbundenen Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung. Da im Vergleich zu CSA die immunsuppressive Potenz von Tacrolimus allerdings etwas stärker eingeschätzt wird, ist dieser Calcineurininhibitor im Hamburger Transplantationszentrum für schwer therapierbare Abstoßungen, beim Auftreten CSA-typischer Nebenwirkungen oder im Falle einer autoimmunologischen Grunderkrankung vorgesehen (initialer Talspiegel 8-10 µg/l).

Durch eine 2001 publizierte Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass durch Erweiterung der Basistherapie mit dem Anti-Interleukin 2-Rezeptor-Antikörper Basiliximab (an Tag 0 und 4 nach LTx) eine signifikante Reduktion der akuten Abstoßungsreaktionen bei guter Verträglichkeit erreicht werden kann (Ganschow et al. 2002). Basiliximab ist ein chimärer, monoklonaler Mensch-Maus-Antikörper (aus menschlichem IgG1 und der antigenbindenden Region eines Maus-Antikörpers), der gegen die α -Kette (CD25-Antigen) des IL-2-Rezeptors gerichtet ist. Dies bewirkt eine Hemmung der durch IL-2 vermittelten T-Lymphozyten-Aktivierung. Dabei bindet Basiliximab mit hoher Affinität spezifisch an das CD25-Antigen aktivierter Lymphozyten und hat somit keinen Effekt auf ruhende T-Lymphozyten.

Im Falle einer Abstoßungsreaktion (siehe Kapitel 1.5 Transplantatabstoßung) besteht die Möglichkeit, die immunsuppressive Therapie um Substanzen wie Mycophenolat-Mofetil (Myfortic[®], Cell Cept[®]), Azathioprin oder mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus zu erweitern. Während Ciclosporin A, Tacrolimus, Basiliximab und Azathioprin als Immunsuppressiva bei pädiatrischer LTx zugelassen sind, besteht für Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus und Everolimus auf diesem Gebiet eine Zulassungsbeschränkung.

Die Wirkung von Mycophenolat-Mofetil beruht auf einer nicht-kompetitiven, reversiblen Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Hierdurch wird eine selektive

Proliferationshemmung von Lymphozyten induziert. Azathioprin hemmt dagegen nichtselektiv die Vermehrung von T-Lymphozyten. mTOR-Inhibitoren blockieren die Aktivierung einer spezifischen Kinase des Zellzyklus und hemmen hierdurch die Lymphozytenproliferation.

Bei autoimmunbedingten Lebererkrankungen (AIH und PSC) besteht nach LTx grundsätzlich ein gewisses Rezidivrisiko. Es hat sich bewährt, bei diesen Patienten eine intensivere Immunsuppression auch im Langzeitverlauf durchzuführen (Ganschow 2007).

In Tabelle 1 sind die Komponenten der immunsuppressiven Therapie zusammengefasst.

Immunsuppression in Hamburg bei Kindern nach LTx	
Basis	Steroide
Basis	Calcineurininhibitoren: Ciclosporin A (CSA) bzw. Tacrolimus
Basis	Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper Basiliximab
Optional	Azathioprin / Mycophenolat Mofetil / Sirolimus
Obsolet	Zytotoxische Antikörper

* gemessen mittels Massenspektrometrie

Tabelle 1: Immunsuppression in Hamburg bei Kindern nach LTx

1.3.2 Nebenwirkungen der Medikamente

Steroide:

Die Effekte einer Steroidtherapie sind aufgrund der großen Zahl der von Corticosteroiden regulierten Gene sehr komplex (Barnes 1998). Zu den dosisabhängigen Nebenwirkungen gehören Ödembildung, Gewichtszunahme, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Knochenmineralisierungsstörungen, eine Abnahme der Hautdicke, gastrointestinale Beschwerden bis hin zu Blutungen, Ulcera oder Perforationen, sowie eine generell erhöhte Infektanfälligkeit.

Ciclosporin A / Tacrolimus:

Neben Nephro- und Neurotoxizität werden als Nebenwirkungen von CSA Blutdruckanstieg, Hyperkaliämie, Allergien, Diabetes mellitus, Infektanfälligkeit sowie ein erhöhtes Malignomrisiko (v.a. maligne Lymphome) angegeben. Sowohl CSA als auch Tacrolimus verursachen bei einigen Patienten im Langzeitverlauf eine eingeschränkte Nierenfunktion und toxische Leberparenchymschäden.

Gravierende unerwünschte Wirkungen sind insgesamt sehr selten, kosmetische Beeinträchtigungen wie Hypertrichose und Gingivahyperplasie jedoch häufig (Abbildung 2) und stellen insbesondere für jugendliche Patienten eine Belastung dar.

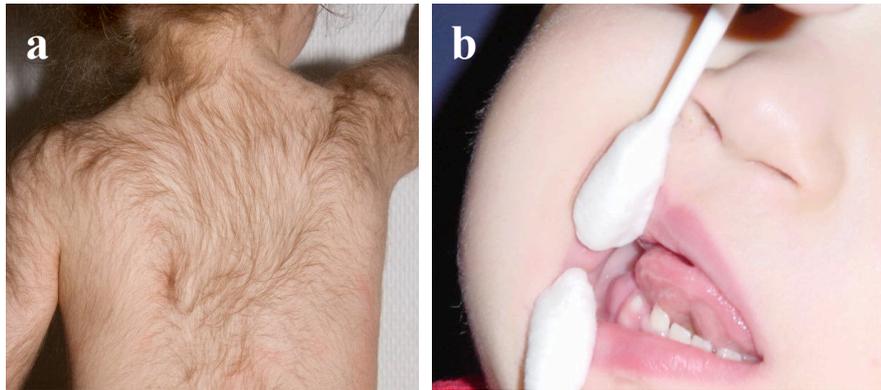


Abbildung 2: Nebenwirkungen unter CSA-Therapie

a) Hypertrichose

b) Gingivahyperplasie

mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. Rainer Ganschow

Die als Nebenwirkung bei CSA- und Tacrolimus-Gabe beschriebene Nephrotoxizität kann u.a. zu renaler Anämie, renaler Osteopathie sowie zu einem Hypertonus führen, der bezogen auf das Hamburger Patientenkollektiv mit einer Inzidenz von 15% beschrieben wird (Grabhorn et al. 2004). Während in anderen Studien bis zu 50% der Patienten sechs Monate nach LTx antihypertensiv behandelt wurden (SPLIT Research Group 2001), ist im Hamburger Transplantationszentrum nur selten eine über Monate dauernde antihypertensive Therapie notwendig.

Das Spektrum der toxischen Leberparenchymschäden umfasst durch CSA induzierte zentrolobuläre Nekrosen, eine Steatose durch Corticosteroide und nodulär regeneratoische Veränderungen durch Tacrolimus (Hübscher und Portmann 2007).

Basiliximab:

Nach Basiliximabgabe können vereinzelt anaphylaktische Reaktionen auftreten. Als neueres Präparat weist Basiliximab jedoch eine deutlich geringere Antigenität als ältere Lymphozyten-Antikörper (wie z.B. ATG und OKT3) auf.

Unter der Anwendung von Mycophenolat-Mofetil werden hauptsächlich Magen-Darm-Beschwerden und eine Leukopenie beobachtet. mTOR-Inhibitoren können in der frühen postoperativen Periode Wundheilungsstörungen verursachen, zudem gastrointestinale Beschwerden, eine Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie auslösen. Ebenfalls werden eine Myelosuppression sowie orale aphtöse Läsionen beobachtet.

1.4 Komplikationen nach pädiatrischer Lebertransplantation

Das für ein Kind erhöhte Infektionsrisiko nach LTx durch zentralvenöse Katheter und abdominelle Drainagen sowie ein generell unreifes Immunsystem bei jungen Patienten führt zusammen mit einer initial intensiven Immunsuppression häufig zu Infektionen in der frühen postoperativen Zeit nach LTx (SPLIT Research Group 2001). Hierbei handelt es sich meist um bakterielle, seltener um fungale Infektionen. Des Weiteren spielen virale Erreger wie z.B. das Cytomegalie- (CMV) und das Epstein-Bar-Virus (EBV) eine wichtige Rolle.

Eine initiale antibiotische Therapie soll septische Komplikationen mit konsekutivem Multiorganversagen verhindern, was in vielen Zentren Hauptursache für das Versterben von Säuglingen in den ersten Wochen nach LTx ist (Grabhorn et al. 2004). So betont auch Ganschow, dass die Gesamtinzidenz von frühen Infektionen mit über 70% ein entscheidender Faktor für die Morbidität nach pädiatrischer LTx ist (Ganschow et al. 2000).

Eine abnormale Lymphozytenproliferation bei einem immunsuppressiv behandelten Transplantatempfänger kann zur Entstehung eines Posttransplantationslymphom (PTLD) führen. Hierbei handelt es sich in über 95% um B-Zell-Lymphome. Dabei scheint eine EBV-Infektion in enger Beziehung mit der Entwicklung eines PTLD zu stehen. So haben diejenigen Patienten das höchste PTLD-Risiko, welche als EBV-negativer Empfänger ein EBV-positives Organ erhalten, im Verlauf auffällige EBV-Serologien aufweisen sowie aufgrund einer Abstoßungsreaktion mit Immunsuppressiva in hohen Dosierungen behandelt werden.

Während aufgrund der eher niedrigen Immunsuppression in bundesdeutschen Zentren die Prävalenz des Posttransplantationslymphoms in Hamburg lediglich 0,8% beträgt (Ganschow et al. 2002), werden international wegen der dort höheren Immunsuppression weitaus größere Zahlen beschrieben (Gross et al. 1998, Cacciarelli et al. 1997, Jain et al. 2002).

Trotz verbesserter chirurgischer Techniken kann man davon ausgehen, dass bei etwa 30% der Patienten interventionsbedürftige chirurgische Komplikationen auftreten (Grabhorn et al. 2004). Als solche sind zu nennen: Thrombosen der Arteria hepatica oder der Vena portae, Galleleckage, Darmperforationen sowie Blutungen aus neuen Gefäßanastomosen oder Resektionsflächen. In vielen Zentren sind gerade bei Säuglingen vaskuläre Probleme wie Thrombosen ein Hauptgrund für die Morbidität und die Mortalität nach LTx (Whittington et al. 2002, Cacciarelli et al. 1997). Um eine Thrombosierung zu verhindern ist eine suffiziente postoperative Heparinisierung sowie eine konzentrationsabhängige Substitution von Antithrombin III ebenso wichtig wie eine bereits intraoperativ durchgeführte dopplersonographische Kontrolle der hepatischen Flußmuster.

Thrombosen, insbesondere der Arteria hepatica, treten nach pädiatrischer LTx bis zu 25% auf (SPLIT Research Group 2001, Gross et al. 1998, Cacciarelli et al. 1997).

Eine weitere gefürchtete Komplikation stellt das bisher ätiologisch ungeklärte primäre Transplantatversagen dar, welches mit einer Inzidenz von unter 3% auftritt und eine zeitnahe Retransplantation erfordert. Während bei einer Lebendspende die primäre Nichtfunktion fast nie auftritt, ist das Entstehungsrisiko bei einer Ischämiezeit von über zwölf Stunden oder bei Verwendung von Vollorganen von Spendern unter 6 Monaten Lebensalter erhöht (Grabhorn et al. 2004).

Biliäre Komplikationen wie Gallengangsstenosen und -strikturen können sich Monate und Jahre nach erfolgter LTx entwickeln, wobei als prädisponierende Faktoren u.a. die Transplantatqualität, die Operationstechnik und arterielle Perfusionsprobleme anzusehen sind. In bundesdeutschen Transplantationszentren wird eine Häufigkeit von unter 5% beschrieben (Ganschow 2007).

Bis zu 75% der Kinder und Jugendlichen entwickeln post LTx Autoantikörper (z.B. ANA und SMA), wobei deren Ätiologie und pathogenetische Bedeutung noch weitestgehend unklar ist (Richter et al. 2007).

Eine weitere wichtige Komplikation post LTx stellt die Transplantatabstoßung dar.

1.5 Transplantatabstoßung

1.5.1 Klinischer Verlauf

Die Rejektion (Abstoßung) des transplantierten Organs wird aufgrund ihrer Geschwindigkeit, der Mediatoren und beteiligten Zelltypen in drei Stadien eingeteilt.

Die sehr seltene hyperakute (humorale) Abstoßung manifestiert sich innerhalb von wenigen Minuten bis einigen Stunden nach LTx als Dysfunktion und Versagen des Transplantats bei einem Empfänger mit präformierten Antikörpern (Drebber und Dienes 2008). Die Inzidenz bei AB0-inkompatiblen Organen ist mit 33% beschrieben (Haga et al. 2006). Histologische Veränderungen umfassen Fibrinablagerungen und hämorrhagische Nekrosen.

Die akute Abstoßung ist die häufigste Form der Abstoßung und stellt eine immunmedierte Entzündung der Leber mit einem Häufigkeitsgipfel im ersten Monat nach LTx dar (Perrella et al. 2006). Die Diagnose der akuten Abstoßung wird anhand klinischer (z.B. Fieber und allgemeines

Unwohlsein), laborchemischer (Transaminasenanstieg) und histopathologischer Kriterien (portale Entzündung, Gallengangsläsionen und Endothelitis) gestellt.

Bei der chronischen Abstoßung kann sich histologisch ein Verlust kleiner Gallengänge sowie eine obliterative Vaskulopathie mit Affektion großer und mittelgroßer Arterien zeigen (Kishi et al. 2007). Die Risikofaktoren werden in Donor-Empfänger-Faktoren (z.B. autoimmune Lebererkrankungen, Mismatch des Geschlechts von Spender und Empfänger, hohes Spenderalter und junges Empfängeralter) sowie Post-Transplantations-Faktoren (z.B. Anzahl und Schwere der akuten Abstoßungen sowie CMV-Infektionen) unterteilt (Hübscher und Portmann 2007). Letztendlich verbleiben die immunologischen Vorgänge der chronischen Abstoßung jedoch unklar.

1.5.2 Histologische Definition einer Abstoßung

Die BANFF-Klassifikation beschreibt eine international akzeptierte Einteilung der Abstoßung in der Transplantatleber. Dabei berücksichtigt der untersuchende Pathologe vor allem die drei Kategorien portale Entzündung, Gallengangschaden oder -entzündung und Endothelitis. Je nach Ausprägung der möglichen Abstoßung werden pro Kategorie null bis drei Punkte vergeben. Der Rejektionsindex (RAI) wird aus der Summe der Werte ermittelt: RAI \leq 4: milde Rejektion, RAI 5-7: mäßige/moderate Rejektion (Grad 2), RAI 8/9: schwergradige Rejektion (Grad 3).

Darüber hinaus wird vom Pathologen zumeist ein Fibrosegrad als weiteres Maß angegeben. Stadieneinteilung nach Metavir: Grad 0: keine Fibrose, Grad 1-2: mäßige Fibrose, Grad 3-4: ausgeprägte Fibrose.

Während histologisch gesicherte akute Abstoßungsreaktionen mit einer Inzidenz von 50-80 % auftreten, werden chronische Abstoßungsreaktionen mit einer Inzidenz von 5-15 % beobachtet (Murphy et al. 1996, Ganschow 2002).

1.5.3 Therapie einer Abstoßung

Die Therapie einer akuten Abstoßung umfasst in erster Linie eine intravenöse (i.v.) Hochdosiskortisontherapie (10 mg/kg KG Prednisolon für drei Tage, gegebenenfalls 5 mg/kg KG Prednisolon für weitere drei Tage). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle sind diese Abstoßungsreaktionen mit dieser Steroidbolustherapie gut therapierbar.

Im Fall einer schwer therapierbaren, steroidresistenten, akuten Abstoßung, welche durch Persistenz der Transaminasenerhöhung und der histologischen Befunde charakterisiert ist, besteht die Möglichkeit, die immunsuppressive Medikation zu wechseln. Treten mehrere Abstoßungen unter

der initial begonnenen Therapie auf, kann diese um weitere Immunsuppressiva wie Mycophenolat-Mofetil erweitert werden.

Bei einer histologisch bestätigten chronischen Abstoßung sollte ebenfalls eine Intensivierung der immunsuppressiven Therapie vorgenommen werden, allerdings kann der Progress der chronischen Abstoßung hierdurch nur in einigen Fällen erfolgreich aufgehalten werden.

1.6 Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung

Lymphozyten umfassen zahlreiche funktionelle Subpopulationen, die anhand ihrer biologischen Funktion und Antigenexpression auf der Zelloberfläche in drei Hauptpopulationen unterteilt werden können: T-Lymphozyten (z.B. Cytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen), B-Lymphozyten und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Eine Transplantatabstoßungsreaktion ist ein komplexer Prozess, bei dem zelluläre wie auch humorale Immunreaktionen eine Rolle spielen, T-Zellen sind dabei allerdings von zentraler Bedeutung. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt nach dem Erkennen eines Alloantigens auf direktem oder indirektem Weg (Abbildung 3): Dem antigenspezifischen T-Zell Rezeptor der Empfänger-T-Lymphozyten steht das Alloantigen gegenüber, welches an das MHC Molekül des Spenders gebunden ist.

T-Zellen erkennen Alloantigene - Der direkte Weg:

Im transplantierten Organ sind antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) des Spenders vorhanden (dendritische Zellen im Bindegewebe, Makrophagen). Durch deren Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I)-Moleküle wird das Alloantigen präsentiert. Nach erfolgter Transplantation des Spenderorgans gelangen diese Zellen aus dem Organ in die periphere Blutbahn und migrieren in die umgebenden Lymphknoten sowie in die Milz. Dort stimulieren sie auf direktem Weg T-Zellen des Transplantatempfängers (Suthanthiran und Strom 1994). Das Erkennen des Alloantigens auf direktem Weg spielt vor allem in den ersten Wochen nach erfolgter Transplantation eine große Rolle und wird daher von einigen Arbeitsgruppen mit dem Vorgang einer akuten Rejektion in Verbindung gebracht (Caballero et al. 2006).

T-Zellen erkennen Alloantigene - Der indirekte Weg:

Die indirekte Antigenpräsentation wird durch die in das Transplantat einwandernden APC des Empfängers, welche das Alloantigen phagozytieren, prozessieren und anschließend über MHC II den empfängereigenen T-Lymphozyten präsentieren, vermittelt. Im Gegensatz zur direkten Antigenpräsentation scheint der Weg der indirekten Alloantigenerkennung mit einer chronischen Rejektion in Verbindung zu stehen (Caballero et al. 2006, Gökmen et al. 2008).

Nach erfolgter T-Zell-Aktivierung auf direktem bzw. indirektem Weg sind weitere kostimulatorische Faktoren erforderlich bevor interzelluläre Signalpeptide (Zytokine) ausgeschüttet werden, welche wiederum T-Zellen und weitere Zellen des Immunsystems aktivieren.

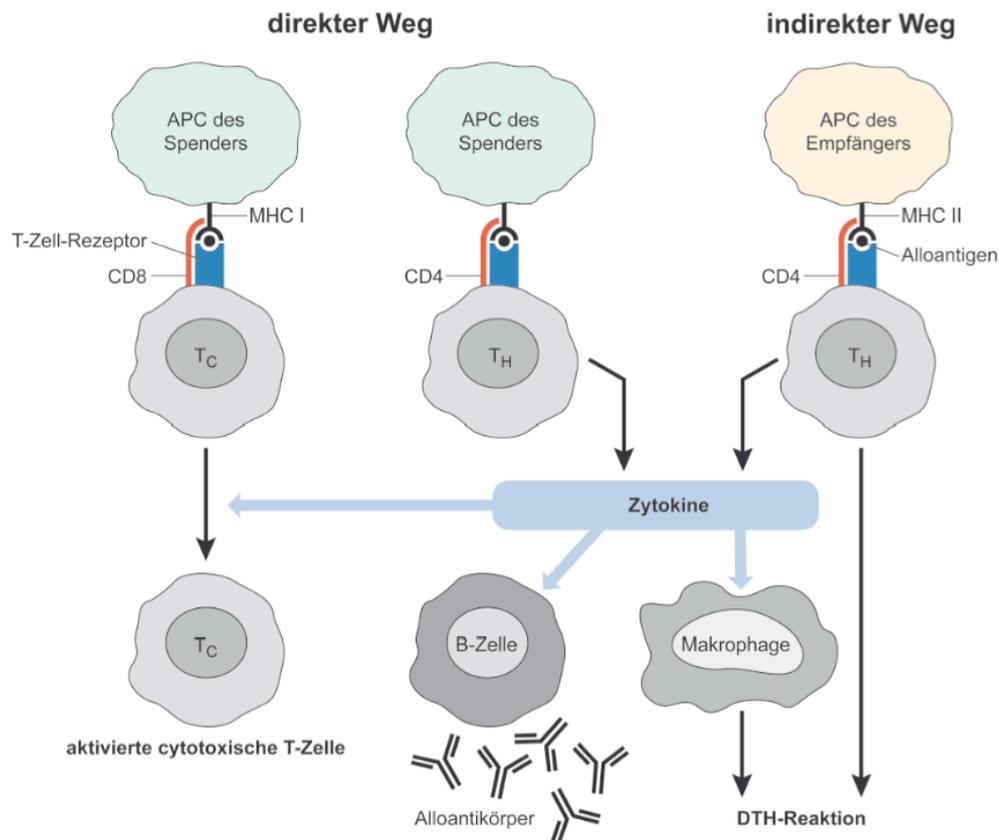


Abbildung 3: Mechanismen der zellulären Abstoßungsreaktion
Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung auf direktem und indirektem Weg

UKE Grafikabteilung - adaptiert aus Suthanthiran und Strom 1994

T_h1-/T_h2-Zellen: Differenzierung, Interaktion und Zytokinproduktion

T-Zellen, die durch den direkten bzw. indirekten Signalweg aktiviert werden bezeichnet man als T_h0-Zellen. Wie letztlich die Differenzierung von T_h0-Zellen in T_h1- und T_h2-Zellen gesteuert wird, ist heute noch nicht genau geklärt. Allerdings ist klar, dass Zytokine, die während der ersten Proliferationsphase der T-Zell-Aktivierung vorhanden sind, eine entscheidende Rolle spielen. Während in Gegenwart von IL-12 und IFN- γ stimulierte CD4⁺ T-Zellen sich v.a. zu T_h1-Zellen entwickeln, entstehen in Gegenwart von IL-4 eher T_h2-Zellen (Yang et al. 2000).

Außerdem ist bekannt, dass T_h1- und T_h2-Zell-vermittelte Immunreaktionen sich gegenseitig regulieren können (Nakamura et al. 1997). So inhibiert das von T_h1-Zellen gebildete IFN- γ die Proliferation von T_h2-Zellen, wobei IL-10, das von T_h2-Zellen freigesetzt wird, die IFN- γ -Sekretion

verhindert. Darüber hinaus können Art und Menge der antigenen Peptide die Differenzierung $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls beeinflussen (Constant und Bottomly 1997).

Während T_h1 -Zellen vorwiegend IL-2 sowie $IFN-\gamma$ bilden und ihnen klassischer Weise eine Induktion der zellulären Immunität und Transplantatabstoßung zugeschrieben wird, produzieren T_h2 -Zellen vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Diese Zellen und Zytokine wurden bereits 1995 mit Toleranz gegenüber dem Spenderorgan in Verbindung gebracht (Dallman 1995). Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass eine Abweichung zu höheren T_h2 -Konzentrationen eine Toleranz gegenüber dem Spenderorgan anzeigen könnte (Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass regulatorische T-Zellen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Toleranz einnehmen, und das Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und IL-17 produzierenden T-Zellen sowie T_h1 -Zellen entscheidend für den klinischen Verlauf nach Transplantation ist (Sanchez-Fueyo und Strom 2011).

Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion

$CD4^+$ -T-Lymphozyten

Sensibilisierte $CD4^+$ T-Zellen erkennen ein spezifisches, via Antigenpräsentation angebotenes Alloantigen, wodurch sie aktiviert und zur Zytokinproduktion angeregt werden. Die von den Lymphozyten sezernierten Zytokine (z.B. IL-2, $IFN-\gamma$, Makrophagen-aktivierender Faktor [MAF] und $TNF-\beta$) lassen Entzündungszellen wie etwa Makrophagen in das betroffene Gewebe einwandern. Darüber hinaus sorgen die ausgeschütteten Zytokine auch für eine Vermehrung $CD8^+$ T-Lymphozyten.

Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL)

CTL weisen als charakteristischen Oberflächenmarker CD8 auf. Werden reife zytotoxische T-Zellen aktiviert (durch Bindung an MHC I, welches Ihnen das Alloantigen präsentiert), so schütten sie Perforine und Granzyme aus, welche die allogene Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) treibt (Getachew et al. 2008). In einem zweiten Weg, wird der Zelltod durch das Erkennen eines Apoptose auslösenden Zelloberflächenrezeptor der Zielzelle induziert.

Makrophagen

Makrophagen zählen zu den Phagozyten und sind ein wichtiger Teil des zellulären Immunsystems. Ihre Rolle nach Organtransplantation wird bis heute kontrovers diskutiert. Klar ist, dass sie bei Entzündungsreaktionen im Transplantat eine wichtige Rolle spielen (Rowshani und Vereyken 2012). Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass eine hohe Anzahl an Makrophagen im

Transplantat mit einem früheren Transplantatversagen einhergeht (Mannon 2012). Vermutlich sind sie jedoch neben ihrer inflammatorischen Funktion im Transplantat ebenso für Reparatur und Remodelling mitverantwortlich (Mannon 2012).

B-Lymphozyten

Während T-Zellen an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, sind B-Zellen die Träger der humoralen Immunantwort. Durch körperfremde Antigene aktiviert, können sie sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (oder Gedächtniszellen) differenzieren.

Die Rolle der B-Lymphozyten bei Transplantatabstoßungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Sowohl B-Zellen als auch Plasmazellen sind in vielen Biopsien mit akuter Abstoßung nachweisbar. Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass diese Zellen maßgeblich an der Aufrechterhaltung chronischer Abstoßungsprozesse beteiligt sind (Vongwiwatana et al. 2003, Krukemeyer et al. 2004).

Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten machen etwa 3-5% der Zellen im Differentialblutbild aus und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt. Durch die Produktion von Eosinophilem Kationischen Protein (ECP) haben sie eine zytotoxische Wirkung auf Gewebezellen des transplantierten Organs (Nagraal et al. 1998).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind ein Teil der angeborenen Immunität und stellen etwa 10-15% der zirkulierenden Lymphozyten dar. Dabei können NK-Zellen ihre Zielzellen ohne vorheriges Antigenpriming erkennen und abtöten. Nachdem lange Zeit angenommen wurde, dass NK-Zellen bei Abstoßungen keine Rolle spielen (Markus et al. 1991), wird inzwischen angenommen, dass diese Zellen sowohl bei akuten als auch bei chronischen Abstoßungsprozessen über derzeit noch unbekannte Mechanismen zur Zerstörung des Transplantats beitragen (Pratschke et al. 2009).

1.7 Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ

In Anlehnung an die international anerkannte Definition des Überbegriffs „**Toleranz**“ unterscheidet man folgende Untergruppen:

- transplantation tolerance: Zustand einer spezifischen, permanenten, immunologischen Akzeptanz fremder Antigene eines Spendertransplantats ohne Immunsuppressiva-Gabe

(Wieërs et al. 2007). Diese Definition ist auf Untersuchungen von Billingham zurückzuführen, der Mäusen in utero Spenderzellen injizierte und später feststellte, dass diese Mäuse ein vom Spender transplantiertes Hautstück tolerierten, aber Transplantate anderer Spender nach wie vor abstießen (Billingham et al. 1953)

- operational tolerance: Zustand eines immunkompetenten Patienten, der nach Transplantation keine Immunsuppressiva mehr einnimmt und eine zufriedenstellende Transplantatfunktion ohne Abstoßungsreaktion aufweist (Wieërs et al. 2007)
- prope tolerance: Zustand eines Patienten ohne Abstoßungsreaktion bei zufrieden stellender Transplantatfunktion unter minimaler Immunsuppression (Calne 2004) - meist eine Calcineurininhibitor-Monotherapie

1.8 Darstellung des bisherigen Wissensstandes

Erste Fallberichte von Patienten, die „Toleranz“ aufweisen, wurden aufgrund zufälliger Beobachtungen bereits 1993 durch T. Starzl veröffentlicht, der sechs Patienten beschreibt, die ohne Medikamenteneinnahme normale Transaminasen bis 13 Jahre nach Lebertransplantation hatten (Starzl et al. 1993). Bis Anfang der 90er Jahre war der Erfahrungsschatz transplantierte Patienten ohne Immunsuppression auf Patienten begrenzt, die aufgrund einer lebensbedrohlichen EBV-Infektion bzw. PTLD (Mañez et al. 1994, Reyes et al. 1993) oder aber wegen non-compliance keine immunsuppressiven Medikamente mehr zu sich nahmen (Starzl et al. 1993). Da nach einer Lebertransplantation im Vergleich zu anderen Organtransplantationen weit weniger Abstoßungen auftreten, wurde bei lebertransplantierten Patienten die Möglichkeit bedacht, die Immunsuppression zu reduzieren oder gar absetzen zu können (Pons et al. 2008). Obwohl ein komplettes Absetzen der Immunsuppression bisher nur von wenigen Instituten durchgeführt wurde und somit nur wenig Erfahrung auf diesem Gebiet vorhanden ist, gehen einige Arbeitsgruppen davon aus, dass bei 25% bis 33% der erwachsenen LTx-Patienten ein Absetzen der Immunsuppression möglich ist (Sanchez-Fueyo und Strom 2004). So gelang es Mazariegos et al., bei 18 von 95 Patienten (19%) die immunsuppressive Medikation komplett abzusetzen (Mazariegos et al. 1997, Mazariegos et al. 2007). Fünf von 18 Patienten (28%) einer Londoner Arbeitsgruppe blieben drei Jahre nach Beginn der Studie ohne immunsuppressive Medikation (Devlin et al. 1998) – sieben Jahre später konnten allerdings nur noch zwei Patienten diesen Medikamenten-freien Zustand aufweisen (Girlanda et al. 2005).

In den letzten Jahren wurden viele wissenschaftliche Studien durchgeführt, die die Mechanismen der Toleranz näher untersuchten. Bisher konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

Toleranz gegenüber dem Fremdorgan wird durch mehrere Mechanismen vermittelt. Neben dendritischen Zellen, B Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen wird allerdings FoxP3-exprimierenden $CD4^+CD25^+$ -T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Wood et al. 2004, Yoshizawa et al. 2005, Sakaguchi et al. 2005, Racusen 2008). Diese so genannten „regulatorischen T-Zellen (Treg)“ entstehen nach Interaktion von $CD4^+$ -T-Lymphozyten mit den Zytokinen IL-2 und TGF- β (Scheffold et al. 2007). Nach tierexperimentellen Untersuchungen beschrieb B. Hall 1990, dass $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von Ratten, die Toleranz gegenüber ihrem Transplantat aufwiesen, diese auf einen anderen Transplantatempfänger übertragen können (Hall et al. 1990). Dagegen führte das Entfernen derselben Treg bei Mäusen zu diversen Autoimmunkrankheiten (Sakaguchi et al. 1995). In einer Reihe von experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden dass Treg für die Toleranz gegenüber einem Spenderorgan mitverantwortlich sind (Kingsley et al. 2002). Im peripheren Blut von erwachsenen Transplantatempfängern, die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ aufweisen, sind regulatorische T-Zellen in signifikant höherer Anzahl nachweisbar als bei Patienten, die ohne immunsuppressive Therapie eine Abstoßungsreaktion aufwiesen (Scheffold et al. 2007). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass lebertransplantierte Patienten mit Transplantattoleranz ohne Immunsuppression höhere Konzentrationen an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen im peripheren Blut haben als gesunde Probanden (Martinez-Llordella et al. 2007). Dagegen wurde bei Patienten mit einer akuten Abstoßung ihres Lebertransplantats eine niedrige Anzahl zirkulierender $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gefunden (Demirkirian et al. 2006). Stenard et al. stellten sinkende $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Konzentrationen im Blut während Rejektion bei gleichzeitigem Anstieg der $FoxP3^+$ Zellen im Spenderorgan fest. So könnten regulatorische T-Zellen im Blut von pädiatrischen LTx Patienten ein ganz entscheidender Marker für die Detektion einer Transplantatabstoßung bzw. Toleranz gegenüber dem Spenderorgan sein (Stenard et al. 2009). Auch bei Patienten nach Nierentransplantation zeigte sich, dass die chronische Abstoßung des Transplantats mit einer reduzierten Anzahl $CD4^+CD25^+ FoxP3^+$ T-Zellen in Verbindung steht (Braudeau et al. 2007).

Zudem wurde auch die Rolle verschiedener Zytokine in der Vermittlung von Graftstabilität bzw. Abstoßungsreaktionen untersucht: Die Rolle einzelner Zytokine im komplexen Prozess der Transplantatabstoßung bzw. der Toleranzentwicklung führte bisher insgesamt zu widersprüchlichen Ergebnissen. Jedoch werden T_h1 -Zellen, die vorwiegend Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF- α produzieren, mit einer Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht (Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007). IFN- γ und TNF- α sind bei transplantierten Patienten mit einer ausgeprägten immunologischen Aktivierung gegen das Transplantat erhöht (Gras et al. 2007). Dagegen schreibt man T_h2 -Zellen, die vorwiegend IL-4, IL-6 und IL-10 produzieren eher eine

Toleranz gegenüber dem Spenderorgan zu (Dallman 1995, Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007).

Wenig ist bisher über die Korrelation peripherer Zytokinkonzentrationen mit dem Ausmaß der mRNA-Expression dieser Zytokine in der Leber bekannt. Gras et al. beobachteten eine gute Korrelation zwischen IL-10 Konzentrationen im peripheren Blut sowie IL-10 m-RNA Konzentrationen im Leberbiopsat, sodass sich aus Sicht der Autoren ein enger Zusammenhang zwischen der Produktion von IL-10 und der Ausschüttung in die periphere Blutbahn finden lässt. Da keine weitere Korrelation zwischen hepatischen und peripheren Zytokinkonzentrationen gefunden werden konnte, geht Gras des Weiteren davon aus, dass diese Zytokine ihren Ursprung extrahepatisch in sekundär lymphatischen Organen haben.

Da bei einem Absetzen der immunsuppressiven Therapie die Gefahr einer akuten und chronischen Rejektion und letztlich dem Transplantatverlust bis hin zum Versterben des Patienten besteht, sind weitere Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet dringend notwendig, um immunologische Grundlagen von Transplantattoleranz und -abstoßung zu evaluieren.

1.9 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Ziel der Studie ist es, Rückschlüsse auf wichtige immunologische Parameter, die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ oder aber eine spenderspezifische Aktivierung im Sinne einer Abstoßung des transplantierten Organs anzeigen, zu gewinnen. Die Kenntnis geeigneter immunologischer Parameter, die die Aktivierung des Immunsystems anzeigen, könnte eine individualisierte immunsuppressive Therapie nach pädiatrischer Lebertransplantation ermöglichen. So könnte gegebenenfalls bei Patienten mit geringer immunologischer Aktivierung eine Reduktion der Immunsuppression ermöglicht und damit die durch die immunsuppressive Therapie bedingten Nebenwirkungen minimiert werden. In der vorliegenden Studie wird diesbezüglich die Rolle regulatorischer T-Zellen und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut untersucht. Zudem soll die Konzentration folgender Zytokine im Serum bestimmt werden: IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α und TGF- β .

Es sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie verhalten sich die oben genannten Parameter bei nicht-transplantierten Patienten im Vergleich zu immunsupprimierten Patienten nach LTx?
- Inwiefern unterscheiden sich diese Parameter bei Patienten mit Abstoßungsreaktionen im Vergleich zu Transplantatempfängern mit klinisch unkompliziertem Verlauf?
- Sind dies geeignete Parameter, um eine individuelle Immunsuppression steuern zu können?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Übersicht der Versuchsausführungen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden pädiatrische Patienten nach Lebertransplantation untersucht. Es wurden Patienten mit akuter oder chronischer Abstoßungsreaktion im Vergleich zu Patienten mit klinisch und laborchemisch unauffälligem Verlauf nach LTx untersucht und die Unterschiede in der immunologischen Aktivität gegen das transplantierte Organ evaluiert.

Lebertransplantierte Kinder werden jährlich im Hamburger Transplantationszentrum zur Kontrolluntersuchung vorgestellt. Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgen u.a. eine Blutentnahme, gegebenenfalls eine Röntgenuntersuchung des Thorax sowie eine Ultraschalluntersuchung der transplantierten Leber. In mehrjährigen Intervallen wird eine Leberbiopsie durchgeführt (Protokollbiopsie).

Im Rahmen dieser Studie wurden Säuglinge und Kinder untersucht,

1. die sich zur jährlichen Kontrolluntersuchung nach LTx mit Protokollbiopsie vorstellten
2. die sich wegen einer akuten/chronischen Abstoßungsreaktion in stationärer Behandlung befanden
3. bei denen eine Leberbiopsie aufgrund unklarer Hepatopathie durchgeführt wurde (diese Gruppe nicht-transplantiertes Kinder wurde als Kontrollgruppe angesehen).

Studienteilnehmer bzw. deren Erziehungsberechtigte wurden ausführlich über Ziel und Zweck der durchgeführten Studie aufgeklärt. Die schriftliche Einverständniserklärung war Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie. Hierbei wurde über die Weitergabe von Krankheitsdaten in anonymisierter Form aufgeklärt. Ebenso wurde die Widerruflichkeit einer Teilnahme mitgeteilt.

Nach schriftlicher Einwilligung zur Studienteilnahme wurde im Rahmen der morgendlichen Blutentnahme ca. 5 ml Blut (Serum und Vollblut) asserviert.

Aus dem Vollblut wurden spätestens 24 Stunden nach Blutabnahme immunologisch bedeutende Oberflächenmarker auf Lymphozyten bestimmt, die eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Abstoßungsreaktionen des transplantierten Organs einnehmen. Dies geschah mittels einer durchflusszytometrischen Analyse, in der die Oberflächenmarker CD2, CD3, CD45, CD4/CD25, CD14/CD3, CD8 und CD127 untersucht wurden.

Insbesondere wurden regulatorische T-Zellen über ihr spezifisches Oberflächenmarkerprofil gemessen ($CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$).

Zusätzlich wurde der Immunstatus des Transplantatempfängers durch Bestimmung von Zytokinen als Botenstoffe einer Abstoßungsreaktion untersucht. Hierbei wurde nach der morgendlichen Blutentnahme das Patientenserum sofort ab zentrifugiert und bei minus 80°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die Messung der Konzentrationen von IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ und TNF- α durch ELISA-Kits.

Abbildung 4 fasst die verschiedenen Methodikteile der Studie schematisch zusammen.

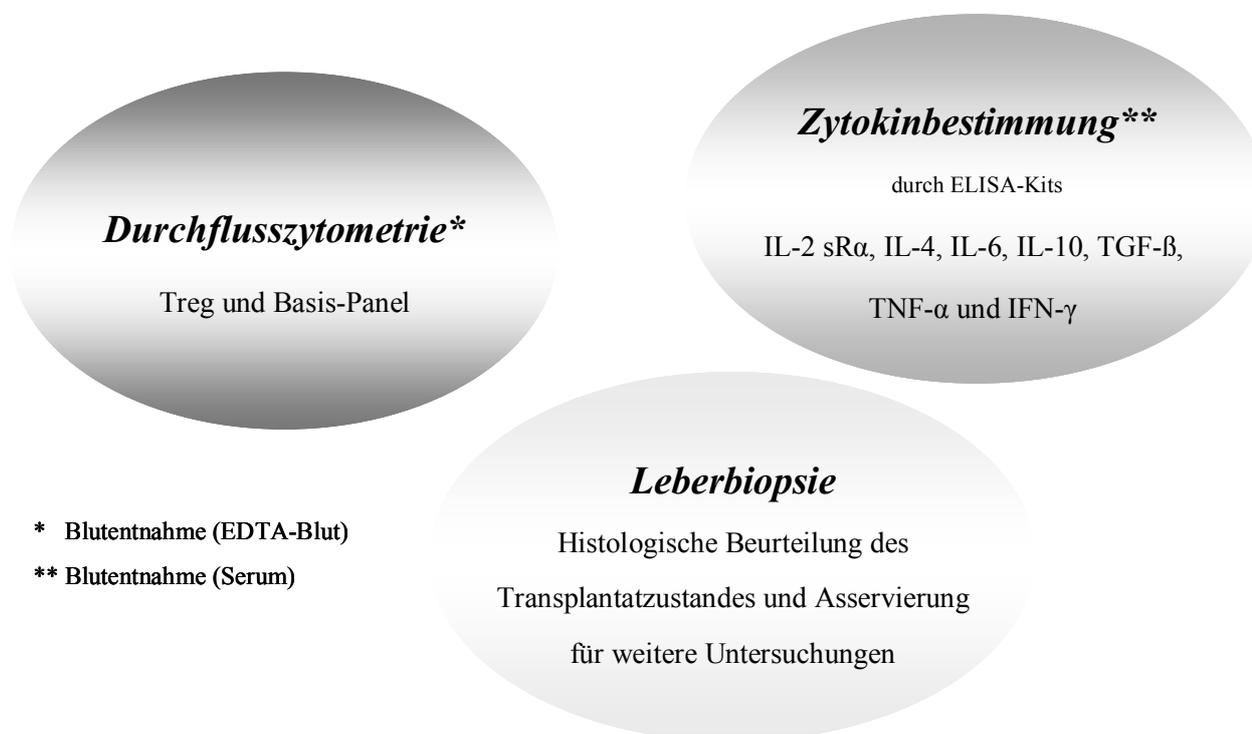


Abbildung 4: Methodikteile der Studie

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg bewilligt:

Bearb.-Nr.: PV3012/Studie: Immunologisches Monitoring nach pädiatrischer Lebertransplantation.

2.2 FACS-Messungen: regulatorische T-Zellen und Basis-Panel

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung der physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in Suspension auf Grundlage der Fluoreszenz und Streulichteigenschaften. Das Durchflusszytometer (FACS, Fluorescence-activated Cell Sorter) misst gleichzeitig Fluoreszenz- und Streulichtsignale von einzelnen Zellen. Die Streulichtsignale geben Auskunft über morphologische Eigenschaften der Zellen. Dabei gibt das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) Aufschluss über die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) über ihre Granularität, wodurch letztlich eine Unterscheidung zwischen Makrophagen,

Granulozyten und Lymphozyten möglich wird. Fluoreszenzsignale können die Expression von Oberflächenmolekülen sichtbar machen, wenn die Zellen vorher mit Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle angefärbt wurden.

Die Unterscheidung der Farbstoffe durch das Gerät erfolgt anhand ihrer unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima. Die Signale werden über den Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und auf den Computer übertragen. Dort erfolgt die Darstellung durch die Gegenüberstellung von FSC und SSC in einem so genannten Plot.

Bei der Treg Messung werden Angaben über die relative Häufigkeit erfasst. Bei der Basis-Panel-Messung können absolute Zellzahlen (Zellen/ml) gewonnen werden, da zu der Zellsuspension eine bekannte Menge von Partikeln (Beads) dazugegeben werden. Das Verhältnis von Zellen zu Beads bei einer bekannten Beads-Konzentration kann verwendet werden, um die Konzentration der Zellen zu ermitteln.

2.2.1 Material, Geräte, Reagenzien und verwendete Antikörper

Material:

BD Trucount Tubes	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Falcon Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Combitips plus 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Racks	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

Geräte:

BD FACSCalibur E0556	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Apple G3	Apple Inc., Cupertino CA, USA
Vortexmischer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia NY, USA
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, D

Reagenzien:

FACS Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACS Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACS Rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Calibrite APC Beads	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Calibrite 3 beads	Microsoft Corporation, Redmond WA, USA

Verwendete Antikörper:

Fluorochrom-markierte Antikörper	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
CD25 FITC (FITC Mouse Anti-Human CD25)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
CD127 PE (PE Conjugated Mouse Anti-Human CD127 (IL-7 receptor α subunit))	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
CD4 APC (APC Mouse Anti-Human CD4)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Multitest IMK-Kit (jeweils in einem Fläschchen):	
<ul style="list-style-type: none"> - BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 Reagenz in 1ml gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumazid - BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 Reagenz in 1ml gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumazid - BD Multitest IMK-Kit Lysing Solution, 10-fach konzentriert, eine firmeneigene (BD), gepufferte Lösung, die <15% Formaldehyd und <50% Diethylenglykol enthält. 	

2.2.2 Durchführung der Treg Messung

Lymphozytenanalysen werden aus EDTA-Blut bestimmt, welches durch Direktpunktion gewonnen wird. Die Blutentnahme erfolgt in EDTA-Monovetten, die bis zur Messung bei Raumtemperatur (20 bis 25°C) auf dem Roller bewegt wurden.

Die EDTA-Proben wurden spätestens innerhalb 24 Stunden nach Abnahme getestet (wobei ein Verwertungszeitraum von 48 Stunden eingehalten werden soll).

Zur Treg Messung wurden folgende Antikörpermengen ins Falconröhrchen pipettiert: 10 μ l CD127 PE, 10 μ l CD25 FITC sowie 20 μ l CD4 APC. Danach wurden 100 μ l EDTA-Blut des Patienten hinzu gegeben. Nach vorsichtigem Vortexen des Röhrchens folgte eine 15 minütige Inkubationsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Die BD FACS Lysing Solution (10-fach Konzentrat) wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden 2 ml der einfachen BD FACS Lysing Solution in das Röhrchen gegeben. Wiederum folgte nach vorsichtigem Vortexen eine 15 minütige Inkubationsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Probe fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und dekantiert. Anschließend wurde 2 ml Waschpuffer hinzugegeben. 500 ml des Waschpuffers bestehen aus PBS, 2,5 g BSA (bovine serum albumine, Sigma[®]) mit 500 μ l Natriumazid (5%). Nach vorsichtigem Vortexen wurde die Probe erneut für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und dekantiert. Abschließend wurde 0,5 ml PBS hinzugefügt.

Vor der Analyse durch FACSCalibur, wurden die Proben zur Reduzierung der Aggregation ein letztes Mal auf dem Vortexmischer vorsichtig gemischt. Die Analyse erfolgte unmittelbar nach dem Färben der Zellen.

2.2.3 Auswertung der Treg Messung

Die Auswertung der Messung erfolgte mit Hilfe des Programms „CellQuest Pro BD“.

Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften und der Anfärbung mit CD4 werden Helfer-T-Zellen identifiziert. Innerhalb der CD4⁺ Zellen werden regulatorische T-Zellen als CD25^{high} und CD127^{low} bestimmt (Liu et al. 2006, Chen et al. 2011, Ekong et al. 2011).

Berechnung der Testergebnisse:

Die Treg werden als Prozentsatz der CD 25^{high} und CD127^{low} Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Dies entspricht dem rechten unteren Quadranten (lower right, LR) im Dot-Plot CD25 vs CD127 (Abbildung 5).

Normalwerte:

Bei einer Population von erwachsenen Blutspendern wurden folgende Normwerte ermittelt.

Normalwerte regulatorischer T - Zellen	
Mittelwert	7,89
Standardabweichung	1,1
Normbereich (2s)	5,69-10,09

Tabelle 2: Normalwerte regulatorischer T-Zellen

Bewertung der Ergebnisse

Der Anteil an CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Zellen stellt eine Abschätzung des Anteils der regulatorischen Zellen aufgrund des Oberflächenmarker-Profiles dar. Insbesondere CD25 kann im Rahmen einer ablaufenden Immunreaktion auch auf Effektorzellen erhöht sein.

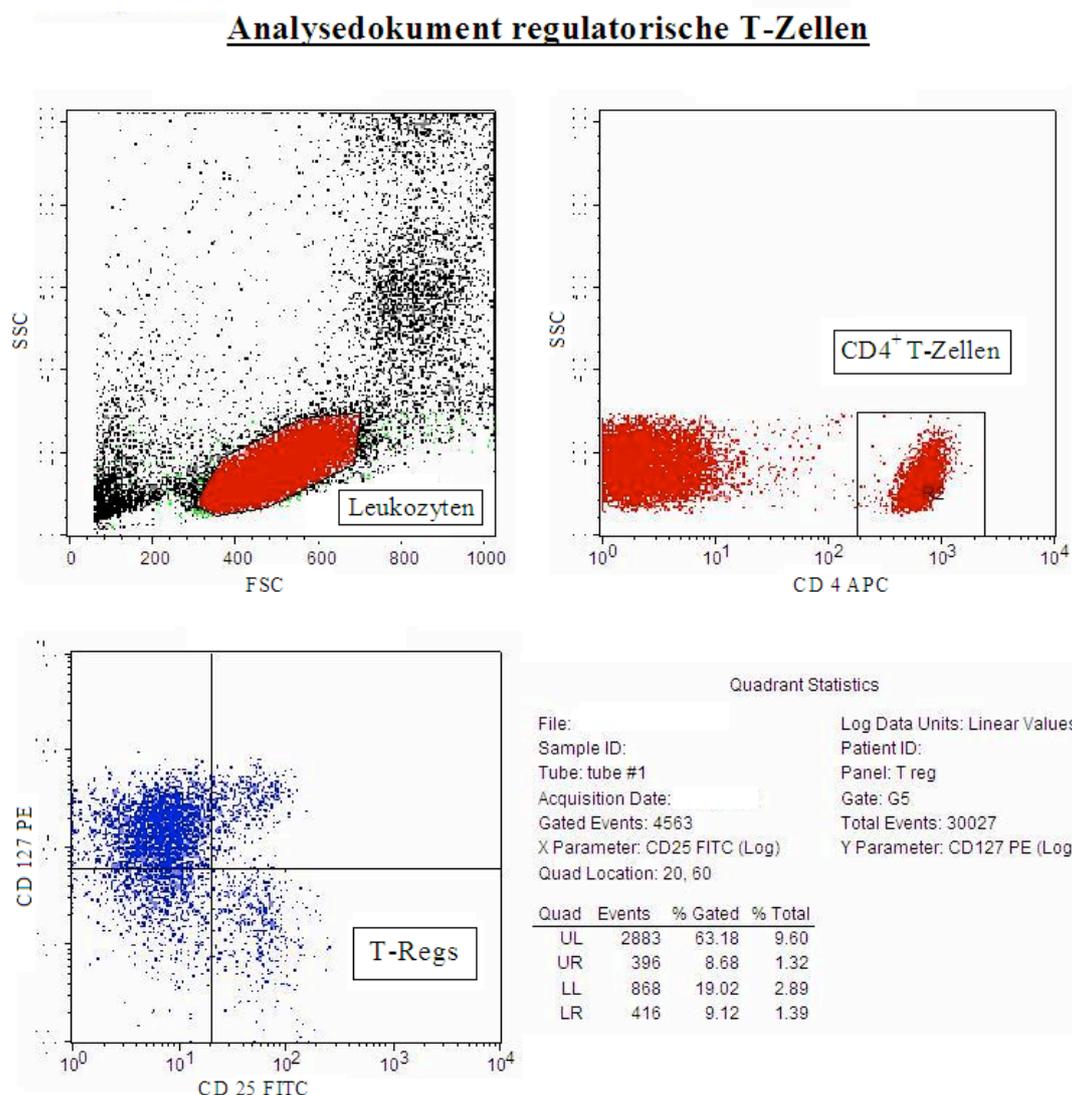


Abbildung 5: Analysedokument regulatorische T-Zellen

(Anteil Treg bei diesem Patienten 9,12%)

2.3.4 Basispanel-Messung (BD Multitest)

Für die Basispanel-Messung wurde der Multitest IMK-Kit von Becton Dickinson verwendet (Ablauf des Färbungsvorgangs wie bei der Treg-Messung). Bei diesem handelt es sich um ein direktes Vierfarben-Immunofluoreszenz-Reagenzienkit, das per FACS zur Identifizierung und Bestimmung der prozentualen Anteile und Absolutwerte der folgenden, reifen, humanen Lymphozyten-Subpopulationen in Vollblut nach Erythrozytenlyse dient:

- T-Lymphozyten (CD3⁺)
- B-Lymphozyten (CD19⁺)
- Helfer-/Inducer-T-Lymphozyten (CD3⁺/CD4⁺)

- Suppressor-/cytotoxische T-Lymphozyten (CD3⁺/CD8⁺)
- natürliche Killer-Lymphozyten NK (CD3⁻/CD16⁺ und/oder CD56⁺)

Die Auswertung der Messung erfolgte mit Hilfe der BD Cell-Quest Software.

2.3 Sandwich-ELISA: Zytokinbestimmung

2.3.1 Material, Geräte, Reagenzien und verwendete Antikörper

Material (Kits*):

Quantikine: Human IL-2 sR α (Lot: 261096)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Quantikine HS (High Sensitivity): Human IL-4 (Lot: 266153)	
Quantikine: Human IL-6 (Lot: 262926)	
Quantikine: Human IL-10 (Lot: 261582)	
Quantikine: Human IFN- γ (Lot: 261674)	
Quantikine: Human TNF- α /TNFSF1A (Lot: 262607)	
Quantikine: Human TGF- β 1 (Lot: 263398)	

* Dabei enthält ein Kit jeweils die entsprechenden 96 well microplates, conjugate, standard, assay diluent, calibrator diluent, wash buffer concentrate, collar reagents, Stopp solution sowie plate covers.

Geräte:

Dynatech Reader MR500	Dynatech Laboratories Inc., Alexandria VA, USA
Laborpipetten (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Transferette (8 Kanal)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Tischzentrifuge, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge, 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge, Megafuge 2.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

2.3.2 Quantifizierung von Zytokinkonzentrationen

Folgende Zytokine (bzw. bei IL-2 der lösliche IL-2 Rezeptor α) wurden mithilfe der ELISA Kits Quantikine (R&D Systems) gemessen: IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β und TNF- α .

Grundlage der Zytokinmessung ist das Prinzip der Sandwich-ELISA Technik („enzyme linked immunosorbent assay“), welches am Beispiel von IL-10 im Folgenden skizziert wird:

Ein IL-10 spezifischer monoklonaler Antikörper wurde auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Standards, Proben und Konjugate werden in die Reagenzgläser pipettiert, wodurch jedes im Reagenzglas befindliche IL-10 Zytokin durch den immobilisierten Antikörper gebunden wird. Nach dem Herauswaschen jeglicher, ungebundener Substanzen, wird ein für IL-10 spezifischer enzymgebundener monoklonaler Antikörper hinzugegeben. Es folgt ein erneuter Waschvorgang, der das Entfernen aller ungebundenen Antikörper-Enzyme als Ziel hat. Danach wird eine Substratlösung hinzu gegeben, wodurch sich ein gewisser Farbumschlag einstellt, dessen Intensität in Relation zur im ersten Schritt gebundenen IL-10 Menge steht. Der Farbumschlag wird gestoppt und die Farbintensität gemessen.

Zusammenfassung des Messvorgangs (wiederum am Beispiel von IL-10):

1. Vorbereiten der Reagenzien, Standards und Proben.
2. Hinzugeben von 50 μ l Assay Diluent RD1W in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte („Well“)
3. Hinzugeben von 200 μ l Standard, Kontrolle bzw. Serum.
4. Zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur
5. Viermaliges Aspirieren und Waschen
6. Hinzugeben von 200 μ l Konjugat in jedes Well.
7. Zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur
8. Viermaliges Aspirieren und Waschen
9. Dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
10. Hinzugeben von 50 μ l Stop-Lösung in jedes Well.
11. Messung bei 450 nm innerhalb 30 Minuten (λ Correction bei 570nm).

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und erfolgten nach den bekannten Vorgaben für dieses Verfahren. Eichkurven als Referenz wurden stets erstellt.

Außerdem wurde darauf geachtet, dass für die Messung von IL-2 sR α und TGF- β noch vor den oben beschriebenen Messvorgängen eine zusätzliche Verdünnung notwendig war.

2.4 Durchführung der Leberbiopsie

Die sonographisch gesteuerte Leberbiopsie ist ein wichtiges diagnostisches Mittel um nach LTx zwischen akuter und chronischer Transplantatabstoßung, toxischem Leberzellschaden oder infektionsbedingten Komplikationen zu differenzieren. Außerdem dient diese Methode zur Abklärung einer unklaren Hepatopathie.

Ein aktueller Gerinnungsstatus (Quick und PTT) sowie die Thrombozytenzahl müssen vor dem Eingriff bestimmt werden, um schwere Gerinnungsstörungen ausschließen zu können.

Während Biopsien nach LTx ohnehin eine sonographische Kontrolle erfordern, sollte bei allen anderen Indikationen im Vorfeld zumindest einmal eine Ultraschalluntersuchung erfolgt sein, um Lageanomalien der inneren Organe oder ein interponiertes Darmanteile (Chilaiditi-Syndrom) ausschließen zu können. Für diese Untersuchung wird in der pädiatrischen Abteilung der Radiologie im UKE ein 2-5, 4-7 oder 5-12 MHz Schallkopf zusammen mit einem kommerziellen HDI 5000 Ultraschallgerät (Philips Corp., Niederlande) eingesetzt.

Bei der Durchführung der perkutanen Leberbiopsie ist auf Folgendes zu achten:

- Die Untersuchung wird in Rückenlage durchgeführt.
- Erfolgt eine Biopsie ohne sonographische Kontrolle wird der Punktionsort durch Perkussion unterhalb des Sinus phrenicocostalis zwischen vorderer und mittlerer Axillarlinie bestimmt.
- Die Analgosedierung wird üblicherweise mit 0,1 mg/kg KG Midazolam (Dormicum®) i.v. und 1 bis 2 mg/kg KG Ketamin S (Ketanest S®) durchgeführt
- Nach Hautschnitt erfolgt die Punktion in Richtung auf den Massenmittelpunkt der Leber bzw. nach Vorgabe des Radiologen
- Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Blutdruck werden während und bis zu zwei Stunden nach dem Eingriff kontinuierlich am Monitor überwacht.

Nach erfolgter Leberbiopsie werden die gewonnenen Biopsate umgehend in Formalinlösung eingebracht und von einem erfahrenen Pathologen histologisch untersucht. Hierbei werden stets eine Hämatoxylin- und Eosinfärbung durchgeführt. Nur bei speziellen Fragestellungen werden weitere Techniken (histologisch, elektronenmikroskopisch, molekulargenetisch, etc.) angewandt.

Die Biopsien werden mit der Menghini-Nadel (Menghini 1958) in so genannter Frei-Hand-Technik durchgeführt.

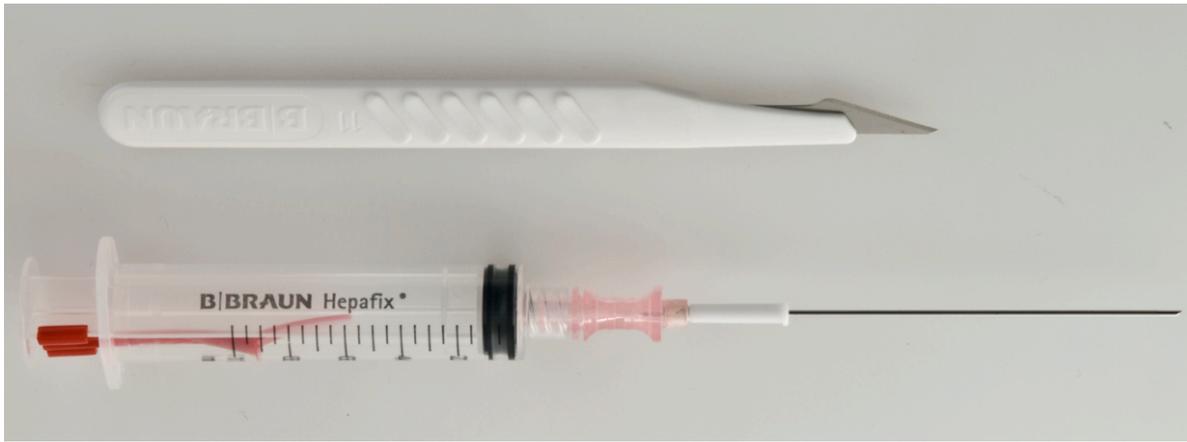


Abbildung 6: Skalpell und Menghini Nadel

Hepafix, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SigmaStat (Systat Software GmbH, Erkrath, D). Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Der Vergleich zweier Patientengruppen erfolgte mittels t-Test. Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung verschiedener Merkmale wurden mit dem Chi-Square-Test ermittelt.

Ein statistisches Niveau von $p < 0,05$ galt als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

In der vorliegenden Studie wurden 60 pädiatrische Patienten nach LTx untersucht.

Elf nicht-transplantierte Patienten, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Leberbiopsie vorgenommen wurde, dienten als Kontrollkollektiv („**Kontrolle**“).

In der Gruppe „**akute Rejektion**“ wurden sieben Patienten mit erhöhten Transaminasen und Bilirubinwerten untersucht, bei denen sich histologisch eine akute Rejektion zeigte. Kriterien hierfür waren u.a. eine portale Entzündung mit fokal lymphozytärer Infiltration von Gallengängen, Gallengangläsionen und Endothelitis. Dies entsprach einem Banff-Score $\geq 4/9$.

Neun Patienten wurden der Gruppe „**chronische Rejektion**“ zugeordnet. Bei diesen Patienten zeigte sich neben persistierend erhöhten Transaminasen und Bilirubinwerten histologisch eine chronische Rejektion mit Duktulopenie, lymphozytäre Durchsetzung der verbreiterten Portalfelder, der Verlust kleiner Gallengänge, eine portale Fibrose und zum Teil der Übergang in eine Leberzirrhose. Dies entsprach ebenfalls einem Banff-Score $\geq 4/9$. Bei fünf dieser neun Patienten zeigte sich eine portale Hypertension mit Hyperspleniesyndrom.

Insgesamt stellten sich 44 Patienten ohne klinische oder laborchemische Zeichen einer Abstoßungsreaktion zur LTx-Jahreskontrolle vor, bei der eine Protokollbiopsie durchgeführt wurde. Bei 36 % (n = 16) dieser Patienten zeigte sich histologisch eine milde Rejektion (Banff 2-3/9) mit Endothelitis ohne Gallengangläsion, so dass sie der Gruppe „**milde Rejektion**“ zugeordnet wurden. In die Gruppe „**keine Rejektion**“ wurden 28 transplantierte Patienten ohne Zeichen einer Abstoßungsreaktion bei geringer Immunsuppression aufgenommen (prope tolerance). Bei diesen Patienten zeigte sich histologisch ein Normalbefund, bei vier Patienten dieser Gruppe wurde ein geringer toxischer Schaden entsprechend einem diffusen Parenchymschaden mit wenigen Einzelzellnekrosen diagnostiziert.

Patienten, bei denen eine chronische Rejektion diagnostiziert wurde, waren zum Zeitpunkt der Transplantation jünger, jedoch unterschieden sich die Gruppen bezüglich des Alters bei Studieneintritt sowie der Geschlechterverteilung nicht (Tabelle 3).

In der Gruppe der akuten Rejektion wurden die Patienten im Vergleich zu den Studienteilnehmern anderer Patientengruppen innerhalb eines kürzeren Zeitraums nach LTx untersucht (Tabelle 3).

Gruppen / Charakteristika	Anzahl & Geschlecht (m / w)	Alter bei LTx*	Alter bei Studieneintritt bzw. diagnostischer Biopsie*	Jahre nach LTx bei Studieneintritt*
akute Rejektion	7 (3/4)	6 ± 1,9 [1 - 13]	9 ± 1,6 [1 -13]	2,6 ± 1,1 [0 - 6]
chronische Rejektion	9 (6/3)	1 ± 0,3 [1 - 4]	8 ± 1,2 [2 -14]	7,1 ± 1,3 [0 - 14]
milde Rejektion**	16 (8/8)	4 ± 1,1 [1 - 13]	10 ± 1,1 [3 - 16]	6,7 ± 0,8 [1 - 11]
keine Rejektion**	28 (14/14)	2 ± 0,4 [1 - 8]	9 ± 0,7 [3 - 17]	7,5 ± 0,7 [1 -16]
Kontrolle	11 (6/5)	-	8 ± 1,7 [1 - 17]	-

*Jahre als Mittelwert ± SEM [Range]

**Protokollbiopsie

Tabelle 3: Patientencharakteristika der jeweiligen Studiengruppe

3.2 LTx-Indikationen der Studienteilnehmer

Abb. Nr. 7 fasst die verschiedenen LTx-Indikationen der Studienteilnehmer zusammen.

In der Gruppe der metabolischen Erkrankungen wurden folgende Krankheiten zusammengefasst: α 1-Antitrypsinmangel (n = 2), Tyrosinämie (n = 1), Citrullinämie (n = 1), OTC-Mangel (n = 1) und CDG-Syndrom (n=1).

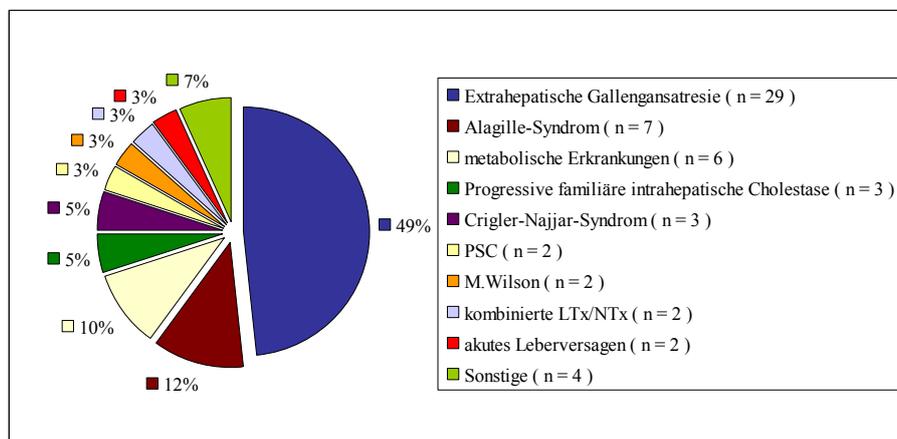


Abbildung 7: LTx-Indikationen der Studienteilnehmer

Bei einem Patienten lag ein durch eine Enterovirusinfektion ausgelöstes akutes Leberversagen vor, im anderen Falle blieb die Ätiologie des Leberversagens ungeklärt. Kombiniert leber- und nierentransplantiert wurde ein Patient mit einer polyzystischen Nierenerkrankung und cholangiodysplastischer Pseudozirrrose sowie ein Studienteilnehmer mit Hyperoxalurie Typ 1.

Unter „Sonstige“ wurden folgende Erkrankungen von insgesamt vier Studienteilnehmern zusammengefasst: Leberzirrhose unklarer Genese (n = 1), kongenitale Leberfibrose (n = 1), neonatale Hämochromatose (n = 1) und Pfortader-Milzvenenthrombose (n = 1).

In der Gruppe der „akuten Rejektion“ wurden die Patienten aufgrund folgender Indikationen lebertransplantiert: Alagille-Syndrom (n = 2), extrahepatische Gallengangsatresie (n = 1), M. Wilson (n = 1), kongenitale Leberfibrose (n = 1), Kombinierte NTx/LTx (n = 1), Pfortader-Milzvenenthrombose (n = 1).

Bei den Patienten der Gruppe „chronische Rejektion“ waren folgende Indikationen Grund einer Lebertransplantation: extrahepatische Gallengangsatresie (n = 6), akutes Leberversagen (n = 1), kombinierte NTx/LTx (n = 1), CDG-Syndrom (n = 1).

Folgende Indikationen führten bei den Patienten der Gruppe „milde Rejektion“ zu einer LTx: extrahepatische Gallengangsatresie (n = 7), PSC (n = 2), PFIC (n = 2), Alagille-Syndrom (n = 1), Crigler-Najjar-Syndrom (n = 1), M. Wilson (n = 1), Tyrosinämie (n = 1), Leberzirrhose unklarer Genese (n = 1).

In der Gruppe „keine-Rejektion“ wurden die Patienten aufgrund folgender Indikationen lebertransplantiert: extrahepatische Gallengangsatresie (n = 15), Alagille-Syndrom (n = 4), Crigler-Najjar-Syndrom (n = 2), α 1-Antitrypsinmangel (n = 2), Citrullinämie (n = 1), neonatale Hämochromatose (n = 1), PFIC (n = 1), OTC-Mangel (n = 1), akutes Leberversagen (n = 1).

3.3 Operationstechniken bei Lebertransplantation

Bei 60 Studienteilnehmern wurden insgesamt 65 Lebertransplantationen durchgeführt, wobei bei fünf Patienten eine Retransplantation (Re-LTx) vorgenommen wurde. Abbildung 8 und Tabelle 4 fassen die verschiedenen Operationstechniken zusammen.

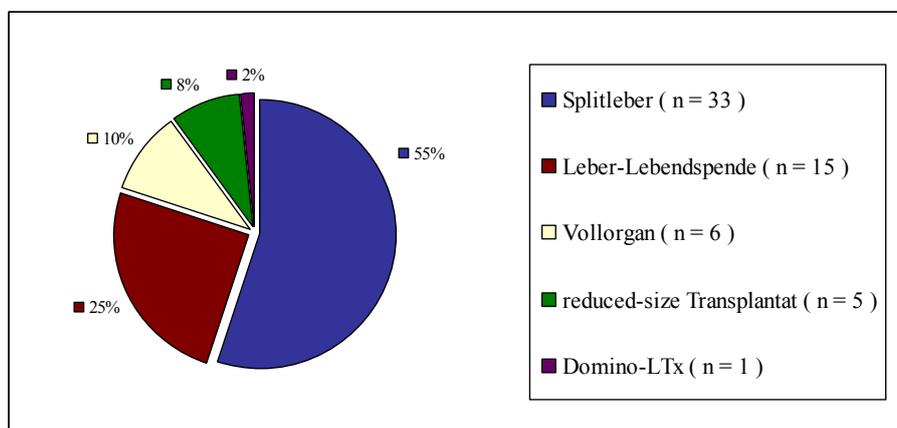


Abbildung 8: LTx-Operationstechniken aller Studienteilnehmer

In der Gruppe der Leber-Lebendspende zeigte sich ein hoher Anteil an Patienten ohne histologische oder laborchemische Anzeichen einer Rejektion (ns).

Gruppen / Operationstechniken	Splitleber *	Leber-Lebendspende *	Vollorgan *	Reduced-size Transplantat *	Domino-LTx *
akute Rejektion	3	1	2	1	-
chronische Rejektion	8	1	-	-	-
milde Rejektion	7	3	3	2	1
keine Rejektion	15	10	1	2	-

* n = Anzahl der Patienten

Tabelle 4: LTx-Operationstechniken in den einzelnen Patientengruppen

3.4 Immunsuppression

Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben erfolgt die initiale Immunsuppression nach pädiatrischer LTx am Hamburger Transplantationszentrum mit Kortikosteroiden, einem Calcineurininhibitor sowie seit 1998 zusätzlich mit dem Interleukin 2-Rezeptorantagonisten Basiliximab.

Bei 25 Patienten wurde aufgrund rezidivierender Rejektionen oder Nebenwirkungen ein Wechsel bzw. eine zusätzliche Gabe eines weiteren Immunsuppressivums vorgenommen.

Die Immunsuppression der Patienten der vorliegenden Studie ist in den Tabellen 5 bis 8 dargestellt.

akute Rejektion		n
Beginn der Immunsuppression	CSA und Steroide	1
	CSA, Steroide und Basiliximab	6
Immunsuppressiva bei Studieneintritt	CSA (Talspiegel 117 µg/l [64-159 µg/l]) + Azathioprin (n = 1)	4
	Tacrolimus (Talspiegel 9,0 µg/l [4,9-14 µg/l])	3

Tabelle 5: Immunsuppression der Gruppe „akute Rejektion“

chronische Rejektion		n
Beginn der Immunsuppression	CSA und Steroide	4
	CSA, Steroide und Basiliximab	5
Immunsuppressiva bei Studieneintritt	CSA (Talspiegel 71 µg/l [51-92 µg/l]) + MMF (n = 2) + Everolimus (n = 1)	5
	Tacrolimus (Talspiegel 7,8 µg/l [3,7-9,5 µg/l]) + Azathioprin (n = 1) + Everolimus (n = 1)	4

Tabelle 6: Immunsuppression der Gruppe „chronische Rejektion“

milde Rejektion		n
Beginn der Immunsuppression	CSA und Steroide	3
	CSA, Steroide und Basiliximab	8
	Tacrolimus und Steroide	1
	Tacrolimus, Steroide und Basiliximab	4
Immunsuppressiva bei Studieneintritt	CSA (Talspiegel 76,5 µg/l [36-129 µg/l])	8
	Tacrolimus (Talspiegel 5,8 µg/l [3,9-9,5 µg/l]) + MMF (n = 1)	8

Tabelle 7: Immunsuppression der Gruppe „milde Rejektion“

keine Rejektion		n
Beginn der Immunsuppression	CSA und Steroide	5
	CSA, Steroide und Basiliximab	21
	Tacrolimus und Steroide	2
Immunsuppressiva bei Studieneintritt	CSA (Talspiegel 64 µg/l [34-112 µg/l])	15
	Tacrolimus (Talspiegel 5,8 µg/l [2,1-9,5 µg/l]) + MMF (n = 1)	13

Tabelle 8: Immunsuppression der Gruppe „keine Rejektion“

3.5 Biopsieergebnisse der Kontrollgruppe

Bei insgesamt elf Studienteilnehmern wurde eine Leberbiopsie aufgrund einer unklaren Hepatopathie durchgeführt. Während des Eingriffs sowie postinterventionell traten wie auch bei allen anderen Patienten der vorliegenden Studie keine Komplikationen auf. Abbildung 10 gibt Auskunft über die verschiedenen Biopsieergebnisse der Kontrollgruppe.

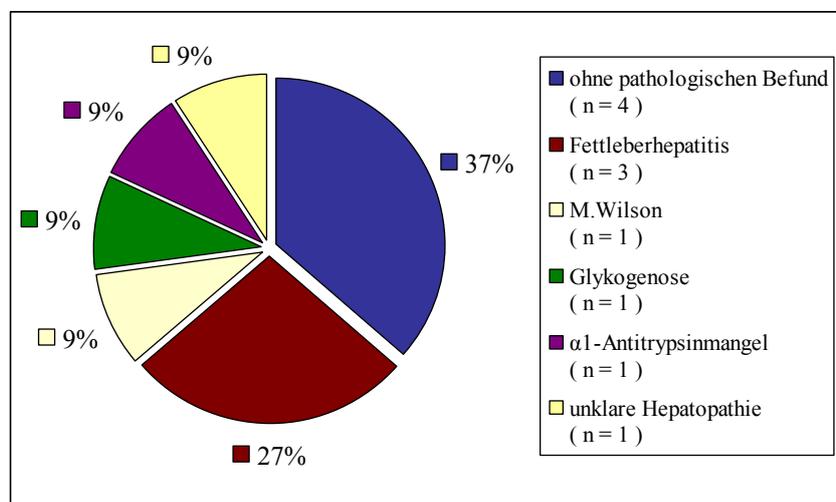


Abbildung 10: Biopsieergebnisse der Kontrollgruppe

3.6 Ergebnisse der FACS-Messungen

Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung wurden Lymphozytensubpopulationen und regulatorische T-Zellen bestimmt.

Hierfür wurden aus dem Vollblut der Patienten folgende immunologisch bedeutende Oberflächenmarker auf Lymphozyten bestimmt, die eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Abstoßungsreaktionen des transplantierten Organs einnehmen: CD2, CD3, CD45, CD4/CD25/, CD14/CD3, CD8, und CD127. Regulatorische T-Zellen wurden über ihr spezifisches Oberflächenmarkerprofil gemessen ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$).

3.6.1 Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lebertransplantation war die Gesamtzahl peripherer Lymphozyten bei Patienten nach pädiatrischer LTx niedriger (Abbildung 11). Insbesondere bei Patienten mit chronischer Rejektion war eine signifikant geringere Gesamtlymphozytenzahl nachzuweisen.

Normwerte für durchschnittliche Gesamtlymphozytenzahlen werden von Comans-Bitter et al. wie folgt angegeben: im Alter von 1-24 Monaten 6000 Lymphozyten / μ l [2600-11900], im Alter von 2-5 Jahren 3300 Lymphozyten / μ l [1700-6900] und im Alter von 5-16 Jahren 2500 Lymphozyten / μ l [1000-5900] (Comans-Bitter et al. 1997).

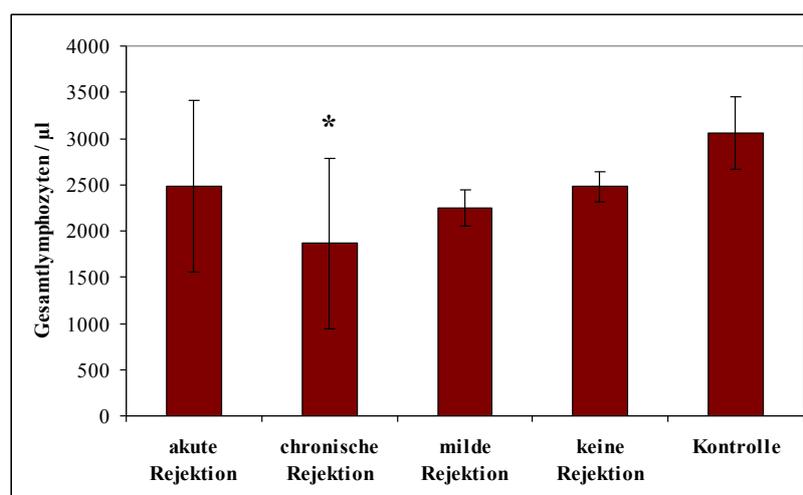


Abbildung 11: Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut

3.6.2 Verhältnis von CD4⁺ Zellen zu CD8⁺ Zellen im peripheren Blut

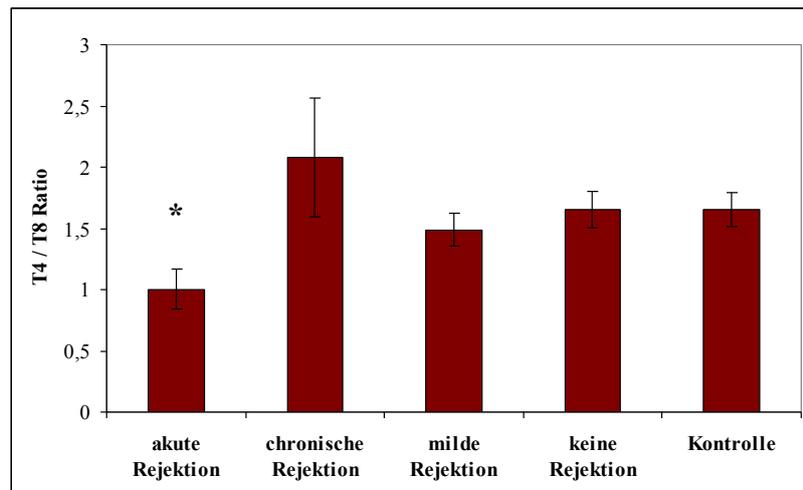


Abbildung 12: T4 / T8 - Ratio

Bei Patienten mit einer akuten Rejektion zeigte sich eine niedrige T4/T8-Ratio. Aufgrund einer geringen Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten bzw. hohen Anzahl an CD8⁺ Lymphozyten war das Verhältnis von T4-Zellen zu T8-Zellen im peripheren Blut signifikant zu T8-Zellen verschoben.

Normwerte für das Verhältnis von T4-Zellen zu T8-Zellen: im Alter von 1-24 Monaten T4/T8 2,6 [0,9-6,3], im Alter von 2-5 Jahren T4/T8 1,6 [0,9-2,9] und im Alter von 5-16 Jahren T4/T8 1,4 [0,9-3,4] (Comans-Bitter et al. 1997).

Gruppen / Lymphozyten	CD4 ⁺ Helfer Lymphozyten (%)	CD4 ⁺ Helfer Lymphozyten (/ µl)	CD8 ⁺ zytotox. Lymphozyten (%)	CD8 ⁺ zytotox. Lymphozyten (/ µl)
akute Rejektion	32 ± 4,4	730 ± 196	33 ± 2,5	715 ± 202
chronische Rejektion	43 ± 2,7	770 ± 115	25 ± 3	533 ± 133
milde Rejektion	37 ± 1,4	817 ± 67	26 ± 1,8	609 ± 76
keine Rejektion	39 ± 1,6	973 ± 87	26 ± 1,3	637 ± 46
Kontrolle	40 ± 1,6	1209 ± 145	26 ± 1,9	783 ± 120

Tabelle 9: Relative und absolute Anzahl CD4⁺ bzw. CD8⁺ Lymphozyten

Normwerte für absolute sowie prozentuale CD4⁺ Helfer-Lymphozyten bzw. CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten werden von Comans-Bitter et al. wie folgt angegeben:

CD4⁺ Helfer-Lymphozyten (prozentual): im Alter von 1-24 Monaten 46 % [25-68], im Alter von 2-5 Jahren 37 % [23-48] und im Alter von 5-16 Jahren 37 % [25-53].

CD4⁺ Helfer-Lymphozyten (absolut): im Alter von 1-24 Monaten 2260 / µl [900-5500], im Alter von 2-5 Jahren 1300 / µl [500-2400] und im Alter von 5-16 Jahren 900 / µl [300-2100].

CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten (prozentual): im Alter von 1-24 Monaten 17 % [9-32], im Alter von 2-5 Jahren 24 % [14-32] und im Alter von 5-16 Jahren 25 % [9-35].

CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten (absolut): im Alter von 1-24 Monaten 1080 / μ l [400-2300], im Alter von 2-5 Jahren 800 / μ l [300-1600] und im Alter von 5-16 Jahren 600 / μ l [200-1800] (Comans-Bitter et al. 1997).

3.6.3 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut

In der Gruppe lebertransplantiertes Kinder mit einer Rejektion unterschied sich der prozentuale Anteil regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen nicht von Patienten, bei denen eine Protokollbiopsie durchgeführt wurde und ein histologischer Normalbefund oder eine milde Rejektion erhoben wurde.

Bei nicht organtransplantierten Patienten lag dieser prozentuale Anteil mit 7,78 % signifikant höher (Abbildung 13).

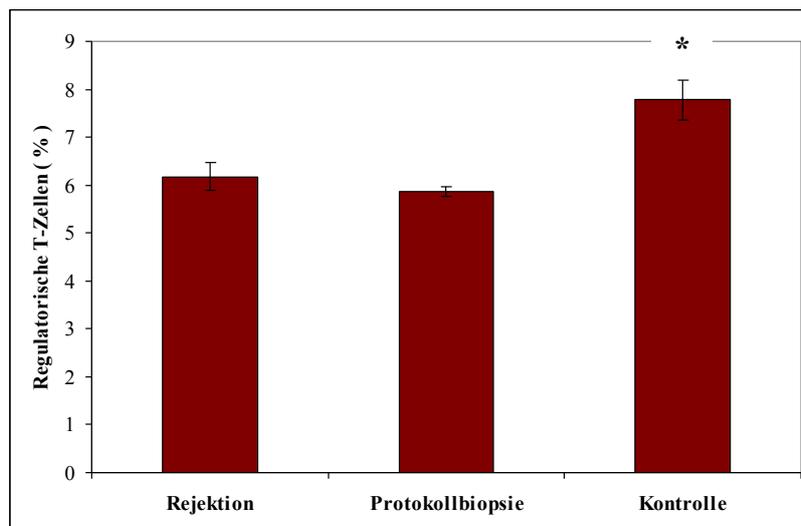


Abbildung 13: Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut

Patienten, die bei ihrer LTx eine Leberlebenspende erhielten, wiesen signifikant höhere Konzentrationen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut auf als Patienten, denen eine Splitleber transplantiert wurde (Abbildung 14).

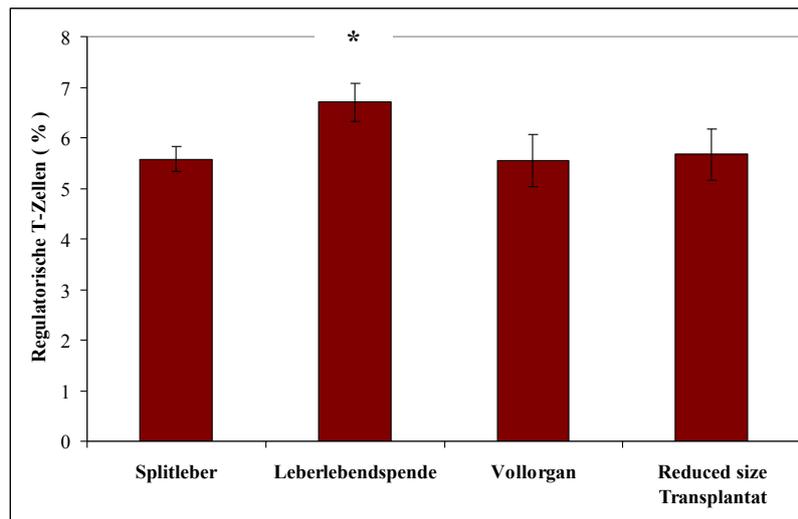


Abbildung 14: Treg Konzentrationen bei verschiedenen Operationstechniken bei LTx

3.6.4 B-Lymphozyten und T-Lymphozyten im peripheren Blut

Die relative und absolute Anzahl der B-Lymphozyten bzw. T-Lymphozyten unterschied sich bei den lebertransplantierten Patienten nicht signifikant.

Gruppen / Lymphozyten	B-Lymphozyten (%)	B-Lymphozyten (/ μ l)	T-Lymphozyten (%)	T-Lymphozyten (/ μ l)
akute Rejektion	16 \pm 3,3	498 \pm 251	71 \pm 4,8	1588 \pm 419
chronische Rejektion	16 \pm 0,6	295 \pm 44	74 \pm 1,3	1402 \pm 256
milde Rejektion	15 \pm 1,2	348 \pm 40	70 \pm 1,4	1581 \pm 159
keine Rejektion	16 \pm 1	414 \pm 44	72 \pm 1,2	1830 \pm 130
Kontrolle	18 \pm 1,9	609 \pm 118	69 \pm 2,2	2107 \pm 269

Tabelle 10: Relative und absolute Anzahl der B-Lymphozyten bzw. T-Lymphozyten

Normwerte für absolute sowie prozentuale B- bzw. T-Zellwerte:

B-Lymphozyten (prozentual): im Alter von 1-24 Monaten 22 % [4-41], im Alter von 2-5 Jahren 24% [14-44] und im Alter von 5-16 Jahren 17 % [8-31].

B-Lymphozyten (absolut): im Alter von 1-24 Monaten 1260 / μ l [600-3100], im Alter von 2-5 Jahren 800 / μ l [200-2100] und im Alter von 5-16 Jahren 400 / μ l [200-1600].

T-Lymphozyten (prozentual): im Alter von 1-24 Monaten 66 % [39-85], im Alter von 2-5 Jahren 64% [43-76] und im Alter von 5-16 Jahren 68 % [52-78].

T-Lymphozyten (absolut): im Alter von 1-24 Monaten 3780 / μ l [1400-8000], im Alter von 2-5 Jahren 2300 / μ l [900-4500] und im Alter von 5-16 Jahren 1700 / μ l [700-4200]

(Comans-Bitter et al. 1997).

3.7 Ergebnisse der Zytokinbestimmungen

Der Immunstatus des Transplantatempfängers wurde zusätzlich durch Bestimmung von Zytokinen als Botenstoffe einer Abstoßungsreaktion untersucht. In abzentrifugiertem Patientenserum wurden die Konzentrationen von IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ und TNF- α durch ELISA-Kits gemessen.

3.7.1 Interleukin 2 sR α im peripheren Blut

Gruppen / Zytokine	IL-2 sR α (pg/ml)
akute Rejektion	4145 \pm 1825
chronische Rejektion	3067 \pm 917
milde Rejektion	2259 \pm 292
keine Rejektion	1670 \pm 166
Kontrolle	1530 \pm 251
Normwert *	1055 [458-1997]

Tabelle 11: IL-2 sR α Konzentrationen im peripheren Blut

* Angabe des Herstellers: Quantikine IL-2 sR α , R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Patientengruppen konnten vor allem für Serumkonzentrationen von IL-2 sR α Konzentrationen im peripheren Blut festgestellt werden. Abbildung 15 veranschaulicht die signifikant höhere IL-2 sR α Konzentration bei Patienten mit einer Rejektion im Vergleich zu Patienten, die keine Anzeichen einer Rejektion aufwiesen bzw. Probanden des Kontrollkollektivs.

Fasst man Patienten ohne Rejektion sowie solche mit einer milden Abstoßung zusammen, so ergibt sich auch für diese Gruppe (Protokollbiopsie) ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den höheren IL-2 sR α Konzentrationen bei Patienten mit einer Rejektion.

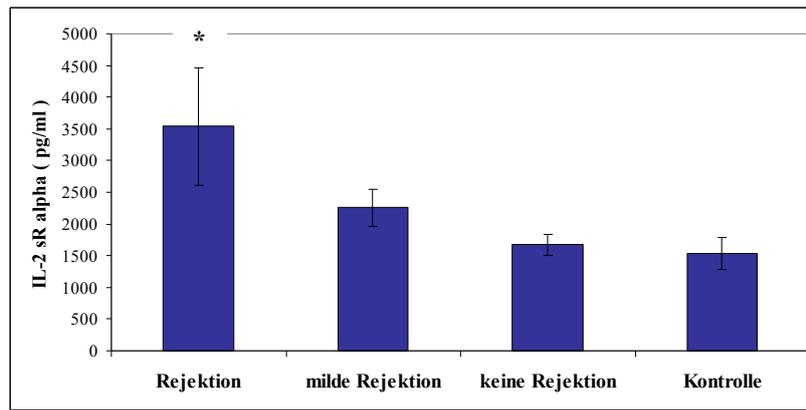


Abbildung 15: IL-2 sR α Konzentrationen im peripheren Blut

3.7.2 Interferon γ im peripheren Blut

Patienten mit einer akuten Rejektion des transplantierten Organs wiesen von allen Patientengruppen die höchsten IFN- γ Konzentrationen im peripheren Blut auf. Abbildung 16 veranschaulicht diese Tendenz, die allerdings aufgrund der geringen Teststärke nicht signifikant ist.

Normwerte der IFN- γ Konzentration im peripheren Blut werden vom Hersteller mit einem Wert kleiner 15,6 pg/ml angegeben (Quantikine IFN- γ , R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D).

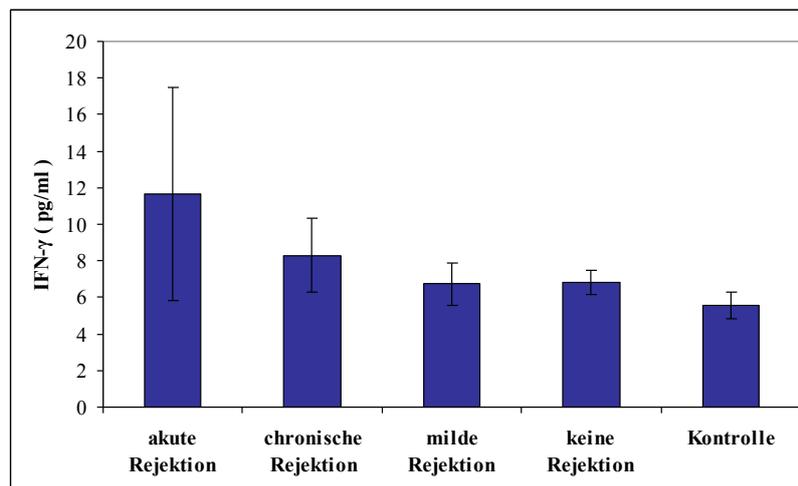


Abbildung 16: IFN- γ Konzentrationen im peripheren Blut

3.7.3 Interleukin 6 im peripheren Blut

Von allen Patientengruppen waren die im peripheren Blut gemessenen Konzentrationen an IL-6 bei Patienten mit einer chronischen Rejektion am höchsten. Niedrige Werte konnten bei Patienten ohne Rejektion ermittelt werden (ns). Normwerte werden vom Hersteller mit IL-6 Konzentrationen kleiner 3,1 pg/ml angegeben (Quantikine IL-6, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D).

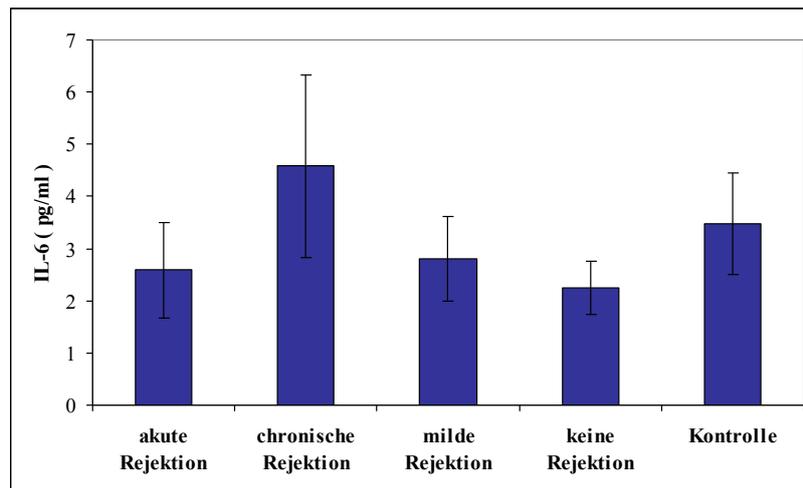


Abbildung 17: IL-6 Konzentrationen im peripheren Blut

3.7.4 Interleukin 4 und TGF- β im peripheren Blut

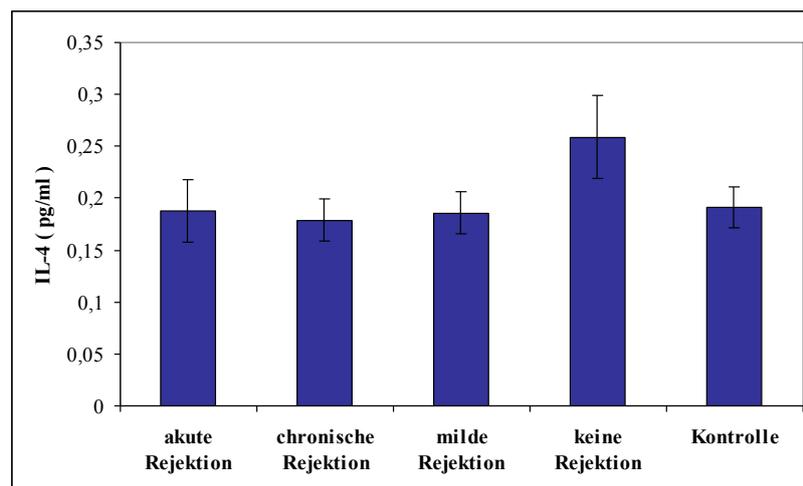


Abbildung 18: IL-4 im peripheren Blut

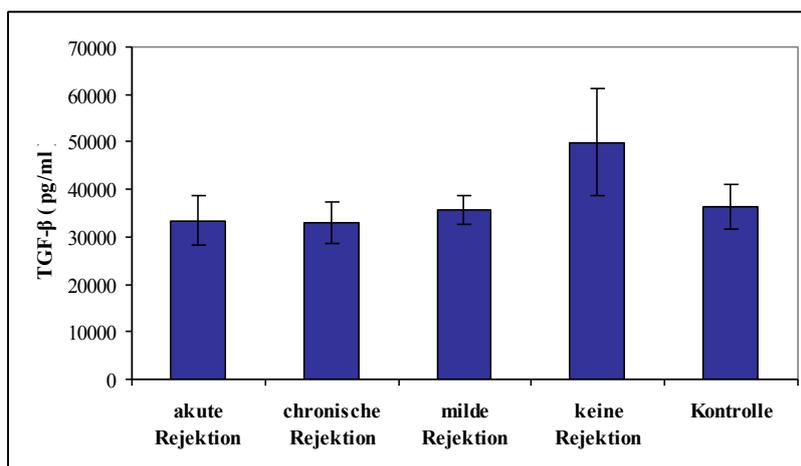


Abbildung 19: TGF-β im peripheren Blut

Die höchsten IL-4 sowie TGF-β Serumkonzentrationen wurden jeweils bei Patienten gemessen, die keine Anzeichen einer Rejektion aufwiesen. Doch auch wenn Abbildung 18 und 19 tendenzielle Unterschiede dieser Patientengruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen andeuten, waren diese nicht signifikant.

Normwerte für IL-4 werden vom Hersteller mit Konzentrationen $< 0,25$ pg/ml bzw. für TGF-β mit Konzentrationen um 39600 pg/ml [18300-63400] angegeben (Quantikine IL-4 und TGF-β, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D).

3.7.5 TNF-α und Interleukin 10 im peripheren Blut

Die Messungen der Zytokinkonzentrationen für TNF-α und IL-10 ergaben in den jeweiligen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Normwerte beziehen sich auf Angaben des Herstellers (Quantikine TNF-α und IL-10, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D).

Gruppen / Zytokine	TNF-α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
akute Rejektion	9,81 ± 1,35	10,02 ± 1,2
chronische Rejektion	7,68 ± 0,8	8,3 ± 1,47
milde Rejektion	11,82 ± 1,96	9,84 ± 1,07
keine Rejektion	8,73 ± 0,87	8,14 ± 0,98
Kontrolle	8,84 ± 2,2	8,15 ± 1,31
Normwert	$< 15,6$	$< 7,8$

Tabelle 12: TNF-α und IL-10 Konzentrationen im peripheren Blut

4. Diskussion

Entscheidend für eine langfristig gute Funktion des Lebertransplantates ist die Verhinderung akuter und chronischer Transplantatabstoßungen. Diesem Ziel versucht man durch den Einsatz immunsuppressiver Medikamente einen Schritt näher zu kommen. Die bisher übliche Methode zur Überwachung des Transplantationsverlaufs besteht bei regelmäßigen Kontrollen vor allem aus der Bewertung klinischer und laborchemischer Parameter wie Leberfunktionsparameter, Entzündungszeichen, Serumspiegelkontrollen der Immunsuppressiva sowie sonographischen Befunden und diagnostischen Leberbiopsien. Die Gabe der Immunsuppression erfolgt nach einem standardisierten Schema. Da es trotz vergleichbarer Medikamentenspiegel zwischen verschiedenen Patienten interindividuelle Unterschiede im pharmakologischen Ansprechen der Immunsuppressiva gibt und die Spiegel nur sehr unzureichend die individuelle immunologische Wirksamkeit im Sinne der funktionellen Beeinflussung widerspiegeln, führt diese Vorgehensweise im klinischen Alltag leider teilweise zu einer zu hohen oder zu niedrigen Immunsuppression mit ihren bekannten Folgen. Deshalb ist es Ziel, eine individuelle immunsuppressive Therapie zu ermöglichen. Dazu ist es allerdings notwendig, Tests zu validieren, die die immunologische Aktivität des Transplantatempfängers anzeigen und standardisiert mit einem hohen prädiktiven Voraussagewert bei guter Sensitivität und Spezifität einsetzbar sind.

Als bisher einzige Methode, um eine Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ festzustellen, wird das Absetzen der Immunsuppressiva mit dem Risiko einer möglichen Abstoßungsreaktion angesehen (Wieërs et al. 2007). Die Komplexität des Abstoßungsvorgangs erschwert die Suche nach einem geeigneten Marker, der eine Transplantatabstoßung bzw. eine Toleranz anzeigt (Allegre et al. 2007).

Regulatorische T-Zellen könnten als wichtiger Grundstein für ein immunologisches Monitoring nach Organtransplantation dienen. Treg entstehen nach Interaktion von CD4 positiven T-Lymphozyten mit IL-2 und TGF- β und scheinen über eine Hemmung der T-Effektorzelle für Toleranz gegenüber einem Spenderorgan mitverantwortlich zu sein (Kingsley et al. 2002, Li et al. 2008, Sakamoto et al. 2009). Im peripheren Blut erwachsener Transplantatempfänger, die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ aufweisen, waren in einigen Studien regulatorische T-Zellen in signifikant höherer Anzahl nachweisbar als bei Patienten, die ohne immunsuppressive Therapie eine Abstoßungsreaktion aufwiesen (Scheffold et al. 2007, Martinez-Llordella et al 2007, Stenard et al. 2009). Dagegen wurden bei Patienten mit einer akuten Abstoßung ihres Lebertransplantats niedrige Treg Konzentrationen im peripheren Blut gefunden (Demirkirian et al. 2006). In anderen

Untersuchungen fanden sich keinerlei Unterschiede in der Anzahl regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit bzw. ohne Rejektion (Brown und Wong 2008). So bleibt die Validität des Parameters als Bestandteil eines immunologischen Monitoring nach Organtransplantation fraglich.

Auch Abweichungen von peripher zirkulierenden Zytokinkonzentrationen könnten als möglicher Parameter dienen, der eine Toleranz bzw. Abstoßung des Transplantats anzeigen könnte. Zytokine wie IL-2 sR α , IFN- γ und TNF- α werden mit einer Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht (Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007). Dagegen schreibt man den Zytokinen IL-4 und IL-10 eher Toleranz gegenüber dem Spenderorgan zu (Dallman 1995, Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007). Einzelne tierexperimentelle Untersuchungen sehen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer Abstoßungsreaktion und Zytokinen wie IL-2 sR α und IFN- γ , sowie einer Toleranz gegenüber der transplantierten Leber und Zytokinen wie IL-4 und IL-10 (Cao et al. 2007, Chen et al. 2008). Auch auf dem Gebiet der Nierentransplantation konnte gezeigt werden, dass Zytokine wie IL-2 sR α und IFN- γ mit einer Abstoßungsreaktion in Verbindung gebracht werden können, wobei höhere IL-4 Konzentrationen bei Patienten mit einer Toleranz gemessen wurden (Amirzargar et al. 2005, Karczewski et al. 2008). Ebenfalls zeigte sich auf dem Gebiet der Herztransplantation ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-2 sR α und IFN- γ Konzentrationen während einer Abstoßungsreaktion (Liang et al. 2006, Wang et al. 2011).

Insgesamt führte jedoch die Rolle der Zytokine im komplexen Prozess der Transplantatabstoßung bzw. der Toleranzentwicklung zu widersprüchlichen Ergebnissen (Li et al. 2004), so dass auch dieser Parameter bisher nicht in einem validierten Immunmonitoring etabliert werden konnte.

Israeli et al. entwickelten ein Monitoring mit dem Namen Immuknow[®], welches den Status der zellulären Immunität mittels quantitativer Messung der intrazellulären ATP-Konzentration in stimulierten, CD4⁺ Lymphozyten bestimmt (Israeli et al. 2007). Trotz viel versprechender Ansätze auch auf dem Gebiet der pädiatrischen LTx (Israeli et al. 2008) bleibt zunächst abzuwarten, ob diese Ergebnisse von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden können. Auch die Evaluierung der Bestimmung dendritischer Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen als immunmodulatorische Untergruppe von T-Zellen hat in der Bestimmung möglicher Biomarker noch zu keinen einheitlichen Ergebnissen geführt (Millán et al. 2010, Sanchez-Fueyo und Strom 2011).

So bleibt bisher das so genannte therapeutic drug monitoring (TDM) die am meisten genutzte Methode, um die immunsuppressive Therapie nach Transplantation zu individualisieren (Wavamunno und Chapman 2008). Hierbei versucht man durch regelmäßige Spiegelbestimmungen die Konzentration der verordneten Immunsuppressiva im Blut der Patienten in Relation zu ihrer

Transplantatfunktion zu setzen. Die Dosis der verordneten Immunsuppressiva spielt dabei eine entscheidende Rolle. Während man bei Patienten mit Verdacht auf eine Abstoßung ihres Transplantates höhere Spiegel der Immunsuppressiva anstrebt, versucht man bei Patienten mit guter Transplantatfunktion, durch niedrige Spiegel das Auftreten von Nebenwirkungen der Immunsuppression zu minimieren. Während in einigen internationalen Transplantationszentren eine eher hohe Immunsuppression mit Talspiegeln für CSA von 250-350 µg/l angestrebt wird (Gross et al. 1998), wird in den meisten bundesdeutschen Zentren traditionell eine niedrigere Immunsuppression mit initialen CSA-Talspiegeln von etwa 120-150 µg/l in einer Dualtherapie mit Steroiden bevorzugt, wobei die CSA-Zielspiegel bei Patienten mit guter Transplantatfunktion nach zwei Jahren bei 60-80 µg/l liegen.

Um eine Reduktion der Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente nach pädiatrischer Lebertransplantation zu erzielen, war es Ziel der vorliegenden Studie, Rückschlüsse auf wichtige immunologische Parameter zu gewinnen, die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ oder aber eine spenderspezifische Aktivierung im Sinne einer Abstoßung des transplantierten Organs im pädiatrischen Patientenkollektiv anzeigen. Neben einer umfassenden Erhebung klinischer Daten des Patientenkollektivs wurde neben Lymphozytensubpopulationen insbesondere der prozentuale Anteil regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl CD4⁺ Zellen im peripheren Blut sowie die Konzentration immunologisch wichtiger Zytokine im Serum wie IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α und TGF- β bestimmt.

4.1 Patientenkollektiv und Methode

Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 60 pädiatrische Patienten nach LTx in die Studie aufgenommen. Es wurden sieben Patienten mit einer akuten Rejektion, neun Patienten mit einer chronischen Rejektion, 16 Patienten mit einer histologisch gesicherten milden Rejektion bei unauffälligen Transaminasen sowie 28 Patienten mit fehlenden klinischen und laborchemischen Anzeichen einer Rejektion untersucht. Zudem dienten elf nichttransplantierte Patienten, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Leberbiopsie vorgenommen wurde, als Kontrollkollektiv.

Vergleichbare Studien auf dem Gebiet der pädiatrischen LTx wurden bisher mit einem Patientenkollektiv von zwölf (Stenard et al. 2009) bzw. 40 Patienten (Gras et al. 2007)

durchgeführt. Somit ist die Größe des Patientenkollektivs der vorliegenden Studie als überdurchschnittlich und aussagekräftig einzuschätzen.

Bezüglich des Zeitraums zwischen Transplantation sowie Studieneintritt wurden Patienten mit einer akuten Rejektion im Vergleich zu Studienteilnehmern anderer Patientengruppen innerhalb eines kürzeren Zeitraums nach LTx untersucht, da akute Rejektionen häufig in den ersten Jahren nach Lebertransplantation zu beobachten sind (Li et al. 2004).

Unterschiedliche Grunderkrankungen und verschiedene Altersklassen bei Studieneintritt lassen insgesamt ein heterogenes Patientenkollektiv vermuten. Einzelne Messergebnisse wie etwa die der Gesamtlymphozytenzahl variieren aufgrund altersabhängiger Unterschiede.

Die einzelnen Patientengruppen sind jedoch bezüglich Alter und Geschlechterverteilung gut vergleichbar.

Die extrahepatische Gallengangsatriese stellte mit 49 % (n = 29) die häufigste Indikation zur LTx in unserem Patientenkollektiv dar. Mit 12 % (n = 7) aller Indikationen war das Alagille-Syndrom der zweithäufigste Grund für eine Lebertransplantation. Auch in anderen pädiatrischen Studien wird eine vergleichbare Häufigkeit der extrahepatischen Gallengangsatriese bzw. des Alagille-Syndroms als Indikationen für eine pädiatrische Lebertransplantation beschrieben (SPLIT Research Group 2001, Ganschow 2007).

In der vorliegenden Studie wurde bei 44 Patienten ohne klinische und laborchemische Zeichen einer Abstoßungsreaktion eine Protokollbiopsie durchgeführt. Es ergab sich bei 36 % (n = 16) dieser Patienten der pathologische Befund einer milden Rejektion, was eine therapeutische Konsequenz mit entsprechender Modulation der Immunsuppression nach sich zog. Angesichts dieses bemerkenswert hohen Anteils wird die regelmäßige diagnostische Leberbiopsie nach Kinderlebertransplantation am Transplantationszentrum Hamburg als wichtiger Bestandteil der LTx-Nachsorge angesehen.

Methode

Bei der perkutanen Leberbiopsie werden Komplikationen wie Nachblutungen, Infektionen oder allergische Reaktionen auf Medikamente beobachtet. Daneben werden sehr selten Komplikationen wie biliäre Peritonitis, Pneumothorax, Pleuraerguss, Hämatothorax, Gallenblasenverletzung, Hämobilie und Sepsis beobachtet (Glaser et al. 1994). In großen retrospektiven Erhebungen liegt die Gesamtkomplikationsrate der perkutanen Leberbiopsie bei Erwachsenen zwischen 0,22 % und

0,29 % (Lindner et al. 1971, Piccinino et al. 1986). Die Komplikationsrate der Biopsie nach LTx liegt dabei mit 0,35 % nur unwesentlich höher (Lang et al. 1999). Sornsakrin et al beobachteten bei sechs von 120 Biopsien (5 %) lebertransplantiertes Kinder und Jugendlicher Komplikationen, wobei es nur in zwei Fällen zu schwerwiegenden Komplikationen in Form von Infektionen kam (Sornsakrin et al. 2010).

Die Durchführung der Leberbiopsie bei Patienten der vorliegenden Studie verlief komplikationslos.

Eine Bestimmung des Anteils regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten ist über ihr spezifisches Oberflächenprofil ($CD4^+CD25^{high}$) durchflusszytometrisch möglich. Da CD25 auch von aktivierten Effektorzellen exprimiert wird, bedarf es der zusätzlichen intrazellulären Färbung von FoxP3⁺ (Brown und Wong 2008, Stenard et al. 2009), um regulatorische T-Zellen zu identifizieren. Die alleinige Detektion von FoxP3⁺ wiederum ist kritisch anzusehen, da FoxP3⁺ in geringem Maße auch von Non-Treg produziert wird (Mantel et al. 2006, Racusen 2008). Eine alternative Messung von Treg kann über die fehlende oder niedrige Expression der α -Kette des IL-7-Rezeptors (CD127) durchflusszytometrisch erfolgen. Dies erlaubt eine sehr genaue Identifikation regulatorischer T-Zellen über das spezifische Oberflächenmarkerprofil $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ (Liu et al. 2006, Chen et al. 2011, Ekong et al. 2011). Diese Methode wurde in der vorliegenden Studie angewendet; sie ist in der klinischen Routine etabliert und stellt somit eine im Rahmen eines immunologischen Monitoring jederzeit verfügbare Methode dar.

Aufgrund einer ausgeprägten Instabilität der zu untersuchenden Zytokine wurde nach der jeweiligen Blutentnahme auf eine umgehende Verarbeitung der Proben (Abzentrifugieren und Einfrieren des Serums) geachtet. Erst zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Zytokinmessungen durchgeführt. So können Unterschiede zwischen Ergebnissen verschiedener Studien, bei denen ebenfalls Zytokinmessungen durchgeführt wurden, unter anderem auch auf unterschiedliche Verarbeitungsmethoden zurückgeführt werden.

Ebenso könnten sich Unterschiede aufgrund einer möglichen zirkadianen Rhythmik der Zytokinausschüttung ergeben. Verschiedene Studien gehen von einer unterschiedlichen zirkadianen Rhythmik der einzelnen Zytokine aus (Young et al. 1995, Guan et al. 2005). Auch die morgendliche Cortisolausschüttung könnte auf die Produktion der Zytokine Einfluss nehmen. So stellten Palm et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen einer geringen IL-2 Produktion bei hohen morgendlichen Cortisol-Konzentrationen fest (Palm et al. 1996).

4.2 Operationstechniken bei Lebertransplantation

Die häufigste Operationstechnik bei den Lebertransplantationen des vorliegenden Patientenkollektivs war mit 55 % (n = 33) die Splitlebertechnik, gefolgt von der Leberlebendspende mit 25 % (n = 15).

Dies ist vergleichbar mit bundesdeutschen Zentren, in denen die Splitlebertransplantation in etwa 40-60% und die Leberlebendspende in etwa 20-30% der Fälle realisiert wird (Ganschow 2007).

In der Gruppe der Leberlebendspende zeigte sich ein höherer Anteil an Patienten ohne histologische oder laborchemische Anzeichen einer Rejektion als in den restlichen Gruppen (ns). Dieser Unterschied könnte für einen, entgegen bisherigen Annahmen (Oliveros et al. 2005, Shaked et al 2009) bestehenden, immunologischen Vorteil lebertransplantierten Patienten nach Lebendspende durch einen Elternteil, sprechen. Im Patientenkollektiv unserer Studie weisen Patienten nach Leberlebendspende einen günstigen klinischen Verlauf auf, allerdings bleiben diese Unterschiede aufgrund der kleinen Fallzahl nicht signifikant.

4.3 Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut

Nach durchflusszytometrischer Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lebertransplantation bei Patienten nach pädiatrischer LTx eine niedrigere Gesamtzahl peripherer Lymphozyten festgestellt. Eine mögliche Ursache dieser Beobachtung könnte die regelmäßige Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten nach pädiatrischer LTx sein.

Insbesondere bei Patienten mit chronischer Rejektion war eine signifikant geringere Gesamtlymphozytenzahl nachzuweisen. Bei fünf dieser neun Patienten mit chronischer Rejektion wurde ein Hyperspleniesyndrom diagnostiziert, was als mögliche Ursache der besonders niedrigen Gesamtlymphozytenzahl in dieser Patientengruppe angesehen werden kann.

4.4 Verhältnis von CD4⁺ Zellen zu CD8⁺ Zellen im peripheren Blut

Im Gegensatz zu Patienten mit einer chronischen Rejektion war bei Patienten mit einer akuten Rejektion das Verhältnis von T4- zu T8-Zellen aufgrund einer geringen Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten bzw. hoher Anzahl an CD8⁺ Lymphozyten signifikant zu T8-Zellen verschoben.

Die Beobachtungen einer hohen Anzahl an CD8⁺ Lymphozyten bei Patienten mit einer chronischen Rejektion stimmen mit denen von Millán et al. überein, die bei erwachsenen Lebertransplantatempfängern eine höhere Anzahl CD8⁺ Lymphozyten bei Patienten erfassten, die nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie eine Rejektion ihres Transplantates erlebten (Millán et al. 2010). Talukdar et al. stellten eine signifikant höhere Anzahl CD8⁺ Lymphozyten bei pädiatrischen Patienten mit einer Rejektion ihres Transplantates im Vergleich zu Patienten ohne Rejektion fest (Talukdar et al. 2008). Andere Arbeitsgruppen fanden bezüglich der CD4/CD8 Ratio keine Unterschiede zwischen Patientengruppen mit bzw. ohne Rejektion (Wang et al. 2003). In weiterführenden kontrollierten Studien könnte die Bestimmung von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten als potentieller Parameter für ein immunologisches Monitoring evaluiert werden.

4.5 Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut

Regulatorische T-Zellen sind seit Jahren Gegenstand transplantationsimmunologischer Untersuchungen. Sie stellen einen möglichen Parameter dar, der die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ oder aber eine spenderspezifische Aktivierung im Sinne einer Abstoßung des transplantierten Organs anzeigen könnte. Erste tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen von Ratten, die Toleranz gegenüber ihrem Transplantat aufwiesen, diese auf einen anderen Transplantatempfänger übertragen können (Hall et al. 1990). Sakaguchi et al. konnten in einem weiteren Tierexperiment zeigen, dass das Entfernen derselben Treg bei Mäusen zu diversen Autoimmunkrankheiten führt (Sakaguchi et al. 1995, Sakaguchi et al. 2005). Kingsley et al. führten allogene Hauttransplantationen an Mäusen durch und konnten nachweisen dass regulatorische T-Zellen mitverantwortlich für die Toleranz gegenüber dem Transplantat sind (Kingsley et al. 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bei erwachsenen LTx-Patienten erhöhte Treg Konzentrationen bei Transplantatempfängern ohne Rejektion messen (Scheffold et al. 2007), während bei LTx-Patienten mit einer Rejektion niedrige Konzentrationen an Treg festgestellt wurden (Demirkirian et al. 2006). Auch bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation wurde die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen untersucht. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Patienten mit einer ausgeprägten Graft-versus-Host-Reaktion signifikant niedrigere Konzentrationen an regulatorischen T-Zellen aufwiesen (Zorn et al. 2005, Rezvani et al. 2006). Wolf et al. untersuchten ebenfalls Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation und wiesen eine signifikant höhere Überlebensrate bei Patienten mit einer größeren Anzahl an Treg nach (Wolf et al. 2007). Huang et al. konnten bei tierexperimentellen Untersuchungen auf dem Gebiet der Herztransplantation keine Unterschiede bezüglich peripher

gemessener Treg-Konzentrationen bei Ratten mit bzw. ohne Rejektion feststellen (Huang et al. 2010). Andere Arbeitsgruppen fanden v.a. auf dem Gebiet der Nierentransplantation widersprüchliche Ergebnisse bezogen auf Treg Konzentrationen bei Patienten mit bzw. ohne Rejektion (Brown und Wong 2008).

Inwieweit Ergebnisse der vorliegenden Studie mit Untersuchungen eines erwachsenen Patientenkollektivs zu vergleichen sind, bleibt aufgrund der möglicherweise bestehenden immunologischen Unterschiede zwischen pädiatrischen und erwachsenen Patienten ungewiss. Bisher ist wenig über die Anzahl regulatorischer T-Zellen bei pädiatrischen Lebertransplantatempfängern bekannt. Stenard et al. konnten bei Patienten nach pädiatrischer LTx sinkende Konzentrationen regulatorischer T-Zellen im Blut während Rejektionsepisoden erfassen (Stenard et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Rejektion und Transplantatempfängern ohne Rejektion erfasst.

Nafady-Huego et al. konnten dagegen bei pädiatrischen LTx Patienten mit operationaler Toleranz höhere Zahlen naiver Treg messen, als bei Patienten mit einer Abstoßung (Nafady-Huego et al. 2010). Diese Arbeitsgruppe geht von einem möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen und operationaler Toleranz aus. Ob Patienten allerdings Immunsuppressiva einnehmen oder diese bereits abgesetzt bzw. ausgeschlichen wurden spielt dabei nach Ansicht dieser Forschergruppe einen großen Unterschied. Während sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen in den verschiedenen Gruppen transplantiert Patienten ohne Immunsuppression unterschied, konnte bei Patienten mit Immunsuppression keine Differenz festgestellt werden (Nafady-Huego et al. 2010). Auch Pons et al. sehen diesbezüglich einen wichtigen Unterschied. So konnte diese Arbeitsgruppe bei transplantierten Patienten aus der Gruppe der operationalen Toleranz, deren Immunsuppressiva sukzessive reduziert wurden eine höhere Anzahl regulatorischer T-Zellen messen. Bevor die immunsuppressive Medikation dieser Patienten reduziert wurde, unterschied sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen in den verschiedenen Patientengruppen jedoch nicht (Pons et al. 2008).

Neben den geringen Erfahrungen bezüglich Konzentrationen regulatorischer T-Zellen bei pädiatrischen Transplantatempfängern bleibt in den ersten Wochen nach Lebertransplantation unklar, ob diese vom Transplantatempfänger stammen oder via Spenderorgan in den Empfänger hineintransplantiert werden und ins periphere Blut gelangen (Demirkirian et al. 2007, Stenard et al. 2009). Da der Zeitpunkt der Untersuchung im vorliegenden Patientenkollektiv mindestens ein Jahr nach Transplantation war, ist davon auszugehen, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl CD4⁺ Zellen tatsächlich Treg des Transplantatempfängers darstellt.

Unterscheidet man die Transplantatempfänger der vorliegenden Studie nach dem jeweiligen Transplantationsverfahren, so fällt auf, dass Patienten, die bei ihrer LTx eine Leberlebendspende erhielten signifikant höhere Konzentrationen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen als Patienten, denen eine Splitleber transplantiert wurde. Mehrere internationale Studien konnten für Patienten mit einer Leberlebendspende keinen immunologischen Vorteil bezüglich eines besseren klinischen Verlaufs nach Transplantation feststellen (Bourdeaux et al. 2007, Shaked et al. 2009). In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch in der Gruppe der Leberlebendspende ein hoher Anteil an Patienten ohne histologische oder laborchemische Anzeichen einer Rejektion. Allerdings sind diese Unterschiede aufgrund der kleinen Fallzahl nicht signifikant. So bleibt bisher unklar ob eine hohe Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Gruppe der Leberlebendspende den Transplantationsverlauf nach pädiatrischer LTx günstig beeinflussen könnte.

4.6 B-Lymphozyten im peripheren Blut

Nicht nur T-Lymphozyten wird eine entscheidende Rolle für immunologische Vorgänge während Abstoßungsreaktionen zugeschrieben, auch B-Lymphozyten spielen in dieser Hinsicht eine wichtige Rolle. Nach pädiatrischer Nierentransplantation wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten B-Zell-Konzentrationen im Transplantat und Abstoßungsreaktionen aufgrund eines Nichtansprechens gängiger Immunsuppressiva wie Steroide beobachtet (Krukemeyer et al. 2004, Tsai und Ettenger 2009). B-Zell-Infiltrate im Nierentransplantat werden darüber hinaus mit einer schlechteren Langzeit-Transplantatfunktion in Verbindung gebracht (Hippen et al. 2005, Tsai und Ettenger 2009). Der CD20-Antikörper Basiliximab wird von einigen Zentren bei Rejektionen nach Nierentransplantation mit hohen B-Zell-Konzentrationen als so genannte rescue-therapy verwendet (Lehnhardt et al. 2006). Studien von Bagnasco und Kayler haben allerdings keinen Zusammenhang zwischen erhöhten B-Zell-Konzentrationen und einer schlechten Nierentransplantatfunktion feststellen können (Bagnasco et al. 2007, Kayler et al. 2007).

In den letzten Jahren sind B-Lymphozyten Gegenstand intensiver transplantationsimmunologischer Forschung geworden, da über diese Zellpopulation insbesondere in Bezug auf Abstoßungsreaktionen sowie deren Vermeidung bei Lebertransplantatempfängern noch wenig bekannt ist (Stegalla et al. 2010). Nach einer Studie von Krukemeyer et al. waren bei erwachsenen lebertransplantierten Patienten erhöhte B-Zell-Konzentrationen im Transplantat mit Abstoßungsreaktionen assoziiert (Krukemeyer et al. 2004). Martinez-Llordella et al. konnten jedoch keinen Unterschied zwischen B-Zell-Konzentrationen bei Patienten mit bzw. ohne Rejektion feststellen (Martinez-Llordella et al. 2007).

Im Patientenkollektiv der vorliegenden Studie unterschied sich die relative und absolute Anzahl der peripher erfassten B-Lymphozyten bei lebertransplantierten Kindern mit Rejektion nicht signifikant von der Zahl der B-Lymphozyten im peripheren Blut pädiatrischer Transplantatempfänger ohne Rejektion. Ob die Anzahl peripher erfasster B-Zellen die Konzentration von B-Zellen im Transplantat widerspiegelt bleibt jedoch bisher unklar.

4.7 Interleukin 2 sR α und Interferon γ im peripheren Blut

Die Zytokine IL-2 sR α und IFN- γ werden als Rejektions-Zytokine beschrieben und stellen Hauptmediatoren einer akuten Abstoßungsreaktion dar. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass erhöhte Konzentrationen dieser Zytokine ein möglicher prädiktiver Faktor für das Auftreten akuter Abstoßungen sind (Ganschow et al. 2001, Wang et al. 2003, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007, Millán et al. 2010).

Patienten mit einer Rejektion wiesen in der vorliegenden Studie signifikant höhere IL-2 sR α Konzentrationen im peripheren Blut auf als Patienten die keine Anzeichen einer Rejektion aufwiesen. Bezüglich der Messung von IL-2 sR α und IFN- γ konnten für Patienten mit einer akuten Rejektion die höchsten Serumkonzentrationen gemessen werden. Ebenfalls hohe Konzentrationen ergaben Messungen von IL-2 sR α und IFN- γ bei Patienten mit einer chronischen Rejektion, während bei Transplantatempfängern ohne Rejektion niedrige Konzentrationen dieser Zytokine erfasst wurden.

Gras et al. führten bei 40 Patienten nach LTx Messungen peripherer Zytokinkonzentrationen sowie eine Bestimmung der mRNA Expressionen dieser Zytokine im Leberbiopsat der pädiatrischen Transplantatempfänger vor und bis zu 28 Tage nach Lebertransplantation durch (Gras et al. 2007). Es erfolgte die Bestimmung von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α und IFN- γ und die Bestimmung der mRNA-Konzentration dieser Zytokine durch RT-PCR im Leberbiopsat. Vor Transplantation unterschieden sich die Zytokinkonzentrationen zwischen den Gruppen Toleranz und Abstoßung nicht. Bei Patienten mit einer Transplantattoleranz konnte ein signifikanter Abfall ihrer IL-2 sowie IFN- γ Konzentrationen nach Lebertransplantation gemessen werden. So bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Vermutung von Gras et al. niedrige Zytokinkonzentrationen von IL-2 und IFN- γ mit einer Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ in Verbindung zu bringen.

Die Bestimmung der mRNA-Konzentration der oben genannten Zytokine durch RT-PCR im Leberbiopsat ergab für IL-10 eine gute Korrelation mit der Konzentration von IL-10 im Serum. Bei allen weiteren Zytokinen konnte keine Korrelation zwischen im Serum gemessenen Konzentrationen und denen im Leberbiopsat festgestellt werden. Deshalb vermuten Gras et al. den

Ursprung von Zytokinen wie IL-2 sR α und IFN- γ nicht im Transplantat selbst sondern in sekundär lymphatischen Organen.

Wang et al. führten Messungen von Zytokinkonzentrationen bei erwachsenen Patienten nach LTx durch. Insgesamt wurden bei 25 Patienten, deren Transplantation bis zu drei Monate zurück lag innerhalb eines Monats mehrfach die Zytokine IFN- γ , IL-4 sowie TGF- β bestimmt (Wang et al. 2003). Bei den Patienten mit einer akuten Rejektion (n=10) konnte im Vergleich zu der Gruppe ohne Rejektion (n=15) eine signifikant höhere IFN- γ Konzentration festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe um Wang sieht IFN- γ deshalb als einen möglichen Parameter an, der im Zuge eines Immunmonitoring nach LTx Patienten mit einer Abstoßung gegenüber ihrem Transplantat detektieren könnte.

Millán et al. untersuchten 24 erwachsene Patienten nach Lebertransplantation, die sich für eine versuchsweise Reduktion der Immunsuppression mit dem Ziel eines endgültigen Absetzens der immunsuppressiven Medikation entschieden (Millán et al. 2010). Bei siebzehn Patienten konnte nach einer kontinuierlichen Reduktion der Immunsuppression über sechs bis neun Monate die immunsuppressive Medikation abgesetzt werden. Nach einer zwölfmonatigen Kontrolle wurde bei dreizehn Patienten nach wie vor eine gute Transplantatfunktion festgestellt, während bei vier Patienten drei Monate nach Absetzen der Medikation eine akute Abstoßung festgestellt wurde. Vor, während und nach dem Absetzen der Immunsuppression wurden regelmäßige Messungen von Zytokinkonzentrationen (IFN- γ , IL-2, IL-10 und TGF- β) durchgeführt. Millán et al. konnten bei Patienten mit einer akuten Abstoßung (n=11) signifikant höhere IFN- γ Konzentrationen im peripheren Blut im Vergleich zu den Patienten ohne Transplantatabstoßung (n=13) feststellen, während sich die IL-2 Konzentrationen im peripheren Blut in den zwei Gruppen nicht signifikant unterschieden. Auch diese Arbeitsgruppe sieht deshalb IFN- γ Konzentrationsbestimmungen im peripheren Blut als wichtigen Bestandteil eines möglichen Immunmonitoring nach LTx an.

Ganschow et al. führten bei insgesamt 105 pädiatrischen Patienten nach LTx Messungen von IL-2 sR α , IL-4, IL-10 sowie IFN- γ Konzentrationen durch (Ganschow et al. 2001). Bei Patienten mit einer Transplantatabstoßung wurden signifikant höherer IL-2 sR α sowie IFN- γ Konzentrationen gemessen als bei Patienten ohne Rejektion. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Konzentrationen von IL-2 sR α und IFN- γ im peripheren Blut von Transplantatempfängern ein möglicher Parameter sein könnte, um Patienten zu detektieren, die eine Abstoßung ihres Transplantates entwickeln. Nach den vorliegenden Studien könnte die Erfassung peripherer Konzentrationen dieser Zytokine ein wichtiger Bestandteil eines immunologischen Monitoring nach LTx werden.

4.8 Interleukin 4, Interleukin 10 und TGF- β im peripheren Blut

Während den Zytokinen IL-2 s α und IFN- γ eine Induktion der zellulären Immunität und Transplantatabstoßung zugeschrieben wird, werden die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β mit Toleranz gegenüber dem Spenderorgan in Verbindung gebracht (Dallman 1995, Regateiro et al. 2011). Einige Arbeitsgruppen vermuten, dass eine Abweichung zu höheren Konzentrationen dieser Zytokine im Serum der Transplantatempfänger Toleranz gegenüber dem Spenderorgan anzeigen könnte (Ganschow et al. 2001, Gras et al. 2007, Wieërs et al. 2007, Regateiro et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurden die höchsten Konzentrationen von IL-4 sowie TGF- β jeweils bei Patienten gemessen, die keine Rejektion gegenüber ihrem Transplantat aufwiesen, wohingegen Patienten mit akuter oder chronischer Rejektion niedrige Konzentrationen von IL-4 sowie TGF- β aufwiesen. Die Messungen der Zytokinkonzentrationen für IL-10 ergaben in den jeweiligen Patientengruppen keine Unterschiede.

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Millán bestätigt, dessen Arbeitsgruppe signifikant niedrigere TGF- β Konzentrationen bei lebertransplantierten Patienten mit einer Abstoßung im Vergleich zu Patienten mit einer Transplantattoleranz feststellen konnte (Millán et al. 2010). Auch in dieser Studie ergaben Messungen von IL-10 Konzentrationen im peripheren Blut in den jeweiligen Patientengruppen keine Unterschiede.

In einer Studie mit 105 pädiatrischen lebertransplantierten Patienten wurden ebenfalls niedrige Konzentrationen an IL-4 sowie IL-10 bei Patienten mit einer akuten Rejektion gemessen, es zeigten sich die höchsten Konzentrationen dieser Zytokine bei Patienten mit einer Transplantattoleranz (Ganschow et al. 2001). Auch in den Untersuchungen von Gras et al. konnte eine deutlich erhöhte IL-10 Konzentration bei Patienten mit einer Transplantattoleranz festgestellt werden. Eine gute Korrelation wurde zwischen den Konzentrationen von IL-10 im peripheren Blut sowie der mRNA-Expression im Leberbiopsat beobachtet (Gras et al. 2007).

Nach der vorliegenden Studie könnten hohe Konzentrationen von IL-4 und TGF- β im peripheren Blut von Transplantatempfängern einen möglichen Parameter darstellen, um Patienten zu identifizieren, die Toleranz gegenüber ihrem Transplantat entwickeln. Somit sollte ebenfalls die Erfassung peripherer Konzentrationen dieser Zytokine im Rahmen eines immunologischen Monitoring nach pädiatrischer Lebertransplantation etabliert werden. Dagegen konnte die Vermutung, dass eine Abweichung zu höheren IL-10 Konzentrationen eine Toleranz gegenüber dem Spenderorgan anzeigen könnte, in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

4.9 Ausblick

Trotz viel versprechender Ergebnisse v.a. auf dem Gebiet der Lebertransplantation bei Erwachsenen scheint die Einzelbestimmung des prozentualen Anteils $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ -T-Zellen im peripheren Blut bei lebertransplantierten Kindern als einzelner Parameter für die individuelle Steuerung der immunsuppressiven Therapie nicht ausreichend. Im Rahmen weiterer Studien soll nun die Rolle einer longitudinalen Messung regulatorischer T-Zellen als Teil eines immunologischen Monitoring nach pädiatrischer Lebertransplantation evaluiert werden. Zytokine wie etwa IL-2 sR α , IFN- γ , IL-4 sowie TGF- β stehen nach der vorliegenden Untersuchung mit einer Abstoßungsreaktion bzw. Transplantattoleranz in Verbindung, sodass diese Zytokinbestimmungen einen wichtigen Parameter im Zuge eines etablierten immunologischen Monitoring darstellen.

Die Interpretation von Abweichungen peripher erfasster regulatorischer T-Zellen aus der Norm bleibt allerdings spekulativ, da bisher nur wenig darüber bekannt ist, inwieweit das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im Blut die Verhältnisse im Zielorgan widerspiegelt. Erste Erkenntnisse in diesem Zusammenhang erlangten bisher Stenard et al., die die Mehrheit aller bestimmten FoxP3⁺ Zellen in einem Portalfeld des Leberbiopsats identifizieren konnten, in dem Zeichen einer entzündlichen Reaktion im Zuge der Abstoßung zu erkennen waren (Stenard et al. 2009). Zudem ist bisher sehr wenig darüber bekannt, wie sich die Konzentrationen der immunologisch modulierenden Zytokine IL-2 sR α , IFN- γ , IL-4 sowie TGF- β im Lebergewebe verhalten. In folgenden Studien sollen die Vorstufen der im peripheren Blut gemessenen Zytokine durch Erfassung der mRNA-Expression im Leberbiopsat der Transplantatempfänger ermittelt werden. Die Messung der mRNA-Expression regulatorischer T-Zellen in mononukleären Zellen des bislang kryokonservierten Leberbiopsats des Patientenkollektivs soll ebenfalls durchgeführt werden. Hiermit soll evaluiert werden, ob eine Bestimmung regulatorischer T-Zellen sowie transplantationsimmunologisch wichtiger Zytokine direkt am Zielorgan erfolgen muss, oder aber im Idealfall eine Bestimmung der genannten Parameter im peripheren Blut für ein immunologisches Monitoring nach pädiatrischer Lebertransplantation ausreicht.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Durchführung von Microarray-Untersuchungen eine viel versprechende Methode darstellt, um tolerante Patienten zu identifizieren.

DNA-Microarrays dienen dazu, die mRNA Menge bestimmter Gene nachzuweisen. Somit kann eine unterschiedliche Expression dieser Gene in verschiedenen Patientengruppen bestimmt werden. Mittels dieser molekularbiologischen Transkriptionsuntersuchung ermittelten Martinez Llordella et al. erwachsene lebertransplantierte Patienten, die Toleranz entwickelten, da sie bei diesen eine

spezielle Signatur (bestehend aus kodierenden Genen für den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor, den NK-Zell-Rezeptor und Proliferationsmarker) nachweisen konnten (Martinez-Llordella et al. 2007, Martinez-Llordella et al. 2008). Während somit erste viel versprechende Erfahrungen bei erwachsenen Lebertransplantatempfängern gemacht wurden, gibt es bisher keine Microarray-Analysen bei Patienten nach pädiatrischer LTx.

So scheint es, dass nicht ein einzelner Marker für ein immunologisches Monitoring nach pädiatrischer LTx ausreichen wird, Patienten zu detektieren, die eine Toleranz gegenüber ihrem Transplantat aufweisen. Vielmehr werden es womöglich mehrere Parameter sein, hierunter eventuell einige der oben genannten, die es Patienten ermöglichen sollen, die immunsuppressive Medikation zu reduzieren bzw. absetzen zu können. Jedoch ist auch bei solchen Patienten eine Reduktion der immunsuppressiven Medikation nicht risikofrei, da nach wie vor die Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion bestehen bleibt (Sanchez-Fueyo und Strom 2004, Mazariegos et al. 2007, Wieërs et al. 2007).

5. Zusammenfassung

Seit 1981 wurden im Hamburger Transplantationszentrum bis Mitte 2012 646 Lebertransplantationen (inklusive Re-LTx) bei 525 Kindern durchgeführt. Um eine Abstoßungsreaktion des transplantierten Organs zu verhindern, wird eine standardisierte Immunsuppression durchgeführt. Ziel der vorliegenden Studie war es, immunologisch wichtige Parameter zu identifizieren, die Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ oder aber eine spenderspezifische Aktivierung im Sinne einer Abstoßung anzeigen, damit zukünftig eine Individualisierung der immunsuppressiven Therapie ermöglicht werden kann. Gegebenenfalls könnte bei Patienten mit geringer immunologischer Aktivierung gegen das transplantierte Organ eine Reduktion der Immunsuppression ermöglicht und damit die durch die Immunsuppression bedingten Nebenwirkungen minimiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden 60 pädiatrische Patienten nach LTx untersucht, bei denen entweder aufgrund einer Abstoßung oder im Zuge der Jahreskontrolle eine Leberbiopsie vorgenommen wurde. Es wurden sieben Patienten mit einer akuten Rejektion, neun Kinder mit einer chronischen Rejektion, 16 Patienten mit laborchemisch normaler Transplantatfunktion und histologisch gesicherter milder Rejektion und 28 Patienten ohne Zeichen einer Rejektion untersucht. Elf nicht-transplantierte Patienten dienten als Kontrollkollektiv. Bei diesen Patienten wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse neben einer Lymphozytensubpopulation insbesondere regulatorische T-Zellen bestimmt. Im Serum der Transplantatempfänger wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-2 sR α , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ und TNF- α durch ELISA-Kits bestimmt.

Der Anteil regulatorischer T-Zellen bei lebertransplantierten Kindern mit einer akuten oder chronischen Rejektion unterschied sich nicht von dem Anteil regulatorischer T-Zellen bei Patienten ohne Rejektion. Im Gegensatz zu Patienten mit einer chronischen Rejektion oder Kindern ohne Rejektion war bei Patienten mit einer akuten Rejektion das Verhältnis von T4- zu T8-Zellen signifikant zu T8-Zellen verschoben, sodass dies Hinweise auf eine immunologische Aktivierung gegen das transplantierte Organ gab. Ein Unterschied bezüglich der B-Zell-Konzentration in den verschiedenen Studiengruppen konnte nicht gefunden werden.

Patienten, die eine Leberlebenspende erhielten, wiesen signifikant höhere Konzentrationen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut auf als Patienten, denen ein post mortem Spenderorgan transplantiert wurde. Zudem zeigte sich bei Transplantatempfängern einer Lebenspende ein hoher Anteil an Patienten mit klinisch gutem Verlauf ohne histologische oder laborchemische Anzeichen

einer Rejektion. Ob entgegen bisherigen Angaben die Leberlebenspende einen immunologischen Vorteil birgt, bleibt aufgrund der kleinen Fallzahl im vorliegenden Patientenkollektiv jedoch unklar.

Patienten mit einer Rejektion wiesen höhere IL-2 sR α (s) bzw. IFN- γ (ns) Konzentrationen im peripheren Blut auf als Patienten, die keine Anzeichen einer Rejektion aufwiesen. Die höchsten IL-4 sowie TGF- β Serumkonzentrationen wurden jeweils bei Patienten gemessen, die keine Anzeichen einer Rejektion aufwiesen.

Die Messung des prozentualen Anteils CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}-T-Zellen im peripheren Blut bei lebertransplantierten Kindern scheint folglich als einzelner Parameter für die individuelle Steuerung der immunsuppressiven Therapie nicht ausreichend. Hingegen könnte die Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen, insbesondere des Verhältnisses von T4- zu T8-Zellen, durchaus eine immunologische Aktivierung gegen das transplantierte Organ anzeigen. Im Serum der Patienten erfasste ZytokinKonzentrationen von IL-2 sR α , IFN- γ , IL-4 und TGF- β könnten eine Abstoßung bzw. Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ widerspiegeln und als Bestandteil eines immunologischen Monitoring dienen.

Ob eine Bestimmung dieser Zytokine direkt am Zielorgan erfolgen muss oder eine Bestimmung im peripheren Blut ausreicht, bleibt bislang unklar. Dies muss in folgenden Studien evaluiert werden.

Zusätzlich sollten noch weitere Parameter untersucht werden, die Bestandteil eines immunologischen Monitoring nach pädiatrischer LTx werden könnten.

Die Durchführung von DNA-Microarray Untersuchungen könnte eine wichtige Rolle spielen, um eine Individualisierung der immunsuppressiven Therapie nach pädiatrischer Lebertransplantation zu ermöglichen.

6. Abkürzungsverzeichnis

- A.: Arteria
- Abb.: Abbildung
- AIH: Autoimmunhepatitis
- AG: Aktiengesellschaft
- Ak: Antikörper
- APC: antigen presenting cells
- ATG: Anti-T-Lymphozyten-Globuline
- BD: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
- bzw.: beziehungsweise
- CD4⁺: Cluster of Differentiation 4 positiv
- CD127⁻: Cluster of Differentiation 127 negativ
- CMV: Cytomegalie-Virus
- CSA: Ciclosporin
- CDG-Syndrom: Congenital Disorders of Glycosylation /
Carbohydrat-Defizit-Glycoprotein-Syndrom
- EBV: Epstein-Bar-Virus
- FACS: fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometrie)
- FSC: Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
- FK 506: Tacrolimus (Prograf)
- GmbH
& Co. KG: Gesellschaft mit beschränkter Haftung
und Compagnie Kommanditgesellschaft
- Inc.: incorporated
- i.v.: intra-venös
- IFN: Interferon
- Ig: Immunglobulin
- IL / IL-2 sR α : Interleukin / Interleukin 2 soluble receptor alpha
- KG: Körpergewicht
- LTx: Lebertransplantation
- MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex
- NK-Zellen: (Natürliche) Killer-Zellen
- ns: nicht signifikant
- NTx: Nierentransplantation

-
- OKT3: Muromonab-CD3
 - OTC-Mangel: Ornithin-Transcarbamylase-Mangel
 - PFIC: Progressive familiäre intrahepatische Cholestase
 - PSC: Primär sklerosierende Cholangitis
 - PTLD: Posttransplantationslymphom
 - PTT: Partielle Thromboplastinzeit
 - Quick: Thromboplastinzeit
 - Re-LTx: Retransplantation (erneute Lebertransplantation)
 - RT-PCR: Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion
 - SEM: Standardfehler
 - SSC: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
 - TGF: Transforming growth factor
 - TNF: Tumornekrosefaktor
 - Treg: Regulatorische T-Zellen
 - T-Zelle: T-Lymphozyt
 - u.a.: unter anderem
 - UKE: Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
 - V. / Vv.: vena / venae
 - v.a.: vor allem
 - V.a.: Verdacht auf
 - z.B.: zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Allegre M-L, Florquin S, Goldman M (2007) Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: Time for reassessment. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 563-568
- Amirzargar A, Lessanpezeski M, Fathi A, Amirzargar M, Khosravi F, Ansaripour B, Nikbin B (2005) TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 2985-2987
- Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R, Racusen LC, Haas M, Mohammed BS, Zachary AA, Montgomery RA (2007) CD20-positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 1968
- Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Colch)* 1998; 94: 557-572
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603-606
- Bismuth H, Morino M, Castaing D, Gillon MC, Descorps-Declere A, Saliba F, Samuel D (1989) Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *Br J Surg* 1989; 76: 722-724
- Bourdeaux C, Darwish A, Jamart J, Tri TT, Janssen M, Lerut J, Otte JB, Sokal E, de Ville de Goyet J, Reding R (2007) Living-related versus deceased donor pediatric liver transplantation: a multivariate analysis of technical and immunological complications in 235 recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 440-447
- Bowman J, Green M, Scatlebury V (1991) OKT3 and viral disease in pediatric liver transplant recipients. *Clin Transplant* 1991; 5: 294-300
- Braudeau C, Racape M, Giral M, Lois S, Moreau A, Berthelot L, Heslan M, Ashton-Chess J, Soulillou JP, Brouard S (2007) Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int* 2007; 20: 845-855
- Brölsch CE, Neuhaus P, Burdelski M, Bernsau U, Pichlmayr R (1984) Orthotope Transplantation von Lebersegmenten bei Kleinkindern mit Gallengangsatresien. *Langenbecks Arch Chir* 1984 (suppl): 105-109
- Brölsch CE, Burdelski M, Rogiers X, Gundlach M, Knoefel WT, Langwieler T, Fischer L, Latta A, Hellwege H, Schulte FJ, Schmiegel W, Sterneck M, Greten H, Kuechler T, Krupski G, Loeliger C, Kuehnl P, Pothmann W, Schulte am Esch J (1994) Living donor for liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 49-55
- Brown K and Wong W (2008) Diagnostic Value of Regulatory T Cells: A New Facet of a much studied cell population. *Transplantation* 2008; 86: 1485-1491

-
- Caballero A, Fernandez N, Lavado R, Bravo MJ, Miranda JM, Alonso A (2006) Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transpl Immunol* 2006; 17: 3-6
 - Cacciarelli TV, Esquivel CO, Moore DH, Cox KL, Berquist WE, Concepcion W, Hammer GB, So SK (1997) Factors affecting survival after orthotopic liver transplantation in infants. *Transplantation* 1997; 64: 242-248
 - Calne RY (2004) Prope tolerance – the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic. *Transpl Immunol* 2004; 13: 83-86
 - Campbell AL, Herold BC (2004) Strategies for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in pediatric liver transplantation recipients. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 619–627
 - Cao H, Liu H and Wu ZY (2007) Effects of combined immune therapy on survival and Th1/Th2 cytokine balance in rat orthotopic liver transplantation. *Chin Med J* 2007; 120(20): 1809-1812
 - Chen M, Mohtize M, Mattei MF, Villemot JP, Kohler C, Faure GC, Béné MC, de Carvalho Bittencourt M (2011) Reduced levels of both circulating CD4⁺ CD25⁺ CD127 (low/neg) and CD4⁺ CD8 (neg) invariant natural killer regulatory T cells in stable heart transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 2011; 163(1): 104-112
 - Chen Y, Chen J, Liu Z, Liang S, Luan X, Long F, Peng Y, Yan L, Gong J (2008) Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in Liver Transplantation in rats. *Transplant Proc* 2008; 40(8): 2691-2695
 - Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beernd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJ (1997) Immunphenotyping of blood lymphocytes in childhdhod. *J Pediatr* 1997; 130: 388-393
 - Constant SL, Bottomly K (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell response: The alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 297-322
 - Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992) Corticosteroids are transcriptional regulators of acute inflammation. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; 105: 25-35
 - Dallman MJ (1995) Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adults. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 632-638
 - Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ (2006) Low circulating regulatory T-cells after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplant* 2006; 12: 277-284
 - Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B and Williams R (1998) Defining the outcome of Immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 926-933
 - Drebber U, Dienes HP (2008) Transplantationspathologie der Leber. *Pathologe* 2008; 29: 84-92
 - Ekong UD, Xunrong L, Yu M, Wang D, Miller SD, O’Gorman MRG (2011) Lymphocyte activation markers may predict the presence of donor specific alloreactivity in pediatric living related liver transplantation recipients. *Human Immunology* 2011; 72: 392-397

-
- Eurotransplant International Foundation (2008) Eurotransplant International Foundation Annual Report 2007. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant International Foundation, Leiden, The Netherlands 2008: 65-73
 - Ganschow R, Nolkemper D, Helmke K, Harps E, Commentz JC, Broering DC, Pothmann W, Rogiers X, Hellwege HH, Burdelski M (2000) Intensive care management after pediatric liver transplantation: a single center experience. *Pediatr Transplant* 2000; 4: 273-279
 - Ganschow R, Broering DC, Nolkemper D, Albani J, Kemper MJ, Rogiers X, Burdelski M (2001) TH2 cytokine profile in infants predisposes to improved graft acceptance after liver transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 929-934
 - Ganschow R, Schulz T, Meyer T, Broering DC, Burdelski M (2002) Low-dose immunosuppression reduces the incidence of post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver graft recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 38: 198-203
 - Ganschow R (2007) Krankheiten nach Lebertransplantation. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2007; 155: 1048-1053
 - Getachew Y, Stout-Delgado H, Miller BC, Thiele DL (2008) Granzyme C efficient CTL-mediated killing late in primary alloimmune responses. *J Immunol* 2008; 181: 7810-7817
 - Girlanda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG and Heaton ND (2005) Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1708-1709
 - Glaser J, Mann O, Siegmüller M, Pausch J (1994) Prospective study of the incidence of ultrasound-detected hepatic hematomas due to percutaneous Menghini needle liver biopsy and laparoscopy-guided Silverman needle biopsy. *Ital J Gastroenterology* 1994; 26: 338-341
 - Gökmen MR, Lombardi G, Lechler RI (2008) The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 568-574
 - Grabhorn E, Schulz A, Helmke K, Hinrichs B, Rogiers X, Broering DC, Burdelski M, Ganschow R (2004) Short- and long-term results of liver transplantation in infants aged less than 6 months. *Transplantation* 2004; 78: 235-241
 - Grabhorn E, Burdelski M, Ganschow R (2007) Lebertransplantation im Säuglingsalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2007; 155: 381-389
 - Gras J, Wieers G, Vaerman JL, Truong DQ, Sokal E, Otte JB, Délépaut B, Cornet A, de Ville de Goyet J, Latinne D, Reding R (2007) Early immunological monitoring after pediatric liver transplantation: cytokine immune deviation and graft acceptance in 40 recipients. *Liver Transplant* 2007; 13: 426-433
 - Gross JA, Shackleton CR, Mc Diarmid SV, Maggard M, Swenson K, Seu P, Vargas J, Martin M, Ament M, Brill J, Harrison R, Busuttil RW (1998) Long-term results after pediatric liver transplantation: an analysis of 569 transplants. *Ann Surg* 1998; 228: 411-420
 - Guan Z, Vgontzas AN, Omori T, Peng X, Bixler EO, Fang J (2005) Interleukin-6 levels fluctuate with the light-dark cycle in the brain and peripheral tissues in rats. *Brain Behav Immun* 2005; 19: 526-529

-
- Haga H, Egawa H, Fujimoto Y, Ueda M, Miyagawa-Hayashino A, Sakurai T, Okuno T, Koyanagi I, Takada Y, Manabe T (2006) Acute humoral rejection and C4d Immunostaining in ABO blood type-incompatible liver transplantation. *Liver Transplant* 2006; 12: 457-464
 - Hall B, Pearce N, Gurley K, Dorsch SE (1990) Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with Cyclosporine. III. Further characterization of the CD4⁺ suppressor cell and its mechanism of action. *J Exp Med* 1990; 171: 141-157
 - Hippen BE, Demattos A, Cook WJ, Kew CE II, Gaston RS (2005) Association of CD20⁺ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2248-2252
 - Huang Y, Shan J, Zhang C, Zhang J, Feng L, Li S, Li Y (2010) Peripheral blood T regulatory cell counts may not predict transplant rejection. *BMC Immunol* 2010; 11: 40
 - Hübscher SG, Portmann BC (2007) Transplantation pathology. Alastair D, Burt BCP, Linda D, Ferrell (eds) *MacSween's Pathology of the liver*, 6th edn. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007: 815-879
 - Israeli M, Yussim A, Mor E, Sredni B, Klein T (2007) Preceding the rejection: in search for a comprehensive post-transplant immune monitoring platform. *Transpl Immunol* 2007; 18: 7-12
 - Israeli M, Klein T, Sredni B, Avitzur Y, Mor E, Bar-Nathen N, Steinberg R, Dinari G, Shapiro R (2008) ImmuKnow: a new parameter in immune monitoring of pediatric liver transplantation recipients. *Liver Transplant* 2008; 14: 893-898
 - Jain A, Mazariegos G, Kashyap R, Kosmach-Park B, Starzl TE, Fung J, Reyes J (2002) Pediatric liver transplantation. A single center experience spanning 20 years. *Transplantation* 2002; 73: 941-947
 - Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K (2008) Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 2008; 40: 3390-3392
 - Kayler LK, Lais FG, Morgan C, Basu A, Blisard D, Tan HP, McCauley J, Wu C, Shapiro R, Randhawa PS (2007) Acute cellular rejection with CD20-positive lymphoid clusters in kidney transplant patients following lymphocyte depletion. *Am J Transplant* 2007; 7: 949-954
 - Kingsley CI, Karim M, Bushell Ar, Wood KJ (2002) CD25⁺CD4⁺ regulatory cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-1086
 - Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M (2007) Histologic eosinophilia as an aid to diagnose acute cellular rejection after living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 214-218
 - Krampe K, Briem-Richter A, Fischer L, Nashan B, Ganschow R (2010) The value of immunoprophylaxis for cytomegalovirus infection with intravenous immunoglobulin in pediatric liver transplant recipients receiving a low-dose immunosuppressive regimen. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 67-71

-
- Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, Rudolph B, Neumann U, Theruvath T, Neuhaus P, Krenn V (2004) Description of B lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 78: 65-70
 - Liang TB, Yu ZY, Zheng SS (2006) Expression of non-T cell derived cytokines in acute rejection after heart transplantation: experiment with mouse model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 26-30
 - Lang M, Neumann UP, Müller AR, Bechstein WO, Neuhaus R, Neuhaus P (1999) Komplikationen der perkutanen Leberbiopsie bei Patienten nach Lebertransplantation. *Z Gastroenterol* 1999; 37: 205-208
 - Lehnhardt A, Mengel M, Pape L, Ehrich JH, Offner G, Strehlau J (2006) Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. *Am J Transplant* 2006; 6: 847-851
 - Lindner H (1971) Das Risiko der perkutanen Leberbiopsie. *Med Klin* 1971; 66: 924-929
 - Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masude K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakagushi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K (2004) Analysis of peripheral blood mononuclear cells on operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 2118-2125
 - Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, Sakaguchi S, Tanaka K, Uemoto S, Koshiba T (2008) The presence of FoxP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86: 1837-1843
 - Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711
 - Mañez R, Kusne S, Linden P, Gonzalez-Pinto I, Bonet H, Kramer D, Fung JJ, Starzl TE (1994) Temporary withdrawal of immunosuppression for life-threatening infections after liver transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 149-151
 - Mannon RB (2012) Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 20-25
 - Mantel PY, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB (2006) Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 2006; 176: 3593-3602
 - Markus PM, van den Brink M, Cai X, Harnaha J, Palomba L, Hiserodt JC, Cramer DV (1991) Effect of selective depletion of natural killer cells on allograft rejection. *Transplant Proc* 1991; 23: 178-179
 - Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernández-Fuentes M, Soullou JP, Sánchez-Fueyo A (2007) Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 309-319

-
- Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, Benitez C, Pons JA, Parilla P, Ramirez P, Brugera M, Rimola A, Sánchez-Fueyo A (2008) Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118: 2845-2857
 - Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, McMichael J, Fung JJ, Starzl TE (1997) Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 243-249
 - Mazariegos GV, Sindhi R, Thomson AW and Marcos A (2007) Clinical tolerance following liver transplantation: Long term results and future prospects. *Transpl Immunol* 2007; 17: 114-119
 - Menghini G (1958) One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterol* 1958; 35: 190-199
 - Millán O, Benitez C, Guillén D, López A, Rimola A, Sánchez-Fueyo, Brunet M (2010) Biomarkers of immunoregulatory status in stable liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive therapy. *Clin Immunol* 2010; 137: 337-346
 - Murphy MS, Harrison R, Davies P, Buckels JA, Mayer AD, Hübscher S, Kelly DA (1996) Risk factors for liver rejection: evidence to suggest enhanced allograft tolerance in infancy. *Arch Dis Child* 1996; 75: 502-506
 - Nafady-Huego H, Li Y, Ohe H, Zhao X, Satoda N, Sakaguchi S, Wood K, Uemoto S, Koshiba T (2010) The generation of donor-specific CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ naive regulatory T cells in operationally tolerant patients after pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 1547-1555
 - Nagral A, Ben-Ari Z, Dhillon AP, Burroughs AK (1998) Eosinophils in acute cellular rejection in liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1998; 4: 355-362
 - Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA (1997) Polarization of IL-4 and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells following activation of naïve CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1997; 158: 1085-1094
 - Ng VL, Anand R, Martz K, Fecteau A (2008) Liver retransplantation in children. A SPLIT database analysis of outcome and predictive factors for survival. *Am J Transplant* 2008; 8: 386-395
 - Oliveros FH, Santamaria ML, Gámez M, Murcia J, Leal N, Frauca E, Hierro L, Camarena C, de la Vega A, Bortolo G, Diaz MC, Jara P (2005) Comparative study between living and cadaveric donors in pediatric liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3936-3938
 - Otte JB, Ville de Goyet J, Sokal E et al. (1990) Size reduction of the donor liver is a save way to alleviate the shortage of size-matched organs in pediatric liver transplantation. *Ann Surg* 1990; 211: 146-157
 - Palm S, Postler E, Hinrichsen H, Maier H, Zabel P, Kirch W (1996) Twenty-four-hour analysis of lymphocyte subpopulations and cytokines in healthy subjects. *Chronobiol Int* 1996; 13: 423-434
 - Perrella O, Sbriglia C, Arenga G, Perrella A, Ferrara A, D'Antonio A, Di Costanzo G, Atripaldi L, Alone C, Sciano D, Cuomo O (2006) Acute Rejection after liver transplantation: Is there a specific immunological pattern? *Transplant Proc* 2006; 38: 3594-3596

-
- Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G (1986) Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68276 biopsies. *J Hepatol* 1986; 2: 165-173
 - Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H (1988) Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (Splitting-Transplantation) – Eine neue Methode in der Weiterentwicklung der Lebersegmenttransplantation. *Langenbecks Arch Chir* 1988; 373: 127-130
 - Pichlmayr R, Oldhafer KJ, Rodeck B (1995) Organtransplantation beim Kind. *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 92: 49-55
 - Pons J, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, Robles R, Rios A, Aparicio P and Parilla P (2008) FoxP3 in Peripheral Blood is Associated With Operational Tolerance in Liver Transplant Patients During Immunosuppression Withdrawal. *Transplantation* 2008; 86: 1370-1378
 - Pratschke J, Stauch D, Kotsch K (2009) Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl Int* 2009; 22: 859-868
 - Racusen LC (2008) Tregulatory Cells in Human Transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1359-1360
 - Regateiro FS, Howie D, Cobbold SP, Waldmann H (2011) TGF- β in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 660-669
 - Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Nour B, Nalesnik M, Trucco M, Abu-Elmagd K, Fung JJ, and Starzl TE (1993) Frequent achievement of drug-free state after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 3315-3319
 - Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ (2006) High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006; 108: 1291-1297
 - Richter A., Grabhorn E., Helmke K, Manns MP, Ganschow R, Burdelski M (2007) Clinical relevance of autoantibodies after pediatric liver transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 427-432
 - Rowshani AT, Vereyken EJ (2012) The role of macrophage lineage cells in kidney graft rejection and survival. *Transplantation* 2012; 94: 309-318
 - Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
 - Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD24⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology* 2005; 6: 345-352
 - Sakamoto R, Asonuma K, Ramirez MEZ, Yoshimoto K, Nishimori A, Inomata Y (2009) Forkhead box P3 (FoxP3) mRNA expression immediately after living-donor liver transplant. *Exp Clin Transplant* 2009; 1: 8-12
 - Sanchez-Fueyo A, Strom TB (2004) Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 41: 698-705

-
- Sanchez-Fueyo A, Strom TB (2011) Immunological basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterol* 2011; 140: 51-64
 - Scheffold A, Murphy KM and Höfer T (2007) Competition of cytokines: T reg cells take all. *Nature Immunology* 2007; 12: 1285-1287
 - Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, Shearon TH, Emond JC, Fair JH, Fisher RA, Kulik LM, Pruett TL, Terrault NA and the A2ALL Study Group (2009) Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor organ liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 301-308
 - Sornsakrin M, Helmke K, Briem-Richter A, Ganschow R (2010) Value of ultrasound-guided percutaneous liver biopsy in children following liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 51: 635-637
 - SPLIT Research Group (2001) Studies of pediatric liver transplantation (SPLIT). Year 2000 outcomes. *Transplantation* 2001; 72: 463-476
 - Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963) Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963; 117: 659-676
 - Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ Jr, Porter KA (1968) Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968; 168: 392-415
 - Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M (1993) Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: The basis of graft acceptance. *Hepatology* 1993; 17: 1127-1152
 - Stegalla M, Raghavaiah S, Gloorb J (2010) The (re)emergence of B cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 451-455
 - Stenard F, Nguyen C, Cox K, Kambham N, Umetsu DT, Krams SM, Esquivel CO, Martinez OM (2009) Decreases in circulating CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells and increase in intragraft FOXP3⁺ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transplant* 2009; 13: 70-80
 - Suthanthiran M und Strom TB (1994) Renal transplantation. *N Engl Med* 1994; 331: 365-376
 - Talukdar A, AshokKumar C, Farrar J, Wilson P, Janakiraman A, Tregaskes M, Sindhi R (2008) Lymphocyte subset reconstitution in pediatric liver recipients induced with steroid-free rabbit anti-human thymocyte globulin. *Pediatr Transplant* 2008; 12: 804-808
 - Tsai E, Ettenger R (2009) B cells and rejection: Is there a link? Meaning and management of rejection characterized by steroid-resistance and B-cell infiltrates. *Pediatr Transplant* 2009; 13: 150-154
 - Wongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF (2003) The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev* 2003; 196: 197-218
 - Wang S, Li J, Xie A, Wang G, Xia N, Ye P, Rui L, Xia J (2011) Dynamic changes in Th1, Th17, and FoxP3⁺ T cells in patients with acute cellular rejection after cardiac transplantation. *Clin Transplant* 2011; 25: 177-186

-
- Wang YI, Tang ZQ, Gao W, Jiang Y, Zhang XH, Peng L (2003) Influence of Th1, Th2, and Th3 cytokines during the early phase after liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 3024-3025
 - Wavamunno MD, Chapman JR (2008) Individualization of immunosuppression: concepts and rationale. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 604-608
 - Whittington PF, Alonso EM, Superina RA, Freese DK (2002) Liver transplantation in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35: 44-50
 - Wieërs G, Gras J, Bourdeaux C, Truong DQ, Latinne D and Reding R (2007) Monitoring tolerance after human liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007; 2: 83-93
 - Wolf D, Wolf AM, Fong D, Rumpold H, Strasak A, Clausen J, Nachbaur D (2007) Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2007; 83:1107-1113
 - Wood KJ, Luo S, Akl A (2004) Regulatory T-cells: potential in organ transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 6-8
 - Yang YF, Tomura M, Ono S, Hamaoka T and Fujiwara H (2000) Requirement for IFN- γ in IL-12 production induced by collaboration between V α 14⁺ NKT cells and antigen-presenting cells. *Int Immunol* 2000; 12: 1669-1675
 - Yoshizawa A, Ito A, Li Y, Koshiha T, Sakagushi S, Wood KJ and Tanaka K (2005) The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 37-39
 - Young MR, Matthews JP, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Scheving LE (1995) Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiology International* 1995; 12: 19-27
 - Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J (2005) Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 2903-2911

8. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu dürfen verdanke ich Herrn Prof. Dr. med. Björn Nashan und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rainer Ganschow, dem ich besonders für seine differenzierten Verbesserungsvorschläge zur Ausarbeitung und Hilfe bei der Recherche der aktuellen Literatur danke.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Andrea Briem-Richter. Als Betreuerin dieser Arbeit war sie mir mit ihrer unermüdlichen Geduld und ihrem außerordentlichen Engagement eine große Hilfe. Mit ihrer freundschaftlichen Art und positiven Einstellung verstand sie es stets mich in unseren Besprechungen weiter zu motivieren und somit unser Forschungsprojekt voranzutreiben.

Liebe Andrea, Du bist niemals müde geworden meine zahlreichen Fragen geduldig zu beantworten. Ich konnte mit jedem Problem zu dir kommen, wofür ich Dir sehr dankbar bin. Du hast mich wirklich sehr gut betreut!

Einen speziellen Dank möchte ich an Frau Jutta Giesecking aus dem Labor der Kinderklinik richten, die mir stets eine verlässliche Ansprechpartnerin war und den experimentellen Teil unseres Forschungsprojekts durch ihre Ideen und Anregungen bereicherte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Haag und dem Labor-Team des Instituts für Immunologie für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Messungen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Patienten und ihren Eltern für die Teilnahme an diesem Forschungsprojekt bedanken. Die interessante und herzliche Zusammenarbeit mit den kleinen Patienten bestärkte mich immer wieder in meinem Bestreben Kinderarzt zu werden.

Zu guter Letzt danke ich natürlich meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, um ein erfolgreiches Medizinstudium absolvieren zu können.

Ihr habt immer an mich geglaubt und gerade vor Beginn meines Studiums meine Entscheidungen respektiert und diese darüber hinaus tatkräftig unterstützt. Dafür bin ich Euch sehr dankbar. Somit wäre also letztlich auch diese Arbeit ohne Eure damalige Hilfe nicht möglich gewesen.

Daher möchte ich Euch diese Arbeit widmen und mich für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

9. Lebenslauf

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: