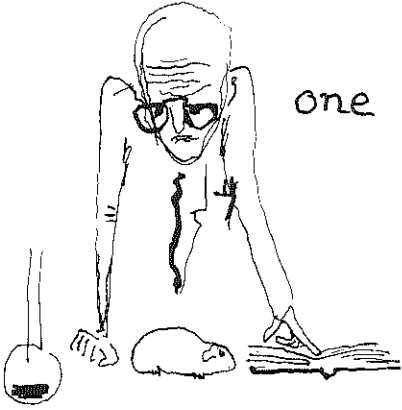


HUID ALLO-TRANSPLANTATIE EN
IMMUNOSUPPRESSIE MET ANTILYMPHOCYTEN SERUM
BIJ UITGEBREIDE VERBRANDINGEN.



one



injects



a substance



into



an animal.....

HUID ALLO-TRANSPLANTATIE EN
IMMUNOSUPPRESSIE MET ANTILYMPHOCYTEN SERUM
BIJ UITGEBREIDE VERBRANDINGEN.

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde
aan de Medische Faculteit te Rotterdam, op gezag van
de Dekaan Dr J. Moll, Hoogleraar in de faculteit der geneeskunde,
tegen de bedenkingen van het College van Dekanen
uit de faculteit der geneeskunde te verdedigen op

Woensdag 10 januari 1973

te 16.00 uur

door

Robert Karl Johan Koumans

geboren te Freiburg (i.B.) in 1932

1972

GEMEENTEDRUKKERIJ ROTTERDAM

Promotor : Prof. Dr P. J. Kooreman

Co-promotor : Prof. Dr D. W. van Bakkum

Co-referenten: Dr H. Balner, Dr D. L. Westbroek

De in dit proefschrift vermelde onderzoeken werden verricht in de laboratoria van Dr J. F. Burke in het Massachusetts General Hospital en het Shriners Burns Institute te Boston.

Degenen, die hun medewerking verleenden aan het tot stand komen van de publicaties worden in hoofdstuk 3 en 4 afzonderlijk genoemd.

Het manuscript werd voorbereid op de heelkundige afdeling van het Zuiderziekenhuis, hoofd Prof. Dr P. J. Kooreman, opgevolgd door Dr G. A. A. Olt-huis.

De tekst van de inleiding werd gereed gemaakt door Mej. I. Daams; de literatuurlijst door Mevr. I. van den Bergh-Snoek en Mej. A. J. Baggerman.

De uitgave van het proefschrift werd gesteund door de Nederlandse Brandwonden Stichting en Behringwerke AG, Marburg, Duitsland.

Het verblijf in de Verenigde Staten werd mede mogelijk gemaakt door medewerking van de Medische Faculteit te Rotterdam.

INHOUD

Hoofdstuk 1

I	<i>Inleiding</i>	10
	<i>Mortaliteit</i>	11
II	<i>Vroege Excisie</i>	13
III	<i>Mogelijkheden van wondsluiting</i>	14
1	Het gebruik van kunststoffen	14
2	Het biologisch wondverband	14
3	Gebruik van autologe huid	15
4	Allo-transplantatie van huid	17
	Transplantatie antigenen en weefseltypering	17
	Weefseltypering en overlevingsduur van huidtransplantaten	19
IV	<i>De immunologische afstotingsreactie</i>	21
1	Immunocompetente cellen, T en B lymphocyten	21
2	De afstotingsreactie van huid	23
3	Invloed van hoge doses antigenen op transplantaat overleving	23
4	Invloed van het verbrandingstrauma op het immuunsysteem	25
V	<i>Immunosuppressie – Antilymphocyten Serum</i>	26
1	Ioniserende stralen	26
2	Cytostatica	26
3	Corticosteroiden	27
4	Antilymphocyten Serum	27
	Bereiding	27
	Zuivering van ALS	28
	Immunosuppressieve eigenschappen	29
	Werkingswijze van ALS	30
	Toediening van ALS	30
	Bijwerkingen van ALS	30
	Klinische ervaringen met ALS	31
VI	<i>Samenvatting van het onderzoek</i>	32
	Litteratuur	33

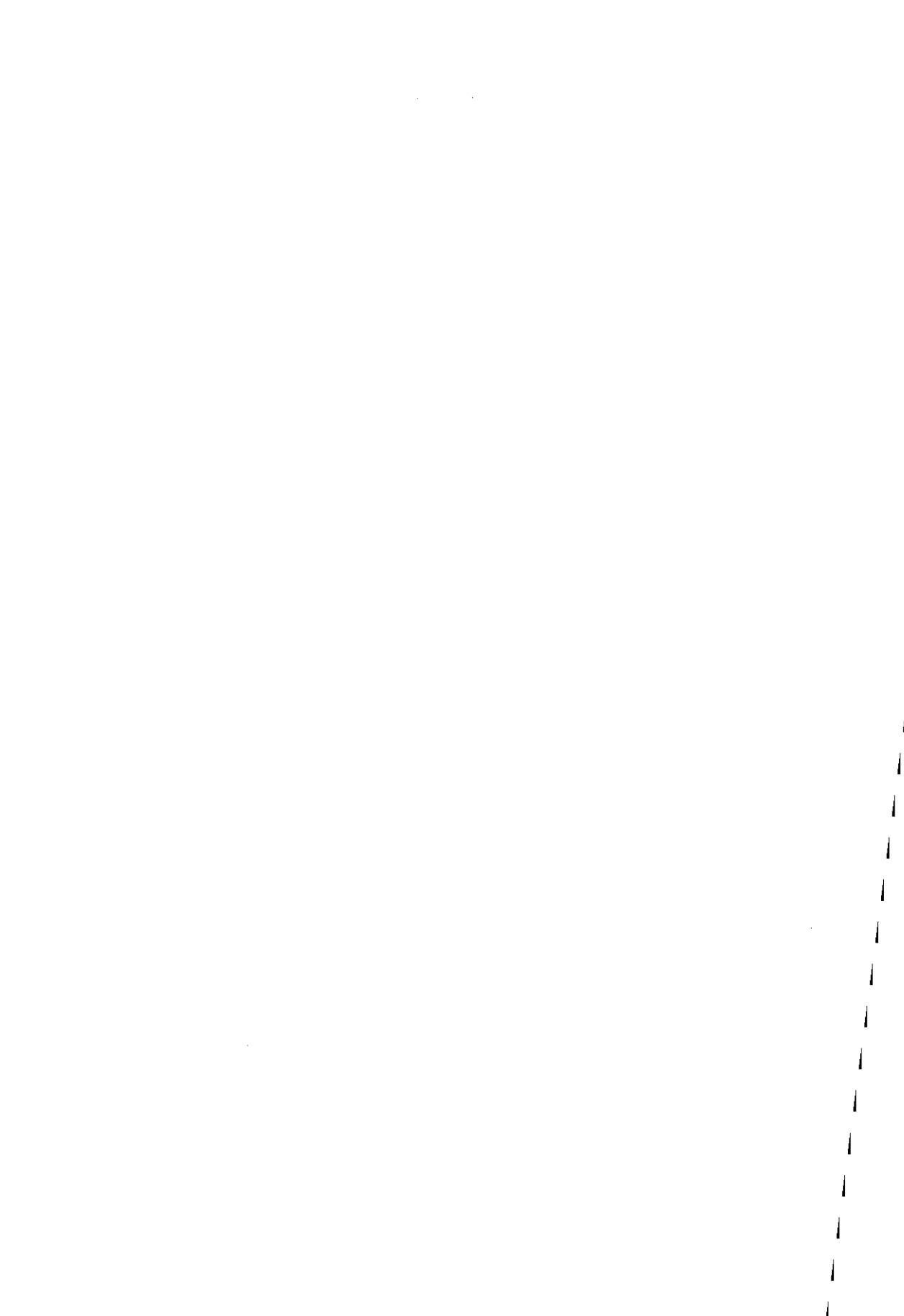
Hoofdstuk 2

	<i>Huid allo-transplantatie en immunosuppressie bij uitgebreide verbrandingen</i>	41
	Samenvatting	41
	Material and Methods	43
	Results	44
	Discussion	48
	References	49

Hoofdstuk 3	
<i>Bijwerkingen van langdurige toediening van antilymphocyten serum</i>	51
Samenvatting	51
Material and Methods	54
Results	55
Discussion	57
References	59
Hoofdstuk 4	
<i>Histo-pathologisch onderzoek</i>	61
Samenvatting	61
Materials and methods	63
Results	65
Discussion	67
References	71
Figures	73
Hoofdstuk 5	
<i>Klinische mogelijkheden</i>	83
Litteratuur	88
Hoofdstuk 6	
<i>Nabeschouwing en conclusies</i>	91
<i>Summary</i>	96
<i>Lijst van gebruikte termen en afkortingen</i>	97

HOOFDSTUK 1

INLEIDING



'Medical knowledge appears superficially to grow more complicated each year, but it has long been our conviction that in biology and medicine true knowledge simplifies as it progresses.'

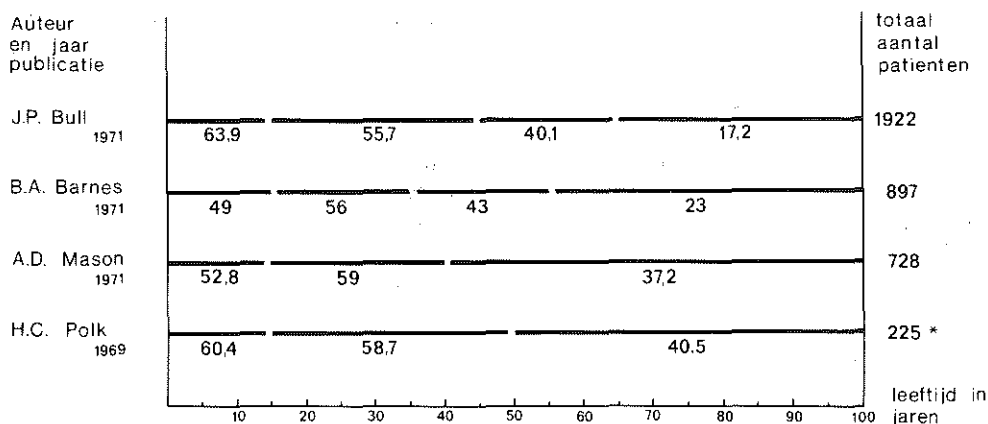
Francis D. Moore.

Ondanks nieuwe inzichten en therapeutische mogelijkheden betekenen uitgebreide verbrandingen van het lichaamsoppervlak nagenoeg onverminderd een ernstige bedreiging van het leven.

I MORTALITEIT

Omvangrijke statistische onderzoeken uit de laatste twee decennia geven een vrij volledig inzicht in de mortaliteit van het verbrandingstrauma in verschillende leeftijdsgroepen (Rittenbury e.a. 1966, Polk e.a. 1969, Barnes e.a. 1971, Bull 1971, Mason e.a. 1971).

De complexe en variabele factoren, die overleving na verbranding bepalen maken statistische bewerking evenwel moeizaam en onbevredigend. Teneinde een lineair verband te verkrijgen tussen mortaliteit en verbrand lichaamsoppervlak werd de statistische methodiek van de probit-analyse ingevoerd (Bull & Squire 1949). Ook deze geeft geen betrouwbare weergave van de overlevingskansen van een verbrande patiënt (Rittenbury e.a. 1966, Polk e.a. 1969). Een eenvoudig hanteerbaar begrip is de LA 50 (lethal area 50), d.w.z. het percentage verbrand lichaamsoppervlak, dat statistisch gezien een overlevingskans geeft van 50 percent. (zie fig. 1).



Figuur 1: LA 50 in 4 patiëntengroepen uit het tijdperk van locale antibacteriële chemotherapie met 0,5% zilvernitraatoplossing (Bull, Barnes, Polk) of 10% sulfamylon creme (Mason). De horizontale, onderbroken lijnen, geven de indeling in leeftijdsgroepen weer. De getallen daaronder de LA 50 voor de desbetreffende groep.

* Deze serie heeft in tegenstelling tot de drie overigen uitsluitend betrekking op 3e graads huidverlies.

De statistische bewerkingen van verschillende patiëntengroepen blijven echter meestal onderling slecht vergelijkbaar. Er worden uiteenlopende indelingen in leeftijd gehanteerd; de soort patiënten kan verschillen (Rittenbury e.a. 1966) evenals de klinische evaluatie van het percentage verbrand lichaamsoppervlak, terwijl het voornaamste statistische struikelblok is de differentiaal diagnose tussen 2e graads en 3e graads huidverbranding. Onder een 2e graads verbranding wordt verstaan een partieel verlies van epidermis, waarbij regeneratie vanuit in de dermis gelegen epitheliale elementen kan optreden. Een 3e graads verbranding betekent een volledig verlies van epitheel. Een 3e graads verbranding gaat ceteris paribus met een duidelijk grotere mortaliteit gepaard dan een partieel verbrandingsletsel. Om dit aspect mede in de beoordeling te betrekken is wel voorgesteld het gebied van 3e graads verbranding met een factor 2 tot 4 te belasten (Bull 1971).

Feitelijk is een betrouwbare diepte-diagnose van het verbrandingstrauma meestal slechts retrospectief mogelijk, wanneer de partieel verbrande huidgedeelten — zonder infectie — spontaan binnen 3 à 4 weken gere-epithelialiseerd zijn (Goris 1970).

Het bovengenoemde maakt duidelijk dat de — uit de statistische bewerking verkregen — gegevens weliswaar goed bruikbaar zijn als maatstaf voor een retrospectieve beoordeling van behandelingsresultaten, maar niet eo ipso gehanteerd kunnen worden als een betrouwbare graadmeter voor het voorspellen van de overlevingskansen van de verbrande patiënt (Bull 1971).

Een nadere beschouwing van recente statistische onderzoeken betreffende de mortaliteit bij uitgebreide verbrandingen (Polk e.a. 1969, Barnes e.a. 1971, Bull 1971, Mason e.a. 1971) leert, dat de gunstigste overlevingskansen liggen bij de leeftijdsgroep van 15 tot 40 jaar. Boven deze leeftijd neemt de LA 50 snel af. Bij kleine kinderen, van 0 — 4 jaar, is de LA 50 kleiner dan bij oudere kinderen.

Met de introductie in de brandwondenkliniek van lokaal toegepaste antibacteriële middelen als 0,5% zilvernitraatoplossing en 10% sulfamylon creme is over het algemeen enige toename van de LA 50 te constateren. Barnes (1971) vond in zijn series deze verbetering niet significant, hoewel hij constateerde dat de duur van overleving van patiënten, die uiteindelijk bezweken was toegenomen, terwijl de opnameduur bij overlevenden terug liep.

Aan het gebruik van breedspectrum antibiotica bij de verbrande patiënt wordt hier voorbijgegaan, daar hun introductie geen duidelijke verbetering in mortaliteit ten gevolge had. Een uitzondering hierop vormt de lokale toepassing van 0,1% gentamycine creme (Lowbury en Jackson 1968, MacMillan e.a. 1968).

De resultaten van bovengenoemde onderzoeken kan men aldus samenvatten:

1. Recente aanwinsten in de vorm van lokale antibacteriële therapie — 0,5% zilvernitraatoplossing (Moyer e.a. 1965); 10% sulfamylon creme (Lindberg e.a. 1965) en naar mag worden verwacht eveneens 1% zilverulfadiazine creme (Fox 1968) — hebben een duidelijke, zij het geringe verbetering gebracht in de overlevingskansen van de ernstig verbrande patiënt.
2. Derde graads verbrandingen vormen een veel grotere bedreiging voor het leven dan oppervlakkige verbrandingen. In het algemeen geldt dat een 3e graads verbranding van meer dan 65% van het lichaamsoppervlak zonder meer een lethaal trauma betekent (Rittenbury e.a. 1966, Polk e.a. 1969). Bij de leeftijdsgroepen boven de 40 jaar en beneden de 4 jaar ligt dit percentage nog lager.

Het meedogenloze feit, dat ondanks nieuwe verworvenheden in de behandeling van de ernstig verbrande patiënt de mortaliteit slechts in zo geringe mate is teruggedrongen, vormde de voornaamste drijfveer voor dit onderzoek.

II VROEGE EXCISIE

It is an extraordinary commentary on the pacificity of the surgeon, that he has been sitting on the sidelines for so many years, watching the fullthickness wound degenerate into a bacterial quagmire, when the means of healing it promptly by excision and grafting, a simple practice of his art, were at hand.'

Oliver Cope, 1947.

De sleutel tot succesvolle behandeling van de ernstig verbrande patiënt is het vroege sluiten van de brandwond. Gedurende het gehele ziekteverloop na de verbranding, dient agressieve therapie gericht te zijn op dit doel (Larson 1965).

Een huidverbranding is geen stationair letsel waarvan de anatomische en pathofysiologische begrenzingsen zijn vastgesteld op het moment van de verbranding. Na het verbrandingstrauma treedt progressieve thrombose op van bloedvaten onder het verbrande gebied (Order e.a. 1965). De brandwond bestaat weldra niet alleen uit een necrotische laag, maar ook uit daaronder liggend oedemateus en hypoxisch weefsel. Zelfs zonder besmetting van buiten vormen bacteriën, uit epidermale appendices als haarfollikels en zweetklieren afkomstig, een potentieel infectiegevaar.

Door teloorgaan van de specifieke barrière-functie van de huid, wordt het verdere ziektebeloop gekenmerkt door continu verlies van proteïnen, electrolyten en vocht. Cope vestigde voor het eerst de aandacht op de hypermetabole toestand welke zich manifesteert in aansluiting op uitgebreide verbrandingen. Het basaal metabolisme kan met 100% toenemen (Cope e.a. 1953). Het verhoogde zuurstofgebruik vindt vnl. zijn oorsprong in energieverlies ten gevolge van de verdamping van water via de defecte huid. Bij normale lichaamstemperatuur bedraagt de verdampings-energie welke aan het lichaam wordt onttrokken 580 Cal. per liter. Een verbranding van meer dan 25% van het lichaamsoppervlak van een normale volwassene (totaal lichaamsoppervlak 1,7 m²) heeft door verdamping alleen een vochtverlies ten gevolge van 2,5 tot 4 liter per dag (Barr e.a. 1968, Gump en Kinney 1970).

Het hyper-metabolisme, de verdampingsnelheid en de uitgebreidheid van de verbranding staan in hechte onderlinge verhouding met elkaar (Roe en Kinney 1964). De huidige methoden van locale chemotherapie verhinderen het vochtverlies niet. Integendeel, met uitzondering van 0,5% zilvernitraatoplossing, zouden zij de verdamping van vocht kunnen doen toenemen (Jelenko 1969). Inmiddels geraakt de patiënt in een ernstige katabole situatie. De stikstofbalans is negatief en ondanks locale of systematische antibacteriële therapie kan in de meeste gevallen een invasie met pathogene micro-organismen niet worden verhinderd. Binnen 24 uur na het verwijderen van het dode weefsel en aanbrengen van huidtransplantaten wordt de brandwond steriel (Eade 1958); verlies van vocht, proteïnen en electrolyten komt tot staan, en de patiënt geraakt snel in een anabole toestand (Larson 1965, MacMillan 1962, Shuck 1970).

Klinisch is het meest opvallende de ommekeer in het psychisch welbevinden van de patiënt, gepaard met het verdwijnen van pijn (Shuck 1970). Het maakt in eerste instantie geen verschil of voor het sluiten van het huiddefect gebruik wordt gemaakt van auto- of allotransplantaten (Burke en Bondoc 1968). Gezien deze bevindingen is het niet verwonderlijk dat de laatste jaren, bij de behandeling van 3e graads verbrandingen een duidelijke tendens te onderkennen is naar primaire excisie van het dode weefsel en sluiten van het huiddefect (Feller 1959, Jackson e.a. 1960, Cramer e.a. 1962, Switzer e.a. 1965, Hendren e.a. 1968, Bennet en Thompson 1969, Haynes 1969).

Ook in ons land is door verschillende onderzoekers op het belang van de vroege excisie en transplantatie gewezen (Sneep e.a. 1959, 1959a, Hermans en Schepel 1967, Hermans 1968, 1971), waarbij zondig tevens gebruik werd gemaakt van allotransplantaten (Sneep 1956, Sneep

1959 b, de Grootte 1961). De indicaties tot vroege excisie zijn grotendeels in het voorgaande te vinden. MacMillan (1970) vat de voordelen aldus samen: voorkomen van brandwond-infecties met alle complicaties van dien; vermindering van contractuurvorming en beter functioneel herstel.

Onder de vele aanhangers van primaire excisie en huidtransplantatie bij de behandeling van brandwonden heerst geen eensluidende mening over de waarde van deze therapie ter verbetering van de overlevingskans bij zeer uitgebreide verbrandingen.

Dit is een gevolg van het feit dat ruimere primaire excisie (meer dan 15 – 20% verbrand lichaams oppervlak) in de handen van veel auteurs geen duidelijk verbeterde overleving biedt. De oorzaak hiervan ligt deels in niet te onderschatten technische problemen, die een dergelijke grote operatieve ingreep met zich brengt, deels in het nog onopgeloste vraagstuk hoe het bestaande huiddefect na excisie te sluiten.

Incidentele opmerkelijke resultaten bewijzen, dat de technische hindernissen niet onoverkomelijk zijn en de oplossing van het tweede probleem gevonden kan worden door gebruik te maken van allogene huid (Kay 1957, Bennet en Thompson 1969, Jackson e.a. 1960, Feller 1959).

Het is de grote verdienste van Sneep geweest, te hebben gewezen op het belang van de primaire excisie en transplantatie voor een goed herstel van de sensibiliteit. Bij vroege transplantatie is de terugkeer van sensibiliteit voor alle kwaliteiten nagenoeg ongestoord; bij secundaire transplantatie herstelt de sensibiliteit zich slechts ten dele of in het geheel niet (Sneep e.a. 1959).

Met Jackson (1960) zijn wij dan ook van mening, dat de meest klemmende indicatie voor primaire excisie en transplantatie gevormd wordt door de zeer uitgebreide 3e graads huidverbranding.

III MOGELIJKHEDEN VAN WONDSLUITING

Teneinde uitgebreide huiddefecten doelmatig te bedekken staan in beginsel vier uiteenlopende wegen open, welke zijn samengevat in hoofdstuk 5.

1. Het gebruik van kunststoffen

Synthetische huid heeft nog steeds niet aan de verwachtingen voldaan, die gezien de uiterst gecompliceerde functie van de huid als orgaan, er ook niet aan gesteld kunnen worden. Verschillende materialen zijn in de loop der laatste jaren beproefd als huid-prothese (Spira e.a. 1969). Septische complicaties blijven de ontwikkeling van een artificiële huid in de weg staan (Skornik 1971). Gebruik ervan kan dan ook slechts aangewezen zijn als noch auto- noch allotransplantaat ter beschikking staat (Spira e.a. 1971).

2. Het biologisch wondverband

De bovenstaande beperkingen gelden eveneens voor het gebruik van al of niet gelyophiliseerde xenogene weefsels als huid van varkens (Law e.a. 1971, Song en Bromberg 1971, German e.a. 1972); van honden (Switzer e.a. 1966) en foetale kalfshuid (Rogers en Converse 1958). Door foetale kalfshuid gedurende enkele uren in donor-RNA te incuberen, zou dit weefsel vertraagd worden afgestoten en beter bruikbaar zijn als tijdelijke bedekking voor de brandwond (Seinfeld e.a. 1971).

Het gebruik van deze materialen wordt samengevat met het begrip biologisch wondverband ('biological dressing'), waarbij het epitheton 'biologisch' in wezen meer slaat op de herkomst dan op de functie van het 'transplantaat'. Ook humane foetale membranen (Klen 1971) en gelyophiliseerde cadaverhuid dienen gerangschikt te worden onder dit begrip. Hetzelfde geldt voor het steeds meer toegepaste gebruik van vitale cadaverhuid (MacMillan 1962, Zaroff e.a. 1966, Burke en Bondoc 1968, Shuck e.a. 1971). Hoewel hier wel degelijk sprake is van een kortdurend functioneel herstel, vereist deze vorm van wondbehandeling immers frequent wisselen van het transplantaat, daar na 5 dagen vascularisatie van de overgeplante huid zover gevorderd is dat verwijdering slechts middels excisie kan gebeuren en met bloedverlies gepaard gaat. Wacht men spontane afstoting af dan is een locale — en bij grotere transplantaten gegeneraliseerde — ontstekingsreactie het gevolg. De patiënt wordt koortsig en ziek; de wond is wederom ongeschikt voor definitieve bedekking en staat weer bloot aan invasieve bacteriële infectie (Burke en Koumans 1969, Shuck 1970).

3. Gebruik van autologe huid.

Eigen huid is ongetwijfeld het beste transplantaat. Doordat het areaal geschikte donorplaatsen beperkt is en deels verder ingeperkt kan zijn door het verbrandingstrauma, kan men in het algemeen evenwel niet meer dan 20% verbrand lichaamsoppervlak met autologe huid bedekken (Hermans 1971). Er is daarom naarstig gezocht naar methoden om met de beschikbare eigen huid grotere defecten te re-epithelialiseren. Door middel van incubatie met trypsine van dunne huidfragmenten is het mogelijk, de epidermis geheel van de dermis los te maken (Medawar 1941). Het zo verkregen, anatomisch intacte, zuiver epidermale vlies kan als een levende cellaag getransplanteerd worden. Het is ook mogelijk door verdere behandeling met trypsine en mechanische bewerking een suspensie te bereiden van levende epitheliale cellen (Billingham en Reynolds 1952). Met deze cel-suspensie kan in principe een ongekende epitheliale spreiding bereikt worden. Hoewel deze zuiver epidermale transplantaten aanvankelijk aanslaan, wordt nooit adequate huid verkregen. De wondcontractie schrijdt voort en na enkele weken is van het oorspronkelijk transplantaat niets meer terug te vinden (Billingham en Reynolds 1952).

Een tweede interessante mogelijkheid tot epidermale spreiding bestaat uit het transplanteren van epitheliale weefselkweken. Hoewel ook op deze wijze aanvankelijk een vitale epidermale wondbedekking wordt verkregen, gaat in de loop van enkele weken het transplantaat te gronde (Karasek 1968). De slotsom van deze onderzoekers is eensluidend, dat voor de normale ontwikkeling en instandhouding van het epidermale transplantaat een dermale ondergrond onmisbaar is. Deze belangwekkende gegevens uit het dier-experiment konden bij de mens worden bevestigd (Van Scott 1965). Uit scherpzinning en uitgebreid speurwerk blijkt dat epidermis en dermis functioneel onafscheidelijk zijn en dat er een zeer nauwe inducerende en regulerende samenhang bestaat tussen het mesenchymale weefsel van de dermis en het ectodermale weefsel van de epidermis (Billingham en Silvers 1963, Wessels 1967, Briggaman en Wheeler 1968). Naast de klaarblijkelijk passieve functie van de dermis als onontbeerlijk substraat waarop de cellen van het stratum germinativum zich kunnen hechten en prolifereren, reguleert de dermis onder meer snelheid en aard van differentiatie van het bedekkend epitheel en de ontwikkeling van epitheliale adnexen.

In 1895 gelukte het von Mangoldt, gebruik makend van 'epithel Brei', bestaande uit dermale en epidermale componenten, epithelialisatie van wondoppervlakten te bewerkstelligen. Een dergelijk resultaat werd in het dier-experiment verkregen met een suspensie van huidpartikels. Weliswaar trad wondretractie op tijdens het genezingsproces, doch 25% van het oorspronkelijk oppervlak bleef met het transplantaat bedekt. De suspensie bevatte relatief veel dermaal weefsel (Najarian e.a. 1957).

Tanner maakte gebruik van suspensies van huiddeeltjes van verschillende grootte (Tanner e.a. 1965). Hij concludeerde dat voor een bevredigend resultaat de huidfragmenten niet kleiner mochten zijn dan 2 mm en dat een ruime hoeveelheid dermis onontbeerlijk was voor uitgroei en overleving van het transplantaat.

Deze methoden werden weinig geschikt geacht voor klinische toepassing, doch maakten duidelijk dat voor een succesvolle huidtransplantatie beide componenten van de huid dienen te worden overgeënt.

Terugkerend tot de klinische toepassingmogelijkheden, mag in een kort overzicht van de ontwikkeling van verspreidingstechnieken de naam Reverdin niet onvermeld blijven.

Hij slaagde er reeds ruim een eeuw geleden in grote wondoppervlakten te bedekken gebruik makend van uitgroei van epitheel vanuit kleine getransplanteerde huideilandjes (Reverdin 1869). Een vervolmaking van deze methode is de micro-transplantatie techniek van Meek (1958, 1963).

Tanner heeft voortbouwend op zijn bovenvermelde experimenten met de uitvinding van de mesh-graft dermatoom een belangrijke bijdrage geleverd tot de ontwikkeling van een bevredigende verspreidingstechniek voor huidtransplantatie (Tanner e.a. 1964). Met dit instrument worden talloze kleine alternerende en evenwijdige incisies in een reep 'split-thickness' huid aangebracht, waarna dit zich tot een netvormige structuur laat uitstrekken. Er wordt aldus een spreiding verkregen van 3 op 1. Met een recentere uitvoering van het apparaat kan zelfs een spreiding van 12 op 1 worden bereikt. Bij voorspoedige wondgenezing kan epithelialisatie van het wondoppervlak voltooid zijn in 10 dagen bij de kleinere spreiding en in 21 dagen bij maximale spreiding van het transplantaat (Tanner e.a. 1969, 1971). In ons land is deze methode bij de vroege excisie van brandwonden door Hermans zorgvuldig en met succes beproefd (Hermans 1968). Verbrandingen van maximaal 40% verbrand lichaams oppervlak werden aldus binnen 2 tot 3 weken tot kleine defecten gereduceerd (Hermans 1971).

Het voordeel van deze behandelwijze zal uit het voorafgaande duidelijk zijn. Er zijn evenwel aan deze methode ook nadelen verbonden. Het epitheel dat uitgroeit in de mazen van het transplantaat is littekenepitheel. Papillen en adnexen ontbreken. Het functionele resultaat is omgekeerd evenredig met de mate van spreiding. Conventionele 'split-thickness' huidtransplantaten worden beter gevasculariseerd en gereïnnerveerd en zijn beter bestand tegen mechanische invloeden; zij zijn te verkiezen als bedekking van vitale structuren en over gewrichten en eigenlijk te allen tijde, wanneer voldoende eigen huid voorhanden is (Tanner e.a. 1964, DiVicenti e.a. 1969). Een technische beperking van de mesh-graft methode is het feit dat een hernieuwde oogst aan huid van een tevoren gebruikt donorgebied — re-epithelialisatie hiervan is meestal binnen 2 weken voltooid — zich door de veranderde consistentie van het vers genezen weefsel, slecht leent voor verwerking in het mesh-graft dermatoom.

Het belangrijkste bezwaar, dat vooral zwaar weegt bij zeer uitgebreide verbrandingen, is dat na excisie en mesh-graft transplantatie in eerste instantie geen huiddefect gesloten wordt. Het onbedekte areaal is in feite aanvankelijk even groot als voor de behandeling. Metabool deficit en infectiegevaar blijven gehandhaafd om eerst geleidelijk af te nemen naarmate het transplantaat uitgroeit en de donorplaats geneest. In dit licht bezien zou het een interessant experiment zijn de mesh-graft te bedekken met allotransplantaten.

Vooralsnog ligt de grens tot waar met goed resultaat primaire excisie en mesh-graft bedekking werd toegepast bij 40% verbrand lichaams oppervlak (Hermans 1971).

Hoewel de hier genoemde verspreidingstechnieken (micro-graft en mesh-graft) een ontegenzeggelijk belangrijke aanwinst betekenen bij de behandeling van brandwonden, geven zij geen afdoend antwoord op de eis tot zo snel mogelijke sluiting van het verbrande gebied. Deze eis dient te dringender gesteld te worden, naarmate het initiële letsel de thans geldende uiterste grenzen van overlevingskans dichter benadert of zelfs overschrijdt.

*'So learned Taliacotius from
the brawny part of Porter's bum
cut supplemental noses, which
would last as long as Parent breech;
But when the last Date of Nock was out,
off dropt the sympathetic snout.'*

*S. Butler, Hudibras
The First Part, Canto I
London, Marriot 1663.*

Bovenstaande satyrische dichtregels behelzen een van de eerste beschrijvingen van de immunologische afstotingsreactie. De geleerde Taliacotius (Tagliacozzo, 1545 - 1599), wel beschouwd als de vader van de plastische chirurgie in Europa, meende dat duurzame allotransplantatie van huid in beginsel uitvoerbaar was, doch gebruikte zelf voor zijn plastische ingrepen autologe huid, wijzend op het uitzonderlijk karakter van het individu (Gnudi en Webster 1950). Nog ten tijde van Reverdin werd algemeen aangenomen, dat er geen essentieel verschil bestond in de mogelijkheden van allo- of autotransplantatie van huid.

4. Allotransplantatie van huid.

De ontwikkeling van de transplantatie biologie is ondenkbaar zonder de talloze experimenten, observaties en gevolgtrekkingen rond het gedrag van huid allotransplantaten (Gibson en Medawar 1943, Medawar 1944, 1945 a, b).

Nog steeds wordt het immunologische gedragspatroon van de gastheer zowel als de hierin al dan niet kunstmatige aangebrachte modificaties veelal getoetst aan de afstotingsnelheid van getransplanteerde huid.

De bevoorrechte positie van dit weefsel wordt gemakkelijk verklaard uit het feit dat de techniek van huidtransplantatie eenvoudig is; observatie van morfologische veranderingen in het transplantaat, zoals beginnende immunologische afstoting, macroscopisch noch stereo-microscopisch problemen geeft (Taylor en Lehrfeld 1953) en het transplantaat zich goed leent voor frequent histologisch onderzoek.

Onder huidtransplantatie wordt hier verder, in analogie met transplantatie van andere organen, bedoeld: de overplanting van huid als levend weefsel van één individu (donor) naar een ander individu (receptor) met het oogmerk een functioneel verlies van de eigen huid van de receptor zo lang mogelijk te vervangen.

Het is verwonderlijk dat in dit tijdperk, waar geen orgaan meer gevrijwaard schijnt te zijn voor overplanting een in alle betekenissen des woords zo voor de hand liggend weefsel als de huid tot voor kort deze dans was ontsprongen. (zie hoofdstuk 6).

Het centrale probleem in de transplantatie biologie is de immunologische reactie van de gastheer op het lichaamsvreemde weefsel. Het immunologisch apparaat van de receptor herkent het niet-eigen zijn aan specifieke antigenen welke zich voornamelijk op de celmembraan van het getransplanteerde weefsel bevinden.

Transplantatie antigenen en weefseltypering.

Weefseltransplantatie confronteert de in genetisch opzicht van de donor verschillende gastheer met antigenen welke immunoreacties in het leven roepen, die leiden tot afstoting van het

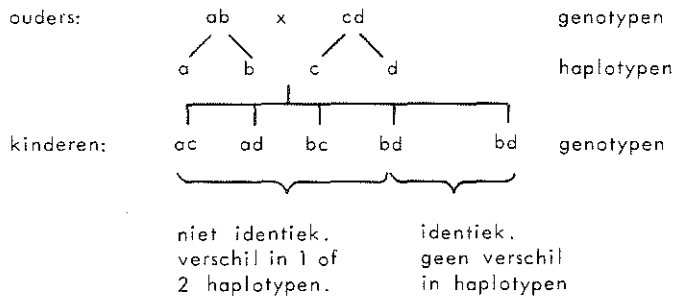
transplantaat. De ernst van de afstotingsreactie hangt af van de mate van histo-incompatibiliteit tussen donor en receptor of m.a.w. van de mate van onderlinge antigene verschillen.

Aard en aantal van deze histocompatibiliteits- of transplantatie antigenen zijn genetisch vastgelegd. Wanneer er genetische identiteit bestaat tussen gastheer en donor zal het transplantaat permanent worden geaccepteerd.

Dit is het geval bij homozygote tweelingen, en bij ingeteelde dierenstammen. Sinds de eerste ervaring van Bauer in 1927, van huidtransplantatie bij homozygote tweelingen zijn thans 7 van dergelijke gevallen beschreven (Niederhuber 1970).

Daar transplantatie antigenen ook gelocaliseerd zijn op de celmembraan van leucocyten en aldaar voor het eerst serologisch werden aangetoond (Dausset, 1958, van Rood e.a. 1958, 1962) worden zij ook leucocyten antigenen genoemd. Het genetisch systeem dat de voornaamste antigenen beheerst is gelegen op één autosomaal segment, de zgn. HL-A locus (Human Leucocyte locus A). Gelijksoortige systemen zijn aangetroffen bij de muis, rat, Rhesus aap en hond. De HL-A locus bestaat uit nauw verbonden sub-loci, waarvan momenteel een tweetal met zekerheid gedefinieerd is. Iedere sub-locus bestaat uit een nog onbekend aantal genen, die zich genetisch gedragen als allelen*, met dien verstande dat iedere chromosoom slechts één allele heeft voor elke sub-locus; ieder individu beschikt derhalve op de HL-A locus over 4 allelen, 2 voor elke sub-locus. Het HL-A systeem op één chromosoom wordt in zijn geheel overgeërfd. De chromosomale combinatie van één allele van elke sub-locus wordt een haplotype genoemd. Dit impliceert dat ieder individu twee HL-A haloptypen bezit. Een algemeen schema van overerving van de HL-A antigenen is afgebeeld in fig. 2. Hieruit blijkt dat bij kinderen van één ouderpaar slechts 4 verschillende HL-A genotypen mogelijk zijn.

Bij transplantatie tussen niet verwante donoren is de situatie uiteraard veel gecompliceerder. Momenteel zijn van de beide sub-loci tenminste 11 respectievelijk 17 verschillende allelen geïdentificeerd. Deze leveren in beginsel $11 \times 17 = 187$ verschillende haplotypen op die zich kunnen combineren tot 17578 verschillende HL-A genotypen. Velen hiervan resulteren in identieke phenotypen, zodat totaal ongeveer 7172 verschillende HL-A phenotypen nu reeds denkbaar zijn (Dausset 1971). Deze getallen geven evenwel een te pessimistisch beeld van de klinische mogelijkheden bij transplantatie van niet verwant weefsel. Enerzijds komen sommige HL-A phenotypen veel frequenter voor dan andere, waardoor de kans een geschikte donor/receptor combinatie te vinden aanmerkelijk toeneemt, anderzijds kunnen kruisreacties optreden met antigenen van donor en receptor, waardoor deze antigenen als zwakke transplantatie antigenen beschouwd kunnen worden (Dausset 1971, Kissmeyer-Nielsen en Thorsby 1970, van Rood en Eysvogel 1970).



Figuur 2: Segregatie van de HL-A allelen. De kans op identiteit voor de HL-A locus is 25%.

* Een allele is één van de twee of meer genen, gelegen op hetzelfde segment (locus) in homologe chromosomen, die elkaar bij de overerving uitsluiten.

Naast deze leucocyten antigenen fungeren ook de bloedgroep antigenen van het ABO systeem als transplantatie antigenen (Ceppelini e.a. 1966, 1969, b., Kissmeyer-Nielsen en Thorsby 1970).

Weefseltypering en overlevingsduur van huidtransplantaten.

Huidtransplantaten tussen HL-A genotypisch identieke kinderen vertonen een gemiddelde overleving van 25 - 30 dagen; tussen niet identieke kinderen daarentegen rond 15 dagen (Amos e.a. 1969, Ceppelini e.a. 1969, b).

Bij huidtransplantaties tussen een kind en één der ouders hebben donor en receptor steeds één HL-A haplotype gemeenschappelijk. Bij transplantatie tussen de kinderen onderling kan incompatibiliteit bestaan voor twee, één of geen HL-A haplotype.

Er blijkt een duidelijke correlatie aanwezig tussen de duur van overleving van het transplantaat en het aantal incompatibiliteiten (Dausset e.a. 1970).

Bij huidtransplantatie tussen serologisch getypeerde niet verwante individuen is het veel moeilijker een dergelijke correlatie aan te tonen (Walford e.a. 1969, Ceppelini e.a. 1969 a, Koch e.a. 1972). Deze discrepantie t.o.v. de resultaten bij verwante individuen is deels verklaarbaar uit het feit, dat zeker nog niet alle transplantatie antigenen geïdentificeerd zijn, terwijl bij het type-
ringsonderzoek de specificiteit van een antiserum onvolkomen kan zijn (Kissmeyer-Nielsen en Thorsby 1970)

Daarenboven is de laatste jaren het belang van compatibiliteit voor de MLC*-reactie steeds sterker op de voorgrond getreden.

Wanneer lymphocyten van een (potentiële) donor en receptor in vitro worden samengebracht, zullen de aanwezige immuno-competente cellen sterker gestimuleerd worden, naarmate de antigenen verschillen groter zijn. Dit kan onder meer geregistreerd worden door een verhoogde opname van radio-actief thymidine (een der bouwstenen voor de DNA synthese). Uit recent onderzoek blijkt deze MLC-activiteit niet beheerst te worden door de HL-A locus, maar door een afzonderlijke, op hetzelfde chromosoom en dichtbij de HL-A locus gelegen MLC-locus (Yunis e.a. 1971, Yunis en Amos 1971, Koch e.a. 1971). Bij de HL-A identieke leden van een dochtergeneratie zal, gezien de nauwe verbondenheid tussen beide loci, de MLC determinant — zij het niet in alle gevallen (Yunis e.a. 1971) — met het HL-A haplotype zijn overgeërfd, zodat geen stimulatie in de MLC-test kan worden waargenomen en goede transplantaat overleving het gevolg is. Bij HL-A identieke niet verwante donor/receptor combinaties evenwel blijkt er een duidelijke omgekeerde evenredigheid te bestaan tussen transplantaat overleving en de mate van stimulatie in de MLC-test (Koch e.a. 1972).

De invloed van beide (HL-A en MLC) loci afzonderlijk op de immunologische reactie is nog een onderwerp van studie.

Zelfs in ABO en HL-A identieke leden van een dochter generatie overleven huidtransplantaten meestal niet langer dan 30 dagen. Het is duidelijk dat andere, zwakkere antigenen systemen mede van invloed zijn.

Bovendien is de transplantatie van huid een bijzonder gevoelige methode voor het aantonen van histocompatibiliteits antigenen. De overleving van huidtransplantaten is aanmerkelijk korter dan van getransplanteerde, primair gevasculariseerde, organen (Murray e.a. 1964, White en Hildemann 1968, Vriesendorp e.a. 1971, Westbroek e.a. 1971, Warren e.a. 1972). Waarschijnlijk zijn zwakke antigenen van grotere invloed bij de afstoting van huidtransplantaten. Bovendien bestaan er aanwijzingen dat transport van antigenen via de lymphbanen naar de klierstations (de zgn. aanvoerende component van de immunologische reactie) in belangrijke mate aansprakelijk

* Mixed Lymphocyte Culture.

is voor de sensibilisatie. Wanneer de lymfahvoer van een huidgebied wordt onderbroken, immuniseert een in dat gebied aangebracht allo-transplantaat de gastheer niet (Barker en Billingham 1968).

Kleine huidtransplantaten, geënt op een bodem, die arm is aan lymfaten (spier) worden vertraagd afgestoten, mits zij niet in contact komen met de omgevende huid van de gastheer (Barker en Billingham 1972).

Het verschil in transplantatoeverleving tussen huid en primair gevasculariseerde organen kan zeker voor een deel worden verklaard uit de mate waarin de aanvoerende component van de immunologische reactie wordt onderbroken.

Ondanks de complexe genetische structuur van het histo-compatibiliteits systeem is de situatie voor klinische weefseltransplantatie gunstiger dan op het eerste gezicht lijkt. Uit klinisch oogpunt schijnen naast het ABO-systeem uitsluitend de antigenen van het HL-A en MLC-systeem van werkelijk belang. Het immunogene effect van de overige 'zwakke' histocompatibiliteits antigenen blijkt goed beïnvloedbaar met immunosuppressieve middelen (Dausset 1971).

Het zou te ver voeren in dit verband in te gaan op even interessante als gecompliceerde modificaties van de immuun-reacties als enhancement en immunologische tolerantie. Hoewel enhancement in de experimentele transplantatie biologie (Jeekel 1971) en tumorimmunologie een opmerkelijke plaats inneemt, kan bij klinische transplantaties aan enhancement vooralsnog geen rol van betekenis worden toegekend.

Op het begrip tolerantie — voor zover dat van belang lijkt te zijn bij klinische huidtransplantatie — wordt hierna (blz. 24) verder ingegaan.

Het recente en opzienbarende onderzoek van Summerlin dient hier zeker niet onvermeld te blijven. Hij kweekte humane zowel als muizenhuid gedurende enkele weken in weefselcultures. Wanneer deze huid vervolgens werd getransplanteerd op allogene gastheren trad geen afstotingsreactie op, ook niet wanneer er grote histocompatibiliteits verschillen in het spel waren. Dit betekent dat in de weefselkweek immunologische veranderingen optreden welke leiden tot verlies van antigene eigenschappen (Summerlin e.a. 1972).

Deze bevindingen zijn niet geheel in overeenstemming met de resultaten van gelijksoortige experimenten met cultures van andere weefsels (Barnes 1972).

In ons land werd door Kooreman en Gaillard (1950) gebruik gemaakt van (neonatale) weefselkweken teneinde antigeniciteit te verminderen bij allotransplantatie van bijschildklierweefsel. Hoewel de resultaten van Summerlin nog niet door andere onderzoekers werden bevestigd, openen zij mogelijk wijde perspectieven voor huidtransplantatie bij de behandeling van zeer uitgebreide brandwonden.

Voor de verwezenlijking van huidtransplantatie bij massale verbrandingen zijn de volgende conclusies van belang:

1. De mate van ABO en HL-A compatibiliteit, met name in een bloedverwante situatie is van evidente invloed op de overlevingsduur van het transplantaat (Amos e.a. 1969, Ceppolini e.a. 1969, a, b, Chamblor en Batchelor 1969, Batchelor en Hackett 1970).
2. Transplantatie van huid van middels weefseltypering geselecteerde verwanten is te verkiezen, boven gebruik van getypeerde niet verwante huid.
3. Het immunogene effect van 'zwakke' transplantatie antigenen is goed beïnvloedbaar middels immunosuppressieve middelen.
4. Om een enigermate gelijkwaardige histocompatibiliteit te kunnen verwachten bij gebruik van niet verwante donor (cadaver) huid in vergelijking tot huid van bloedverwante donoren, dient men de beschikking te hebben over ruime hoeveelheden getypeerde huid van ongeveer 500 fenotypisch verschillende donoren (Kissmeyer-Nielsen en Thorsby 1970, van Rood en Eysvoogel 1970), ondergebracht in een huidbank.

De verwezenlijking van een dergelijke huidbank is mogelijk geworden, doordat gebleken is dat huid, mits onder bepaalde voorzorgen ingevroren, en bewaard bij een temperatuur van -196°C (vloeiende stikstof) op zijn minst enkele jaren houdbaar is (Billingham en Medawar 1952, Berggren en Lehr 1965, Cochrane 1969, Bondoc en Burke 1971). De duur van deze preservatie is niet van invloed op de vitaliteit van het transplantaat.

IV DE IMMUNOLOGISCHE AFSLOTINGSREACTIE.

Voor een inzicht in de veranderingen in immunologische afweer, optredend bij ernstige verbrandingen, massale huidtransplantatie en niet in het minst bij opzettelijke beïnvloeding zoals in dit onderzoek zal worden beschreven, is een overzicht van de factoren, die bij het immunologisch proces betrokken zijn, op zijn plaats.

Hierbij vervult het lymphocytair systeem een overheersende rol (Gowans en McGregor 1965).

1. Immunocompetente cellen, T en B lymphocyten.

Lymphocyten die reageren op de inwerking van een antigeen worden immunocompetente cellen genoemd. (zie fig. 3).

De stamcellen van deze lymphocyten zetelen in het beenmerg. De lymphocyt wordt eerst competent onder invloed van een lymphatisch orgaan. Dit kan de thymus zijn, dan wel een nog vrij hypothetisch orgaan-systeem, dat bij vogels morphologisch en functioneel gelocaliseerd is in één orgaan: de bursa van Fabricius (Glick 1956).

Bij zoogdieren zou dit bursa-analoon gevestigd zijn in milt, tonsillen, appendix en Peyerse plaques (Good 1966).

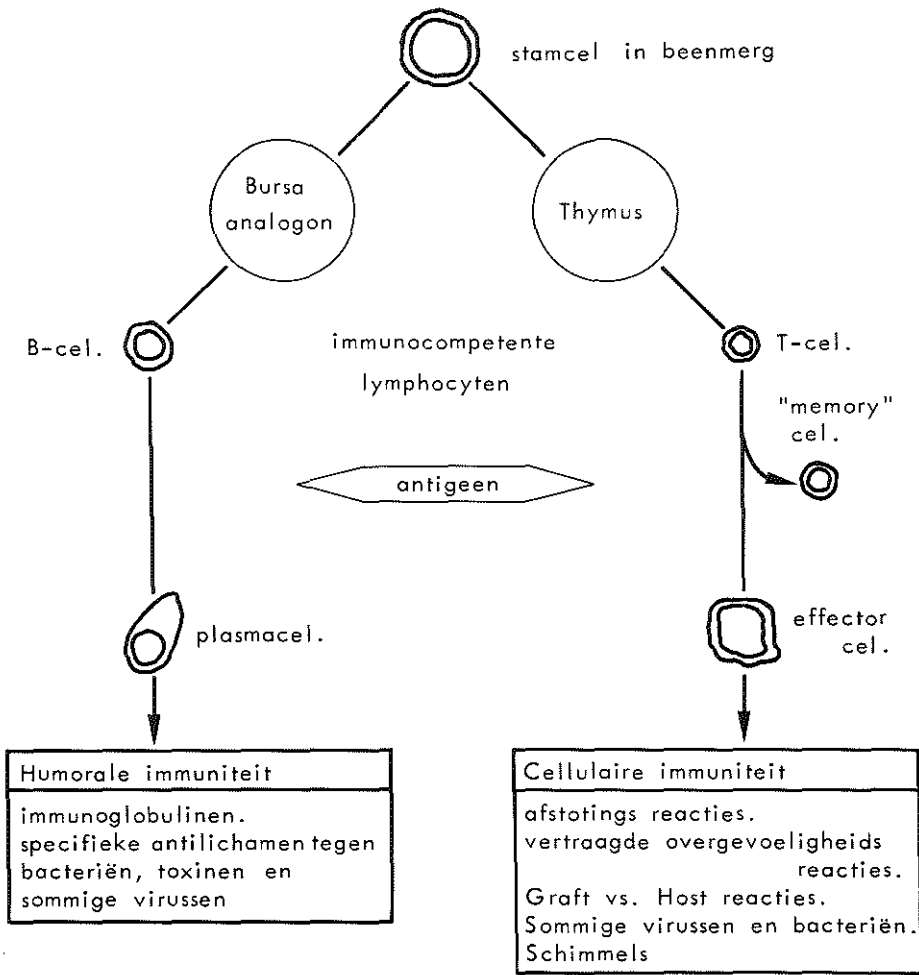
De lymphocyten welke de thymus gepasseerd zijn, worden thymus-afhankelijke of T-cellen genoemd. Zij verzorgen de cellulaire immuniteit, verantwoordelijk voor de vertraagde allergische reactie (e.g. tuberculine reactie) evenals de afstoting van allotransplantaten, terwijl zij beschermen tegen bepaalde virale en schimmel infecties. Daarnaast kunnen zij ook op tumor-specifieke antigenen reageren, op de celmembraan van zich aberrant differentierende cellen. Tenslotte fungeren zij als immunologisch geheugen ('memory cells').

De T-cellen zijn kleine, langlevende lymphocyten, die vnl. voorkomen in de para-corticale zone van de lymphklier (zie hoofdstuk 4) en van daaruit recirculeren in het lichaam (Gowans en McGregor 1965).

De lymphocyten, die competent worden onder invloed van het bursa-analoon systeem, worden bursa-afhankelijke * of B-lymphocyten genoemd. Zij kunnen zich differentiëren tot plasmacellen en zijn verantwoordelijk voor de synthese van antilichamen (immunoglobulinen), m.a.w. voor humorale immuniteit (Good 1966, Daniëls e.a. 1968, Möller 1971). Deze cellen komen vnl. voor in de corticale gebieden (follikels) van de lymphklieren en in de plaques van Peyer.

De cellulaire immuniteit speelt als gezegd een overheersende rol bij de afstotingsreactie. Mononucleaire celfiltraten ter plaatse van huidtransplantaten werden reeds in 1926 door Murphy, en later door Medawar (1944) beschreven. Afstoting van huidtransplantaten blijkt in het algemeen wel mogelijk middels overdracht van gesensibiliseerde lymphocyten, maar niet d.m.v. immuunsera (Mitchison 1953, Billingham e.a. 1954 b, Möller 1971). Daarenboven verhindert neonatale thymectomie, waardoor de ontwikkeling van cellulaire immuniteit wordt belet, de

* ook wel als 'Bone-marrow derived' bestempeld.



Figuur 3: Schematische voorstelling van de ontwikkeling van het immuunsysteem.

afstotingsreactie (Miller 1961, 1962, Martinez e.a. 1962). Deze experimentele bevindingen vinden bevestiging in de kliniek bij congenitale immuundeficiencies. Bij de agammaglobulinaemie type Bruton bestaat een selectieve uitval van het humorale immuunsysteem. Huid-allotransplantaten worden bij deze kinderen normaal afgestoten. Bij het syndroom van DiGeorge daarentegen ontbreekt aanleg van de thymus, terwijl het humorale systeem intact is. Afstoting van huid-allotransplantaten treedt niet of ernstig vertraagd op.

Onder bepaalde omstandigheden zijn B-cellen eveneens betrokken bij de afstotingsreactie (Jooste e.a. 1972). Met name allogene cellen van het hematopoietisch systeem en hun maligne autologe tegenhangers zijn gevoelig voor de inwerking van specifieke antilichamen. Ook bij de hyperacute afstoting van (nier) transplantaten zijn gepreformeerde antilichamen van betekenis (Kissmeyer-Nielsen e.a. 1966, Terasaki e.a. 1968, Williams e.a. 1968).

In wezen dragen beide lymphocyttaire systemen bij tot het afstotingsphenomeen en is een zorgvuldige scheiding tussen humorale en cellulaire reacties kunstmatig (Russel en Winn 1970). Grosso modo kan men evenwel stellen dat de afstotingsreactie vnl. een functie van de

T-lymphocyt is en de bacteriële afweer, voor zover beheerst door immunoglobulinen, een functie van de B-lymphocyt.

Vooraf bij de afstoting van huidtransplantaten speelt de cellulaire immuniteit een overwegende rol. Passieve immunisatie van de gastheer met doses antiserum veel groter dan noodzakelijk voor het afstoten van ander weefsel, had geen invloed op het huidtransplantaat, terwijl relatief kleine aantallen gesensibiliseerde (isologe*) lymphocyten uiterst effectief bleken (Billingham e.a. 1954 a, b.).

2. De afstotingsreactie van de huid.

Reeds vanaf de 3e dag na transplantatie vormt zich geleidelijk een infiltraat bij de grens tussen donorweefsel en receptor (Medawar 1944). Dit infiltraat bestaat vnl. uit mononucleaire cellen, macrophagen en plasmacellen.

Slechts een minderheid behoort tot de specifiek geactiveerde (immuno-competente) lymphocyten. Het is nog niet met zekerheid bekend hoe deze lymphocyten de lichaamsvreemde cellen vernietigen. Aangenomen wordt dat zij zich actief verplaatsen naar de vreemde cellen ('target-cells') en bij contact schadelijke stoffen afscheiden (Rosenau en Moon 1961, Möller 1965). Bovendien vormen gesensibiliseerde lymphocyten een stof die migratie van macrophagen remt (M.I.F. = Migration Inhibiting Factor), waardoor deze laatste ter plaatse van het afstotingsproces blijven deelnemen aan de infiltraatvorming en mogelijk in samenwerking met de gesensibiliseerde lymphocyt tot phagocytose van de vreemde cellen overgaan. Vasculaire veranderingen treden eerst op na de infiltratieve veranderingen doch kort voordat het transplantaat necrotisch wordt. Zij zijn in vivo stereomicroscopisch waarneembaar als dilatatie van de huidcapillairen met stasis van bloed (Taylor en Lehrfeld 1953, Converse en Rapaport 1956). Het transplantaat bleekt dan niet meer op bij druk. In de in hoofdstuk 2 en 3 beschreven huidtransplantaties werden deze capillaire veranderingen gehanteerd als norm voor afstoting.

3. Invloed van hoge doses antigeen op transplantaat overleving.

De intensiteit van de meeste immunologische reacties wordt mede bepaald door de hoeveelheid toegediend antigeen. Aanvankelijke observaties gaven de indruk dat kleine huidtransplantaten langer overleefden dan grotere (Medawar 1944, 1945 a, Lehrfeld en Taylor 1953). In 1960 toonde Zotikov evenwel aan dat transplantaten ter grootte van 1/3 van het lichaams oppervlak van het proefdier (rat) veel langer overleefden dan kleinere transplantaten (Zotikov e.a. 1960). Deze bevindingen werden door andere onderzoekers bevestigd (Ballantyne e.a. 1962, Converse e.a. 1963 a, b, Zanella e.a. 1968, van Es 1972).

Het zoeken naar een verklaring voor dit verschijnsel heeft aanleiding gegeven tot velerlij hypothesen. Vermoedelijk werken verschillende factoren samen om de afstoting te vertragen. Zo geeft het grotere operatietrauma een specifieke remming van de immuunreactie (Zotikov e.a. 1960, Zanella e.a. 1968, Park e.a. 1971), hoewel deze factor de mate waarin de afstoting vertraagd wordt, onvoldoende verklaart (Zotikov e.a. 1960). Daarnaast zou het denkbaar zijn dat, gezien de overmaat aan allogeen weefsel, relatief te weinig immunocompetente lymphocyten voor een adequate immuunreactie gerecruteerd kunnen worden (Zanella e.a. 1968, van Es 1972). Naast deze niet specifieke factoren speelt klaarblijkelijk ook een specifieke immunologische beïnvloeding een rol.

Een klein en een groot transplantaat van dezelfde donor, tegelijkertijd overgeplant op dezelfde gastheer, vertonen een gelijktijdig verlengde overleving, terwijl een (klein) derde transplantaat afkomstig van een andere donor en tegelijkertijd aangebracht, binnen de normale tijd wordt afgestoten (Converse e.a. 1963). Bovendien had transplantatie van een klein stukje huid na afstoting van een groot transplantaat van dezelfde donor geen versnelde ('second set') afstoting

* identiteit voor transplantatie antigenen tussen donor en receptor.

ten gevolge (Zanella e.a. 1968). Ballantyne vond wel een versnelde afstoting van kleine, maar niet van grote 'second set' huidtransplantaten (Ballantyne en Stetson 1964). Merkwaardig is ook, dat de afstoting van grote transplantaten niet kan worden beïnvloed door passieve immunisatie met gesensibiliseerde (isologe) lymphocyten (Ballantyne e.a. 1963). Een bevredigende verklaring voor de genoemde uitingen van specifieke immunosuppressie is niet te geven. Sommige onderzoekers (Converse e.a. 1963, Ballantyne e.a. 1963) suggereren een absorptie van antilichamen door het implantaat, hetgeen nauwelijks een verklaring is, daar humorale factoren van ondergeschikte betekenis zijn voor de afstotingsreactie van huid. Het zou misschien mogelijk zijn, dat zij onbedoeld op een enhancement effect hebben gezinspeeld. Ook werd antigene overbelasting ('antigenic-overloading') van het immuunsysteem als mogelijke oorzaak gezien, hoewel deze verklaring op zich geen verdere verduidelijking betekent.

Uit klinische ervaringen met grote huid allotransplantaten is eveneens bekend dat de afstotingsreactie duidelijk vertraagd verloopt (Kay 1958, Converse 1960, MacMillan 1962, Burke en Koumans 1969, Chamblor en Batchelor 1969, Shuck 1970). Daar het hier steeds patiënten betreft met uitgebreide verbrandingen, kan niet worden vastgesteld in hoeverre hier specifieke immunosuppressie door het verbrandingstrauma (zie blz. 25 e.v.) of specifieke remming door het grote implantaat van invloed is.

Uit talloze dierexperimenten is gebleken dat het mogelijk is, door toediening van antigeen onder bepaalde omstandigheden, een specifieke immunologische tolerantie t.o.v. het betreffende antigeen te induceren. Deze omstandigheden behelzen in algemene zin een verminderd immunologisch reactievermogen op het moment van contact met het antigeen, zoals bij perinatale expositie, een lage histocompatibiliteits barrière, thymectomie, immunosuppressie etc. (Billingham e.a. 1956, Russell en Monaco 1965, Monaco e.a. 1966 b), en/of een specifieke wijze van toediening en dosering van het antigeen (Howard e.a. 1962). Volgens dit beginsel kon een verlengde overlevingsduur van huidtransplantaten, zowel over een zwakke als krachtige histocompatibiliteits barrière bewerkstelligd worden door een voorafgaande injectie met donor antigeen (Medawar 1963, Kelly e.a. 1966). Dit effect werd nog versterkt door immunosuppressie m.b.v. bestraling of andere immunosuppressieve agentia (Medawar 1963). Vergelijkbare resultaten werden verkregen met herhaalde injecties van een extract van miltcellen (Martinez e.a. 1963). Deze experimenten leidden tot de slotsom, dat tolerantie kan worden opgewekt middels transplantatie-antigenen. Het onderhouden van de tolerante toestand schijnt afhankelijk te zijn van een continu of herhaaldelijk contact met het antigeen (Smith 1961, Medawar 1963, Russell en Monaco 1965). In tegenstelling tot het gemak waarmee tolerantie kan worden opgewekt in de perinatale periode, zijn bij volwassen proefdieren veel grotere hoeveelheden antigeen vereist. Ook al worden deze toegediend onder niet immunogene omstandigheden, zoals bij (tijdelijke) immunosuppressie (Howard e.a. 1962) dan nog is een enigszins vergelijkbare mate van tolerantie moeilijk te realiseren.

Wanneer we onder immunologische tolerantie verstaan een verkregen toestand van niet reageren op een specifieke antigene stimulatie ten gevolge van voorafgaand contact met het betreffende antigeen onder bepaalde (tolerogene) omstandigheden, dan blijken er enkele opmerkelijke punten van overeenkomst te bestaan met het fenomeen van antigene overbelasting, zoals dat wordt aangetroffen bij grote huidtransplantaten.

Door het ingrijpende operatietrauma is het immuunapparaat van de gastheer tijdelijk specifiek geremd. Tegelijkertijd wordt, in de vorm van een massaal huidtransplantaat, een hoge dosis specifiek antigeen over een langere periode toegediend. Het is aannemelijk dat aldus tolerantie van, zij het beperkte duur, wordt geïnduceerd.

Hoe ook de uiteindelijke verklaring voor de langere levensduur van grote huidtransplantaten zal luiden, het is duidelijk dat het fenomeen van belang is bij de klinische toepassing van huid-allotransplantaten van vergelijkbare of nog grotere afmeting.

4. Invloed van het verbrandingstrauma op het immuunsysteem

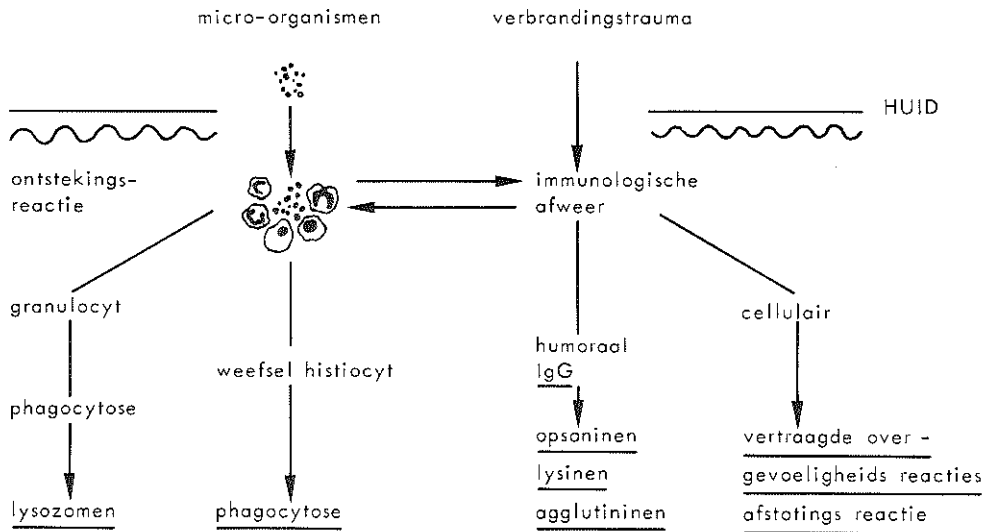
Door verbranding gaan de functies van de huid verloren. Dit betekent tevens dat de natuurlijke barrière tegen (pathogene) micro-organismen wegvalt. Daarnaast vinden deze in het necrotische, exsudaatrijke weefsel een ideale voedingsbodem.

Naast de uitgebreide pathofysiologische veranderingen welke in verschillende orgaansystemen optreden, waarbij de verbrandingsshock centraal staat, raakt ook de immunologische afweer gestoord. Aard en intensiteit van deze stoornissen zijn de laatste jaren het onderwerp van vele onderzoeken geweest (zie fig. 4). Meestentijds werd hierbij de nadruk gelegd op veranderingen in bacteriële afweermechanismen om de begrijpelijke reden dat bacteriële infectie de belangrijkste doodsoorzaak is bij verbrandingen (Alexander en Moncrief 1966, 1967, Alexander 1968, Alexander en Wixon 1970, Arturson e.a. 1969, Rittenbury en Hanback 1967, Rittenbury 1970). Bacteriële afweer is vnl. een functie van granulocyten, fagocyten en humorale antilichamen (B-lymphocyten).

Daarnaast treden evenwel ook stoornissen in de cellulaire immuniteit op, blijkend uit onderdrukking van de vertraagde overgevoeligheidsreactie (Casson e.a. 1966, Rapaport e.a. 1968, Leguit 1972) alsmede uit een vertraagde afstoting van allogene huid, zowel bij het proefdier (Rapaport e.a. 1964, Alexander en Moncrief 1966), als bij de mens (Dempster en Lennox 1951, Kay 1957, Alexander en Moncrief 1966, Chamblor en Batchelor 1969).

Leguit heeft in de MLC test aangetoond, dat lymphocyten van brandwondpatiënten een duidelijk verminderde reactie vertonen (Leguit 1972). Deze test is een afspiegeling van het reactievermogen van de T-lymphocyt op transplantatie-antigenen (Hajiri en Defendi 1970, Koch e.a. 1972, Sasportes e.a. 1972) (zie blz. 19).

Alle onderzoekers vonden een positieve correlatie tussen ernst van de verbranding en de mate van suppressie van het immuun-apparaat.



Figuur 4: Invloed van het verbrandingstrauma op bacteriële afweer- en immuunmechanismen. Van de onderstreepte componenten is vastgesteld, dat zij gestoord raken.

Hoe het verbrandingstrauma ingrijpt in de immunologische processen is niet nauwkeurig bekend maar berust hoogwaarschijnlijk op een samengaan van verschillende factoren. De remming van bacteriële afweer is deels een algemene reactie op een trauma. Iedere ernstige verwonding veroorzaakt een verhoogde gevoeligheid voor infectie (Conolly e.a. 1969) en verstoring van de immunologische afweer (Park e.a. 1971). Bij het verbrandingstrauma zijn deze veranderingen veel sterker uitgesproken (Munster 1970). Mogelijk kan een op de verbranding volgende lymphopenie (Sevitt 1957) mede van invloed zijn op een depressie van de cellulaire immuniteit (Casson e.a. 1966). Een uitgesproken invloed van een verhoogde corticosteroiden productie t.g.v. de verbrandings stress op de afstotingsreactie lijkt minder waarschijnlijk. Het is niet aannemelijk dat de bloedspiegels voldoende hoog zijn om afstoting enigermate te vertragen.

Het is duidelijk dat — wat ook de wegen mogen zijn waarlangs remming van de immuun-afweer-mechanismen in aansluiting op het verbrandingstrauma tot stand komt — de verdediging tegen bacteriële invasie verder wordt ondermijnd.

Het dichten van de bres in de huid door allotransplantatie herstelt de eerste barrière tegen binnendringende bacteriën en trekt tevens voordeel uit de verlaagde immunologische slagvaardigheid.

In hoeverre het immuun-apparaat van de gastheer zich sneller herstelt na vroege excisie en transplantatie van de brandwond is voorsnog een niet te beantwoorden maar met recht te stellen vraag.

V IMMUNOSUPPRESSIE — ANTILYMPHOCYTEN SERUM

Immunosuppressieve middelen zijn agentia, die het immunologisch reactievermogen verzwakken of uitschakelen. Hoewel hun toediening in eerste instantie erop gericht is de afstotingsreactie te verminderen, dient als uiteindelijk doel te worden gezien, het bewerkstelligen van specifieke immunologische tolerantie.

Immunosuppressieve middelen kunnen worden onderverdeeld in:

1. Ioniserende stralen (röntgenstraling).

Hoewel lage doses ioniserende stralen een krachtige onderdrukking van het immuun-apparaat ten gevolge hebben, raakt deze vorm van immunosuppressie steeds minder in gebruik door de introductie van eenvoudiger toe te dienen chemische en biologische agentia. Zij hebben daarentegen het voordeel lokaal gedoseerd te kunnen worden.

2. Cytostatica.

- a. Anti-metaboliëten als purine en pyrimidine derivaten (met in de klinische transplantaties als meest gebruikte het azathioprine = imuran) en folinezuur antagonistien.
- b. Alkylerende middelen.
- c. Methylhydrazine derivaten.
- d. Antibiotica als actinomycine, mitomycine etc.
- e. Vinca-alkaloïden.

Al deze middelen zijn afkomstig uit de oncologie. Hun invloed op het immuun-apparaat is slechts een bijkomstig aspect van hun algemene toxische werking op de prolifererende cel. Aangezien vooral de humorale immuniteit door bovengenoemde middelen wordt beïnvloed zal met name deze component van de immuunreactie worden geremd, hetgeen de natuurlijke bacteriële afweer kan compromitteren (Medawar 1969).

Daar de afstoting van huidtransplantaten voornamelijk onder invloed staat van cellulaire immuniteit, terwijl een ernstig verbrande patiënt reeds eo ipso aan verhoogd infectie gevaar bloot staat, lijken deze middelen alleen al op theoretische gronden niet aangewezen als primair immunosuppressivum bij allotransplantatie van huid.

3. Corticosteroiden.

Het effect van deze hormonen op het lymphatisch systeem was reeds lang bekend voordat het verband was gelegd tussen de lymphocyt en de immunologische reacties. De aangrijpingspunten van steroïden op het immunologisch proces zijn niet nauwkeurig omschreven, doch hun immunosuppressieve eigenschappen staan vast. Vermoedelijk remmen zij de differentiatie en rijping van lymphocyten, de stimulatie van immunocompetente T-cellen, als ook de recirculatie van lymphocyten vanuit de lymphklieren. Zeker is, dat zij de ontstekingsreactie afzwakken (Claman 1972) en tevens recruterende van macrophagen in de weg staan (Thompson 1971). Hun grote immunosuppressieve waarde ligt meer in hun vermogen een dreigende afstotingsreactie te voorkomen, dan een primaire sensibilisatie af te remmen (Billingham e.a. 1951, Medawar en Sparrow 1956).

Opvallend is, dat zij een periode van door antilymphocyten serum geïnduceerde immunologische onderdrukking aanmerkelijk kunnen verlengen (Levey en Medawar 1966, b).

Hun mogelijke toepassing als immunosuppressivum in huid-allotransplantatie bij massale brandwonden heeft nog een bijzonder facet, omdat zij lokaal op het transplantaat geapliceerd kunnen worden (Medawar 1966). Nadelen van het systematische gebruik van corticosteroiden bij de ernstig verbrande patiënt, als verhoogd infectiegevaar en vergroot risico van gastro-intestinale bloedingen zouden aldus deels kunnen worden voorkomen.

Mede gezien de nadelige eigenschappen van corticosteroiden, wondgenezing en met name de ingroei van huidtransplantaten, af te remmen (Billingham e.a. 1951), alsmede de kans op infectie te vergroten, lijkt hun toepassing bij uitgebreide brandwonden eerst aangewezen, wanneer het allotransplantaat is aangeslagen en het merendeel van het huiddefect is gesloten.

4. Antilymphocyten serum.

Van alle gebruikelijke immunosuppressieve middelen is Antilymphocyten Serum (ALS) het enige, dat in principe het immuunsysteem gericht beïnvloedt en uitsluitend om deze hoedanigheid werd ontwikkeld.

Antileucocytaire sera werden voor het eerst in 1899 door Metchnikoff beschreven in een periode van sterk toegenomen belangstelling in de werking van velerlei antilichamen. Hun toepassing in de transplantatiebiologie heeft moeten wachten tot de centrale functie van de lymphocyt in immunologische reacties was onderkend (Gowans en McGregor 1965). Nadat de aanvankelijke experimentele resultaten enigszins teleurstelden (Woodruff 1960, Waksman e.a. 1961), werd door onderzoekers in Edinburg (Woodruff en Anderson 1963) en Boston (Gray e.a. 1964, 1966, Monaco e.a. 1966, a) overtuigend aangetoond dat ALS een zeer krachtig en relatief onschadelijk immunosuppressivum is.

Onderzoekingen naar de uiteenlopende aspecten van op velerlei wijzen bereide antilymphocyten sera namen weldra in aard en hoeveelheid dergelijke proporties aan, dat hun beschouwing valt buiten het bestek van dit overzicht. Enkele aspecten, van belang voor het hier vermelde onderzoek, dienen evenwel naar voren te worden gebracht.

Bereiding.

Het principe van de bereiding van ALS is eenvoudig. Door lymphocyten afkomstig van één species te introduceren in een vertegenwoordiger van een andere soort, wordt de vorming van

heterologe antilichamen tegen de 'vreemde' lymphocyten geïnduceerd. Deze antilichamen zijn werkzaam tegen de lymphocyten van alle vertegenwoordigers van de species, waartoe de lymphocyten donor behoort. De antigenen welke aanleiding geven tot de vorming van antilymphocyttaire antilichamen bevinden zich niet exclusief op de lymphocyt, doch ook op de celmembraan van andere weefsels (Levey en Medawar 1966, a). Zo kunnen met epitheelcellen en fibroblasten ook werkzame antisera worden bereid. Het lijkt evenwel geen twijfel, dat de lymphocyt — mogelijk door de specifieke configuratie van zijn antigenen — zich bij uitstek leent voor het opwekken van actieve antilichamen (Medawar 1967).

Hoe eenvoudig de bereidingswijze in beginsel ook is, in de praktijk blijkt de situatie bijzonder gecompliceerd te worden, doordat het niet altijd mogelijk is een effectief serum te verkrijgen. Pogingen tot oplossing van dit probleem hebben geleid tot het gebruik van verschillende antigenen zoals lymphocyten afkomstig van lymphklieren of uit de ductus thoracicus, lymphoblasten, thymocyten, subcellulaire lymphocyttaire fracties (Moynihan en Grogan 1968, Najarian en Simmons 1971, Lance 1972), terwijl daarnaast verschillende species voor het opwekken van de antilichamen worden gebruikt en verschillende immunisatie-schemata worden gehanteerd. Bovendien kan bij de immunisatie al of niet gebruik worden gemaakt van adjuvantia.

Het bij de bereiding van ALS meest gebruikte adjuvans is het zgn. Complete Adjuvans van Freund (CFA), bestaande uit paraffine, een emulgator en gedode tuberkelbacillen. De werkwijze van dergelijke adjuvantia is niet nauwkeurig bekend doch resulteert in een intensivering van de immunreactie (antilichaam productie) op een begeleidend antigeen (Salvaggio 1968).

Maakt een dergelijke verscheidenheid in de bereiding van antilymphocytten sera een vergelijking van de resultaten van verschillende onderzoekers reeds bijzonder problematisch, de beoordeling wordt nog verder vertroebeld, doordat nog steeds een betrouwbare methode om de immunosuppressieve kwaliteiten van de verschillende antisera voor klinische toepassing te bepalen ontbreekt.

Hoewel het spoorwerk naar deze (toets)steen der wijzen in volle gang is (ALG Workshop 1972), wordt de door Balner in 1968 beschreven in vivo-testmethode in de chimpansee en lagere apen, vooralsnog als meest nauwkeurig aanvaard.

Zuivering van ALS

Ongezuiverd ALS bevat als ieder heteroloog serum veel componenten welke potentiëel antigeen zijn. Daarnaast leidt de immunisatie van het ALS producerende dier ook tot de vorming van ongewenste antilichamen (bijv. haemagglutininen) welke niet bijdragen tot de immunosuppressieve activiteit doch potentiëel schadelijk zijn.

Het is gebleken dat de immunosuppressieve antilichamen geconcentreerd zijn in de immunoglobuline G-fractie (IgG) van het globuline (Balner en Dersjant 1967, James en Medawar 1967, Betel e.a. 1970). Het spreekt vanzelf dat — zeker voor klinische toepassing — deze fractie geïsoleerd dient te worden (zie hoofdstuk 3).

Ook in deze IgG fractie zullen zich nog ongewenste immunoglobulinen bevinden, welke verondersteld worden te zijn opgewekt door niet relevante antigenen welke de immuniserende lymphocyt deelt met andere weefsels (Hintz en Webber 1965, Medawar 1967, Taub en Lance 1968).

Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat door voortgezette (hyper) immunisatie van het ALS-producerende dier, steeds krachtiger immunosuppressieve sera kunnen worden gekweekt. Dit blijkt evenwel niet het geval te zijn. Weliswaar neemt de lymphocytotoxische en -agglutinerende activiteit belangrijk toe, doch het immunosuppressief vermogen blijft constant of neemt zelfs af (Levey en Medawar 1966, b, Jeejeebhoy 1967, Davis e.a. 1969) — terwijl de titer van ongewenste, schadelijke en voor immunosuppressie irrelevante antilichamen aanzienlijk kan stijgen (Medawar 1967 Jooste e.a. 1968, Najarian en Simmons 1971, Simpson e.a. 1972).

Het gebruik van een adjuvans bij de bereiding van ALS leidt volgens sommige onderzoekers tot de vorming van krachtiger antisera (Wood en Vriesendorp 1969, Najarian en Simmons 1971, Skamene en Russell 1971), doch wordt door anderen overbodig geacht (Levey en Medawar 1966, b, Medawar 1967) en zelfs als schadelijk beschouwd, wegens een verhoogde stimulering tot vorming van toxische antilichamen tegen irrelevante antigenen (Jooste e.a. 1968, Taub en Lance 1968, Sheil 1972, b) (zie hoofdstuk 3).

Er staan in beginsel 3 wegen open om te komen tot een nog verder gezuiverd ALS:

De ongewenste antilichamen kunnen worden geabsorbeerd aan de desbetreffende (irrelevante) antigenen. Zo is het gebruikelijk haemagglutininen te elimineren door absorbtie aan erythrocyten (hoofdstuk 2 en 3). Op dezelfde wijze is het mogelijk nephrotoxische antilichamen te absorberen met glomerulaire basaal membranen (Skamene e.a. 1972) en hepatotoxische antilichamen (zie hoofdstuk 3) met een suspensie van levercellen (Skamene en Russell 1971).

Het aldus gezuiverde IgG hoeft door al deze manipulaties niet noodzakelijkerwijze aan immunosuppressief vermogen in te boeten.

In plaats van deze bewerkelijke absorbtie-procedures lijkt het eenvoudiger een omgekeerde weg te bewandelen en de specifiek antilymphocytair immunoglobulinen te isoleren door absorbtie aan lymphocyten waarna in tweede instantie de antilichamen door elutie weer kunnen worden teruggewonnen (Medawar 1967, Lance 1972). In de praktijk blijkt deze methode evenwel nog grote technische problemen met zich mee te brengen.

Het meest voor de hand liggend is de vorming van ongewenste antilichamen a priori te voorkomen door gebruik te maken van zuiver specifiek lymphocytair antigeen (Levey en Medawar 1966 a, Medawar 1967). Pogingen hiertoe zijn in het werk gesteld met lymphoblasten uit celcultures (Najarian e.a. 1969), of subcellulaire lymphocytair componenten (Lance 1972).

Het is nog te vroeg om de klinische waarde van aldus opgewekte antilymphocytair sera te kunnen beoordelen.

Immunosuppressieve eigenschappen

1. Uit een overvloed van uit het dierexperiment afkomstig bewijsmateriaal blijkt dat ALS een uiterst krachtig en doelmatig immunosuppressivum is.
Gezegd moet worden dat de klinische resultaten minder spectaculair zijn dan hetgeen in het laboratorium is bereikt. Dit is stellig ten dele te wijten aan een behoedzamer dosering dan experimenteel gebruikelijk is.
2. Door zijn krachtige immunosuppressieve eigenschappen is het effect van ALS minder afhankelijk van de mate van antigenen verschillen tussen donor en receptor dan de werking van conventionele immunosuppressiva (Levey en Medawar 1966, b). Dit maakte voor het eerst verlengde overleving van huidtransplantaten tussen verschillende species (xenotransplantatie) mogelijk (Lance en Medawar 1968, b).
3. Combinatie van conventionele immunosuppressiva met ALS leidt tot een synergistisch effect (Hoehn en Simmons 1966, Levey en Medawar 1966 a, Starzl e.a. 1967 a, Weil en Simmons 1968, Najarian en Simmons 1971) waardoor het mogelijk wordt hun dosering te verlagen en dientengevolge de kans op aan hun gebruik inherente schadelijke bijwerkingen te reduceren (Starzl e.a. 1967 a, b, Sheil e.a. 1971).
4. ALS kan worden beschouwd als een agens dat in hoofdzaak aangrijpt op de cellulaire immuniteit (Levey en Medawar 1967 a, Lance en Batchelor 1968, Möller en Zukosi 1968), terwijl in doseringen welke toereikend zijn om de afstotingsreactie te onderdrukken, de humorale immuniteit niet, of slechts in geringe mate wordt beïnvloed (Medawar 1967, Russell 1968). Dit is in tegenstelling met de immunosuppressieve eigenschappen van de cytostatica (zie blz. 26). De selectieve remming van de cellulaire immuniteit is van grote

klinische betekenis daar het transplantaat voor afstoting kan worden gevrijwaard zonder de bacteriële afweer van de gastheer te compromitteren (zie hoofdstuk 2).

Bij het afwegen van de mogelijkheden van allotransplantatie van huid met immunosuppressie bij de ernstig verbrande patiënt, is deze eigenschap van het ALS van grote waarde te achten.

Werkingswijze van ALS. 'A good lymphocyte is a dead lymphocyte'.

Het vermoeden dat ALS zijn werkzaamheid ontleent aan specifieke uitputting van de populatie van langlevende, recirculerende, thymusafhankelijke lymphocyten (Lance 1967) is inmiddels door vele onderzoekers bevestigd. De perifere lymphocyt is het voornaamste slachtoffer van het antiserum, terwijl de lymphocyten in lymphklieren en thymus moeilijk voor het ALS bereikbaar zijn (Levey en Medawar 1967 b, Taub en Lance 1968).

De aard van de inwerking van de antilymphocyttaire immunoglobulinen op de lymphocyt is nog steeds niet nauwkeurig bekend en heeft aanleiding gegeven tot verschillende hypothesen (Levey en Medawar 1967 a, Möller 1971).

Sinds gebleken is dat de werkzaamheid van ALS afhankelijk is van complement (Reithmüller 1967, Jooste e.a. 1968) is het waarschijnlijker geworden dat ALS de lymphocyt doodt door cytolyse en/of opsonisatie, al of niet met de hulp van macrophagen (Greaves e.a. 1969, Medawar 1969, Woodruff 1971).

Toediening van ALS

De hoeveelheid toe te dienen ALS wordt min of meer op empirische gronden bepaald en zou afhankelijk dienen te zijn van de mate van immunosuppressief vermogen. Zoals reeds opgemerkt staat nog geen uniforme en handzame methode ter beschikking dit vermogen nauwkeurig te bepalen en de verschillende antisera te standardiseren.

Het immunosuppressief effect is duidelijk afhankelijk van de toegediende dosis (Monaco e.a. 1967, Najarian en Simmons 1971) en in niet mindere mate van het moment en de duur van toediening. Het blijkt van belang zo mogelijk reeds enkele dagen voor transplantatie met de immunosuppressieve therapie aan te vangen (Starzl e.a. 1967, a, b, Monaco e.a. 1967), terwijl regelmatige toediening effectiever is dan een intermitterend doseringsschema (Lance 1967, Medawar 1967, Monaco e.a. 1967).

Bij klinische toepassing verdient het de voorkeur ALS intraveneus te geven, daar subcutane of intramusculaire injecties vaak een pijnlijke locale ontstekingsreactie veroorzaken (Starzl e.a. 1967, a, Kashiwagi e.a. 1968) en meer aanleiding geven tot sensibilisatie tegen het antiserum. Tenslotte kunnen langs intraveneuze weg grotere doses worden verstrekt, terwijl toediening onmiddellijk kan worden gestaakt indien allergische verschijnselen optreden (Najarian en Simmons 1971). Desondanks blijft grote voorzichtigheid geboden wegens het gevaar van acute anaphylactische shock, welke zelfs de dood ten gevolge kan hebben (Wilson 1972).

Bijwerkingen van ALS

Op de mogelijke aanwezigheid van toxische en ongewenste antilichamen in het ALS en sensu strictiori in de IgG fractie, werd reeds gewezen. Haemagglutinerende antilichamen worden veelvuldig aangetroffen en dienen door fractionering en absorptie aan erythrocyten te worden geëlimineerd. Desondanks manifesteert zich veelal toch een zekere mate van anaemie, welke in

het proefdier aanleiding kan geven tot extramedullaire hematopoïese (Taub en Lance 1968) (zie hoofdstuk 4).

Zoals bij toediening van ieder heteroloog serum te verwachten is kunnen zowel lokale als gegeneraliseerde overgevoeligheidsreacties optreden. Deze reacties zijn uit klinische ervaringen bekend, vnl. uit de periode dat nog van minder stringent gezuiverd ALS werd gebruik gemaakt (Starzl e.a. 1967 a, Kashiwagi e.a. 1968).

Twee gevaren, inherent aan het onderdrukken van de natuurlijke immunologische afweer dienen nauwlettend onder de ogen te worden gezien: Hoewel er reeds op is gewezen dat bij doseringen toereikend voor effectieve onderdrukking van de afstotingsreactie, de (humorale) afweer tegen de meeste virale en bacteriële infecties niet in belangrijke mate wordt ondermijnd, dient men bij langdurige toediening van relatief hoge doses ALS toch op infectieuze complicaties bedacht te zijn (Abaza e.a. 1966, Medawar 1967), temeer daar de afweer tegen bepaalde virussen, bacteriën (*M.tuberculosis*) en schimmels resorteert onder de cellulaire immuniteit.

Ten tweede betekent onderdrukking van het thymus afhankelijke systeem een remming van de natuurlijke immunologische reactie op tumorspecifieke antigenen, waardoor op theoretische gronden met een frequenter voorkomen van de novo ontstane maligne tumoren rekening moet worden gehouden.

Inderdaad bestaat er een significante relatie tussen immunosuppressie en maligne gezwellvorming (Editorial, Lancet 1969, 1972; Penn en Starzl 1970, Walder e.a. 1971) terwijl een klaarblijkelijk ongeremde groei van onvermoede (Martin e.a. 1965) of reeds aanwezige maligniteiten (Starzl e.a. 1969) wordt waargenomen. Aangezien het immunosuppressieve regime een combinatie is van verschillende agentia, is het moeilijk één ervan als schuldige aan te wijzen (Penn en Starzl 1972).

Vooralsnog kan men afgaande op ervaringen uit het dierexperiment (Balner 1970, 1971, Simpson en Nehlsen 1970) en de kliniek (Starzl 1972, Sheil 1972 a) stellen, dat ALS, minder dan andere immunosuppressiva aanleiding geeft tot maligne nieuwvorming.

Klinische ervaringen met ALS

Na de introductie van ALS als immunosuppressivum bij klinische orgaantransplantaties (Starzl e.a. 1967 a) is er een toenemende stroom van ervaringen en resultaten gevolgd, vnl. betreffende de toepassing van ALS bij niertransplantatie. Het vergelijken van deze veelheid aan gegevens en een poging tot het trekken van eensluidende conclusies wordt bemoeilijkt door de in het voorafgaande reeds genoemde grote verscheidenheid in bereidingswijze, dosering en immunosuppressief vermogen.

Op het ogenblik wordt ALS bij ongeveer 35% van alle niertransplantaties gebruikt (Kayhoe 1972). De resultaten zijn even heteroog als uit het bovenstaande verwacht mag worden. Sommige onderzoekers vonden geen duidelijke verbetering in functie en overleving van het transplantaat (Thiel e.a. 1972). Anderen komen wel tot gunstiger resultaten, doch zijn beducht voor bijwerkingen (Wilson e.a. 1972, Simmons e.a. 1972) terwijl velen zich fervente voorstanders tonen en ALS niet meer uit hun immunosuppressief arsenaal willen missen (Starzl en Putnam 1972, Sheil e.a. 1971, 1972 b.). Wil men uit de veelheid aan gegevens en meningen toch komen tot enkele algemene gevolgtrekkingen dan kan het volgende worden geconcludeerd:

1. ALS is, mits zorgvuldig bereid, gezuiverd en op zijn immunosuppressieve eigenschappen getoetst, een krachtig en weinig toxisch immunosuppressivum. De afstoting van humane huid-allotransplantaten wordt ook bij de mens door ALS duidelijk vertraagd (Monaco e.a. 1967, Najarian e.a. 1969, 1971).
2. Het neemt naar het zich momenteel laat aanzien t.o.v. conventionele immunosuppressiva een gunstiger positie in wat betreft de kans op infectieuze complicaties en het predisponeren tot maligne nieuwvorming.

3. Het is zeer goed werkzaam in combinatie met andere immunosuppressieve middelen als steroïden en imuran.
4. ALS is met name geschikt in het voorkomen van de vroege afstotingsreactie en voor effectieve immunosuppressie bij een minder dan optimale histocompatibiliteit tussen donor en receptor.

VI SAMENVATTING VAN HET ONDERZOEK.

Uit de in de aanhef van dit hoofdstuk vermelde statistische onderzoeken blijkt, dat ondanks recente therapeutische aanwinsten, de mortaliteit van zeer uitgebreide verbrandingen ter nauwernood is afgenomen. Deze patiënten overlijden uiteindelijk aan de gevolgen van insufficiëntie van een onmisbaar orgaan: de intacte huid.

Aangezien gebruikelijke methoden om tot tijdig en doelmatig functioneel herstel van het huiddefect te geraken hier te kort schieten, leek het van belang na te gaan in hoeverre transplantatie van huid onder immunosuppressie — in analogie met overplanting van andere organen — een oplossing zou kunnen betekenen voor het probleem van de lethaal verbrande patiënt.

Gebruik makend van de gegevens uit de transplantatie biologie en ervaringen uit de kliniek van orgaan transplantaties, zoals in dit hoofdstuk beschreven, zal een dergelijke behandelingswijze in beginsel nog aan de volgende voorwaarden dienen te voldoen:

1. De behandeling moet praktisch uitvoerbaar zijn zonder ernstig additioneel levensgevaar voor de patiënt te betekenen.
2. Het transplantaat moet in staat zijn het functionele verlies van eigen huid langdurig te ondervangen.
3. De behandeling moet resulteren in een duidelijk verbeterde overlevingskans.

Het in hoofdstuk 2 beschreven onderzoek werd verricht teneinde in het dierexperiment na te gaan of aan deze voorwaarden kon worden voldaan.

Om langdurige transplantaat overleving, bij histocompatibiliteits verschillen van enige betekenis tussen donor en receptor, te bewerkstelligen zal gebruik dienen te worden gemaakt van immunosuppressieve middelen. Daarom werd tevens de invloed van deze preparaten — al dan niet in, bij klinische transplantatie gebruikelijke, combinaties — op transplantaat overleving en optreden van ongewenste bijverschijnselen nagegaan. Hoewel het gebruik van ALS in het lethaal verbrande dier naast een goed immunosuppressief effect, het minst aanleiding bleek te geven tot infectieuze complicaties, manifesteerden zich pathologische symptomen welke resulteerden in een cachectisch beeld, de zgn. 'wasting disease'. De oorsprong van deze toxische verschijnselen werd gezocht in ongewenste componenten van het ALS.

De in hoofdstuk 3 beschreven onderzoeken werden uitgevoerd teneinde de factoren te identificeren, die aanleiding geven tot het optreden van deze pathologische verschijnselen en na te gaan op welke wijze dit kan worden voorkomen.

In hoofdstuk 4 worden de histopathologische veranderingen beschreven, welke bij deze experimenten met verschillende antilymphocytair sera aan het licht traden, alsmede hun relatie tot de ontwikkeling van 'wasting disease'.

Hoofdstuk 5 bevat een overzicht van de klinische mogelijkheden ter behandeling van zeer uitgebreide verbrandingen. Bovendien wordt aan de hand van de experimentele resultaten een behandelingsschema voor klinische huid-allotransplantatie en immunosuppressie opgesteld.

In hoofdstuk 6 ten slotte, worden de eerste klinische resultaten van de hier ontworpen therapie vermeld.

LITTERATUUR.

- Abaza, H. M., Nolan, B., Watt, J. G., Woodruff, M. F. A. (1966). Effect of antilymphocytic serum on the survival of renal homotransplants in dogs. *Transplantation*, 4: 618.
- Alexander, J. W. (1968). Effect of thermal injury upon the early resistance to infection. *J. surg. Res.*, 8: 128.
- Alexander, J. W., Moncrief, J. A. (1966). Alterations of the immune response following severe thermal injury. *Arch. Surg.*, 93: 75.
- Alexander, J. W., Moncrief, J. A. (1967). Immunologic phenomena in burn injuries. *JAMA*, 199: 105.
- Alexander, J. W., Wixon, D. (1970). Neutrophil dysfunction and sepsis in burn injury. *Surg. Gynec. Obstet.*, 130: 431.
- ALG therapy and standardization workshop — Session I. (1972). Behring Institute Mitteilungen; nr. 51, Marburg, Behringwerke AG.
- Amos, D. B., Seigler, H. F., Southworth, J. G., Ward, F. E. (1969). Skin graft rejection between subjects genotyped for HL-A. *Transplant. Proc.*, 1: 342.
- Arturson, G., Hogman, C. F., Johansson, S. G. O., Killander, J. (1969). Changes in immunoglobulin levels in severely burned patients. *Lancet*, 1: 546.
- Ballantyne, D. L., Siegel, W. H., Converse, J. M. (1963). The behaviour of massive skin homografts in adoptively and actively immunized rats. *Plast. reconstr. Surg.*, 32: 310.
- Ballantyne, D. L., Siegel, W. H., Kapitchnikov, M. M. (1962). Further observations on massive skin homografts in rats. *Transplant. Bull.*, 30: 533.
- Ballantyne, D. L., Stetson, C. A. (1964). Serologic reactions to skin homografts of various sizes in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 120: 7.
- Balner, H. (1970). Immunosuppression and neoplasia. *Rev. europ. Etudes clin. biol.*, 15: 599.
- Balner, H. (1971). Reduced incidence of X-ray induced leukaemia after treatment with anti-lymphocyte serum. *Rev. europ. Etudes clin. biol.*, 16: 981.
- Balner, H., Dersjant, H. (1967). Effects of antilymphocytic sera in primates. In: *Antilymphocytic serum*. Ciba Foundation Study Group; nr. 29. Eds. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor. Boston, Little Brown & Cie, blz. 85.
- Balner, H., Eysvoogel, V. P., Cleton, F. J. (1968). Testing of anti-human lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Lancet*, 1: 19.
- Barker, C. F., Billingham, R. E. (1968). The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J. exp. Med.*, 128: 197.
- Barker, C. F., Billingham, R. E. (1972). Extension of skin homograft survival by preventing graft-host skin contact. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.
- Barnes, B. A. (1972). *Persoonlijke mededeling*.
- Barnes, B. A., Constable, J. D., Burke, J. F. (1971). Mortality of burns at the Massachusetts General Hospital 1955-1969. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T. L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 430.
- Barr, P. O., Birke, G., Liljedahl, S. O., Plantin, L. O. (1968). Oxygen consumption and water loss during treatment of burns with warm dry air. *Lancet*, 1: 164.
- Batchelor, J. R., Hackett, M. (1970). HL-A matching in treatment of burned patients with skin allografts. *Lancet*, 11: 581.
- Bauer, K. H. (1927). Homeotransplantation von Epidermis bei eineiigen Zwillingen. *Beitr. klin. Chir.*, 141: 442.
- Bennett, J. E., Thompson, L. W. (1969). The role of aggressive surgical treatment in the severely burned patient. *J. Trauma*, 9: 776.
- Berggren, R. B., Lehr, H. B. (1965). Clinical use of viable frozen human skin. *JAMA*, 194: 129.
- Betel, I., Appelman, A. W. M., Balner, H. (1970). The localization of the immunosuppressive activity in horse antimonkey lymphocytic sera. *Transplantation*, 9: 431.
- Billingham, R. E., Krohn, P. L., Medawar, P. B. (1951). Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Brit. med. J.*, 1: 1157.
- Billingham, R. E., Medawar, P. B. (1952). The freezing, drying and storage of mammalian skin. *J. exp. Biol.*, 29: 454.
- Billingham, R. E., Reynolds, J. (1952). Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *Brit. J. plast. Surg.*, 5: 25.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B., Sparrow, E. M. (1954a). Quantitative studies on tissue transplantation immunity. *Proc. Roy. Soc. B.*, 143: 43.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B. (1954b). Quantitative studies on tissue transplantation immunity: origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. *Proc. Roy. Soc. B.*, 143: 58.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B. (1956). Quantitative studies on tissue transplantation immunity III. Actively acquired tolerance. *Transplant. Bull.*, 239: 357.

- Billingham, R. E., Silvers, W. K. (1963). The origin and conservation of epidermal specificities. *New Engl. J. Med.*, 268: 477.
- Billingham, R. E., Silvers, W. K. (1963). The origin and conservation of epidermal specificities. *New Engl. J. Med.*, 268: 539.
- Bondoc, C. C., Burke, J. F. (1971). Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. *Ann. Surg.*, 174: 371.
- Briggaman, R. A., Wheeler, C. E. (1968). Epidermal-dermal interactions in adult human skin: role of dermis in epidermal maintenance. *J. invest. Derm.*, 51: 454.
- Bull, J. P. (1971). Revised analysis of mortality due to burns. *Lancet*, II: 1133.
- Bull, J. P., Squire, J. R. (1949). A study of mortality in a burns unit. *Ann. Surg.*, 130: 160.
- Burke, J. F., Bondoc, C. C. (1968). Combined burn therapy utilizing immediate skin allografts and 0,5% AgNO₃. *Arch. Surg.*, 97: 716.
- Burke, J. F., Koumans, R. K. J. (1969). Niet gepubliceerde data.
- Casson, P. R., Solowey, A. C., Converse, J. M. (1966). Delayed hypersensitivity status of burned patients. *Surg. Forum*, 17: 268.
- Cepellini, R., Curtoni, E. S., Mattiuz, P. L., Leigheb, G., Visetti, M., Colombi, A. (1966). Survival of test skingrafts in man. Effects of genetic relationship and bloodgroup incompatibility. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 129: 421.
- Cepellini, R., Mattiuz, P. L., Scudeller, G., Visetti, M. (1969a). Experimental allotransplantation in man. I — The role of the HL-A system in different genetic combinations. *Transplant. Proc.*, 1: 385.
- Cepellini, R., Bigliani, S., Curtoni, E. S., Leigheb, G. (1969b). Experimental allotransplantation in man. II — The role of A1, A2 and B antigens. III — Enhancement by circulating antibody. *Transplant. Proc.*, 1: 390.
- Chambler, K., Batchelor, J. R. (1969). Influence of defined incompatibilities and area of burn on skin-homograft survival in burned subjects. *Lancet*, I: 16.
- Claman, H. N. (1972). Corticosteroids and lymphoid cells. *New Engl. J. Med.*, 287: 388.
- Cochrane, T. (1968). The low temperature storage of skin: a preliminary report. *Brit. J. plast. Surg.*, 21: 118.
- Conolly, W. B., Hunt, T. K., Sonne, B. A., Dunphy, J. E. (1969). Influence of distant trauma on local wound infection. *Surg. Gynec. Obstet.*, 128: 713.
- Converse, J. M. (1960). In de discussie op: Zotikov, E. A., Budik, V. M., Puza, A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 87: 172.
- Converse, J. M., Rapaport, F. T. (1956). The vascularization of skin autografts and homografts. An experimental study in man. *Ann. Surg.*, 143: 306.
- Converse, J. M., Siegel, W. H., Ballantyne, D. L. (1963). Studies in antigenic overloading with massive skin homografts in rats. *Plast. reconstr. Surg.*, 31: 9.
- Cope, O., Nardi, G. L., Quijano, M., Rovit, R. L., Stanbury, J. B., Wright, A. (1953). Metabolic rate and thyreoid function following acute thermal trauma in man. *Ann. Surg.*, 137: 165.
- Cramer, L. M., McCormack, R. M., Carroll, D. B. (1962). Progressive partial excision and early grafting in lethal burns. *Plast. reconstr. Surg.*, 30: 595.
- Daniels, J. C., Ritzman, S. E., Levin, W. C. (1968). Lymphocytes: morphological, developmental and functional characteristics in health, disease and experimental study — an analytical review. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 26: 5.
- Dausset, J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta haemat. (Basel)*, 20: 156.
- Dausset, J. (1971). The genetics of transplantation antigens. *Transplant. Proc.*, 3: 8.
- Dausset, J., Rapaport, F. J., Legrand, L., Colombani, J., Marcelli-Barge, A. (1970). Skin allograft survival in 238 human subjects. Role of specific relationships at the four gene sites of the first and second HL-A loci. In: *Histocompatibility testing*. Copenhagen, Munksgaard.
- Davis, R. C., Cooperband, S. R., Mannick, J. A. (1969). Preparation and in vitro assay of effective and ineffective anti-lymphocyte sera. *Surgery*, 66: 58.
- Dempster, W. J., Lenox, B. (1951). An experimental approach to the homotransplantation problem in plastic surgery; the use of multiple donors. *Brit. J. plast. Surg.*, 4: 81.
- DiVicenti, F. C., Curreri, P. W., Pruitt, B. A. (1969). Use of mesh skin autografts in the burned patient. *Plast. reconstr. Surg.*, 44: 464.
- Eade, G. G. (1958). The relation between granulation tissue, bacteria and skin grafts in burned patients. *Plast. reconstr. Surg.*, 22: 42.
- Editorial. Immunosuppression and cancer. (1969). *Lancet*, I: 505.
- Editorial. Radiation, immunity and cancer. (1972). *Lancet* II: 217.
- Es, A. A. van. (1972). A comparative study on the survival of massive and small skin grafts in ALS treated rats. Wordt gepubliceerd.
- Feller, I. (1959). Survival of a severely burned child. *Surg. Clin. N. Amer.*, 39: 407.
- Fox, C. L. (1968). Silversulfadiazine — a new topical therapy for pseudomonas in burns. *Arch. Surg.*, 96: 184.

- German, J. C., Wooley, T. E., Achauer, B., Furnass, D. W., Bartlett, R. H. (1972). Porcine xenograft burn dressing. A critical reappraisal. *Arch. Surg.*, 104: 806.
- Gibson, T., Medawar, P. B. (1943). The fate of skin homografts in man. *J. Anat.*, 77: 299.
- Glick, B., Chang, J. S., Jaap, R. C. (1956). The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.*, 35: 224.
- Gnudi, M. T., Webster, J. P. (1950). The life and times of Gaspare Tagliacozzi. New York, Herbert Reichner.
- Good, R. A. (1966). Disorders of the immune system. *Ann. Rev. Med.*, 17: 234.
- Goris, R. J. A. (1970). Diepte diagnose, wondgenezing en littekenvorming van verbrandingen van de huid. Proefschrift Rotterdam.
- Gowans, J. L., McGregor, D. D. (1965). The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy*, 9: 1.
- Gray, J. G., Monaco, A. P., Russell, P. S. (1964). Heterologous mouse anti-lymphocyte serum to prolong skin homografts. *Surg. Forum*, 15: 142.
- Gray, J. G., Monaco, A. P., Wood, M. L., Russell, P. S. (1966). Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. *J. Immunol.*, 96: 217.
- Greaves, M. F., Tursi, A., Playfair, J. H. L., Torrigiani, G., Zanir, R., Roitt, I. M. (1969). Immunosuppressive potency and in vitro activity of antilymphocyte globulin. *Lancet*, I: 68.
- Groote, F. de. (1961). Uitgebreide verbranding behandeld met alternerende strips. *Ned. T. Geneesk.*, 105: 874.
- Gump, F. E., Kinney, J. M. (1970). Caloric and fluid losses through the burn wound. *Surg. Clin. N. Amer.*, 50: 1235.
- Hajiri, P., Defendi, V. (1970). Mixed lymphocyte cultures produce effector cells: model in vitro for allograft rejection. *Science*, 168: 133.
- Haynes, B. W. (1969). Early excision and grafting in third degree burns. *Ann. Surg.*, 169: 736.
- Hendren, H., Constable, J. D., Zawacki, B. (1968). Early partial excision of major burns in children. *Pediat. Surg.*, 3: 445.
- Hermans, R. P. (1968). De techniek van de behandeling van brandwonden. Proefschrift Leiden. (Leiden, Stafleu).
- Hermans, R. P. (1971). Primary excision of full thickness burns up to 40% of body surface, followed by micro- or meshgrafts. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T. L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 301.
- Hermans, R. P., Schepel, J. A. C. (1967). Ervaringen met nieuwe technieken voor huidtransplantatie bij verbrandingen. *Ned. T. Geneesk.*, 111: 165.
- Hintz, B., Webber, M. (1965). Antithymic antibody localization in the mouse. *Nature (Lond.)* 208: 797.
- Hoehn, R., Simmons, R. L. (1966). Immunosuppressive drugs combined with heterologous anti-lymphocyte serum; a clinical regimen for homograft prolongation. *Surg. Forum*, 17: 251.
- Howard, J., Michie, D., Woodruff, M. (1962). Transplantation tolerance and immunity in relation to age. In: *Ciba Symposium: Transplantation*. Boston, Little Brown & Cie, blz. 138.
- Jackson, D., Topley, E., Cason, J. S., Lowbury, E. J. L. (1960). Primary excision and grafting of large burns. *Ann. Surg.*, 152: 167.
- James, K., Medawar, P. B. (1967). Characterization of antilymphocytic serum. *Nature (Lond.)*, 214: 1052.
- Jeejeebhoy, H. F. (1967). Studies on the mode of action of heterologous antilymphocyte plasma. I – A comparison of the immunosuppressive properties of dog and rabbit anti-rat lymphocyte plasma. *Transplantation*, 5: 273.
- Jeekel, J. (1971). Immunological enhancement of skin allo- and heterografts. Proefschrift Rotterdam. (Delft, Meinema).
- Jelenko, C. (1969). Topical control of water loss from the body surface. II – The effects of some topical agents upon mature burn eschar: an in vivo intercomparison. *J. surg. Res.*, 9: 409.
- Jooste, S. V., Lance, E. M., Levey, R. H., Medawar, P. B., Ruszkiewicz, M., Sharman, R., Taub, R. N. (1968). Notes on the preparation and assay of anti-lymphocytic serum for use in mice. *Immunology*, 15: 697.
- Jooste, S. V., Winn, H. J., Russell, P. S. (1972). Destruction of rat skin grafts by humoral antibody. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.
- Karasek, M. A. (1968). Growth and differentiation of transplanted epithelial cell cultures. *J. invest. Derm.*, 51: 247.
- Kashiwagi, N., Brantigan, C. O., Brettschneider, L., Groth, C. G., Starzl, T. E. (1968). Clinical reactions and serologic changes after the administration of heterologous antilymphocyte globulin to human recipients of renal homografts. *Ann. int. Med.*, 68: 275.
- Kay, G. D. (1957). Prolonged survival of skin homografts in a patient with very extensive burns. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 64: 767.
- Kayhoe, D. E. (1972). Kidney transplantation: clinical reports. In *discussie op: ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 113.
- Kelly, W., McKneally, M., Oliveras, F., Martinez, C., Good, R. A. (1966). Acquired tolerance to skin grafts

- induced with cell-free antigenic material. Further tissue sources, frozen storage, dose duration requirements. *Transplantation*, 4: 489.
- Kissmeyer-Nielsen, F., Olsen, S., Petersen, V. P., Fjeldborg, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, II: 662.
- Kissmeyer-Nielsen, F., Thorsby, E. (1970). Human transplantation antigens. *Transplant. Rev.*, 4.
- Klen, R. (1971). Preparation of chorion and/or amnion grafts used in burns. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T. L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 289.
- Koch, C. T., Frederiks, E., Eysvoogel, V. P., Rood, J. J. van. (1971). Mixed-lymphocyte-culture and skin graft data in unrelated HL-A identical individuals. *Lancet*, II: 1334.
- Koch, C. T., Frederiks, E., Rood, J. J. van. (1972). Effectiveness of matching for MLC on skingraft survival between full-house HL-A identical donor-recipient pairs. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.
- Kooreman, P. J., Gaillard, P. J. (1950). Therapeutic possibilities of grafting cultivated embryonic tissues in man. *Arch. chir. neerl.*, 2: 326.
- Lance, E. M. (1967). The effects of chronic ALS administration in mice. In: *Advances in transplantation*. Eds. J. Dausset, J. Hamburger, G. Matthé. Copenhagen, Munksgaard, blz. 107.
- Lance, E. M. (1972). Some comments on the production and purification of ALS with special reference to the use of lymphocyte membranes. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 68.
- Lance, E. M., Batchelor, J. R. (1968). Selective suppression of cellular immunity by anti-lymphocytic serum. *Transplantation*, 6: 490.
- Lance, E. M., Medawar, P. B. (1968). Survival of skin heterografts under treatment with antilymphocytic serum. *Lancet*, I: 1174.
- Larson, D. L. (1965). Closure of the burn wound. *J. Trauma*, 5: 254.
- Law, E. J., Nathan, P., MacMillan, B. G. (1971). Clinical experience with porcine xenografts. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T. L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 281.
- Leguit, P. (1972). Immunological studies in burn patients. *Proefschrift Amsterdam*.
- Lehrfeld, J. W., Taylor, A. C. (1953). The dose phenomenon in rat skin homografts. *Plast. reconstr. Surg.*, 12: 432.
- Levey, R. H., Medawar, P. B. (1966a). Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56: 1130.
- Levey, R. H., Medawar, P. B. (1966 b). Some experiments on the action of antilymphoid antisera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 124: 164.
- Levey, R. H., Medawar, P. B. (1967 a). The mode of action of antilymphocytic serum. In: *Antilymphocytic serum*. Ciba Foundation Study Group; nr. 29. Eds. G. E. W. Wolstenholme, M. O' Connor. Boston, Little Brown & Cie, blz. 72.
- Levey, R. H., Medawar, P. B. (1967 b). Further experiments on the action of antilymphocytic serum. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58: 470.
- Lindberg, R. B., Moncrief, J. A., Switzer, W. E., Order, S. E., Mills, W. (1965). The succesful control of burn wound sepsis. *J. Trauma*, 5: 601.
- Lowbury, E. J. L., Jackson, D. M. (1968). Local chemoprophylaxis for burns with gentamycin and other agents. *Lancet*, I: 654.
- MacMillan, B. G. (1962). Homograft skin — a viable adjunct to the treatment of thermal burns. *J. Trauma*, 2: 130.
- MacMillan, B. G. (1970). Indications for early excision. *Surg. Clin. N. Amer.*, 50: 1337.
- MacMillan, B.G., Hill, E.O., Altemeyer, W.A. (1967). Use of topical silvernitrate, mafenide and gentamycin in the burn patient; a comparative study. *Arch. Surg.*, 95: 472.
- Mangoldt, F. von. (1895). Die Ueberhautung von Wundflächen und Wundhöhlen durch Epithel Aussaat. *Dtsch. med. Wschr.*, 21: 798.
- Martin, D.C., Rubini, M., Rosen, V.J. (1965). Cadaveric renal homotransplantation with inadvertent transplantation of carcinoma. *JAMA*, 192: 82.
- Martinez, C., Kersey, J., Papermaster, B. W., Good, R. A. (1962). Skin homograft survival in thymectomized mice. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med. N.Y.*, 109: 193.
- Martinez, C., Smith, J.M., Blaese, M., Good, R.A. (1963). Production of immunological tolerance in mice after repeated injections of disrupted spleen cells. *J. exp. Med.*, 118: 743.
- Mason, A. D., Pruitt, B. A., Lindberg, R. B., Moncrief, J. A. Foley, F. D. (1971). Topical sulfamylon chemotherapy in the treatment of patients with extensive thermal burns. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T. L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 120.
- Medawar, P.B. (1941). Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature (Lond.)*, 148: 783.
- Medawar, P.B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J. Anat.*, 78: 176.

- Medawar, P.B. (1945 a). A second study of behaviour and fate of skin homografts in rabbits. *J. Anat.*, 79: 157.
- Medawar, P.B. (1945 b). The experimental study of skin grafts. *Brit. med. Bull.*, 3: 79.
- Medawar, P.B. (1963). Use of antigenic tissue extracts to weaken immunological reactions against skin homografts in mice. *Transplantation*, 2: 21.
- Medawar, P.B. (1967). Biological effects of heterologous antilymphocyte antisera. In: *Human transplantation*. Eds. F.T. Rapaport, J. Dausset. New York, Grune & Stratton, blz. 501.
- Medawar, P.B. (1969). Immunosuppressive agents with special reference to anti-lymphocytic serum. *Proc. roy. Soc.*, 174: 155.
- Medawar, P.B., Sparrow, E.M. (1956). The effects of adrenocortical hormones, adrenocorticotrophic hormone and pregnancy on skin transplantation immunity in mice. *J. Endocr.*, 14: 240.
- Meek, C. P. (1958). Successful microdermagrafting using the Meek-Wall microdermatome. *Amer. J. Surg.*, 96: 557.
- Meek, C.P. (1963). Extensive severe burn treated with enzymatic debridement and microdermagrafting: a case report. *Amer. Surg.*, 29: 61.
- Metchnikov, E. (1899). Etudes sur la résorption des cellules. *Ann. Inst. Pasteur*, 13: 737.
- Miller, J.F.A.P. (1961). Immunological function of thymus. *Lancet*, II: 748.
- Miller, J.F.A.P. (1962). Role of thymus in transplantation immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99: 340.
- Mitchison, N.A. (1953). Passive transfer of transplantation immunity. *Nature (Lond.)*, 171: 267.
- Möller, E. (1965). Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign iso-antigens. *Science*, 147: 873.
- Möller, G. (1971). Immunocompetent cells in graft rejection. *Transplant. Proc.* 3: 15.
- Möller, G., Zukosi, C. (1968). Differential effect of heterologous antilymphocyte serum on antibody producing cells and antigen-sensitive cells. *J. Immunol.*, 101: 325.
- Monaco, A.P., Wood, M.L., Gray, J.G., Russell, P.S., (1966a). Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. II- Effect on the immune response. *J. Immunol.*, 96: 229.
- Monaco, A.P., Wood, M.L., Russell, P.S. (1966b). Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. III- Immunologic tolerance and chimerism produced across the H2 locus with adult thymectomy and ALS. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129: 190.
- Monaco, A.P., Wood, M.L., Werf, B.A. van der, Russell, P.S. (1967). Effects of antilymphocyte serum in mice, dogs and man. In: *Ciba Foundation Study Group; nr. 29*. Eds. G.E.W. Wolstenholme, M. O'Connor. Boston, Little Brown & Cie., blz. 111.
- Moyer, C.A., Brentano, L., Gravens, D.L., Margraf, H.W., Monafò, W.W. (1965). Treatment of large human burns with 0,5% silver nitrate solution. *Arch. Surg.*, 90: 812.
- Moynihan, P., Grogan, J.B. (1968). The efficacy of subcellular fraction antisera in immunosuppression. *Clin. Res.*, 16: 83.
- Munster, A.M. (1970). Alterations of the host defense mechanism in burns. *Surg. Clin. N. Amer.*, 50: 1217.
- Murphy, J.B. (1926). Lymphocyte in resistance to tissue grafting, malignant disease and tuberculous infection. *Rockefeller Institute for Medical Research; Monografic 21*, blz. 168.
- Murray, J.E., Sheil, A.G.R., Moseley, R., Knight, P., Gavic, D.J., Dammin, G.J. (1964). Analysis of mechanisms of immunosuppressive drugs in renal homotransplantation. *Ann. Surg.*, 160: 449.
- Najarian, J.S., Crane, T.T. McCorkle, H.J. (1957). An experimental study of the grafting of a suspension of skin particles. *Surgery*, 42: 218.
- Najarian, J.S., Simmons, R.L. (1971). The clinical use of antilymphocyte globulins. *New Engl. J. Med.*, 285: 158.
- Najarian, J.S., Simmons, R.L., Gewurz, H., Moberg, A., Merkel, F., Moore, G.E. (1969). Anti-serum to cultured human lymphoblasts: preparation, purification and immunosuppressive properties in man. *Ann. Surg.*, 170: 617.
- Niederhuber, J., Feller, J., Arbor, A. (1970). Permanent skin homografting in identical twins. *Arch. Surg.*, 100: 126.
- Order, S.E., Mason, A.D., Walker, H.L., Lindberg, R.B., Switzer, W.E., Moncrief, J.A. (1965). Vascular destructive effects of thermal injury and its relationship to burn wound sepsis. *J. Trauma*, 5: 62.
- Park, S.K., Brody, J.I., Wallace, H.A., Blakemore, W.S. (1971). Immunosuppressive effect of surgery. *Lancet*, I: 53.
- Penn, I., Starzl, T.E. (1970). Malignant lymphomas in transplantation; A review of the world experience. *Int. J. clin. Pharmacol.*, 1: 49.
- Penn, I., Starzl, T.E. (1972). Immunosuppression and neoplasia. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 204.
- Polk, H.C., Monafò, W.W., Moyer, C.A. (1969). Human burn survival; Study of efficacy of 0,5% aqueous silver nitrate. *Arch. Surg.*, 98: 262.

- Rapaport, F.T., Converse, J.M., Horn, L., Ballantyne, D.L., Mudholland, J.H. (1964). Altered reactivity to skin homografts in severe thermal injury. *Ann. Surg.*, 159: 390.
- Rapaport, F.T., Milgrom, F., Kano, K., Gesner, B. et al. (1968). Immunologic sequelae to thermal injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 150: 1004.
- Reithmüller, G. (1967). Antilymphocytic serum. *Lancet*, II: 1210.
- Reverdin, J. L. (1869). Greffe epidermique, *Bull. Soc. Chirurgie Paris*, 10: 493.
- Rittenbury, M. S. (1970). The response of the reticulo-endothelial system to thermal injury. *Surg. Clin. N. Amer.*, 50: 1227.
- Rittenbury, M.S., Hanback, L.D. (1967). Phagocytic depression in thermal injuries. *J. Trauma*, 7: 523.
- Rittenbury, M.S., Maddox, R.W., Schmidt, F.H., Ham, W.T., Haynes, B.W. (1966). Probit analysis of burn mortality in 1.831 patients. Comparison with other large series. *Ann. Surg.*, 164: 123.
- Roe, C.F., Kinney, J.M. (1964). Water and heat exchange in third degree burns. *Surgery*, 56: 212.
- Rogers, B.O., Converse, J.M. (1958). Bovine embryo zoograft as temporary biological dressing for burns and other skin defects. *Plast. Reconstr. Surg.*, 22: 471.
- Rood, J.J. van. (1962). Leucocyte grouping. *Proefschrift Leiden*.
- Rood, J.J. van, Eernisse, J.G., Leeuwen, A. van. (1958) Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature (Lond.)*, 181: 1735.
- Rood, J.J. van, Eysvoogel, V.P. (1970). HL-A identical phenotypes and genotypes in unrelated individuals. *Lancet*, I: 698.
- Rosenau, W., Moon, H.D. (1961). Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.*, 27: 471.
- Russell, P.S. (1968). Antilymphocyte serum as an immunosuppressive agent. *Ann. intern. Med.*, 68: 483.
- Russell, P.S., Monaco, A.P. (1965). *The biology of tissue transplantation*. Boston, Little Brown & Cie., blz. 50 e.v.
- Russell, P.S., Winn, H.J. (1970). *Transplantation*. *New Engl. J. Med.*, 282: 786
- Salvaggio, J.E., Castro-Nurillo, E. (1968). Mycobacterial substitutes in 'complete' Freund's adjuvant. *J. Immunol.*, 100: 1340.
- Sasportes, M., Lebrun, A., Dausset, J., Rapaport, F.T. (1972). Correlation of MLC and skin graft survival. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.
- Seinfeld, H., Brendel, W., Bohmert, H. (1971). Fetal calf skin and nucleic acids in the surgical treatment of extensive burns. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 277.
- Sevitt, S. (1957). Changes in white cells, platelets and clotting factors. In: *Burns, pathology and therapeutic applications*. London, Butterworth, blz. 220.
- Sheil, A.G.R. (1972a). In discussie op: Tumour progression risk. ALG therapie and standardization workshop. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 211.
- Sheil, A.G.R. (1972b). Relative toxicity of ALG of horse and goat. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 61.
- Sheil, A.G.R., Mears, D., Kelly, G.E. (1971). Controlled clinical trial of antilymphocyte globulin in patients with renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, I: 359.
- Shuck, J.M. (1970). The use of homografts in burn therapy. *Surg. Clin. N. Amer.*, 50: 1325.
- Shuck, J.M., Pruitt, B.A., Moncrief, J.A. (1971). Multiple uses of cadaver homograft skin in burned patients. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 273.
- Simmons, R.L., Condie, R., Najarian, J.S. (1972). Anti-lymphoblast globulin for renal allograft prolongation. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 119.
- Simpson, E., Binns, R.M., Nehlsen, S.L. Ruszkiewicz, M. (1972). Sources of ALS. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 57.
- Simpson, E., Nehlsen, S.L. (1971). Prolonged administration of antithymocyte serum in mice. II- Histopathological investigations. *Clin. exp. Immunol.*, 9: 79.
- Skamene, E., Russell, P. S. (1971). A quantitative study of the binding of ALS to various cell types. *Clin. exp. Immunol.*, 9: 195.
- Skamene, E., Hawkins, D., Gold, P., Shuster, J., Freedman, S. O., Taylor, H. E. (1972). Studies on nephrotoxic antibody in antilymphocyte globulin. *Transplantation*, 31: 9.
- Skornik, W.A., Dressler, D.P. (1971). Topical antiseptics studies in the burned rat. *Arch. Surg.*, 103: 469.
- Smith, R. (1961). Immunological tolerance of non-living antigens. In: *Advances of immunology*. New York, Academic Press, vol. 1: blz. 67.
- Sneep, A.J. (1956). De vroege excisie en plastiek van de derde graads verbranding. *Ned. T. Geneesk.*, 100: 3031.
- Sneep, A.J. (1959 a). Diepe verbrandingen. *Ned. T. Geneesk.*, 103: 645.
- Sneep, A.J. (1959 b). The significance of skin homograft in the treatment of deep burns. *Arch. chir. neerl.*, 11: 368.

- Sneep, A.J., Folkerts, J.F., Meyling, H.A. (1959). The rehabilitation of patients with deep burns connected with the recovery of function and sensation of grafted skin areas. *Verh. Kon. Ned. Ak. Wetensch. (Natuurk.)*, LII/3. Amsterdam, Noord-Hollandsche Uitg. Mij.
- Song, I.C., Bromberg, B.E. (1971). Pig skin biological dressing on burn wounds. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova. Bern. Hans Huber Verlag, blz. 285.
- Spira, M., Fisetete, J., Hall, C.W., Hardy, S.B., Gerow, F. (1969). Evaluation of synthetic fabrics as artificial skin grafts to experimental burn wounds. *J. biomed. Mater. Res.*, 3: 213.
- Spira, M., Hall, C.W., Fisetete, J., Hardy, S.B. (1971). A laboratory and clinical investigation of polypeptide laminate nylon velour as a temporary skin substitute. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 162.
- Starzl, T.E. (1972). In discussie op: Tumour progression risk. ALG therapy and standardization workshop. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 210.
- Starzl, T.E., Marchioro, T.L., Porter, K.A., Iwasaki, Y., Cerilli, G.J. (1967 a). The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation. *Surg. Gynec. Obstet.*, 124: 301.
- Starzl, T. E., Porter, K. A., Iwasaki, Y., Marchioro, T. L., Kashiwagi, N. (1967b). The use of heterologous anti-lymphocyte globulin in human renal homotransplantation. In: *Antilymphocytic serum*. Ciba Foundation Study Group; nr. 29. Eds. G. E. W. Wolstenhome, M. O'Connor. Boston, Little Brown & Cie, blz. 4.
- Starzl, T. E., Porter, K. A., Brettschneider, L., Penn, I., Bell, P., Putnam, C. W., McGuire, R. L. (1969). Clinical and pathological observations after orthotopic transplantation of the human liver. *Surg. Gynec. Obstet.*, 128: 327.
- Starzl, T.E., Putnam, C.W. (1972). Clinical experience with ALG. In: *ALG therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 124.
- Summerlin, W.T., Faanes, R.B., Good, R.A. (1972). Homologous transplantation of cultured skin. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.
- Switzer, W.E., Jones, J.W., Moncrief, J.A. (1965). Evaluation of early excision of burns in children. *J. Trauma*, 5: 540.
- Switzer, W.E., Moncrief, J.A., Mills, W. et al. (1966). The use of canine heterografts in the therapy of thermal injury. *J. Trauma*. 6: 391.
- Tanner, J.C. (1971). Wide-mesh skin graft. In: *Research in burns*. Eds. P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova. Bern, Hans Huber Verlag, blz. 307.
- Tanner, J.C., Put, J.J. van de, Olley, J.F. (1964). The mesh skin graft. *Plast. reconstr. Surg.*, 34: 287.
- Tanner, J.C., Put, J.J. van de, Olley, J.F. (1965). Skin grafting with suspensions of skin particles. *J. occup. Med.*, 7: 1.
- Tanner, J.C., Shea, P.C., Bradley, W.H., Put, J.J. van de. (1969). Large-mesh skin graft. *Plast. reconstr. Surg.*, 44: 504.
- Taub, R.N., Lance, E.M. (1968). Histopathological effects in mice of heterologous antilymphocyte serum. *J. exp. Med.*, 128: 1281.
- Taylor, A.C., Lehrfeld, J.W. (1953). Determination of survival time of skin homografts in the rat by observation of vascular changes in the grafts. *Plast. reconstr. Surg.*, 12: 423.
- Terasaki, P.I., Trasher, D.L., Hauber, T.H. (1968). Serotyping for homotransplantation. XIII-Immediate kidney transplant rejection and associated preformed antibodies. In: *Advances in transplantation*. Eds. J. Dausset, J. Hamburger, G. Matthé. Kopenhagen, Munksgaard, blz. 225.
- Thiel, G., Brunner, F., Enderlin, F., Harder, F. (1972). Clinical results with intravenous antilymphocyte globulin (ALG) in cadaver kidney transplantation. In: *ALG Therapy and standardization workshop*. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51. Marburg, Behringwerke AG, blz. 126.
- Thompson, J. (1971). De invloed van glucocorticosteroiden op kinetica en functie van mononucleaire fagocyten. Proefschrift Leiden.
- VanScott, E.J. (1965). Replacement kinetics of integumental epithelia. In: *Biology of the skin and hair growth*. Eds. A.G. Lyne, B.F. Short. New York, Amer. Elsevier Publ. Inc., blz. 399.
- Vriesendorp, H.M., Rothengatter, C., Bos, E., Westbroek, D.L., Rood, J.J. van. (1971). The production and evaluation of dog alloantilymphocytotoxins for donor selection in transplantation experiments. *Transplantation*, 11: 440.
- Waksmann, B.H., Arbouys, S., Arnason, B.G. (1961). The use of specific 'lymphocyte' antisera to inhibit hypersensitive reactions of the 'delayed' type. *J. exp. Med.*, 114: 997.
- Walder, B.K., Robertson, M.R., Jeremy, D. (1971). Skin cancer and immunosuppression. *Lancet*, II: 1282.
- Walford, R.L., Colombani, J., Dausset, J. (1969). Retrospective leucocyte typing of unrelated human donor-recipient pairs in relation to skin allograft survival times. *Transplantation*, 7: 188.
- Warren, R., Lofgreen, J., Steinmuller, D. (1972). Differential survival of heart and skin allografts in inbred rats. *Proceedings 4th International Congress Transplant. Society*. New York, Grune & Stratton, in druk.

- Weil, R., Simmons, R.L. (1968). Combined immunosuppression for canine renal allograft prolongation: antilymphocyte serum plus prednisone or azathioprine. *Ann. Surg.*, 167: 239.
- Wessels, N.K. (1967). Differentiation of epidermis and epidermal derivatives. *New Engl. J. Med.* 277: 21.
- Westbroek, D.J., Gruyl, J. de, Verschoor, L., Hulsmans, H.A.M., Vries, M.J. de, Vriesendorp, H.M. (1972). DL-A and isolated pancreas transplantation. Wordt gepubliceerd.
- White, E., Hildemann, W.H. (1968). Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney and skin. *Science*, 162: 1293.
- Williams, G.M., Hume, D.M., Hudson, R.P., Morris, P.J., Kano, K., Milgrom, F. (1968). Hyperacute renal-homograft rejection in man. *New Engl. J. Med.*, 279: 611.
- Wilson, R.E., Carpenter, C.B., Birtch, A.G., Murray, J.E., Merrill, J.P. (1972). Peter Bent Brigham Hospital experience with controlled clinical trial of antilymphocyte globulin for human renal allografts. In: ALG therapy and standardization workshop. Behring Institute Mitteilungen; nr. 51, Marburg, Behringwerke AG, blz. 129.
- Wood, M.L., Vriesendorp, H.M. (1969). A comparative study of heterologous anti-mouse thymocyte sera prepared by two different immunization methods. *Transplantation*, 7: 522.
- Woodruff, M.F.A. (1960). The transplantation of tissues and organs. Springfield, C.C. Thomas.
- Woodruff, M.F.A. (1971). Antilymphocytic serum and its mode of action. *Transplant. Proc.* 3: 34.
- Woodruff, M.F.A., Anderson, N.A. (1963). Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats. *Nature (Lond.)*, 200: 702.
- Yunis, E.J., Amos, D.B. (1971). Three closely linked genetic systems relevant to transplantation. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 68: 3031.
- Yunis, E.J., Plate, J.M., Ward, F.E., Seigler, H.F., Amos, D.B. (1971). Anomalous MLR responsiveness among siblings. *Transplant. Proc.* 3: 118.
- Zanella, G., Reif, A.E., Buenviaje, O.L., Asakuma, R., Deterling, R.A. (1968). On prolonged survival of massive skin allografts in mice. *Transplantation*, 6: 885.
- Zaroff, L.I., Mills, W., Duckett, J.W., Switzer, W.E., Moncrief, J.A. (1966). Multiple uses of viable cutaneous homografts in the burned patient. *Surgery*, 59: 368.
- Zotikov, E.A., Budik, V.M., Puza, A. (1960). Some peculiarities of the survival time of skin homografts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 87: 166.



HOOFDSTUK 2

HUID ALLO-TRANSPLANTATIE EN IMMUNOSUPPRESSIE BIJ UITGEBREIDE VERBRANDINGEN

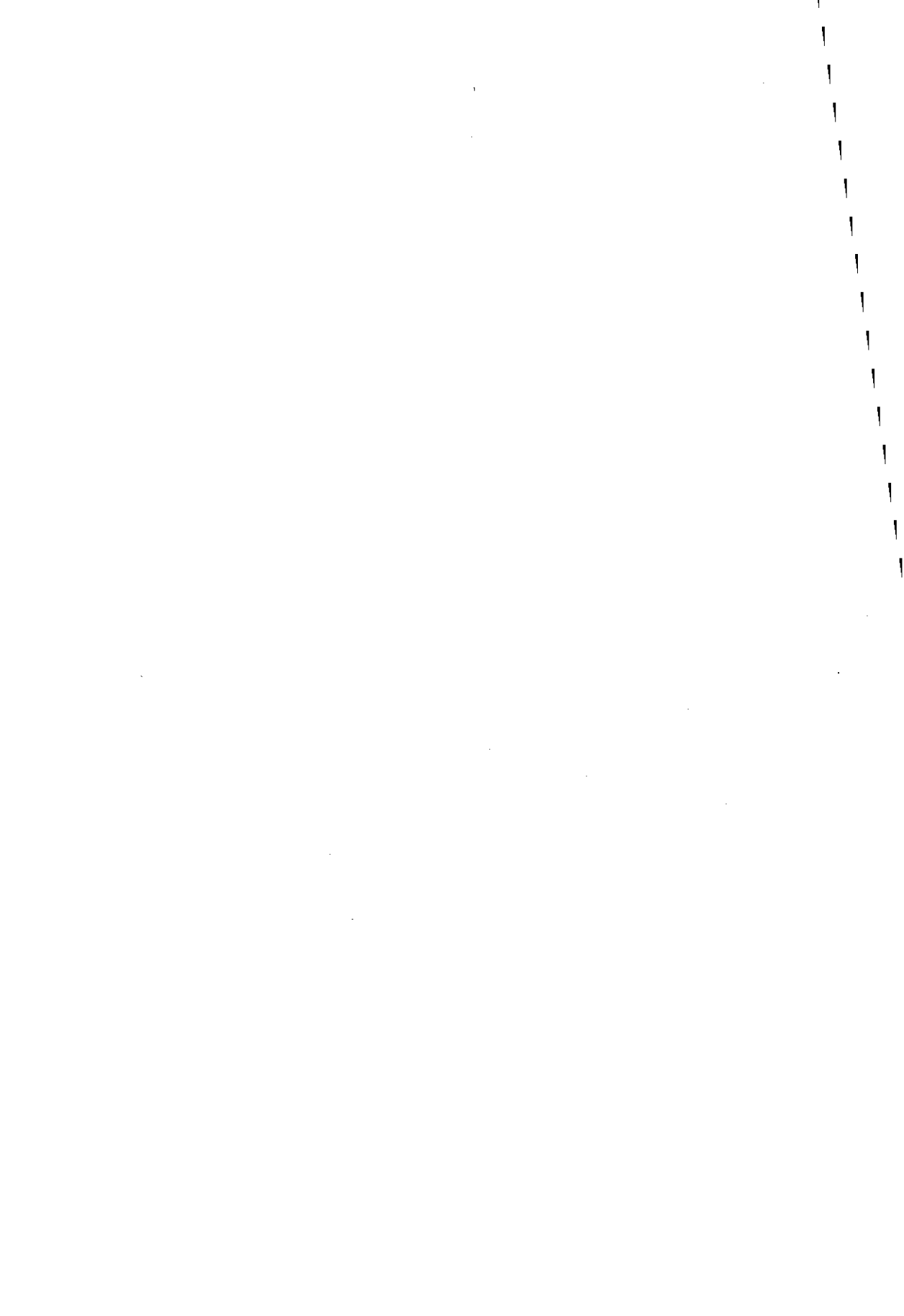
Samenvatting: In Experiment I wordt het effect van immunosuppressie met ALS, ALS + prednison, ALS + prednison en imuran; en imuran + prednison, experimenteel nagegaan. Het proefdier, de cavia, onderging een (lethale) 3e graads verbranding van 50% van het lichaamsoppervlak. De brandwond werd geëxicideerd en bedekt met een allo-transplantaat. De met imuran en prednison behandelde dieren vertoonden de hoogste mortaliteit t.g.v. sepsis. Alle met ALS behandelde dieren ontwikkelden het beeld van 'wasting disease' en overleden binnen 4 weken.

Experiment II: Niet verbrande, niet getransplanteerde cavia's werden behandeld met verschillende antisera. Wasting disease werd niet aangetroffen bij dieren, welke ALS kregen toegediend, dat was bereid zonder het Complete Adjuvans van Freund (CFA).

Experiment III: Immunosuppressie in dieren, voorbehandeld als in Experiment I, werd bewerkstelligd met ALS, bereid zonder CFA. Transplantaat overleving was gelijkwaardig aan die in Experiment I, maar wasting disease ontwikkelde zich niet.

De ontstaanswijze van de ALS-wasting disease wordt gezocht in ongewenste toxische antilichamen in het ALS, waarvan de vorming door het gebruik van een adjuvans wordt gestimuleerd. De consequenties van dit onderzoek voor de kliniek worden besproken.

overgenomen uit: Surgery vol. 66, nr. 1 - 1969
blz. 89-96.



Skin allografts and immunosuppression in the treatment of massive thermal injury

R. K. J. KOUMANS, M.D.*

J. F. BURKE, M.D.**

BOSTON, MASS.

From the Department of Surgery, Harvard Medical School and the General Surgical Services of the Massachusetts General Hospital and Shriners Burns Institute

Survival following near total full-thickness burns remains exceptional. Death is usually caused by septic and catabolic complications related to the extensive and irreversible loss of integument. Investigations have established the beneficial effects of early allografting of the burn wound,⁵ but this biologic closure is, per se, temporary. However, one possible permanent solution to the problem is skin transplantation. With this in mind, the following study was undertaken in order to examine the problems and possibilities involved in transplantation, i.e., primary excision and allografting of extensive burns combined with immunosuppressive therapy. The animal model used in these studies was the guinea pig with an approximate 50 percent body surface full-thickness burn. In a preliminary experiment it was shown that without treatment a burn of this extent is lethal within 8 days (Fig. 4). The studies divide themselves into three groups; the first characterizes the problems of conventional immunosuppressive therapy in an animal with a large burn, the second group concerns the evaluation of the problems raised, and the third tests possible solutions for these problems.

This work was supported by the Shriners Burns Institute and United States Public Health Service Grant No. AI-02392.

Presented at the Thirtieth Annual Meeting of the Society of University Surgeons, Miami, Fla., Feb. 13-15, 1969.

*Work done as a Traveling Fellow from the Medical Faculty of Rotterdam, Netherlands.

**Requests for reprints should be sent to Dr. J. F. Burke, Massachusetts General Hospital, Boston, Mass. 02114.

MATERIAL AND METHODS

Animals and animal care. English short-haired, female, albino guinea pigs weighing 500 to 600 grams. were used in burn and transplant experiments. Antisera were raised in albino New Zealand rabbits. Skin graft donors were colored male English short-haired guinea pigs. Burned and transplanted animals were housed in groups of 6 in standard incubators with forced circulation of humidified air at 28° C. The remaining animals were housed in conventional animal-farm facilities.

Preparation of sera. Rabbit anti-guinea pig lymphocyte serum prepared with complete Freund's adjuvant (RAGPLS) was raised by injecting the rabbit foot pads with divided doses of a solution containing 1 ml. of a washed saline suspension of viable guinea pig lymph node cells (7.5×10^7) mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA). Subsequent intravenous injections of the same number of viable cells without adjuvant were given 3 weeks later on 3 successive days. The rabbits were bled one week following the booster injections and the serum harvested, decomplexed at 56° C. for 30 minutes, and absorbed against washed, packed guinea pig erythrocytes. In addition, the serum was absorbed against guinea pig serum conjugated with polyamino-polystyrene resin.^{10, 23} Finally, the serum was passed through a Millipore filter and after addition of Merthiolate was stored at -10° C. Rabbit anti-guinea pig lymphocyte serum prepared without com-

plete Freund's adjuvant (RAGPLS-CFA) was raised by intravenous injection of 1 ml. of a viable lymph node cell suspension (7.5×10^7 cells) followed in 3 weeks by a similar injection repeated on 3 successive days and again repeated for 3 successive days 5 weeks after the first sensitizing injection. One week later serum was harvested, processed, and stored as above. Determination of total protein and leukoagglutination titer was performed on each batch of serum. Protein content ranged between 4 and 4.2 mg. percent. The leukoagglutination titers of the serum prepared without CFA ranged between 1:128 and 1:256. Titers of the serum prepared with CFA ranged between 1:64 and 1:128. Rabbit anti-Freund's hyperimmune serum (RAFS) was raised by injecting 1 ml. of CFA intradermally in divided doses. Three weeks later the rabbits were injected subcutaneously with CFA in 3 ml. of saline on 3 successive days. The serum was harvested one week later and prepared as above. A serial twofold dilution of RAFS was made and diffused against a 10 percent dilution of concentrated tuberculin (1 ml. = 1 ml. Ref. O.T.) in a double diffusion, Ouchterlony technique. The highest dilution showing a precipitate was 1:64. Normal rabbit serum (NRS) was decomplemented, filtered, and after addition of Merthiolate stored at -10°C .

Drug and serum administration. All sera were administered subcutaneously. Prednisone was also given subcutaneously. Azathioprine (Imuran) was injected intraperitoneally.

Experimental burns. A full-thickness burn with preservation of the panniculus carnosus was made by suspending the anesthetized animal on a frame and immersing it for 9 seconds in water of 90°C . The 50 percent body surface area to be burned was derived from body weight, body length analysis,¹¹ and involved the back and both flanks.

Excision and grafting. Eighteen to 24 hours following burning, under general anesthesia and aseptic precautions, the burned skin was excised suprapannicularly. Split-thickness skin allografts were immediately placed and sutured to the surrounding skin and a dry sterile pressure dressing applied.

Donor skin. Donor animals were killed, clipped, and depilated. After preparation with soap and 70 percent isopropyl alcohol, strips of partial-thickness skin were taken using the Brown dermatome set at 0.017 inch. The grafts were stored in saline-soaked sponges at 4°C . Skin grafts stored over one week were not used.

Anesthesia and postoperative care. A halothane-oxygen anesthesia was used in all animals. Animals in Experiments I and III received infusions of saline (2 ml. per kilogram body weight) subcutaneously prior to burning and again before excision. In addition, normal saline was placed in their drinking bottles both on the day of burning and the day of excision. No antibiotics were used.

CLINICAL STUDIES

Dressings were removed on the tenth postoperative day and the grafts were inspected daily thereafter for signs of rejection. At one-week intervals and whenever the diagnosis of rejection was suspected, skin biopsies were taken and processed for routine histology. Total white cell and lymphocyte counts were done before and 6 hours following the initiation of immunosuppressive therapy and repeated at weekly intervals in all experiments.¹³ Body weight was recorded weekly. Autopsies were carried out on all animals. Samples of lung, liver, spleen, kidney, adrenal, peripheral lymph node, terminal ileum, and grafted skin were processed for routine histology. Bacterial cultures were reliable only from animals that were killed. Tissue fragments of liver and spleen, as well as heart blood were cultured on blood-agar plates and trypticase-soy broth.

RESULTS

Experiment I. Experiment I was designed to identify the most effective of 5 combinations of immunosuppressive agents. The 144 guinea pigs which received 50 percent body surface burns had their burns excised and allografted as described. The burned and grafted animals were divided into the five groups as follows: Group 1: 18 animals received no immunosuppressive treatment;

Group 2: 60 animals received 1 ml. of RAGPLS subcutaneously 3 times a week, starting on the day before transplantation; Group 3: 24 animals received RAGPLS as above and in addition received prednisone 1 ml. per kilogram 3 times a week; Group 4: 18 animals received RAGPLS, prednisone, and, in addition, Imuran intraperitoneally, 12 hours before transplantation (10 mg. per kilogram) and then 2 mg. per kilogram 3 times a week; Group 5: 24 animals were treated with prednisone and Imuran as above but did not receive RAGPLS.

The findings in this experiment are summarized in Table I under Experiment I and are of interest to the problem of skin transplantation in the extensive burn. First, combinations of RAGPLS, prednisone, and Imuran showed the highest proportion of graft prolongation up to Day 20 following transplantation. Second, prednisone and Imuran alone caused a sharp increase in septic deaths throughout the period of study. Third, no animal treated with RAGPLS (either alone or in combination) survived 4 weeks after grafting. These animals did not die of graft rejection and sepsis, but of a "wasting disease." This "wasting disease" was clinically characterized by continuous loss of weight, patchy alopecia with coarseness of the remaining fur, and a high-stepping gait. Fourth, autopsy of animals with "wasting" demonstrated marked morphologic changes, predominantly in the liver and spleen, which were not encountered in animals treated without RAGPLS (Group 1 and 5). These findings are summarized in Fig. 1. An additional point of interest is the beneficial effect of skin allograft covering of a 50 percent burn in the guinea pig. In these animals a nearly closed wound was maintained as wound contracture compensated for slowly developing allograft rejection. It was also noted that the period of allograft survival was prolonged in the extensively burned guinea pig without immunosuppressive therapy.^{1, 8, 24, 25} In unburned animals, graft survival was 8 to 13 (mean, 11.5) days; in burned animals it was 10 to 18 (mean, 14.6) days.

Experiment II. In order to clarify the role

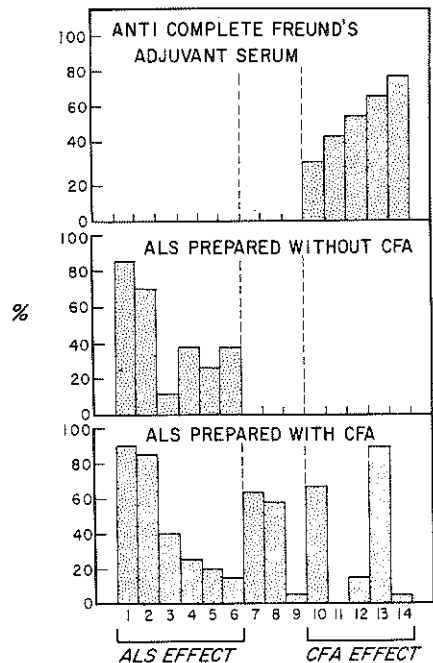


Fig. 1. Histologic abnormalities seen following treatment of groups of guinea pigs with antilymphocyte serum prepared with CFA (RAGPLS), antilymphocyte serum prepared without CFA (RAGPLS-CFA), and serum from rabbits immunized against CFA alone (RAFS). The height of the bar represents the percent of the abnormality found in each group at autopsy. The abnormalities are the following: (1) marginal depletion of lymphocytes, spleen; (2) lymphocyte depletion, lymph node; (3) thickened basement membrane, glomerular tufts; (4) venous vasculitis, liver; (5) extramedullary hematopoiesis in red pulp, spleen; (6) hypercellularity, glomerular tufts; (7) massive centrilobular necrosis, liver; (8) liver cell pleomorphism; (9) lymphocytic depletion, Peyer's patches; (10) basophilic degeneration, liver cells; (11) interstitial eosinophilia, lymph nodes; (12) germinal center hyperplasia; (13) red pulp fibrosis, spleen; and (14) acute splenitis.

of CFA in the production of "wasting disease"^{16, 21} and to further investigate the nature of the "wasting disease," the following experiment was devised. Fifty guinea pigs weighing between 500 and 600 grams were divided into 5 equal groups. Subcutaneous injections of various rabbit sera were given 3 times a week according to the following schedule. Group A: 2 ml. of normal rabbit

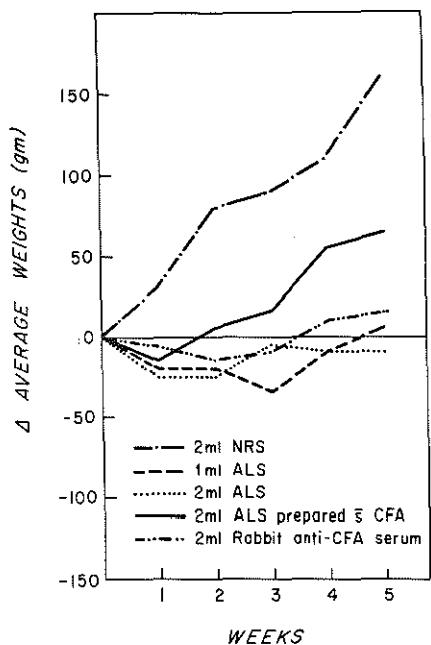


Fig. 2. Body weight changes in groups of 10 guinea pigs each, treated with normal and various immune rabbit sera.

serum (NRS); Group B: 1 ml. RAGPLS; Group C: 2 ml. RAGPLS; Group D: 2 ml. RAGPLS-CFA; Group E: 2 ml. RAFS.

The 10 guinea pigs in Group A receiving NRS thrived and gained weight rapidly. No remarkable histologic changes were found at autopsy. Animals in Groups B and C (i.e., treated with RAGPLS) as well as animals in Group E (i.e., those treated with RAFS) failed to gain weight significantly (Fig. 2). In addition, a more or less marked clinical picture of "wasting disease" was encountered in many instances in these groups (B, C, and E). Animals in Group D, (animals treated with RAGPLS-CFA) however, did well, although they failed to gain weight as rapidly as those receiving NRS. Histologic examination following autopsy of animals in Group D showed a picture that was markedly different from that seen in Groups B, C, and E. The percentage of occurrence of 14 histologic abnormalities seen in each group is recorded in Fig. 1. The data fall into 3 groups according to the treatment regimen given. There appears to be a group of abnormalities related to the antilymphocyte

antibodies (ALS effect), a second group of effects seems related to antibody directed against CFA (CFA effect), and a third pattern of histologic findings occurs when both ALS and CFA effects are combined.

Animals treated with RAFS manifested extensive histologic changes in the liver, lymph nodes, and spleen consisting of basophilic degeneration of liver cells, interstitial eosinophilia and germinal cell hyperplasia in lymph nodes, and red pulp fibrosis and acute splenitis in the spleen. These changes were never seen in animals treated with RAGPLS-CFA. On the other hand, animals treated with RAGPLS-CFA showed marginal depletion of small lymphocytes and extra medullary hematopoiesis in the red pulp of the spleen, lymphocyte depletion in lymph nodes, venular vasculitis in the liver, and thickened basement membranes with hypercellularity in the glomerular tufts. These abnormalities were never seen in animals treated with RAFS. When antilymphocyte serum prepared with CFA was used, the histologic picture at autopsy showed a combination of the effect seen with RAGPLS-CFA and RAFS plus the occasional finding of massive centrolobular necrosis of the liver with liver cell pleomorphism and lymphocytic depletion of Peyer's patches never seen in the above groups.

Experiment III. In order to evaluate RAGPLS-CFA as a long-term immunosuppressive agent in skin transplantation following extensive burns, an experiment similar to Experiment I was performed. Eighteen guinea pigs were burned, excised, and allografted as described. Immunosuppressive treatment consisted of subcutaneous injection of 1 ml. of RAGPLA-CFA three times a week starting on the day before grafting. The changes in body weight with this treatment regimen are depicted in Fig. 3 and are compared with the 5 treatment regimens described in Experiment I. The charts show that animals treated with RAGPLS given alone or in combination with other immunosuppressive agents lose weight continually until death at about 4 weeks following transplantation. Animals treated with RAGPLS-

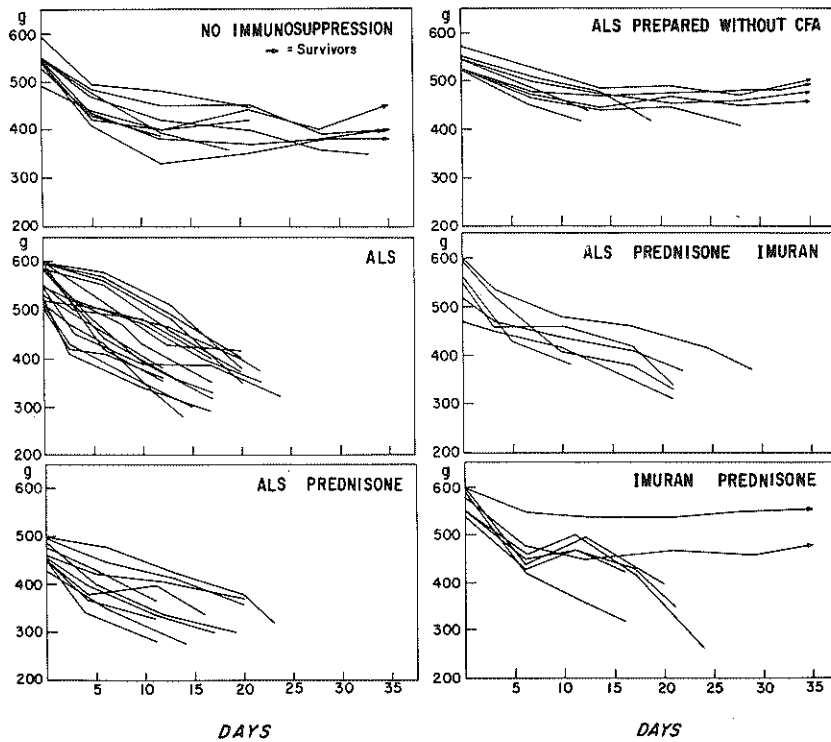


Fig. 3. Body weight changes in groups of guinea pigs surviving at least 10 days following a 50 percent body surface burn. All groups received fluid therapy, primary excision, and immediate skin allografting. Sera was prepared in the rabbit with CFA except as noted.

Table I. Proportion of guinea pigs surviving longer than 10 days following 50 percent body surface burn, excision, allografting, and treatment with various immunosuppressive agents*

	Immunosuppression					
	Experiment I					Experiment III
	None	ALS preparation with CFA	ALS preparation with CFA + prednisone	ALS preparation with CFA + prednisone + Imuran	Prednisone + Imuran	ALS preparation without CFA
% "Day 10 survivors"	50 (9)	45 (27)	42 (10)	33.4 (6)	29.2 (7)	44.4 (8)
% Graft prolongation						
Over 15 days	0 (8)	73.3 (15)	75 (6)	80 (5)	71.4 (7)	71.4 (6)
Day 20	0 (7)	66.7 (9)	66.7 (3)	80 (5)	20 (5)	83.3 (5)
Day 30	0 (5)	All dead of wasting disease			0 (2)	50 (4)

*The table also shows percent of graft propongation in these groups at 15, 20, and 30 days. Experiment I comprises groups of animals treated with antilymphocyte serum prepared with CFA given alone, prednisone and Imuran given alone, and various combinations of both. Experiment III comprises a group of animals treated with antilymphocyte serum prepared without CFA. Numbers in parentheses = survivors.

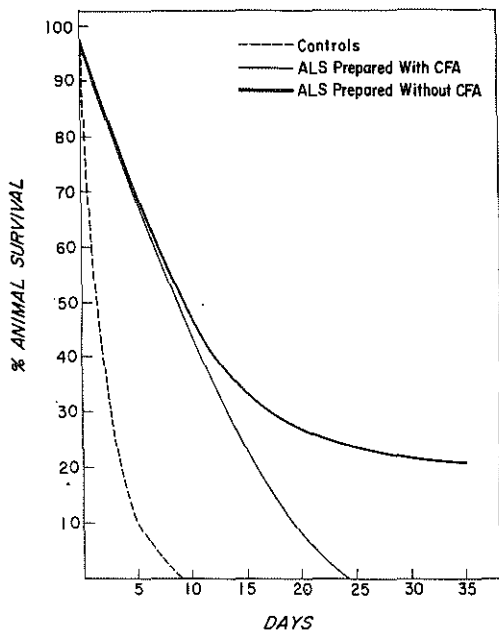


Fig. 4. Proportion of animals surviving in each of three groups of guinea pigs subjected to a 50 percent body surface burn. Control animals received fluid therapy alone. Both groups who received immunosuppression with ALS prepared with and without CFA were subjected to burn excision and immediate skin allografting in addition to fluid therapy.

CFA lose weight for the first weeks (secondary to burning and primary excision) but thereafter slowly gain weight. The pattern of graft survival in this group is summarized in that portion of Table I describing Experiment III. In these experiments graft prolongation was at least comparable to that provided with antilymphocyte serum prepared with CFA⁹ and long-term survival is not abrogated by death from "wasting disease" (Fig. 4).

Bacterial cultures in all three experiments of heart blood, liver, and spleen, were, with rare exception, negative in animals routinely killed at the end of an experiment. Animals that received RAGPLS prepared with CFA which were killed because they were dying showed a 50 percent incidence of positive cultures. Animals receiving RAGPLS-CFA which were killed because they were dying

showed a 33 percent incidence of positive cultures. There was no detectable pattern to the bacteriology observed.

DISCUSSION

Although it is obvious that a possible solution to the therapeutic problem posed by a near total body surface burn is skin transplantation, little consideration was given this mode of treatment because of the dangers of infection. As sepsis is by far the most common cause of death in the burn patient, immunosuppression with agents such as Imuran or prednisone would increase an already substantial risk of bacterial infection. This view has been modified (1) by recent work indicating that antilymphocyte serum produces a substantial anti-inflammatory effect in the acute bacterial inflammatory reaction^{17, 18} and (2) that antilymphocyte serum provided effective immunosuppression.^{14, 22} With this information it appears that skin transplantation following extensive thermal burns can be a practical as well as a possible lifesaving measure. However, there are a number of questions, such as, the method raising antilymphocyte serum, the therapeutic use of antilymphocyte serum alone or in combination with other immunosuppressive agents, the importance of tissue typing⁶ and the use of selective skin donors, as well as the use of germ-free nursing facilities which must be resolved before skin transplantation can be used clinically. The series of experiments reported here have sought to provide information on the first two points. This work confirms the impression that immunosuppressive agents such as Imuran or prednisone increase the risk of posttransplantation sepsis. In animals treated with Imuran and prednisone alone, only 29 percent of the animals survived longer than 10 days, while 45 percent of the animals treated with antilymphocyte serum alone survived longer than 10 days. This increase in death rate in the Imuran- and prednisone-treated animals can be attributed to overwhelming bacterial infection.

It is also of interest to note that burned animals treated with excision and skin allo-

grafting without immunosuppression showed the same beneficial effect as has been observed in the clinic with this form of treatment. In this study, 50 percent of the animals treated with allografting alone were alive at Day 10 following allografting, whereas all ungrafted control animals had died by Day 8. This lifesaving effect of allografting stems from the fact that the grafted skin is slowly destroyed by the rejection process, allowing sufficient time for the wound to contract to an area which is not a threat to the animal's life.

The occurrence of a "wasting disease," in burned animals treated with antilymphocyte serum prepared with CFA, leading to death without allograft rejection was a disturbing finding in the first set of experiments conducted. A wasting-like disease has been reported by many investigators in rodents with a deficient immunologic response, i.e., radiation chimeras,^{3, 4, 7} postthymectomy syndrome,^{2, 15, 19} or a prolonged antilymphocyte serum administration.²² Of neonatal mice, 80 percent in which a wasting state was elicited by cortisone administration were found to have positive bacterial cultures.²⁰ Therefore, a bacterial origin has been proposed as an etiology for the wasting syndrome.¹² In the experiments reported here, cultures of heart blood, liver, and spleen were performed on animals killed with severe "wasting" in which only 50 percent were positive. In addition, the histologic picture at autopsy was not consistent with overwhelming bacterial involvement of liver or spleen. From these observations, it appears that bacterial infection is not a consistent cause of "wasting" in the guinea pig, although a viral etiology cannot be ruled out. The data accumulated in Experiment II indicate that the "wasting disease" seen in animals treated with RAGPLS is caused, at least in part, by antibodies created in the rabbit directed against CFA. This concept is corroborated in the third group of experiments which demonstrates that RAGPLS-CFA provides effective immunosuppression and graft prolongation but does not cause "wasting" in burned allografted animals. It

is possible that the toxicity of CFA prepared serum could be reduced by serum fractionation and the therapeutic use of globulin fraction alone.

The experiments examining the allograft prolongation of antilymphocyte serum alone or in combination with prednisone or prednisone and Imuran demonstrate that the latter combination produces slightly improved results. Unfortunately, this increase in efficiency in allograft prolongation is accompanied by a higher incidence of post-operative septic complications. It appears, therefore, that for clinical use in a severely burned, primarily excised, and allografted patient, the safest and most effective treatment regimen would consist of antilymphocyte serum used alone until the allograft had taken and the transplanted integument provided a secure barrier against bacterial invasion. Thereafter, other immunosuppressive agents could be added for long-term immunosuppressive management.

REFERENCES

1. Alexander, J. W., and Moncrief, J. A.: Alterations of the immune response following severe thermal injury, *Arch. Surg.* 93: 75, 1966.
2. Azar, H. A.: Bacterial infection and wasting in neonatally thymectomized rats, *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 116: 817, 1964.
3. van Bekkum, D. W., van Putten, L. M., and deVries, M. J.: Anti-host reactivity and tolerance of the graft in relation to secondary disease in radiation chimeras, *Ann. New York Acad. Sc.* 99: 550, 1962.
4. van Bekkum, D. W., and Vos, O.: Treatment of secondary disease in radiation chimeras, *Internat. J. Radiation Biol.* 3: 173, 1961.
5. Burke, J. F., and Bondoc, C. C.: Combined burn therapy utilizing immediate skin allografts and 0.5% AgNO₃, *Arch. Surg.* 97: 716, 1968.
6. Chambler, K., and Batchelor, J. R.: Influence of defined incompatibilities and area of burn on skin—Homograft survival in burned subjects, *Lancet* 1: 16, 1969.
7. Connel, Sister St. James, and Wilson, R.: The development of an atypical secondary disease in x-irradiated germ-free mice treated with allogenic and syngenic bone marrow, *Radiation Res.* 25: 181, 1965.
8. Converse, J. M., Siegel, W. H., and Ballantyne, D. L.: Studies in Antigenic overloading

- with massive skin homografts in rats, *Plast. & Reconstruct. Surg.* **31**: 9, 1963.
9. Greaves, M. F., Tursi, A., Playfair, J. H. L., Torrigiani, G., Zamir, R., and Roitt, I. M.: Immunosuppressive potency and in vitro activity of anti-lymphocyte globulin, *Lancet* **1**: 68, 1969.
 10. Gyenes, L., and Sehon, A. H.: Preparation and evaluation of polystyrene-antigen conjugates for the isolation of antibodies, *Canad. J. Biochem.* **38**: 1235, 1960.
 11. Ilahi, M. A., Barnes, B. A., and Burke, J. F.: To be published.
 12. Keast, D., and Walters, M. N. I.: The pathology of murine runting and its modification by neomycin sulphate gavages, *Immunology* **15**: 247, 1968.
 13. Koumans, R. K. J., Billote, J. B., and Burke, J. F.: Problems in prolonged administration of anti-lymphocyte serum I. Experimental studies. To be published
 14. Levey, R. H., and Medawar, P. B.: Nature and mode of action of anti-lymphocyte serum, *Ann. New York Acad. Sc.* **129**: 164, 1966.
 15. McIntire, K. R., Sell, S., and Miller, J. F. A. P.: Pathogenesis of the post-neonatal thymectomy wasting syndrome, *Nature* **204**: 151, 1964.
 16. Medawar, P. B.: Personal communication, 1969.
 17. Morris, P. J., Bondoc, C. C., and Burke, J. F.: Effect of heterologous anti-lymphocyte serum on acute bacterial inflammation, *S. Forum* **17**: 74, 1966.
 18. Morris, P. J., and Burke, J. F.: Anti-lymphocyte serum and staphylococcal infection, *Nature* **214**: 1138, 1967.
 19. Parrott, D. M. V.: Strain variation in mortality and runt disease in mice thymectomized at birth, *Transplantation Bull.* **29**: 102, 1962.
 20. Reed, N. D., and Jutila, J. W.: Wasting disease induced with cortisol acetate: Studies in germ-free mice, *Science* **150**: 356, 1965.
 21. Russell, P. S.: Personal communication, 1968.
 22. Russell, P. S., and Monaco, A. P.: Heterologous anti-lymphocyte sera and some of their effects, *Transplantation* **5**: 1086, 1967.
 23. Webb, T., and LaPresle, C.: Study of the absorption on and desorption from polystyrene-human serum albumin conjugates of rabbit anti-human serum albumin antibodies having different specificities, *J. Exper. Med.* **114**: 43, 1961.
 24. Zanella, G., Reif, A. E., Buenviaje, O. L., Asakuma, R., and Deterling, R. A., Jr.: On prolonged survival of massive skin-allografts on mice, *Transplantation* **6**: 885, 1968.
 25. Zotikov, E. A., Budik, V. M., and Puza, A.: Some peculiarities of the survival time of skin homografts, *Ann. New York Acad. Sc.* **87**: 166, 1960.

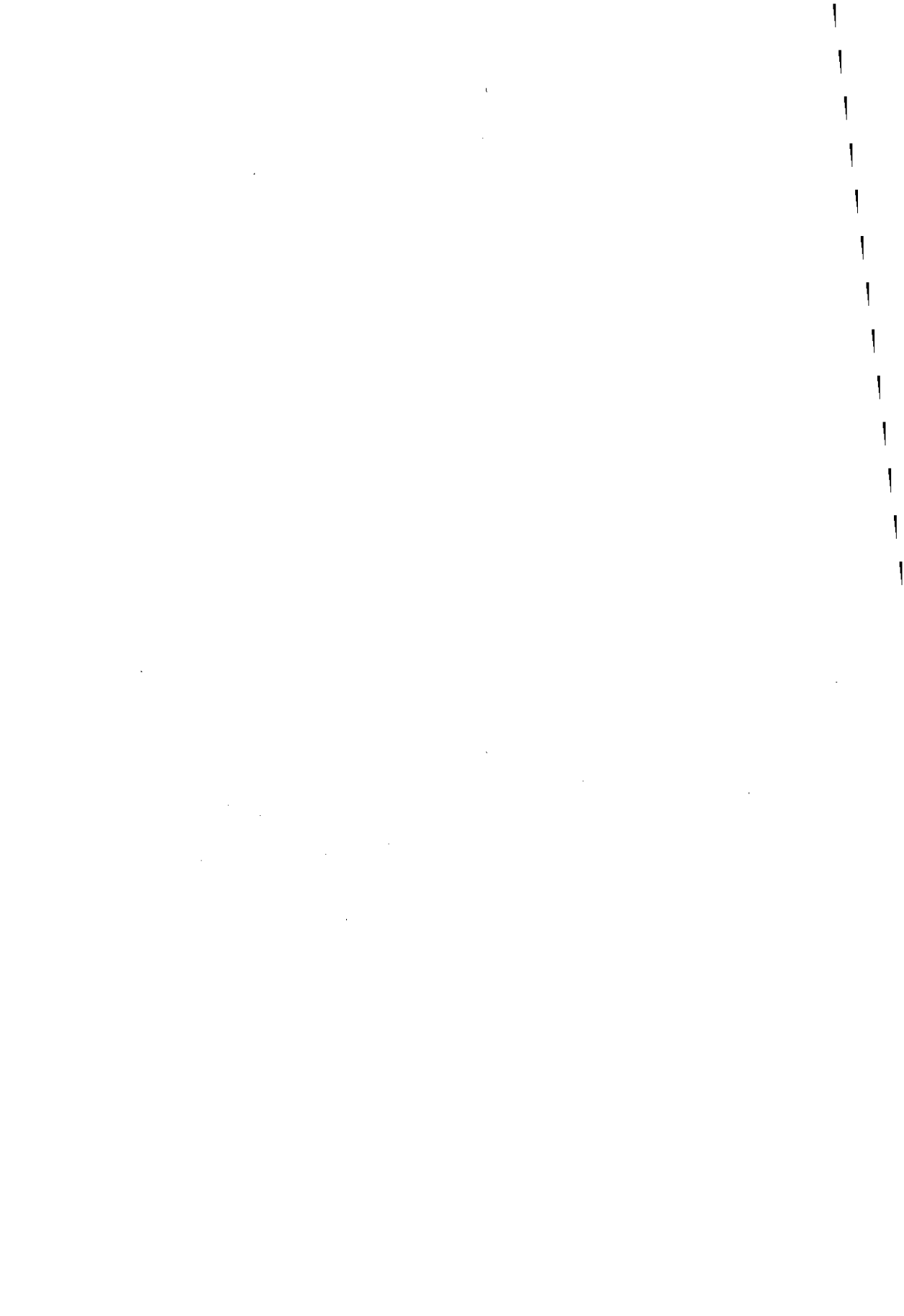
HOOFDSTUK 3

BIJWERKINGEN VAN LANGDURIGE TOEDIENING VAN ANTILYMPHOCYTEN SERUM

Samenvatting: In dit onderzoek worden de toxische bijwerkingen van verschillende antilymphocyten sera in de cavia nagegaan. Hierbij kon het volgende worden vastgesteld:

- 1 – Dieren behandeld met ALS, bereid met adjuvans (CFA) vertonen veelvuldig het beeld van een dodelijk verlopende 'wasting disease'.
- 2 – Het gebruik van CFA bij de bereiding van ALS leidt waarschijnlijk tot een sterk verhoogde titer van toxische antilichamen in het antiserum tegen andere weefsels dan van het lymphatisch systeem.
De invloed van deze ongewenste antilichamen manifesteert zich in het proefdier in de symptomen van wasting disease.
- 3 – In dit experimentele model is de lever het voornaamste doelwit van deze toxische antilichamen.
- 4 – Bacteriële infectie is niet de oorzaak, maar slechts een bijkomstigheid van ALS-wasting disease.
- 5 – Het gebruik van een adjuvans bij de bereiding van ALS resulteerde niet in een beter immunosuppressief serum. Verschillende vormen van experimentele wasting disease worden besproken en mogelijkheden van isolering van de immunosuppressieve eigenschappen van ALS door absorbtie en fractionering worden aangegeven.

overgenomen uit: Transplantation vol. 14, nr. 1 – 1972, blz. 1–8.



COMPLICATIONS IN PROLONGED ADMINISTRATION OF ANTILYMPHOCYTE SERUM IN THE GUINEA PIG¹

R. K. J. KOUMANS², J. B. BILLOTE, AND J. F. BURKE

The Shriners Burns Institute and the General Surgical Services of the Harvard Medical School and the Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114, and the Surgical Services of the Medical Faculty of Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands

SUMMARY

Systemic toxicity of various antilymphocyte sera (ALS), as defined by failure to thrive or complete wasting, was studied in guinea pigs. The following observations were made. (1) A high incidence of fatal wasting is encountered in animals treated with ALS raised with complete Freund's adjuvant (CFA). (2) Use of CFA in preparing ALS raises the titer of antibodies toxic to tissues other than lymphoid to an extent that is clinically manifest. (3) In this animal model of ALS wasting disease, the liver is the primary target organ for these toxic tissue antibodies. (4) Sepsis is a minor complication and not a causal factor in ALS wasting. (5) Use of adjuvant in the preparation of ALS did not result in a more immunosuppressant serum. (6) These results indicate potential hazards of the use of adjuvants in raising ALS for use in humans.

It is only a few years since the original reports on the immunosuppressive qualities of ALS have appeared (10, 18, 19, 24, 39, 43, 44). Because of its unique potential of selectively abolishing immune responses, ALS has, for the time being, become the most promising drug in immunosuppressive therapy. For this reason, clinical experience is accumulating rapidly, although the exact nature of its mode of action is not completely understood. Initial dosage to patients was much smaller than those which proved effective in the laboratory animal and, in addition, it was given in combination with other

agents of well known immunosuppressive potency (34, 35). The prospect of prolonged courses of high dose ALS therapy raises two important questions besides the nature of its immunosuppressive effect. Will the prolonged ALS therapy produce (1) toxic side effects, and (2) increase the risk of infection?

Previous experimental work in guinea pigs treated with primary excision, skin allografts, and continuous immunosuppression following massive thermal burns demonstrated that animals receiving ALS alone were less prone to septic complications than those receiving other immunosuppressive regimes. However, all ALS-treated animals eventually died of a wasting disease thought to be a complication of ALS therapy (16). In view of the widening clinical use of ALS, together with an expected increase in both dose and period of treatment, the occurrence of side effects seems to merit close examination.

¹ This work was supported by the Shriners Burns Institute, Boston Unit, and United States Public Health Service Grant A1-E2392 from the National Institutes of Health.

² Present address: Surgical Services of the Medical Faculty of Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands.

This study was undertaken in an attempt to clarify the nature of the complications produced by prolonged ALS therapy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

English short hair albino guinea pigs of both sexes, weighing 400–500 g, were used in all experiments. New Zealand white rabbits, weighing 2,500–3,000 g, were used to raise sera.

Preparation of Sera

Rabbit anti-guinea pig lymphocyte serum (RALS) raised with the use of CFA. The technique for producing sera has been presented in detail elsewhere and is summarized here (16).

Viable guinea pig lymphocytes were emulsified in CFA and injected in the toepads of New Zealand rabbits. After 3 weeks, i.v. booster injections were given. Animals were bled. The serum was harvested, decplemented at 56 C for 30 min, and absorbed against washed, packed guinea pig erythrocytes, reducing hemoagglutination titers to maximal 1:4. In addition, the serum was absorbed against guinea pig serum conjugated with polyamino-polystyrene resin (12, 40). Finally, the serum was passed through a Millipore filter and, after addition of Merthiolate to a final concentration of 1:10,000, was stored at -10 C. Three weeks after collection, a second booster series was given, followed by harvesting of the sera.

Rabbit anti-guinea pig IgG. This was prepared from a portion of pooled ALS by initial precipitation of the globulin fraction with saturated ammonium sulfate solution and dialyza-tion of the precipitate with normal saline and

0.0175 M phosphate buffer at a pH of 6.3. The IgG fractions were obtained using the DEAE-cellulose column as described by Peterson and Sober (27). The immunoglobulin derived from pooled RALS-CFA was designated RAL IgG-CFA, and that from pooled RALS was designated RAL IgG.

Rabbit anti-CFA hyperimmune serum (RAFS). This sera was raised by injecting 1 ml of CFA i.d. in divided doses. Three weeks later the rabbits were injected s.c. with 1 ml of CFA in 3 ml of saline on 3 consecutive days. The serum was harvested 1 week later. Both RAFS and normal rabbit serum (NRS) were decplemented, filtered, and stored as described.

Each pool of ALS was assayed for total protein content and leukoagglutinating properties (Table 1). Immunosuppressive potency was assessed by prolongation of skin allograft survival. Immunological property of RAFS was assessed by diffusing a serial 2-fold dilution against a 1:10 dilution of concentrated tuberculin (1 ml = 1 ml of reference old tuberculin) in a double diffusion Ouchterlony plate technique. The highest dilution showing a precipitin line was 1:64. Administration of sera and globulin fractions was by s.c. injection three times/week, starting the day before skin grafting. Sera were given in 1-ml amounts. The IgG preparations were diluted so that 1 ml of the purified preparations contained the same amount of γ -globulin as 1 ml of unpurified preparation.

Animal Procedures

Partial-thickness skin grafts, 2 × 3-cm, harvested with a Brown dermatome set at 0.017 inch, were taken from colored guinea pigs and transferred to the dorsal chest wall of host albino guinea pigs. Grafts were secured with nylon sutures and a pressure bandage. Sterile precautions were maintained throughout the procedures.

Postoperative Course

After grafting the animals were kept in an isolation room in order to achieve constant environmental conditions. Dressings were removed on the 10th postoperative day and the grafts were inspected daily thereafter for signs of rejection. Rejection was considered complete as soon as capillary refill in the transplanted skin was absent (Guthy, Billote, and Burke, unpub-

TABLE 1. Total protein content and leukoagglutination titer of pooled batches of sera used

Serum	Protein content (mg/ml)	Leukoagglutination titer
NRS	50	—
RALS-CFA	68	256
RALS	64	128
RALIgG-CFA	35	512
RALIgG	42	512
RAFS	57	64 ^a

^a Antituberculin titer described in Materials and Methods.

lished data). Polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte counts were done before and 6 hr following the initiation of serum injections and were repeated at weekly intervals. Body weights were recorded preoperatively and weekly post-grafting.

The animals were killed on day 35 and autopsies were carried out on all, including some moribund animals killed before day 35. Samples of lung, liver, spleen, kidney, adrenal peripheral lymph node, thymus, terminal ileum, and the skin-grafted area were examined. Additional groups of animals were killed at 4-day intervals and similar histopathological examinations were performed. Histological examination in these additional groups, as well as in the groups recorded previously, was performed on each animal by one of us (J. B. B.) without prior knowledge of treatment or clinical status of the animal involved.

Bacterial Cultures

Bacterial cultures were obtained from all animals on which autopsies were performed, including two groups treated with NRS and normal saline solution and an untreated group. Tissue fragments of liver and spleen, as well as 1 ml-aliquots of heart blood, were cultured on blood agar plates and Trypticase Soy Broth.

RESULTS

The experimental animals were divided into 10 groups. Group 1 consisted of 30 pigs which received RALS-CFA; group 2 (28 animals) received RALS; group 3 (12 animals) received RAL IgG-CFA; and group 4 (28 animals) was treated with RAL IgG. All animals in these groups had skin allografts on the day following their first serum injection. Group 5, 10 animals which received NRS, and group 6, 9 animals which received RAFS, served as controls and were not skin grafted. Group 7 consisted of 31 grafted untreated animals whose grafts survived 8-14 days, with a mean of 11.2 days. For bacteriological studies, three additional ungrafted groups were included: group 8, 12 animals treated with NRS; group 9, 12 animals treated with normal saline solutions; and group 10, 12 untreated animals.

Occurrence of wasting syndrome. Typical symptoms of wasting disease, as manifested by kyphosis, increase in coarseness of fur and areas

of alopecia, a high stepping gait, and terminal diarrhea were noted only in those animals receiving RALS-CFA, as well as in one animal from group 6 receiving RAFS (wasting with no liver necrosis). Failure to gain weight or weight loss is the only common denominator clinically observable for this wasting condition, and weight was regarded as the most sensitive and objective clinical parameter. At autopsy, liver necrosis was present in all animals receiving RALS-CFA, and this change provides the complete wasting syndrome seen. Initial weight loss, in consequence of anesthetic and operative procedures, was observed in all animals from groups 1, 3, and 4. Those animals receiving RALS or IgG raised either with or without CFA started to gain weight rapidly thereafter (Fig. 1). Guinea pigs receiving RAFS, although not hampered by operative trauma, failed to gain weight at the expected rate, the "clinical wasting syndrome."

Leukocyte counts. Administration of the ALS or its IgG fraction elicited a striking diminution in lymphocyte counts in all animals within the first 6 hr. This decline was associated with a concomitant rise in the number of polymorpho-

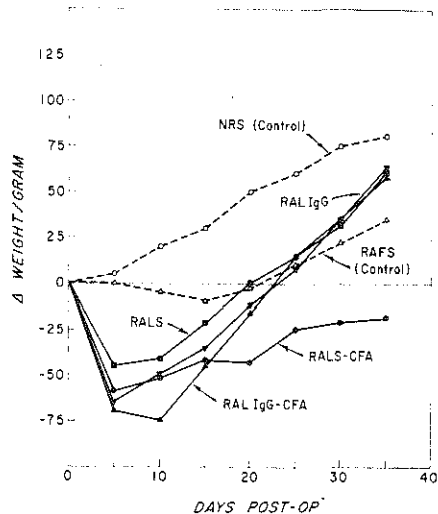


FIGURE 1. Average body weight of animals plotted by groups. Animals receiving ALS-CFA formed the only group not regaining initial weight during the course of the experiment. Animals receiving NRS and RAFS did not undergo operation and therefore do not show the initial weight loss seen in the other groups.

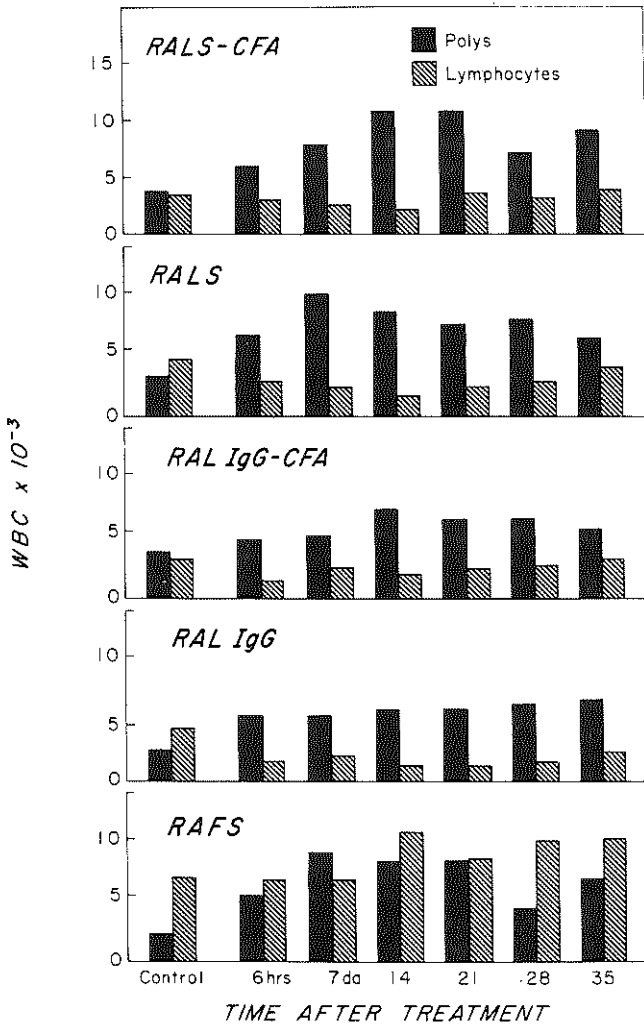


FIGURE 2. Polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte counts before treatment (controls), 6 hr following treatment, and weekly thereafter plotted by groups of animals receiving specified sera. All groups except the animals receiving RAFS showed a prompt drop in lymphocyte counts associated with a rise in polymorphonuclear counts.

nuclear leukocytes as previously reported (25) (Fig. 2). During the first 2 weeks, lymphocyte counts remained low but, thereafter, continued administration of antilymphocytic antibodies appeared less effective in maintaining these low levels and a gradual rise was observed. However, there was no correlation between this restoration in total number of mononuclear cells and graft rejection. This corroborates observations by other investigators (18) and adds support to the concept that small, long lived lymphocytes re-

sponsible for cell-mediated rejection are eliminated by ALS and replaced by larger, probably short lived mononuclear cells, apparently less capable of producing allograft rejection (17).

Graft prolongation. In this assay only those animals were considered that were in possession of a healthy skin transplant with noticeable capillary refill at day 10 postgrafting. This time limit was set in order to avoid nonspecific graft damage during the healing period. In this animal model, partial-thickness skin allografts will sur-

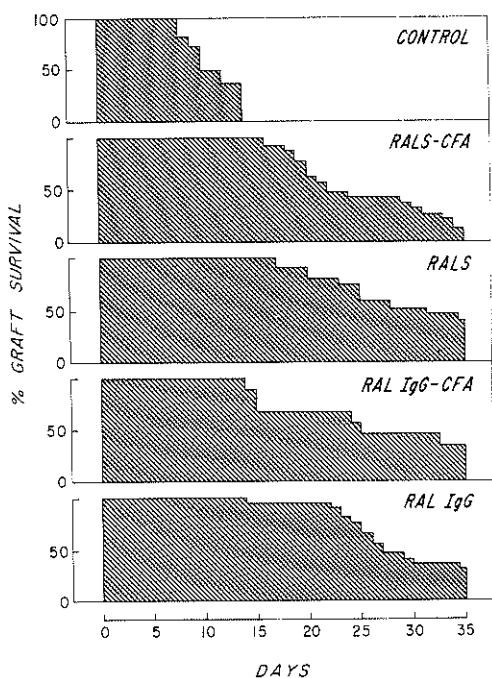


FIGURE 3. Immunosuppressive effect of the different sera used as compared to untreated control group. Marked graft prolongation was observed in all treated groups, without demonstrating a clear-cut difference in potency.

vive for a mean of 11.2 days (8–14-day range) without immunosuppression (Fig. 3). All grafts not viable at day 10 were considered technical failures and were excluded. However, not all grafts were rejected by the time the experiments were concluded and the animals were killed at day 35; therefore, average graft survival time could not be determined. It is questionable if, in this model of outbred animals, the groups are large enough to provide accurate data on mean survival time. The differences in graft prolongation in these experiments, even among animals belonging to the same group, clearly illustrate that there is a variety in histocompatibility among the individual animals. With these reservations, observations can be made in regard to immunosuppressive potencies of the different sera used (Fig. 3). There is no indication that the use of CFA resulted in a better immunosuppressant serum. Graft survival appeared slightly superior in animals receiving ALS or RAL IgG raised without the use of adjuvant.

Pathology. The only pathological changes uniformly found on gross examination in all antibody-treated animals consisted of marked hepatosplenomegaly. In animals treated with RALS-CFA, spleens were often markedly nodular because of focal fibrosis, and all of the livers showed circumscribed to extensive areas of yellowish softening, which extended deep into the liver parenchyma.

Bacteriology. The results of bacterial cultures of heart blood, liver, and spleen and identification of contaminating bacterial species do not provide any suggestions of a specific portal of entry (Table 2). There is little fluctuation in incidence of positive cultures in the different groups treated with the various immunosuppressive sera, NRS, and normal saline solution (Fig. 4). An untreated group showed positive culture in the liver. There is no correlation in the occurrence of wasting disease caused by ALS therapy and bacterial infection. Although there is a slight increase in the percentage of positive cultures in group 1 over the other groups, the majority of these animals wasted without sepsis. The results indicate that ALS wasting can occur in the absence of septicemia.

DISCUSSION

A wasting syndrome clinically characterized by weight loss, ruffled fur, alopecia, hunched posture, and occasional diarrhea is seen to occur in a variety of animal species (21) and has been described under several headings. It can be induced by neonatal thymectomy (22), graft-ver-

TABLE 2. Incidence of bacterial species in cultures of blood, liver, and spleen*

Species	Positive cultures	
	%	No.
<i>β</i> Hemolytic streptococcus	29	24
Pneumococcus	20	16
Salmonella	12	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	9
Nonhemolytic streptococcus	10	8
Bacillus	9	7
<i>Escherichia coli</i>	4	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	2
Diphtheroids	2	2
<i>Mima polymorpha</i>	1	1
Total	100	82

* Total No. of cultures, 457.

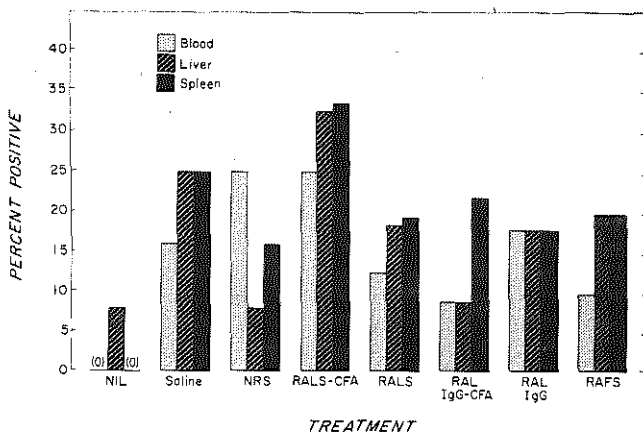


FIGURE 4. Incidence of positive bacterial cultures in blood, liver, and spleen from guinea pigs treated with various antisera. NRS, and normal saline solutions, as well as an untreated group (NIL).

sus-host reactions as runt disease, or homologous disease (2, 26, 33). It can be produced in radiation chimaeras (secondary disease) (4, 37, 38), as well as by other manipulations, including administration of cortisone (32), sterile bacterial vaccines (7, 8), viable microorganisms (3, 9), bacterial endotoxins (14), and virus (40). A wasting condition induced by prolonged administration of ALS has been noted in mice (11, 13, 29, 36) and in guinea pigs (16).

In view of the fact that all of the wasting syndromes are similar clinically, it is tempting to search for a common etiological cause. Bacterial invasion or absorption of endotoxin, probably originating from the gut, has been incriminated, and favorable effects on different types of runting disease have been noted with neomycin gavage (15). Administration of tetracycline reduced the incidence of postthymectomy wasting (1) or cortisone-induced wasting (5). Furthermore, it has been shown conclusively that postthymectomy wasting does not occur under axenic (germ-free) conditions (21), but fatal wasting resulted after transferring the axenic animals to conventional environments (42). However, graft-versus-host runting did occur in axenic mice (21), and both conventional as well as axenic mice died within 20 days from homologous disease, which excludes an infectious agent as the sole etiology for this syndrome (31).

Because most of the wasting conditions enumerated are associated with decreased lymphoid tissue, it has been postulated that lymphoid de-

pletion is the common factor in this syndrome (20, 22, 23). Enhancement of wasting symptoms may be a result of exposure to bacterial, viral, or endotoxin components in association with lymphoid depletion. In animals on prolonged ALS administration, involution of lymphoid tissue takes place and a wasting condition develops. Though animals showing signs of the ALS wasting syndrome may be more susceptible to bacterial infection, we were able to demonstrate that infection is not necessary for this condition to occur and proceed to a fatal outcome.

There is mounting evidence that, by suppressing cell-mediated immunity with ALS, defenses against viral infections in both animal and man are undermined. In runting thymectomized mice showing severe hepatic pathology, the presence of an hepatotropic virus has been demonstrated (6). Although a casual relationship between virus and these extensive liver lesions has as yet to be established, viral involvement is a possibility that certainly has to be considered whenever immunological functions are depressed. In our guinea pigs showing signs of wasting and manifesting gross liver pathology, we were unable to demonstrate the presence of virus in the affected livers either by electron microscopy or culture techniques.

Finally, it is shown that where all animals treated with ALS or its IgG fractions manifested comparable lymphoid involution, only those animals receiving crude ALS raised with adjuvant showed conclusive signs of wasting. Apparently,

in this model, neither lymphoid depletion nor infection explains the development of fatal wasting. In our opinion, wasting syndromes are elicited by a wide variety of manipulations deleterious to the animal to form a single response clinically observable as wasting disease. In our model the single variable responsible for wasting was ALS produced in association with CFA.

The fact that animals in group 5 receiving RAFS failed to gain weight significantly and, on one occasion, showed a complete picture of wasting disease indicates that wasting can be produced by antisera not associated with lymphocytes. Little can be said, however, about the etiological nature of this wasting state.

ALS wasting could only be induced when adjuvants were used in raising the antisera (11, 13, 16, 29, 36). This does not exclude the same factors being present, although to a lesser extent, in ALS raised without adjuvants or in purified globulin fractions. ALS is a complex of antibodies produced by many cellular antigens found on the lymphocyte. There is no reason to believe that these antigens are not shared by other tissues. It should be borne in mind that antisera showing immunosuppressive activity can be raised using varying tissues or cell components.

It is our supposition that by the use of adjuvants, induction of antibodies against "irrelevant" (17) cellular antigens is strongly stimulated and that these antibodies exert systemic toxic effects, primarily expressed in the liver cell. In our opinion, this systemic toxicity is responsible for the ALS wasting syndrome. A similar state of affairs may exist when ALS is raised in animals which are repeatedly boosted with lymphoid cells.

One way of reducing the titer of irrelevant antibodies is to isolate the IgG fraction of the crude ALS-CFA. This resulted in a decrease in the incidence of the clinical wasting syndrome as well as a decrease in the incidence of massive liver necrosis. However, all the animals treated with RALS-CFA-IgG as well as RAL IgG showed the presence of antiliver antibodies by fluorescence microscopy. Thus, the purification reduced the toxicity of the sera without decreasing its ability to prolong graft survival, but did not eliminate all antiliver antibodies.

A second method of reducing systemic toxicity is by absorption of the ALS with various tissue powders (i.e., liver). All of our ALS was absorbed with guinea pig red cells but not liver

powder, which might well decrease the liver toxicity without reducing the graft-prolonging capabilities of the sera.

Acknowledgments. We wish to express appreciation for excellent technical assistance to Misses Donna Collotta, Nicola Green, Helen Hardy, and Gabriele Pollinger in immunology, Miss Sybil Marquis in bacteriology, and Miss Laurie Welch for preparing the manuscript.

REFERENCES

1. Azar, H. A. 1964. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**: 817.
2. Billingham, R. E.; Brent, L. 1958. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **242**: 439.
3. Brooke, M. S. 1964. *J. Exp. Med.* **120**: 375.
4. Connel, Sr. St. James; Wilson, R. 1965. *Radiat. Res.* **25**: 181.
5. Duhig, J. T. 1965. *Nature* **207**: 651.
6. East, J.; Parrott, D. M. V.; Chesterman, F. C.; Pomerance, A. 1963. *J. Exp. Med.* **118**: 1069.
7. Ekstedt, R. D.; Hayes, L. L. 1967. *J. Immunol.* **98**: 110.
8. Ekstedt, R. D.; Mishimura, E. T. 1964. *J. Exp. Med.* **120**: 795.
9. Festenstein, H.; Abrahams, C.; Bokkenheuser, V. 1967. *Clin. Exp. Immunol.* **2**: 311.
10. Gray, J. G.; Monaco, A. P.; Wood, M. L.; Russell, P. S. 1964. *Surg. Forum* **15**: 142.
11. Gray, J. G.; Monaco, A. P.; Wood, M. L.; Russell, P. S. 1966. *J. Immunol.* **96**: 217.
12. Gyenes, L.; Sehon, A. H. 1960. *Canad. J. Biochem.* **38**: 1235.
13. Jooste, S. V.; Lance, E. M.; Levey, R. H.; Medawar, P. B.; Ruskiewicz, M.; Sharman, R.; Taub, R. N. 1968. *Immunology* **15**: 697.
14. Keast, D. 1968. *Immunology* **15**: 237.
15. Keast, D.; Walters, M. 1968. *Immunology* **15**: 247.
16. Koumans, R. K. J.; Burke, J. F. 1969. *Surgery* **66**: 89.
17. Lance, E. M. 1967. p. 107. *In* J. Dausset, J. Hamburger, and G. Mathé (eds.), *Advance in transplantation*. Munksgaard, Copenhagen.
18. Levey, R. H.; Medawar, P. B. 1966. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **129**: 164.
19. Levey, R. H.; Medawar, P. B. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **56**: 1130.
20. Loutit, J. F. 1962. *Lancet* **2**: 1106.
21. McIntire, K. R.; Sell, S.; Miller, J. F. A. P. 1964. *Nature* **4954**: 151.
22. Miller, J. F. A. P. 1962. *Proc. Roy. Soc. B* **156**: 415.
23. Miller, J. F. A. P.; Marshall, A. H. E.; White, R. G. 1962. *Adv. Immunol.* **2**: 111.

24. Monaco, A. P.; Wood, M. L.; Russell, P. S. 1965. *Science* 149: 432.
25. Morris, P. J.; Burke, J. F. 1967. *Nature* 214: 1138.
26. Nisbet, N. W.; Heslop, B. F. 1962. *Brit. Med. J.* 5272-3: 129, 206.
27. Peterson, E. A.; Sober, H. A. 1956. *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 751.
28. Reed, N. D.; Jutila, J. W. 1965. *Science* 150: 356.
29. Russell, P. S. Monaco, A. P. 1967. *Transplantation* 5: 1086.
30. Salomon, J. C. 1965. *C. R. Acad. Sci.* 260: 4862.
31. Salomon, J. C.; Lecourt, J. C. 1966. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122: 640.
32. Schlesinger, M.; Mark, R. 1964. *Science* 143: 965.
33. Siskind, G. W.; Thomas, L. 1959. *J. Exp. Med.* 110: 511.
34. Starzl, T. W.; Brettschneider, L.; Penn, I.; Schmidt, R. W.; Bell, P.; Kashiwagi, N.; Townsend, C. M.; Putnam, C. W. 1969. *Transpl. Proc.* 1: 448.
35. Starzl, T. W.; Porter, K. A.; Iwasake, Y.; Marchioro, T. L.; Kashiwagi, N. 1967. p. 4. *In* G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor (eds.). *Antilymphocytic serum*. Ciba Foundation Study Group No. 29. Little, Brown, Boston.
36. Taub, R. N.; Lance, E. M. 1968. *J. Exp. Med.* 128: 1281.
37. van Bekkum, D. W.; Vos, O. 1961. *Int. J. Radiat. Biol.* 3: 173.
38. van Bekkum, D. W.; van Putten, L. M.; de Vries, M. J. 1962. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 99: 550.
39. Waksman, B. H.; Arbouys, S.; Arnason, B. G. 1961. *J. Exp. Med.* 114: 997.
40. Walters, M.; Joske, R. A.; Leak, P. J.; Stanley, N. F. 1963. *Brit. J. Exp. Pathol.* 44: 427.
41. Webb, T.; La Presle, C. 1961. *J. Exp. Med.* 114: 43.
42. Wilson, R.; Sjodin, K.; Bealmar, M. 1964. p. 89. *In* V. Defendi and D. Metcalf (eds.) *The thymus*. Wistar Institute Press, Philadelphia.
43. Woodruff, M. F. A.; Anderson, N. F. 1963. *Nature* 200: 702.
44. Woodruff, M. F. A.; Anderson, N. F. 1964. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 120: 119.

Received 10 May 1971.

Accepted 2 February 1972.

HOOFDSTUK 4

HISTO-PATHOLOGISCH ONDERZOEK

Samenvatting: De immunosuppressieve werkzaamheid van ALS, afgemeten aan een vertraagde afstotingsreactie van huid allo-transplantaten, vindt histologisch zijn afspiegeling in het verdwijnen van de kleine lymphocyten uit de lymphklieren en de witte pulpa van de milt. De lymphocyten in de plaques van Peyer en de thymus verdwijnen, ondanks langdurige toediening van ALS, niet.

ALS vertoont in dit experimentele model hepatotoxische bijwerkingen die histologisch tot uitdrukking komen in necrose van afzonderlijke levercellen en massale levernecrose. Het klinische beeld van wasting disease gaat in alle gevallen gepaard met deze histo-pathologische leverafwijkingen, welke voornamelijk optreden bij toediening van ALS bereid met adjuvans.

De aard van deze veranderingen in de lever wordt nagegaan en een verklaring voor hun ontstaan gegeven.

Dit hoofdstuk is als een afzonderlijk artikel ter publicatie ingezonden.

COMPLICATIONS IN PROLONGED ADMINISTRATION OF ANTI-LYMPHOCYTE SERUM. HISTOPATHOLOGICAL STUDIES.

J. B. Billote, R. K. J. Koumans* and J. F. Burke.

From the Shriners Burns Institute, Boston Unit, the Departments of Pathology and Surgery, Harvard Medical School, the James Homer Wright Pathology Laboratory and the General Surgical Services, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, 02114.

*the Surgical Services of the Medical Faculty, Rotterdam.

This work was supported by the Shriners Burns Institute, Boston Unit and by USPHS Grant A1-E2392 from the National Institutes of Health.

SUMMARY

The immunosuppressive activity of ALS in the guinea pig, as gauged clinically by a viable skin allograft, is reflected morphologically by depletion of small lymphocytes in the lymph nodes and in the marginal areas of the splenic white pulp. This depletion is temporary in the former and apparently permanent in the latter. The lymphoid cells in the Peyer's patches and in the thymus are not depleted in spite of continuous ALS therapy. ALS has toxic effects which manifest morphologically in the liver as piecemeal and massive necrosis. These hepatic lesions are seen in all animals that developed wasting disease. The toxicity of ALS appears to be due to antibodies, which cross-react with non-lymphoid tissues. The titer of these antibodies is potentiated by complete Freund's adjuvant.

INTRODUCTION

Heterologous anti-lymphocyte serum (ALS) is an important agent in transplantation immunology. In experimental burn injury ALS has been employed successfully to prolong the viability of skin allografts (1). A disturbing problem in this experimental animal model is the development of a wasting syndrome, which results in a high mortality in animals in an immunosuppressed state. The clinical aspect of this wasting syndrome is presented elsewhere (2). In view of the current widespread use of ALS as an immunosuppressive agent, it appears important to define the nature of this wasting. This work involves a study of guinea pigs that received prolonged treatment with variously induced rabbit anti-lymphocyte sera. Control animals received normal rabbit serum and anti-sera raised against complete Freund's adjuvant. Morphologic examination was carried out without knowledge of the experimental protocol.

The data to be presented are a catalogue of the effects of ALS generated in various ways and its relationship to wasting disease in the guinea pig.

MATERIALS AND METHODS

Procedures that are not directly involved with histopathology and immunopathology are described in detail elsewhere (2) and are summarized below.

Summary of experimental immunological evaluation procedures

English short-haired albino guinea pigs of both sexes, weighing 350-500 grams were used. Each animal received a 2 x 3 cm split-thickness allograft harvested with a Brown dermatome, set at 0.017 inch. Grafts were secured with nylon sutures and a pressure bandage. Sterile precautions were maintained throughout the procedure. The various ALS preparations used were: Rabbit anti-guinea pig lymphocyte sera raised with complete Freund's adjuvant (RALC-CFA); rabbit anti-guinea pig lymphocyte sera raised without adjuvant (RALI); immunoglobulin fraction (3) of RALC-CFA (RALIgG-CFA); and immunoglobulin fraction of RALC (RALIgG). Control animals were treated with either rabbit anti-complete Freund's adjuvant (RAFS) or normal rabbit serum (NRS). An additional control group received no treatment at all. Each guinea pig received 1 ml of ALS preparation subcutaneously on the day before grafting and three times a week until the animal was sacrificed. The IgG fraction of RALC-CFA and RALC was administered in the same dosage after dilution in normal saline solution to contain 10 mg globulin per ml. This was the same amount of globulin which was measured to be in 1 ml of unpurified ALS. The technique for preparing the serum is presented in detail elsewhere (1, 2) and will be summarized here.

Viable guinea pig lymphocytes were emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) and injected in the toe pads of New Zealand rabbits. After three weeks, intravenous booster injections were given and the animals were bled one week thereafter. The serum was decemplemented (56°C for 30 min.) and adsorbed against washed, packed guinea pig erythrocytes (reducing hemoagglutination titers to a maximal of 1:4). The serum was further adsorbed against guinea pig serum conjugated with polyamino-polystyrene resin (4, 5). Finally, the serum was passed through a millipore filter and Merthiolate was added to attain a final concentration of 1:10,000. Pooled serum was stored at -10°C.

RALIgG-CFA and RALIgG were respectively prepared from pooled RALC-CFA and RALC, by initial ammonium sulfate precipitation of the globulin fraction and the IgG component was obtained by fractionation through a DEAE-cellulose column (3).

RAFS was prepared by injecting 1 ml CFA intradermally in divided doses. After three weeks, booster injections of 1 ml CFA in 3 ml normal saline solution were given for three consecutive days. The serum was harvested one week later.

Both RAFS and NRS were decemplemented, adsorbed and stored as described above.

Each pool of anti-lymphocyte serum was assayed for total protein and leucoagglutinating properties. Immunosuppressive potency was assessed by prolongation of skin allograft survival.

Animals were sacrificed at 12, 24 and 36 hours and at days 4, 8, 12, 30, 35 and 62. Excision biopsy of peripheral lymph nodes was also done at days 4, 8, 20 and 30 on selected animals.

Preparation of histopathological slides

In every sacrificed animal, tissues were obtained from the peripheral and thoraco-abdominal lymph nodes, abdominal and thoracic viscera, and the skin allograft. The tissues were placed in 10% neutral formalin, processed routinely for paraffin embedding and were stained with hematoxylin and eosin (H & E), Masson's trichrome stain, and when indicated, with Verhoeff's elastic stain, Periodic acid Schiff (PAS) stain and phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) stain.

Immunofluorescent tests

Frozen sections of normal, control and ALS-treated guinea pig livers were made in a cryostat and air-dried. The livers from uninjected animals were examined by an indirect, or 'sandwich', immunofluorescence test (6). They were flooded for thirty minutes with various ALS preparations, rinsed with Coon's buffered saline solution (7) and washed in buffer for 15 minutes. The sections were then flooded for thirty minutes with fluorescein conjugated goat anti-rabbit gamma globulin which had been adsorbed with acetone dried guinea pig liver powder (8). Sections were washed with Coon's buffered saline solution for 15 minutes, mounted in 50% buffered glycerol at pH 8.0 and examined by ultraviolet microscopy. Cryostat sections of livers from injected animals were examined by direct immunofluorescence test, i.e.; the sections were flooded for 30 minutes with fluorescein conjugated goat anti-rabbit gamma globulin, washed twice with buffered saline solution for 15 minutes, mounted in 50% buffered glycerol at pH 8.0 and examined by ultraviolet microscopy. A microsomal fraction of normal guinea pig liver cells was obtained by differential ultracentrifugation (9). Since the microsomal fraction does not adhere to glass slides as tissue section, the fraction was stained and washed in suspension, by an indirect immunofluorescent test modified from a technique employed for living cells in suspension (6). Microsome fraction suspension (containing about 5 mg protein/ml) (10) was washed with Coon's buffered saline solution for 15 minutes and centrifuged at 106,000 xg for 66 minutes in an ultracentrifuge. The supernatant was replaced by various ALS preparations except one control which was replaced by buffered saline solution. The fractions were resuspended by shaking and incubated at room temperature for 15 minutes. They were then alternately washed and centrifuged (106,000 xg) for 66 minutes

with buffered saline solution. After the last wash, the sediment was resuspended and incubated for 30 minutes in fluorescein conjugated goat anti-rabbit gamma globulin which had been absorbed with acetone-dried guinea pig liver powder. They were then washed with buffered saline solution, centrifuged, and the sediment was smeared on a glass slide, mounted in 50% buffered glycerol and examined under ultraviolet microscopy.

Agar gel diffusion studies

Antibody activity of various ALS preparations and the purified fractions against various organs were studied by agar-gel diffusion using a modification of the Petri dish method of Ouchterlony (11).

Preparation of organ extracts

The liver, kidney, spleen, lymph nodes, heart and brain from normal guinea pigs were diced into 50-100 mg pieces and washed several times with normal saline solution. They were put through a stainless steel fine mesh strainer, washed with normal saline solution and alternately centrifuged at 1000 xg. The sediment was resuspended in normal saline solution and lyophilized.

RESULTS

This report is concerned mainly with the morphological changes encountered in the guinea pig following prolonged administration of ALS. The clinical as well as other immunological aspects of the study are presented in detail elsewhere (2). The immunosuppressive potency of the different ALS preparations is assayed by prolongation of skin allograft viability summarized below.

Summary of ALS Immunosuppressive Assay

Without immunosuppression, split-thickness skin allograft in this model survived for a mean of 11.2 days (8-14 day range). There was a very significant prolongation of allograft viability associated with administration of various ALS preparations (Fig. 1). However, the mean graft survival time in the immunosuppressed animals could not be determined because not all grafts were rejected by day 35 when the majority of the animals were sacrificed.

Histopathological Observations:

The morphological findings were made without prior knowledge of the treatment each animal had received. The variously prepared sera; 1) RALS-CFA, 2) RALS and other purified fractions (RALIgG-CFA and RALIgG) and 3) RAFS, and 4) NRS – resulted in three morphologic patterns of lesions. The primary differences between the four treatment groups involved the lymph nodes, spleen and liver and these morphological changes will be discussed in detail. A number of secondary changes will also be presented and discussed. The findings are summarized in Table No. 1.

1. *Thymus*: The thymus in all animals is morphologically normal at all times throughout the experimental period.
2. *Peyer's Patches*: In all animals injected with ALS preparations the Peyer's Patches appear hyperplastic (Fig. 2). This is noted on the fourth day after ALS therapy coinciding with the leukopenia, and this appearance continued throughout the duration of the experiment with slight fall-off.
3. *Lymph Nodes*: Depletion of small lymphocytes is seen only in those animals treated with

various ALS preparations. Initially, depletion of small lymphocytes is observed to involve only the primary follicles. By the third week depletion of the small lymphocytes involves all the follicles as well as the interfollicular areas. The fibrous tissue stroma is accentuated by the loss of cortico-medullary lymphoid cells (Fig. 3). Repopulation of lymph nodes with small and large lymphocytes takes place in thirty days in spite of continuous ALS treatment. By the 35th day the lymph nodes appear normal.

4. *Spleen*: The characteristic alteration in the spleen, depletion of the small lymphocytes at the periphery of the white pulp, is seen only in those animals treated with various ALS preparations. Loss of lymphocytes is observable as early as the fourth day (Fig. 4) after the first injection of ALS and complete disappearance occurs at about the twelfth day. Thereafter, there is replacement fibrosis and hyalinization of the depleted areas with continued absence of lymphocytes through the entire time of observation (Fig. 5, 6). Some of the hyalinized areas are positive for amyloid as shown by apple-green birefringence of alkaline congo red stained sections with polarization optics (12). Splenic sections from those animals treated with RALS-CFA, from the 4th to the 12th day, show not only depletion of the small lymphocytes in the margin of the white pulp but also extensive tissue destruction in the red pulp. Destruction includes not only lymphoid cells but parts of the sinusoids and stroma as well. There are multiple focal hemorrhages with abundant pigment-laden histocytes in the sinusoids intermixed with an abundant amount of cell debris. Consequently, splenic sections by day 30 show extensive interstitial replacement fibrosis in the red pulp, associated with marked dilatation of the sinusoids, resembling that of a cavernous hemangioma (Fig. 7). This degree of tissue destruction and replacement is seen only in the spleen of animals treated with RALS-CFA. Numerous small islands of hematopoiesis with megakaryocytic hyperplasia are seen in the sinusoids of the red pulp. This is most intense during the first week of ALS treatment when peripheral leukopenia is at its height, but not enough to account for the hepato-splenomegaly. It also appears to be more intense in those animals with bronchopneumonia.

5. *Liver*: Hepatic lesions occur only in those animals treated with various preparations of ALS (See Table No. 1).

Within each lobule throughout the entire liver, starting from the fourth day through the duration of the experiment, there are a few cells which stain intensely basophilic (Fig. 8). The same cells stain bright red with Masson's trichrome stain and are PAS negative. Occasionally, the adjacent von Kupffer cell is swollen and stains similarly. In animals sacrificed at later times, these basophilic cells show loss of nuclei. This sequence of events suggests individual liver cell necrosis (Fig. 8). Frequently, groups of three or four liver cells show this change. Significantly, in serial frozen sections, those cells showing basophilic staining are positive by immunofluorescent test for rabbit gamma globulin (Fig. 9). This phenomenon of basophilic degeneration associated with the presence of intra-cytoplasmatic rabbit gamma globulin is seen in animals treated with RALS-CFA (61%) or RALS (10%). The positive immunofluorescence test and basophilic degeneration could be detected in non-grafted guinea pigs within twelve hours after intraperitoneal or subcutaneous injection of 2 ml of RALS-CFA or 4 ml dosages of RALS, RALIgG-CFA, or RALIgG given twice at 12 hours intervals.

Massive liver necrosis (Fig. 10) occurs almost exclusively in animals treated with RALS-CFA (78%). However, RALS and the two purified fractions show the lesion (8%) as well. It is not seen in control animals who received injection of either RALS or NRS. This massive necrosis appears grossly as well defined yellowish friable areas, usually in the subcapsular area, and with selective involvement of the anterior-inferior edges of the right and the left lobes, as well as the quadrate lobe. Microscopically, it varies in extent from the focal centrilobular to an extensive multilobular involvement. Frequently, periportal areas are spared. The necrosis is of the coagulative type, characterized by complete loss of cytologic detail, but with preservation of the histologic architecture. The boundaries of the necrotic areas are delineated from the surrounding, apparently viable hepatocytes, by a zone of pleomorphic liver cells (Fig. 11). A striking observation in and around these destructive hepatic lesions is the absence of any

significant inflammatory cell infiltrates. The pleomorphic hepatocytes, at all stages, are free of rabbit gamma globulin by immunofluorescence test. In the latter stages (day 24-35) foci of fibroblastic proliferation and collagen deposition are seen in the marginal areas. Significant replacement fibrosis occurred by day 35 in many animals (Fig. 12).

After the second week of ALS treatment, an occasional vein in the periportal area may show moderate lymphocytic infiltration of the adventitia. These infiltrates do not involve the bile ducts or the arteries. There is no definite evidence of vasculitis. This venous alteration is seen in all the experimental and injected control groups with slightly increased occurrence in ALS treated animals (See Table No. 1).

6. *Lungs*: Interstitial pneumonia is significantly more apt to occur in ALS treated animals (See table No. 1). The lesion is characterized by lymphocytic and monocytic infiltration of the alveolar septae with consequent narrowing of the alveoli. This lymphocytic infiltrate is present in spite of the peripheral lymphopenia or depletion of small lymphocytes in the lymph nodes and spleen.

Some animals in experimental and control groups have bronchopneumonia but with slightly higher incidence in the ALS-treated animals (See Table No. 1). This lesion is characterized by intra-alveolar collections of polymorphonuclear leukocytes, intermixed with fibrin, edema fluid and frequently bacterial colonies.

7. *Kidneys*: A renal lesion, which is seen exclusively in ALS-treated animals (RALS-CFA 40%; RALS 12%) appears at about the fourth week. It consists of amorphous hyaline thickening of the basement membrane of the capillary tufts of the glomeruli. This thickening is linear and branching and occasionally nodular (Fig. 13), and is frequently associated with increased cellularity of the glomerulus.

8. *Skin Allografts*: From day 4 to 6 the skin allografts from immunosuppressed and non-immunosuppressed animals have the same histological picture. There is minimal granulation tissue in the graft bed, with complete graft-host coaptation. Host vascular buds have established connection with the overlying graft. The epidermis and dermal appendages are histologically intact as in normal skin and frequently there is epithelial hyperplasia.

From days 8 to 14, allograft rejection occurs in the non-immunosuppressed animals. This is characterized by invasion of the basal and deeper prickle cells of the epidermis and hair follicles by small lymphocytes (Fig. 14), associated with inter-epithelial edema, cell lysis and disarray. Similar lymphocytic invasion occurs in the dermal vessels particularly the venules. Advanced stage of rejection shows increasing density of lymphocytic infiltrate and total detachment of the graft epidermis (Fig. 15).

The allografts in immunosuppressed animals which survived beyond day 20 show histologically intact epidermis and dermal appendages. Hair follicles are incorporated into the hyperplastic epidermis (Fig. 16) and subsequently became regenerated within 4 to 6 days (Fig. 17), grossly corresponding to regrowth of fur. When rejection finally occurs, the histological features are the same as described above.

DISCUSSION

The major postmortem findings in the guinea pigs divide into three phenomena and are directly related to the treatment the animals had received: 1) immunosuppressive effects, 2) indirect effects that may be the consequence of decreased immunological defense against infection associated with compensatory response to leukopenia or (when the immune system is partially restored) a specific immune reaction against the ALS itself, and 3) toxic effects. The toxic effects are probably related to the wasting syndrome.

Immunosuppressive Effects:

This lesion consists of depletion of small lymphocytes in the spleen and lymph nodes and is present in all ALS-treated animals with viable allografts. Absence of this change within the first week is associated with allograft rejection.

Repopulation of lymph nodes by small lymphocytes may partially explain the 'escape' phenomenon (13), whereby an allograft is eventually rejected in spite of continuous therapy. Depletion of the small lymphocytes in the spleen is apparently permanent. A curious effect of prolonged ALS treatment is seen in Peyer's patches; instead of becoming depleted of small lymphocytes, they become hyperplastic (Fig. 1). There is no immediate explanation of this phenomenon. Similar observations have been made in mice(14).

Non-specific Effects:

These morphologic lesions are apparently secondary to the lowered immunological defense of the animal as a result of lymphocytic depletion. There is a higher incidence of interstitial pneumonia in ALS-treated animals. An increase in the incidence in bronchopneumonia may imply that there is also a depression of humoral antibody defense as has been observed by some investigators (13), or that small lymphocyte-mediated defense has a role in this type of infection. Hyperplasia of the Peyer's patches in the ileum could be compensatory in as much as it is most marked at the peak of systemic lymph node depletion. Hyaline deposits in the renal glomeruli coincide with the approximate time of lymph node repopulation. Since these hyaline deposits are believed to be antigen-antibody complexes (15) associated with the basement membrane of the glomerular capillary tufts, their appearance at the time of small lymphocyte repopulation may imply partial restoration of the immunological capability of the animal. The animal may at this time be forming antibody against the ALS. This lesion is not seen in animals injected with normal rabbit serum or anti-complete Freund's adjuvant serum.

Increased glomerular cellularity is apparently due to epithelial and endothelial cell hyperplasia intermixed with mononuclears in response to the deposits of antigen-antibody complexes.

Toxic Effects:

The hepatic lesions, both local and massive, are important for three reasons: 1) liver lesions are seen only in ALS-treated animals; 2) of the ALS-treated animals, hepatic lesions occur with higher incidence in those treated with RALS-CFA, less in those animals treated with RALS and RALIgG; 3) all animals with wasting disease had hepatic lesions. However, not all animals with hepatic lesions had wasting disease.

In our model there are apparently two distinct forms of liver necrosis: individual liver cell necrosis and massive liver necrosis. The individual liver cell necrosis associated with prolonged treatment with ALS is also observed in other conditions. Popper and his co-workers (16, 17, 18) described individual liver cell necrosis in serial liver biopsies of patients with chronic active hepatitis which eventually ended in cirrhosis. Their conclusion was that individual liver cell necrosis was the morphologic expression of perpetuation of subclinical chronic hepatitis. A recent report (19) describes intra-nuclear and intra-cytoplasmic localization of Australia antigen (20) by immunofluorescence test in liver biopsies from patients who had lymphoproliferative disorders. The presence of anti-liver antibody in ALS was initially suspected in our model, in view of the presence of precipitin lines in agar-gel double diffusion tests, between ALS and normal guinea pig liver extract. Moreover, the heaviest precipitin lines are elicited by RALS-CFA, and are less prominent with RALS. Apparently, hepatotoxic antibodies are always present in our ALS preparations but the titer is considerably higher in RALS-CFA.

Horse anti-canine lymphocyte serum shows precipitin lines against dog serum, lymphocytes, erythrocytes, leukocytes, thrombocytes, and other tissue extracts (21). A specific precipitin line against dog lymphocytes is found, and is apparently distinct from other precipitin lines against extracts. Absorption of this ALS preparation with dog erythrocytes eliminates the precipitin lines against dog tissue extracts. This is not the case in our model. The precipitin line between RALS-CFA and guinea pig liver extract is only completely eliminated by absorption of the former with acetone-dried guinea pig liver powder.

Individual liver necrosis in our model is very significant because these same cells are positive for rabbit gamma globulin by immunofluorescence test. Of the various components of guinea pig liver cells obtained by differential ultracentrifugation only the microsomal fraction would form a complex with RALS-CFA, (but not with RALS, RALIgG, RAfS, or NRS) which is detectable with fluorescein labelled goat anti-rabbit gamma globulin. The foregoing observations suggest that individual liver cell necrosis in our model is due to the formation of antigen-antibody complexes which consists of liver cell microsomes and an antibody component of RALS-CFA. Massive liver necrosis, on the other hand, is apparently produced on the basis of a completely different mechanism. This mechanism has been the source of much controversy in the past. A few of the postulates are reviewed briefly.

On the assumption that prolonged anti-lymphocyte serum makes an immunological cripple out of the experimental animal, it is apt to be the victim of massive, terminal bacterial infection (22). Hepatic invasion could occur via the portal vein from the gut or local infections in other organs, most commonly in the lungs, may spread via the systemic circulation. By this mechanism, the hepatic lesions could be the result of bacterial emboli with resulting septic infarction. Microscopic observation of the hepatic lesions after treatment with ALS (RALS-CFA, RALS and RALIgG) do not bear this out.

The massive liver necrosis seen in graft versus host reaction could be induced by injection of allogeneic lymphoid cells from germ-free donors to germ-free recipients (23). However, wasting disease which follows neonatal thymectomy in mice does not develop in germ-free animals (24). In our model there is no correlation between positive bacterial cultures in the liver and the occurrence of massive liver necrosis. In fact, positive bacterial cultures are seen in normal control animals (2). It is possible that extra-hepatic foci of infection could cause damage to the liver by blood borne toxic by-products of bacteria and tissue breakdown. The cortisone-induced model of wasting disease (25) appears to be explainable on this basis: increased secretory activity of the gastrointestinal tract induced by the hormone precipitates the formation of mucosal ulcers (26). The resulting increased permeability of the mucous membranes allows the rapid influx of intestinal micro-organisms or their toxins to the portal and systemic circulation of a defenseless host, thereby resulting in clinical wasting and hepatic lesions. Indeed, the clinical course in this model is altered for the better by neomycin sulfate gavage (27).

Endotoxin was shown to attack vascular endothelium including the hepatic vessels (28). This could possibly contribute to the formation of sinusoidal damage, fibrin deposition and hence, ischemic infarction. Viral infection is the alternative mechanism to bacterial infection. Administration of ALS results in depression of the cell-mediated defense of the organism, increasing susceptibility to viral infection (29). Consequently, the hepatic lesions could possibly be analogous to human viral hepatitis. However, the morphological appearance of the lesions in our model is not the usual histology of viral hepatitis. No viral elements are detectable by electron microscopy or culture. RALS-CFA and RALS had equal capacity to induce an immunosuppressed state in our model, yet differed markedly in their capacity to induce hepatic lesions.

Morphologically, the massive liver necrosis is of the coagulative type, with a tendency to predominate in Rappaport's zone 3 and 3' of the liver acinus (30,31) and frequently spares Rappaport's zone 1. In reference to the whole liver, the necrotic areas are generally confined to the areas of least perfusion (32). The foregoing characteristics suggest that the lesion is due to ischemic infarction. Arakawa and his co-workers (33) proposed a mechanism of this infarction

which appears to fit our model. Immune-mediated cellular destruction occurs in the spleen and the by-products of this cellular breakdown drain into the liver, causing von Kupffer cell swelling. Swelling of the von Kupffer cells, extra-medullary hematopoiesis in the sinusoids, and swelling of the hepatocytes cause stasis in the sinusoidal flow, the effects of which is most acutely felt in the areas of least perfusion. Stasis leads to formation of platelet thrombi and fibrin precipitates (34) (Fig. 18).

All these factors, acting in concert, result in hypoperfusion severe enough to cause ischemic infarction. The by-products of liver necrosis further enhance von Kupffer cell swelling and further aggravate the sinusoidal occlusion, and further necrosis occurs.

It is significant that these two types of destructive lesions in the liver have been reported in human patients (35) who received immunosuppressive therapy, which included ALS, following renal allografting.

Table No. 1:

MORPHOLOGIC LESIONS	TREATMENT RECEIVED AND PERCENTAGE OF LESION OCCURRENCE				
	RALS-CFA Animals-54 %	RALS Animals-108 %	RAFS Animals-21 %	NRS Animals-25 %	NT Animals-8 %
Peyer's patches Lymphoid hyperplasia	46	75	5	8	0
Lymph Nodes: Depletion, small lymphocytes	85	72	0	0	0
Spleen: Depletion, small lymphocytes	90	87	0	0	0
Increased hematopoiesis	44	40	5	4	12
Liver: Basophilic degeneration, hepatocytes	61	10	0	0	0
Necrosis, individual liver cell	64	25	0	0	0
Pleomorphism, liver cells	57	8	0	0	0
Necrosis, massive	77	9	0	0	0
Lymphocytic infiltration, periportal veins	24	37	0	0	0
Hematopoiesis	14	12	0	0	0
Lungs: Interstitial pneumonia	61	62	24	24	25
Bronchopneumonia	24	20	9	12	12
Kidney: Thickened glomerular tuft basement membrane	40	12	0	0	0
Hypercellularity, glomeruli	24	37	0	0	0

Table No. 1

Frequency of occurrence (%) of major morphologic lesions in autopsied guinea pigs after prolonged treatment with rabbit sera raised against guinea pig lymphocytes (RALS-CFA and RALS) and complete Freund's adjuvant (RAFS). The values given for RALS include those animals treated with RALIgG-CFA and RALIgG. Control animals include those treated with normal rabbit serum (NRS) and those animals who received no treatment (NT).

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to express appreciation for excellent technical assistance to the following: Misses Donna Collotta, Judith Piccolie and Gaby Pollinger in immunology; Misses Blanca Lusetti, Susan Graves and Ingrid Berg who prepared the histopathological slides. Dr. Joseph B. Warshaw kindly provided us with microsome fraction from normal guinea pig liver. We also thank Miss Laurie Welch for preparing the manuscript.

REFERENCES

1. Koumans, R. K. J. and Burke, J. F.: Skin allografts and immunosuppression in the treatment of massive thermal injury. *Surgery*, 66:89-96, 1969.
2. Koumans, R.K.J., Billote, J.B. and Burke, J.F.: Complications in prolonged administration of antilymphocyte serum in the guinea pig. *Transplantation* 14: 1 – 8, 1972.
3. Peterson, E.A., Sober, H.A.: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange absorbents. *J. Am. Chem. Soc.* 78:751-755, 1956.
4. Gyenes, J., Sehon, A.H.: Preparation and evaluation of polystyrene antigen conjugates for the isolation of antibodies. *Canad. J. Biochem.* 38:1235-1248, 1960.
5. Walters, M.N.I., Joske, R.A., Leak, P.J. and Stanley, N.F.: Murine infection with reovirus; I. Pathology of the acute phase. *Brit. J. Exp. Path.* 44:427-436, 1963.
6. Moeller, G.: Fluorescent antibody technique for demonstration of isoantigens in mice. In: H. N. Eisen (ed.) *Methods in Medical Research*, Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp. 58-69, 1964.
7. Coons, A. H., Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells; improvements in method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91:1-13, 1950.
8. McDevitt, H. O. and Coons, A. H.: Methods for the preparation of fluorescent proteins. In: H. N. Eisen (ed.) *Methods in Medical Research*. Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp. 142-148, 1964.
9. von Jagow, R.: The preparation of microsomes. *Nauyn Schmeideberg Arch. Exp. Path.* 251:73 – 87, 1965.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
11. Ouchterlony, O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*, 5:1-78, 1958.
12. Puchtler, H., Sweat, F., Levine, M.: On the binding of congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* 10:355-364, 1962.
13. Levey, R. H. and Medawar, P. B.: Nature and mode of action of anti-lymphocyte serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 129:164-177, 1966.
14. Taub, R. and Lance, M.: Histopathological effects in mice of heterologous antilymphocyte serum. *J. Exp. Med.* 128:1281-1307, 1968.
15. Dixon, F. J., Feldman, J. D., and Vasquez, J. J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113:899-920, 1961.
16. Popper, H., Rubin, E., Krus, S., and Schaffner, F.: Postnecrotic cirrhosis in alcoholism. *Gastroenterology* 39:669-689, 1960.
17. Popper, H., Paranetto, F., and Schaffner, F.: Immune processes in the pathogenesis of liver disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 124:779-781, 1965.
18. Schaffner, F., Popper, H., and Dallatone, M.: Structural alterations in the clinical evaluation of cirrhosis. *Gastroenterology* 30:357-372, 1956.
19. Nowolowski, A., Brzosko, W. J., Medalinski, K., and Krawczynski, K.: Cellular localization of Australia antigen in the liver of patients with lymphoproliferative disorders. *Lancet*, 1:494-497, 1970.
20. Blumberg, B. S. and Sutwick, A. J.: Australia antigen and hepatitis. *J. A. M. A.* 207:1895-1896, 1969.
21. Fateh-Moghadam, A., Knedel, M., Pichimayr, R., Morrel, Ch: Zur Frage der Antikorperspezifität von heterologem Antilymphocytenserum. *Klin. Wschr.* 46:1092-1098, 1969.

22. Nisbet, N.W. and Heslop, B.F.: Runt Disease. *Brit. Med. J.*, I and II, 1:129-135, 2:203-213, 1962.
23. McIntire, K.R., Sells, S., and Miller, J.F.A.P.: Pathogenesis of wasting syndrome. *Nature (London)* 204:151-155, 1964.
24. Miller, J. F. A. P.: Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. Roy. Soc. (Biol.)* 156:415-428, 1962.
25. Duhig, J. T.; The beneficial effects of oxytetracycline in cortisone induced wasting disease. *Nature (London)* 207:651-652, 1965.
26. White, A., Handler, P., and Smith, E. L.: *Textbook: Principles of biochemistry*, McGraw-Hill Book Co., N. Y., 3rd Ed. pp. 885, 1964.
27. Keast, D. and Walters, M. N.: The pathology of murine runting and its modification by neomycin sulphate gavages. *Immunology* 15:247-262, 1968.
28. Rubinstein, H. S., Fine, J., and Coons, A. H.: Localization of endotoxin in the walls of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y)* 111:458-467, 1962.
29. Hirsch, M. S. and Murphy, E. A.: Effects of antilymphoid sera on viral infection. *Lancet* 2:37-40, 1968.
30. Rappaport, A. M., Borowy, Z. J., Loughheed, W. M. and Lotto, W. N.: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anat. Record* 119:11-13, 1954.
31. Rappaport, A. M.: Observations on the pathophysiology of liver structure. *Klin. Wschr.* 38:561-577, 1960.
32. Daniel, P. M. and Prichard, M. M. L.: Variations in the circulation of the portal venous blood within the liver. *J. Physiol.* 114: 521-537, 1951.
33. Arakawa, K., Jezequel, A. M., Macvie, S. I., Johnston, R., Perz, Z. M., and Steiner, J. W.: The liver in murine transplantation (runt) disease. *Amer. J. Path.* 49:257-279, 1966.
34. Schlesinger, M. and Essner, E.: Histochemical and electron microscopic studies of the liver in runt disease. *Amer. J. Path.* 47:371-401, 1965.
35. Evans, D. B., Millard, P. R., and Herbertson, B. M.: Hepatic dysfunction associated with renal transplantation. *Lancet* 2:929-933, 1968.

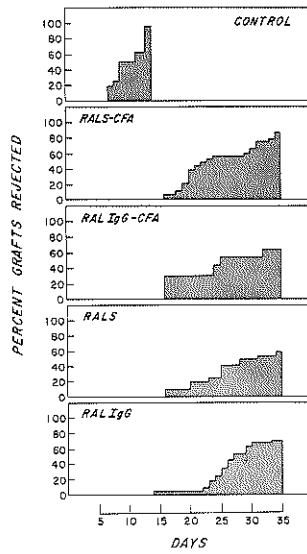


Figure 1: Assay of the immunosuppressive potency of the various sera used as compared to the non-immunosuppressed control group. Allografts in the control animals were all rejected (100%) by day 14. All groups treated with various ALS preparations showed marked prolongation in allograft survival although there was no significant difference in potency. Not all allografts in the immunosuppressed animals were rejected when the experiments were ended at day 35: RALS-CFA-88%; RAL IgG-CFA – 66%; RALS – 58%; RAL IgG – 70%.

Figure 2: Lymphoid hyperplasia in the Peyer's patch in the guinea pig ileum at day 4 following ALS treatment when there is depletion of lymphocytes in the lymph nodes and spleen associated with peripheral lymphopenia. (x26)



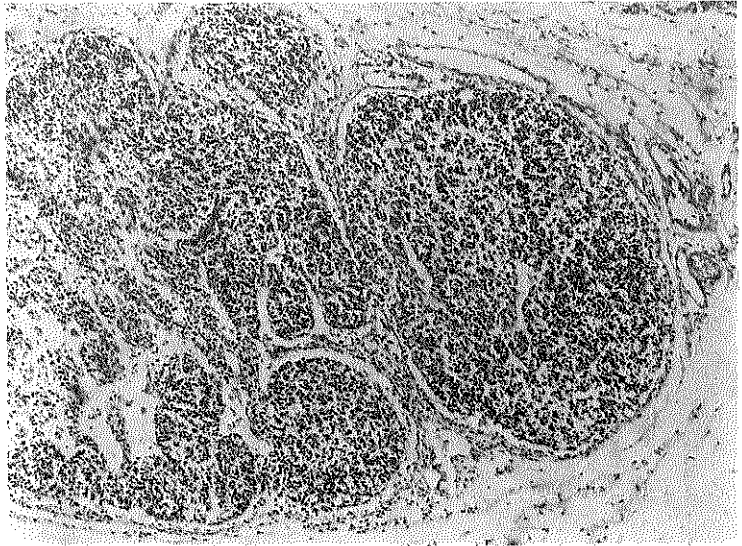
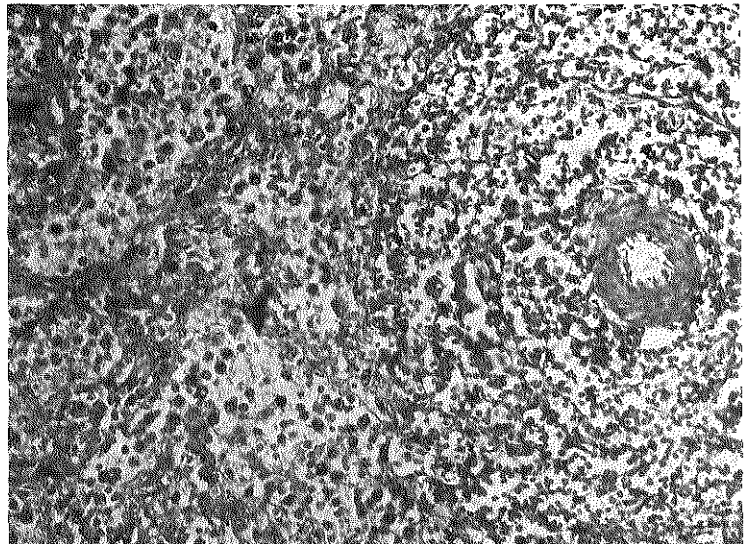


Figure 3: Marked depletion of lymphoid cells in a lymph node sectioned at day 20 following treatment with ALS. There is marked accentuation of the stroma and complete loss of the cortico-medullary landmarks. (x32)

Figure 4: A splenic follicle at day 4 following treatment with ALS, showing marked depletion of small lymphocytes, accentuation of the stroma, and presence of numerous pigment-laden histiocytes and cell debris in dilated sinusoids. (See Fig. 6) (x208)



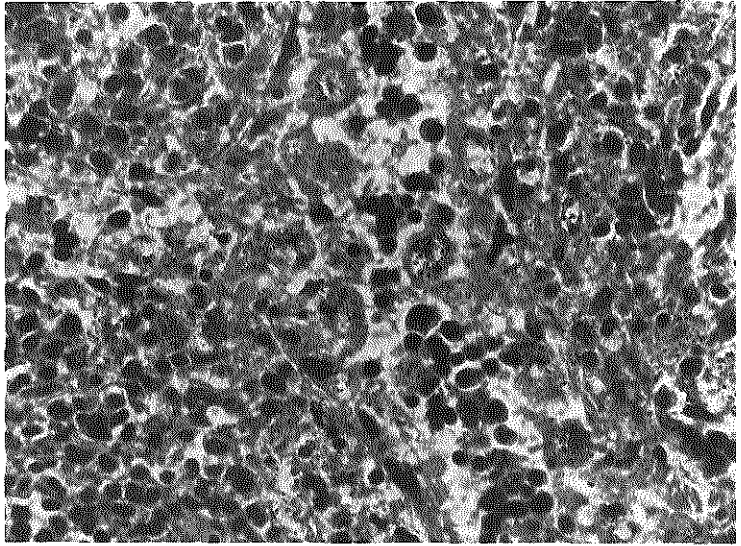
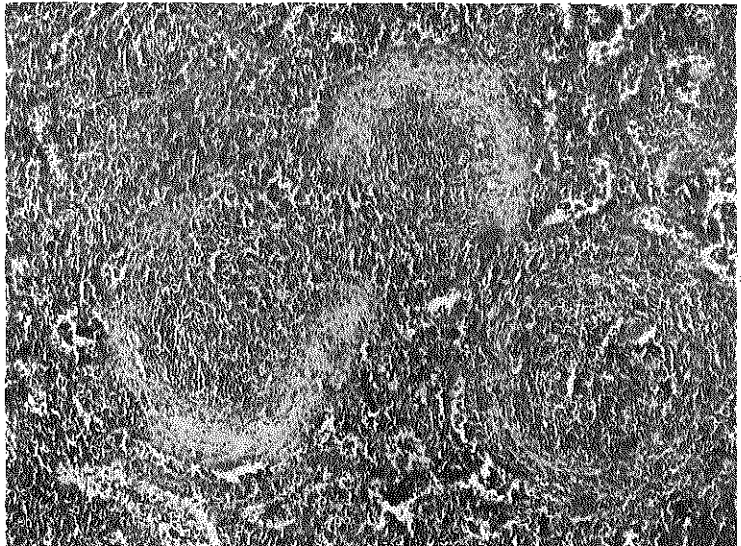


Figure 5: High power view of a dilated sinusoid showing abundant cell debris, pigment-laden histiocytes, large lymphocytes, and a few small lymphocytes. (x500)

Figure 6: Replacement fibrosis of the margin of a splenic follicle at day 30 following ALS treatment. (x32)



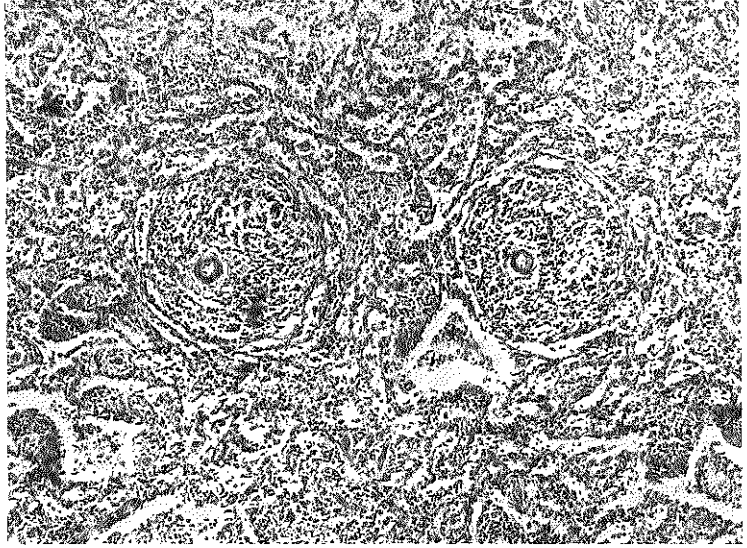
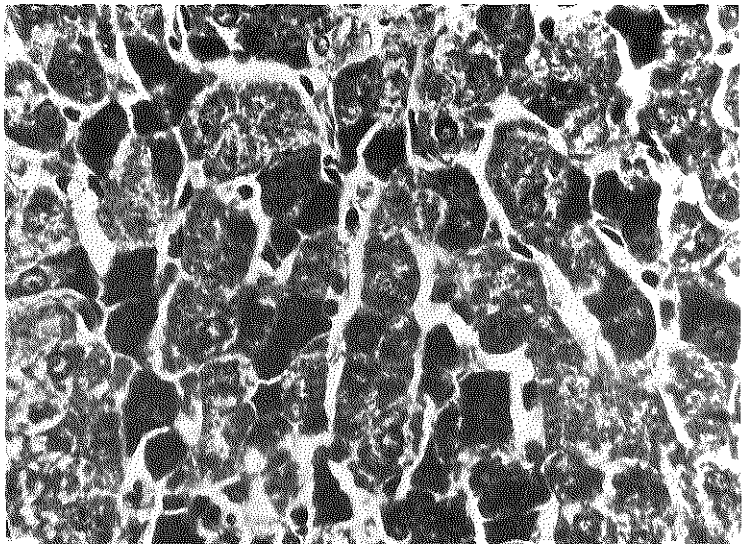


Figure 7: Marked depletion of lymphoid cells in the lymphoid follicles and red pulp in the spleen of an animal treated with RALS-CFA. Extensive tissue destruction resulted in replacement fibrosis in the red pulp which now resembles a cavernous hemangioma. (x32)

Figure 8: Basophilic degeneration (dark cells) of a group of liver cells. Some of the cells have lost their cytoplasmic as well as their nuclear detail, indicative of necrosis.



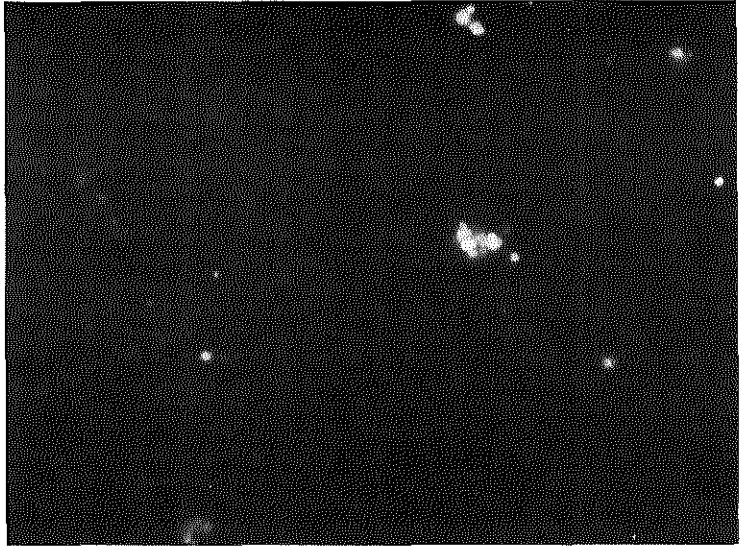
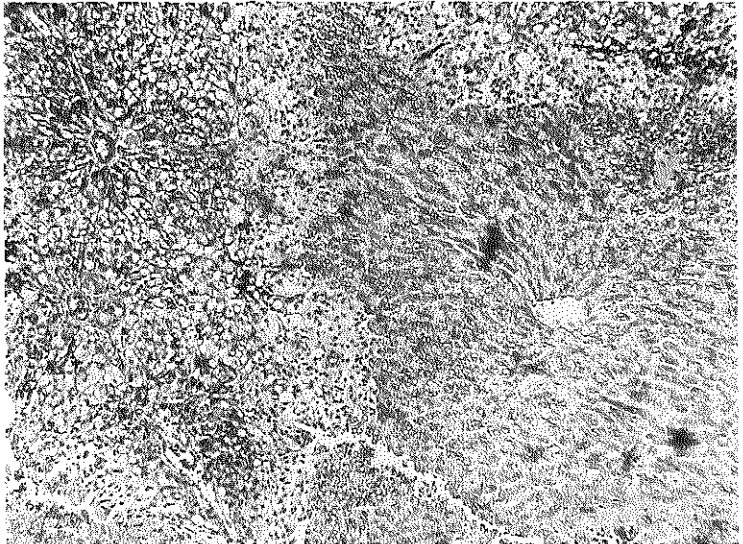


Figure 9: Frozen section of liver of guinea pig treated with ALS, showing the presence of rabbit gamma globulin in individual liver cells by direct immunofluorescence test. Serial sections show these same cells to be those undergoing basophilic degeneration. (x208)

Figure 10: Massive liver necrosis of the coagulative type, localizing in Rappaport's zone 2 and 3 in the hepatic acinus (note central vein). The necrotic areas are surrounded by a zone of pleomorphic liver cells. The hepatocytes in the periportal areas are viable but show fatty metamorphosis. Note the absence of inflammatory cell reaction. (x26)



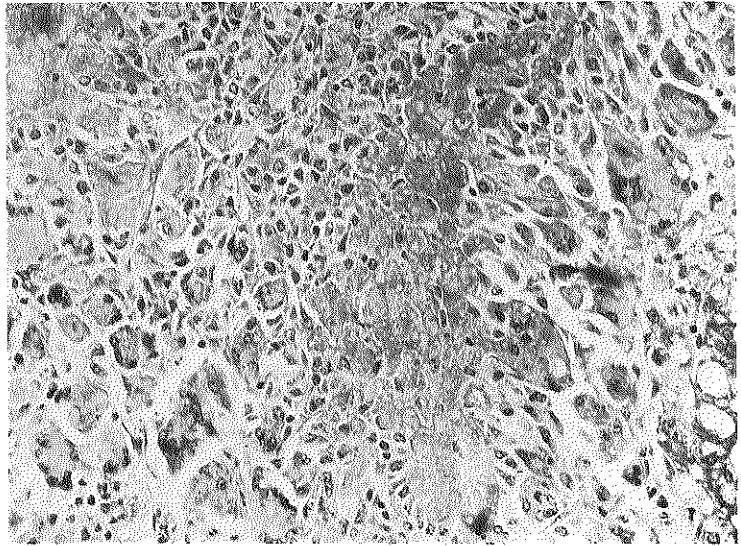
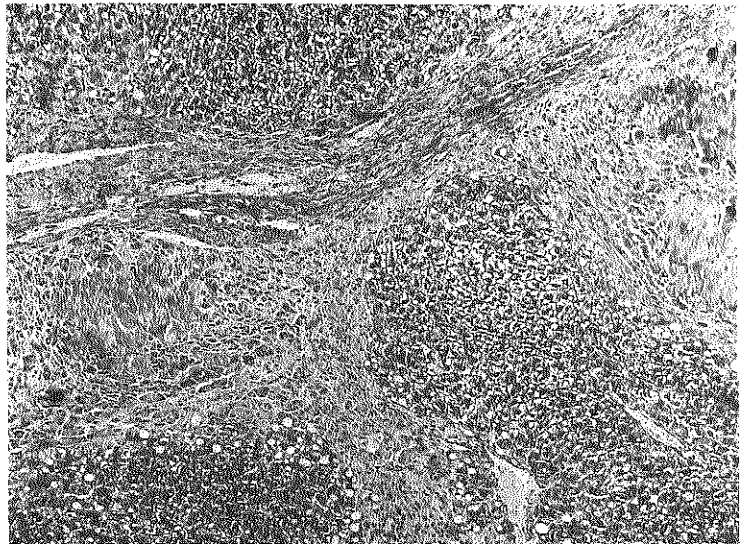


Figure 11: Liver cell pleomorphism intermixed with typical multinucleated giant cells. (x160) (H & E)

Figure 12: Broad bands of replacement fibrosis in the liver associated with hepatic necrosis induced by prolonged treatment with ALS. Sections are obtained at day 35. (x32)



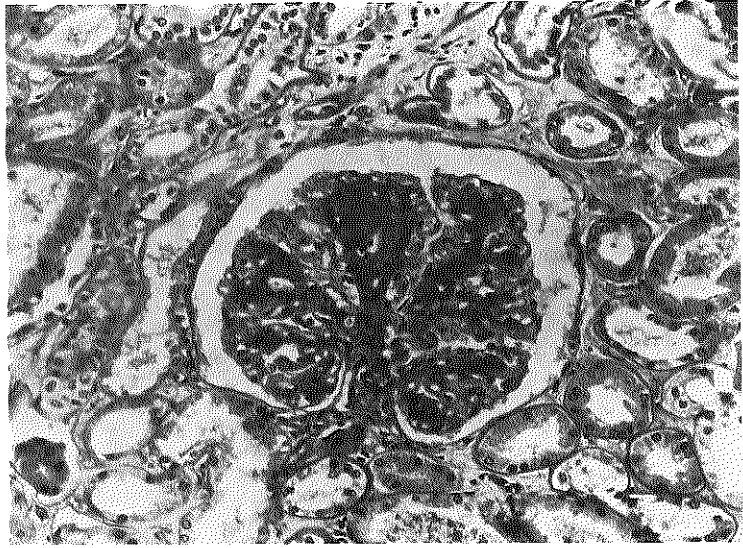
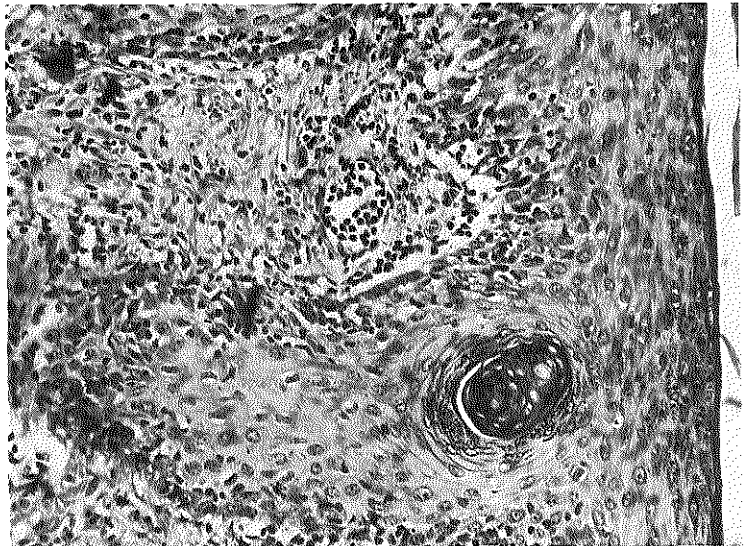


Figure 13: Nodular and branching hyaline deposits in the basement membrane of the glomerular capillary tufts. Section taken at day 30 after continuous treatment with ALS. (x520)

Figure 14: Small lymphocytes invading beyond basement membrane into basal and deeper prickle cells of graft epidermis. There is resultant intercellular edema, epithelial cell lysis and disarray.



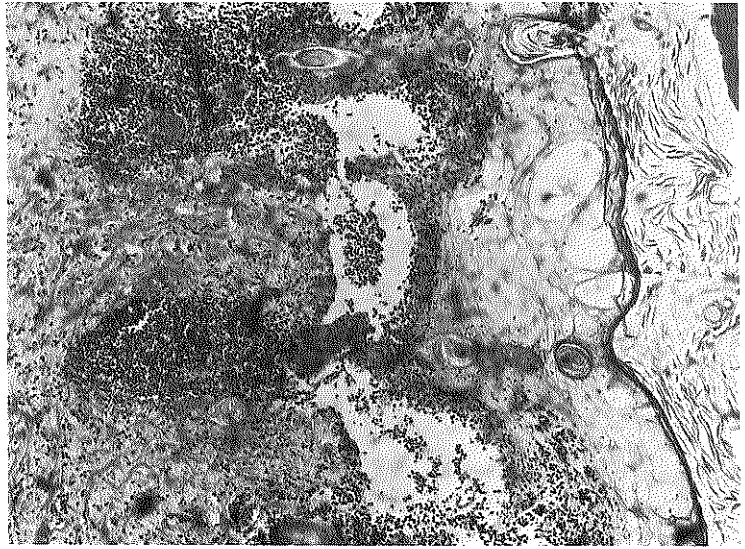
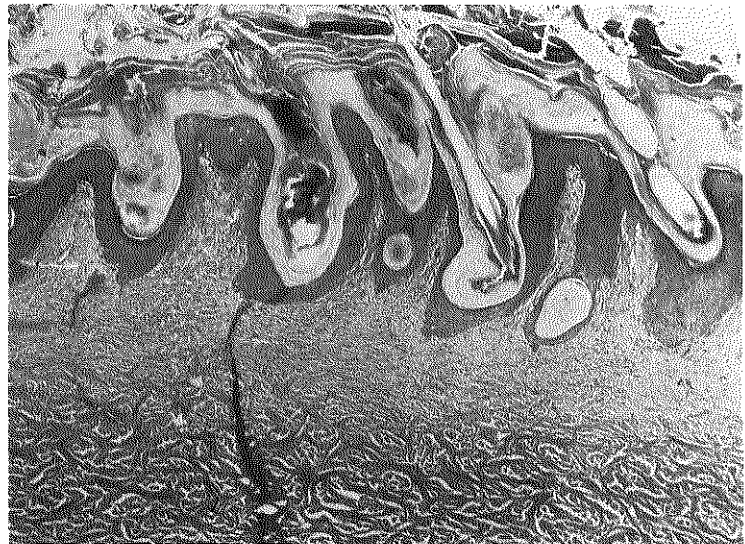


Figure 15: Advanced allograft rejection showing dense lymphocytic infiltrate in dermo-epidermal junction with consequent detachment of epidermis.

Figure 16: Hair follicle shafts shown in the process of being incorporated by graft epidermis undergoing epithelial hyperplasia. This corresponds to clinical hair loss, and is followed by a period of morphologic absence of dermal appendages.



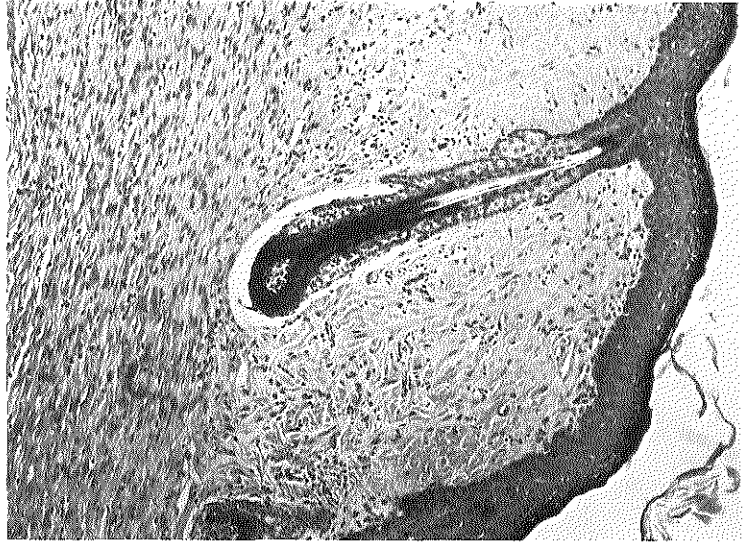
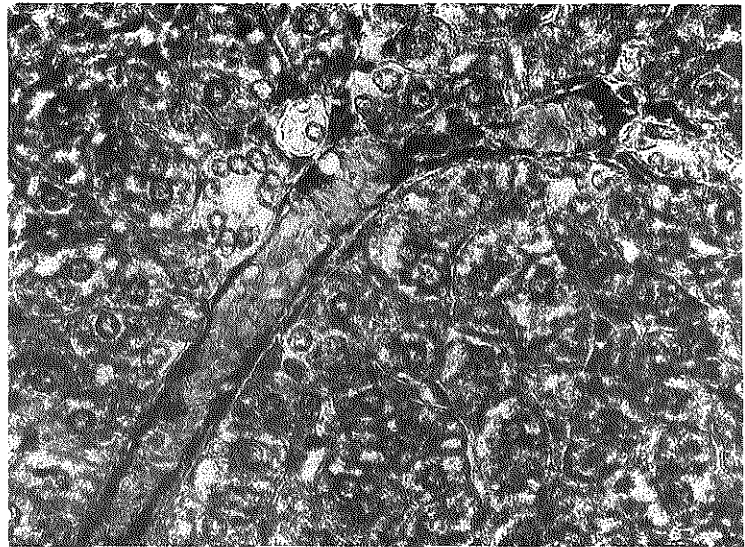


Figure 17: Regenerating hair follicle with identifiable hair bulb and regenerating sebaceous gland.

Figure 18: Erythrocytic aggregation in a portal vein with PTAH-positive fibrin deposit on the endothelial surface. (x520)



HOOFDSTUK 5

KLINISCHE MOGELIJKHEDEN

Overgenomen uit: De grenzen van het chirurgisch handelen.

Verslag van het 22ste Congres van de Nederlandse Vereniging tot bevordering der chirurgische wetenschappen. — 1970.

In de laatste decennia is enorme vooruitgang gemaakt in resuscitatie en behandeling bij uitgebreide verbrandingen. Patiënten met meer dan 65% verbrand lichaamsoppervlak (V.L.O.) kunnen maanden lang in leven worden gehouden. Uiteindelijk overlijden zij evenwel onder het beeld van cachexie ('chronic burn state'), ten gevolge van continu en irreversibel verlies aan eiwitten en kaloriën en het voortdurend blootgesteld zijn aan infectie. De overlevingskansen eindigen globaal genomen bij 65% V.L.O. (20). Een ontvullend statistisch onderzoek heeft aangetoond dat deze grens, ondanks nieuwe therapeutische verworvenheden in het laatste decennium niet meer verschoven is (4). Het is duidelijk dat deze patiënten ten gronde gaan door insufficiëntie van een vitaal orgaan: de intacte huid. De enige effectieve behandelingswijze moet dan ook gezocht worden in 'orgaan'-transplantatie.

Het is slechts verwonderlijk dat in dit tijdperk waar geen orgaan meer gevrijwaard schijnt te zijn voor overplanting een — in alle betekenissen des woords — zo voor de hand liggend weefsel als de huid, vooralsnog deze dans is ontsprongen. Het is over de klinische mogelijkheden van deze behandelingswijze dat ik u in korte trekken een overzicht wil geven.

Ten einde dergelijke huiddefecten te bedekken staan verschillende mogelijkheden ten dienst:

A. *'Biological dressing'*

Hieronder valt niet alleen het gebruik van viltachtige kunststoffen 'polypeptide velour' (27) en gelyophiliseerde kadaverhuid (12,24), doch ook de applicatie van hetero- (soort vreemde) transplantaten als varkenshuid e.d. (26). Ook de toepassing van levende (kadaver) allo-transplantaten, die regelmatig vervangen worden valt in beginsel onder deze mogelijkheden van wondbedekking. (7, 31). Het nadeel van deze behandelingswijzen is evenwel dat zij slechts een tijdelijke oplossing betekenen en derhalve geen afdoend antwoord kunnen geven op het vraagstuk van de zeer uitgebreide verbrandingen.

B. *Auto-transplantaat.*

De beste oplossing is ongetwijfeld auto-transplantatie. Bij massale verbrandingen is deze methode niet toe te passen daar onvoldoende en/of ongeschikt donor areaal voor handen is. De toepassing van verspreidings-technieken ('mesh-grafts' en 'micro-grafts') komt deels aan dit bezwaar tegemoet. Het bleek mogelijk tot 40% huidverlies op deze wijze met succes aan te vullen (15). Nadelen zijn de inferieure kwaliteit van het littekenepitheel (28), maar belangrijker nog het tijdsverloop (\pm 3 weken) totdat volledige epithelialisatie heeft plaatsgevonden. In principe berust deze werkwijze op wondgenezing per secundam intentionem, met verhoogd infectie-gevaar, en verhoogde mortaliteit, terwijl de kwaliteit van de resulterende huid omgekeerd evenredig is met de mate van spreiding van het transplantaat (25).

C. *Allo-transplantaat*

De derde mogelijkheid is huid allo-transplantatie, waarvoor, in analogie met de kliniek van de niertransplantatie, gebruik kan worden gemaakt van kadaverdonoren of bloedverwante donoren. In beide gevallen zullen, wil men een langdurige (of blijvende?) functie van het transplantaat bewerkstelligen, de mogelijkheden van weefseltypering en immunosuppressie moeten worden uitgebuit. Alvorens op de praktische toepassingsmogelijkheden van deze

therapie in te gaan zijn nog enkele waarnemingen van belang. In het dierexperiment werd aangetoond dat overlevingsduur van grote huid allo-transplantaten 2 à 3 maal langer was dan van kleinere transplantaten (32, 11, 30), hetgeen wordt geweten aan een 'antigenic overloading' van het immuunsysteem van de gastheer. Daarenboven is gebleken dat het immuunapparaat van ernstige verbrande individuen gedeeltelijk verlamd is, waardoor eveneens een verlate en vertraagde afstoting van allo-transplantaten plaatsvindt (1, 2, 21). (Hiertegenover staat dat de antigeniciteit van de huid groter wordt geacht dan van andere weefsels. M.a.w. kleine huidtransplantaten zouden eerder worden afgestoten dan orgaan-transplantaten. Mogelijk speelt ook een verschil in primaire vascularisatie hierbij een rol).

Samenvattend kan men stellen dat huid allo-transplantatie enkele bijzondere voordelen heeft boven ander orgaan transplantaties: Er bestaan geen overwegende bezwaren tegen het gebruik van levende (bloedverwante) donoren; technisch biedt het weinig problemen; het te transplanteren weefsel kan voor onbepaalde tijd gepreserveerd worden (10); het getransplanteerde weefsel kan — eventueel microscopisch, (29) — in situ gecontroleerd worden op dreigende rejectie en tenslotte: de immunologische afweermechanismen van de receptor zijn door de aard van zijn trauma reeds onderdrukt.

I. *Transplantatie van kadaverhuid:*

Het voordeel van gebruik van kadaverhuid ligt voor de hand, hoewel minder uitgesproken dan bij andere orgaantransplantaties. Immers bij levende huiddonoren zal het donor-areaal zich spontaan herstellen. Het belangrijkste nadeel is evenwel dat, ten einde een kans op goede histocompatibiliteit te verkrijgen, men de beschikking moet hebben over een zeer ruime selectie-mogelijkheid; m.a.w. over een ruim voorziene huidbank, waarin kadaverhuid van zeer veel verschillende weefseltypen onbepaald kan worden bewaard. Dit is evenwel technisch gezien geen onoverkomelijk bezwaar. (10, 6). De kans op identiteit voor de voornaamste (H.L.-A) transplantatie antigenen blijft evenwel zeer gering. Zo kon in 500 niet verwante individuen éénmaal genetische identiteit worden vastgesteld (22). Gebruikmakend van getypeerde kadaverhuid bij patiënten met brandwonden, kon worden aangetoond dat er een duidelijke correlatie bestaat tussen de levensduur van het transplantaat en de mate van H.L.-A identiteit tussen donor en gastheer (9,5). Bij patiënten met meer dan 45% V.L.O. bleven transplantaten die ten hoogste voor één aantoonbaar transplantatie antigeen van de gastheer verschilden, gemiddeld langer dan 60 dagen intact (5). Hierdoor wordt veel tijd gewonnen om veelvuldige auto-transplantaten van hetzelfde donor-areaal te oogsten. Daar gebruik werd gemaakt van alternerende strips auto- en allo-transplantaat bleek het bij minder uitgebreide verbrandingen niet steeds nodig het allo-transplantaat chirurgisch te vervangen, daar dit geleidelijk geschiedde vanuit de repen eigen huid door 'creeping substitution' (16, 14).

II. *Transplantatie van huid van levende (bloedverwante) donoren.*

In 1957 vermeldde Kay het opzienbarende resultaat van de transplantatie van huid van een broer bij een zeer ernstig verbrande patiënt. Het transplantaat bleef langer dan 8 maanden intact (17). Amos e.a. (3) toonden de markante verschillen in overlevingsduur aan van kleine huidtransplantaten tussen gezinsleden, identiek voor beide, één of geen van beide H.L.-A allelen. Tenslotte is ook uit de kliniek der nier-transplantatie bekend dat organen afkomstig van getypeerde bloedverwante donoren een betere overlevingskans hebben dan eveneens getypeerde kadaver-nieren (13).

Indien men bij deze zwakke histocompatibiliteitsverschillen tevens immuunsuppressiva toedient, ligt het in de verwachting dat zeer langdurige transplantaat-overleving gerealiseerd kan worden. In het Shriners Institute for Burned Children in Boston is een behandelingsprogramma ontwikkeld dat zeer binnenkort in praktijk zal worden gebracht (8).

Voorafgaand experimenteel onderzoek heeft uitgewezen dat het gebruik van antilym-

phocyten globuline (A.L.G.) als initieel immuun-suppressivum de voorkeur verdient boven andere immuno-suppressiva of combinaties van immuno-suppressiva, daar de beïnvloeding van antibacteriële afweermechanismen en daarmee de kans op septische complicaties het geringst is (18, 19). Het bleek mogelijk in cavia's de afstoting van 'split-thickness' allo-transplantaten met behulp van langdurige toediening van A.L.G. voor lange tijd te voorkomen, en lethaal verbrande (50% V.L.O.) dieren konden op deze wijze in leven worden gehouden. Is eenmaal de integriteit van de huid hersteld, dan kunnen ook andere immuno-suppressiva zonder bezwaar worden toegediend. Het is uiteraard nog niet bekend of het op deze wijze mogelijk is, een vorm van tolerantie te bewerkstelligen die uiteindelijke afstoting van het transplantaat voorkomt. Het ligt evenwel in de bedoeling deze afstoting niet af te wachten, doch etappe-gewijs de allo-transplantaten door autologe huid te vervangen.

Aan de volgende voorwaarden moet worden voldaan wil deze vorm van behandeling een kans van slagen hebben:

1. *Patiënt*: Een kind* met uitgebreide 3e graads verbrandingen met een voorspelbare lethaliteit van meer dan 50%.
2. *Donor*: Wettelijk meerderjarige gezinsleden die een genetische identiteit met de receptor vertonen voor één of beide H.L.-A haplotypen. (Benevens uiteraard bloedgroep identiteit).
3. Mogelijkheid tot behandeling in bacterie-vrije omgeving ('Laminar flow units').
4. De beschikking over voldoende hoeveelheid effectief A.L.G.

Het behandelingsschema, zoals dat in Boston is opgesteld ziet er dan in grote lijnen als volgt uit: Eerste dag: resuscitatie, verpleging in 'Laminar flow unit', locale behandeling met 0,5% zilvernitraat.

Weefseltypering van receptor en potentiële donoren.

Tweede dag: beginnen met immunosuppressie door middel van intraveneus toegediend A.L.G. (Deze dosering natuurlijk afhankelijk van de immuno-suppressieve hoedanigheden van het globuline). In een dosering van 7,3 mg per kg. lichaamsgewicht/dag (23).

Derde dag: excisie en transplantatie van 20-30% van het V.L.O., bij voorkeur van die gebieden, die zich goed lenen voor huidtransplantaties. Vervolgens wordt om de 3 à 4 dagen deze procedure herhaald, — waarbij de minst toegankelijke gebieden het laatst worden getransplanteerd — totdat het gehele verbrande oppervlak door gezond huidtransplantaat is bedekt.

Hierbij dient het volgende te worden opgemerkt:

1. Excisie dient te geschieden tot op gezond weefsel dat een goede bodem voor het transplantaat vormt. Dit betekent meestal tot vlak op de fascie.
2. Mesh-grafts worden niet toegepast daar een genezing per secundam verhoogd infectie-gevaar betekent.
3. Bij perineale verbrandingen bleek het ook in 'Laminar flow units' niet mogelijk steriliteit van de brandwonden langer dan 14 dagen te garanderen. Verbrandingen waarbij dit gebied mede betrokken is dienen derhalve binnen 14 dagen geheel getransplanteerd te zijn (8).
4. De chirurgische procedures geschieden bij voorkeur onder ketamine anaesthesie en zonder intubatie.

Hoewel er van bewust dat deze gegevens slechts een 'preliminary report' vormen, met nadruk op 'preliminary', brengen zij het terrein in kaart, waar binnenkort de strijd om de zeer ernstig verbrande patiënt gevoerd zal worden. Voortbouwend op nieuwe inzichten en verworvenheden betreffende primaire brandwonden-behandeling, transplantatiebiologie en bacterie-vrije verpleging, lijken de omstandigheden voorspoedig om de slag te wagen.

* Voor een volwassene zijn uiteraard meer donoren vereist.

LITTERATUUR.

1. Alexander, J.W., Moncrief, J.A.
Alterations of the immune response following severe thermal injury.
Arch. Surg. 93 : 75, 1966.
2. ----
Immunological Phenomena in Burn Injuries
J.A.M.A. 199/4 : 105, 1967.
3. Amos, D.B., Seigler, H.F., Southworth, J.G., Ward, F.E. Skin graft rejection between subjects genotyped for HL-A. Transplant. Proc. 1/1:342. 1969.
4. Barnes, B.A., Constable, J.D., Burke, J.F.
Mortality and morbidity of burns at the Massachusetts General Hospital 1955 – 1969.
Proc. III Intern. Congress Research in Burns. Prague, 1970.
5. Batchelor, J.R., Hackett, M.
HL-A matching in treatment of burned patients with skin-allografts.
Lancet ii : 581, 1970.
6. Batchelor, J.R., 1970.
Persoonlijke mededeling.
7. Burke, J.F., Bondoc, C.C.
Combined burn therapy utilizing immediate skin-allografts and 0,5% silver nitrate.
Arch. Surg. 88 : 800, 1964.
8. Burke, J.F.
Persoonlijke mededeling, 1970.
9. Chamblor, K., Batchelor, J.R.
Influence of defined incompatibilities and area of burn skin-homograft survival in burned subjects. .
Lancet i : 16, 1969.
10. Cochrane, T.
The low temperature storage of skin: a preliminary report.
Brit. J. Plast. Surg. 21 : 118, 1968.
11. Converse, J.M., Siegel, W.H., Ballantyne, D.L.
Studies in antigenic overloading with massive skin-homografts in rats.
Plast. Reconstr. Surgery 31/1 : 9, 1963.
12. Dogo, G.
Clinical and experimental research on burns: treatment with homologous lyophilized skin.
in: Research in Burns. Ed. C.P. Artz.
Washington. Am. Inst. Biol. Sci. : 368, 1962.
13. Greep, J.M., Terpstra, J.L.
De resultaten van niertransplantatie in de wereld, Europa en Nederland.
in: Orgaan-transplantatie: Nederl. Bibliotheek Geneesk.
Deel 58 : 199.
Stafleu, Leiden, 1970.
14. Hackett, M.
Persoonlijke mededeling, 1970.
15. Hermans, R.P.
Primary excision of full thickness burns up to 40% of body surface, followed by micro- or meshgrafts.
Proc. III Intern. Congress Research in Burns, Prague, 1970.
16. Jackson, D.M.
The use of skin-homografts in burns.
N.T. v. G., 102 : 300, 1958.

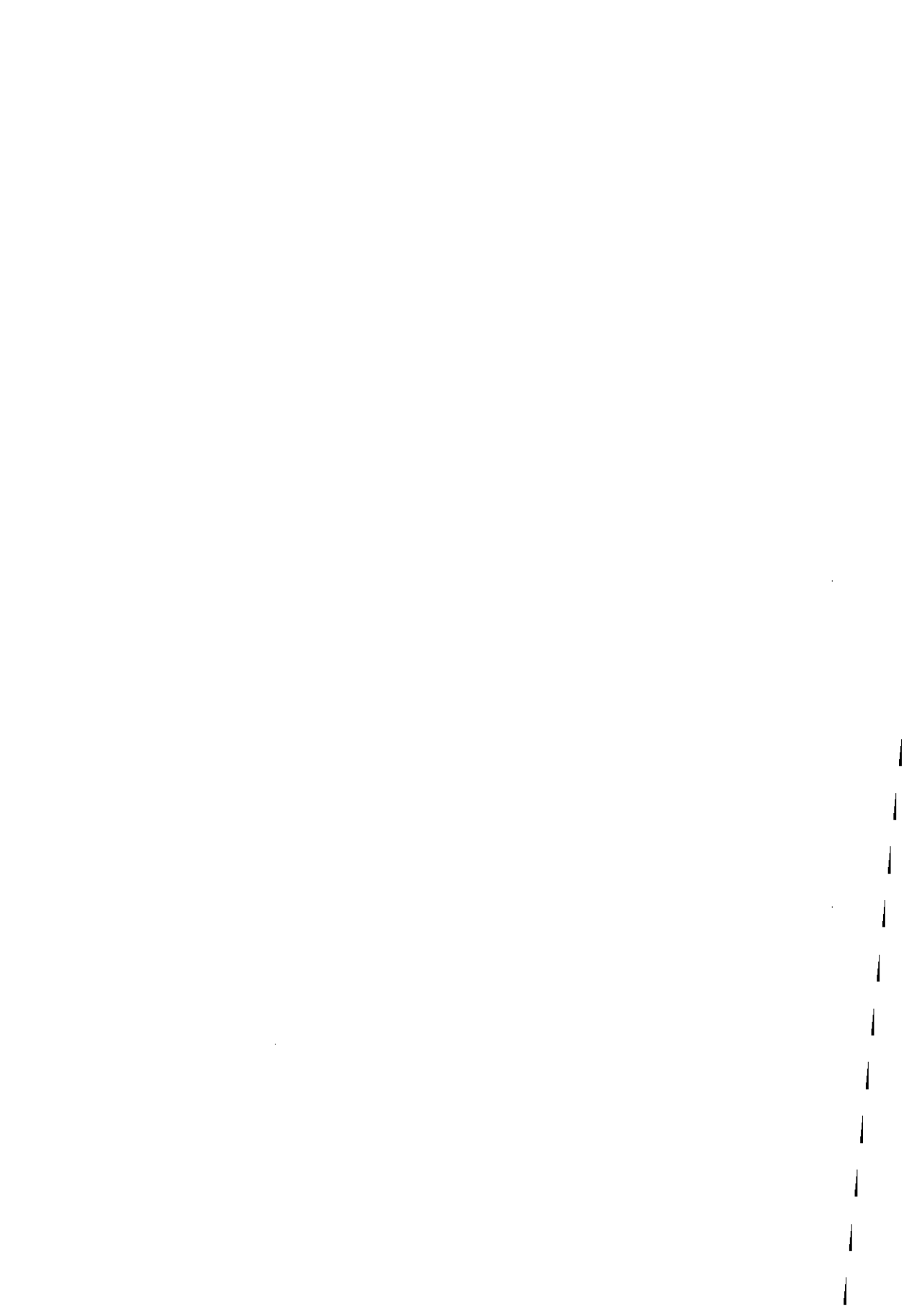
17. Kay, G.D.
Prolonged survival of a skin-homograft in a patient with very extensive burns.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 64 : 767, 1957.
18. Koumans, R.K.J., Burke, J.F.
Skin-allografts and immunosuppression in the treatment of massive thermal injury.
Surgery, 66/1 : 89, 1969.
19. Koumans, R.K.J.
Huid allotransplantatie en immuno-suppressie ter behandeling van zeer uitgebreide verbrandingen.
N.T.v.G. 114 : 937, 1970.
20. Polk, H.C., Monafu, W.W., Moyer, C.A.
Human Burn Survival. Study of efficacy of 0,5% aqueous Silver nitrate.
Arch. Surg. 98 : 262, 1969.
21. Rapaport, F.T., Converse, J.M., Horn, L., Ballantyne, D.L., Mudholland, J.H.
Altered reactivity of skin-homografts in severe thermal injury.
Ann. Surg. 159 : 390, 1964.
22. Rood, J.J. van, Eysvogel, V.P.
HL-A Identical phenotypes in unrelated individuals.
Lancet i : 698, 1970.
23. Russell, P.S.,
Persoonlijke mededeling, 1970.
24. Sell, K.W., Hyatt, G.W. Gresham, R.B.
The status of the freeze-dried skin-homograft in the severely burned patient.
in: *Research in Burns*. Ed. C.P.Artz.
Washington. Am. Inst. Biol. Sci. : 351, 1962.
25. Skoog, T.
Skin Replacement.
Proc. IIIrd Intern. Congress Research in Burns. Prague 1970.
26. Song, I.C., Bromberg, B.E., Mohn, M.P.
Heterografts as biological dressing for large skin wounds.
Surgery, 59 : 576, 1966.
27. Spira, M., Hall, W., Hardy, S.B.
Polypeptide laminate velour as an effective synthetic skin.
Proc. IIIrd intern. Congress Research in Burns. Prague 1970.
28. Tanner jr., J.C.; Vandeput, J.J., Bradley, W.H.
Two years with mesh skin grafting.
Amer. J. Surg. 111 : 543, 1966.
29. Taylor, A.C., Lehrfeld, J.W.
Determination of survival time of skin-homografts in the rat by observation of vascular changes in the graft.
J. Plastic. Reconstr. Surgery 12/6 : 423, 1953.
30. Zanella, G., Reif, A.E., Buenviaje, O.L., Asakuma, R., Deterling jr., R.A.
On prolonged survival of massive skin-allografts in mice.
Transplantation 6/8 : 885, 1968.
31. Zaroff, L.I., Mills jr., W., Duckett jr., J.W., Switzer, W.E., Moncrief, J.A.
Multiple uses of viable cutaneous homografts in the burned patient.
Surgery 59 : 368, 1966.
32. Zotikov, E.A., Budik, V.M.
Some peculiarities of the survival time of skin-homografts.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 87 : 166, 1960.

HOOFDSTUK 6

NABESCHOUWING EN CONCLUSIES

Il faut nous dire qu'une tentative maladroite, en partie avortée, vaut mieux que l'absence de toute tentative.

Alexis Carrel 1935.



Onder de, klinisch toegepaste, immunosuppressieve middelen neemt antilymphocyten serum een bijzondere plaats in door zijn gerichte werking op het lymphatische systeem en zijn potentieel krachtig immunosuppressief vermogen. Ongewenste en schadelijke bijwerkingen maken evenwel tot nogtoe ALS niet tot het ideale en definitieve immunosuppressief panacee, waartoe het aanvankelijk leek voorbestemd.

Medawar (1967) heeft ons inziens slechts ten dele gelijk, wanneer hij stelt, dat het verzamelen van bewijsmateriaal omtrent schadelijke bijwerkingen van ALS van ondergeschikte betekenis is, daar het streven gericht moet zijn op bereiding van een zuiverder antiserum. Het is moeilijk in te zien hoe tot een dergelijk — overigens onomstreden — doel te geraken, zonder de wetenschap van welke componenten ALS gezuiverd dient te worden en waarom.

Het onderzoek, in hoofdstuk 3 en 4 vermeld, werd voornamelijk met dit oogmerk verricht. Hierbij werd aangetoond, dat, in het gebruikte experimentele model, vnl. de levercel het doelwit is van ongewenste toxische antilichamen en dat de titer van deze antilichamen aanzienlijk toeneemt indien het ALS wordt opgewekt met behulp van een adjuvans. Deze toename van schadelijke componenten resulteerde in uitgebreide leverpathologie, welke gepaard ging met de klinische manifestatie van wasting disease. Tevens werd gesuggereerd, dat deze antilichamen, welke zich ten dele ook in de IgG fractie van het antiserum bevinden, zouden kunnen worden verwijderd middels absorptie aan leverweefsel.

Het is duidelijk, dat ALS vooralsnog slechts klinische toepassing zal mogen vinden, indien men voldoende geïnformeerd is over immunosuppressief vermogen en zuiverheid. Daarnaast moet de overtuiging bestaan, dat, onder de gegeven omstandigheden, de voordelen van het gebruik van ALS ruimschoots zullen opwegen tegen de mogelijke nadelen. Dit menen wij in de experimenten, beschreven in hoofdstuk 2, te hebben aangetoond. Bovendien rechtvaardigen de omstandigheden, die worden aangetroffen bij een uitgebreide 3e graads verbranding, gepaard met een op statistische gegevens geschatte overlevingskans van minder dan 50%, naar onze mening een ingrijpende behandeling, zoals die wordt voorgesteld in hoofdstuk 5.

Excisie van het verbrande weefsel en sluiten van het defect middels allotransplantatie maakt het ons inziens mogelijk de mortaliteit terug te dringen. Deze overtuiging is gebaseerd op gronden welke in hoofdstuk 1 (II en III) werden uiteengezet. Teneinde een transplantatoeverleving te bewerkstelligen, welke voldoende respijt geeft om de vitale donorhuid in etappes te vervangen met autologe huid van een resterend intact — of partieel verbrand doch inmiddels genezen — gebied, zal immunosuppressieve therapie in de meeste gevallen een dringende noodzaak zijn. Dit geldt temeer, daar de gegevens uit het weefseltyperingsonderzoek vooralsnog geen nauwkeurige voorspelling over de duur van transplantatoeverleving toelaten, terwijl het risico van een tussentijdse afstoting van het transplantaat zo enigszins mogelijk voorkomen dient te worden. Op theoretische (hoofdstuk I, V) en experimentele gronden (hoofdstuk 2), zijn wij van mening dat ALS als aanvankelijk immunosuppressivum bij de ernstig verbrande patient te verkiezen is boven andere immunosuppressieve agentia.

Nochthans werd in alle, in dit onderzoek vermelde, experimenten tevens vastgesteld, dat immunosuppressie met ALS op zich zelf geen onschadelijke procedure is. De ernst van de

klinische situatie en de mogelijkheden, die de hier ontworpen vorm van behandeling biedt (hoofdstuk 5), maken in onze ogen het risico van eventuele bijwerkingen volledig aanvaardbaar. Het is dan ook onjuist het door ons voorgestelde gebruik van ALS onder deze omstandigheden te veroordelen (Munster 1970), door aan te voeren, dat dit bij de ernstig verbrande patient – uiteraard – een verdere remming van de immunologische afweer tegen bacteriële infectie ten gevolge heeft. Een dergelijke kritiek gaat geheel voorbij aan het feit, dat deze behandelingswijze een vroeg en duurzaam herstel van het huiddefect beoogt en daardoor juist resulteert in een vermindering van het infectiegevaar.

Naar aanleiding van het in hoofdstuk 2 vermelde onderzoek werd door Rapaport en Ball (1971) het effect nagegaan van toediening van ALS aan ratten met een (meestal) niet lethale verbranding van 30% van het lichaams oppervlak.

Brandwondexcisie en huidtransplantatie werd niet verricht. Zoals reeds te verwachten zou zijn, bleek de mortaliteit onder de dieren, die ALS kregen toegediend, aanzienlijk hoger dan in de controlegroep. De eigenlijke oorzaak van deze verhoogde sterfte werd door deze onderzoekers niet nagegaan, doch zij achten de tijd niet rijp voor toepassing van immunosuppressie met ALS bij de verbrande patient. Ook deze mening is ons inziens niet gerechtvaardigd. Het ware meer in overeenstemming met de klinische situatie, indien bij de dieren, die ALS ontvingen, tevens vroege excisie en allotransplantatie van de brandwond was verricht.

In hoofdstuk 2 werd reeds aangetoond dat op deze wijze, bij dieren met een lethale verbranding, een aanzienlijke verbetering in overlevingsduur en daling in mortaliteit kon worden bereikt.

Inmiddels zijn de eerste hoopgevende klinische resultaten van allotransplantatie van huid met immunosuppressie bij zeer ernstige verbrandingen bekend geworden. Diethelm behandelde op deze wijze twee patientjes met een verbrandingstrauma van 75% van het lichaams oppervlak (Diethelm e.a. 1972). Evenwel beantwoordde de gevolgde procedure in zoverre niet aan de door ons in hoofdstuk 5 opgestelde gedragslijn, doordat excisie en transplantatie niet primair plaats vond, terwijl spontane afstoting van het allotransplantaat werd afgewacht alvorens tot definitieve autologe wondbedekking over te gaan. Het gelukte hem één patientje in leven te houden. In het Shriners Burns Institute te Boston werden onlangs 3 patientjes met lethale, merendeels 3e graads, verbrandingen van meer dan 80% van het lichaamsoppervlak behandeld met primaire excisie, immunosuppressie en transplantatie van huid van een der ouders, geselecteerd op basis van het weefseltyperingsonderzoek. Het allotransplantaat werd in etappes vervangen door autologe huid. Eén van de patientjes is inmiddels uit het ziekenhuis ontslagen, de andere twee zijn bij het ter perse gaan van deze bladzijden buiten levensgevaar (Burke 1972, persoonlijke mededeling.).

Deze resultaten zullen binnenkort door ons uitvoerig worden gepubliceerd.

Wij zijn ervan overtuigd, dat de ingeslagen weg juist is en allotransplantatie van huid een adequate oplossing biedt voor het probleem van het niet met het leven verenigbare huidverlies bij zeer uitgebreide verbrandingen. Niettemin is het duidelijk, dat de wijze waarop deze behandeling wordt gerealiseerd nog verre van ideaal is.

Met name duidt het feit, dat het allotransplantaat alsnog vervangen moet worden door eigen huid op het ontoereikende van de methoden ter beïnvloeding van de immunologische reacties.

Het verdere streven en de verwachting zal dan ook erop gericht moeten zijn – zoals overal in de transplantatie biologie – de immunologische afstotingsreactie doeltreffender te beïnvloeden en te beheersen.

Litteratuur

Medawar, P.B. (1967).

Biological effects of heterologous antilymphocyte antisera.

In:

Human transplantation.

Eds. F.T. Rapaport, J. Dausset.

New York, Grune & Stratton, blz. 501.

Munster, A.M. (1970).

Alterations of the host defense mechanism in burns.

Surg. Clin. N. Amer., 50: 1217.

Rapaport, F.T., Ball, S.K. (1971).

Increased mortality of thermal injury — a possible effect of heterologous antilymphocyte serum.

Colloques Int. C.N.R.S., nr. 190: blz. 435.

SUMMARY.

Contemporary burn statistics demonstrate that burn mortality in the last decades has barely declined, notwithstanding recent advances in topical burn therapy. Death eventually supervenes as a consequence of the insufficiency of a vital organ: the intact integument.

As conventional methods of timely and effective wound closure are inadequate in very extensive burns, a study was undertaken to assess the value of skin-allografting and immunosuppression in improving mortality from otherwise lethal burn trauma. Besides taking full advantage of the evidence and information obtained from transplantation biology and clinical transplantation, the proposed treatment has to fulfill the following prerequisites:

1. It should not further seriously jeopardize the life of the burned patient.
2. The transplant should functionally compensate for the loss of integument for a sufficient amount of time to permit its replacement by autologous skin.
3. Treatment should result in improved survival.

The experiments described in chapter 2 were designed to investigate whether these requirements could be met. To accomplish prolonged graft survival across a significant histocompatibility barrier, some form of immunosuppression is indispensable. Therefore the influence on graft survival of different immunosuppressive agents and their combinations, as used in clinical transplantation, as well as the occurrence of side-effects were assessed. The animal model was the lethally burned, excised and skin-allografted guinea pig. Although antilymphocytic serum (ALS) produced good graft prolongation with a minimum of septic complications, its prolonged administration resulted in a wasting condition, the cause of which was ascribed to undesirable and toxic components in the antiserum.

The experiments described in chapter 3 were designed to identify the factors giving rise to these pathological changes and to define in what way their occurrence could be prevented.

The ALS-wasting disease appeared to be attributable to the presence of irrelevant and primarily hepatotoxic antibodies in ALS, their titer being enhanced by the use of adjuvant in raising the antiserum.

Fractionation of ALS prevented wasting disease but did not completely abolish the hepatotoxic effects. Further absorption of ALS against liver tissue therefore seems advisable. In chapter 4 the histopathological changes, brought about by different antilymphocytic sera, are reviewed and their relation to the clinical occurrence of wasting disease is established.

Chapter 5 summarizes different clinical methods of wound closure in very extensive burns. A treatment protocol for clinical skin-allografting and immunosuppression, designed at the Shriners Burns Institute in Boston, is presented.

Chapter 6 briefly deals with some criticism of this new therapeutic concept in the treatment of severe burns and contains a short report of its first favourable clinical results.

LIJST VAN GEBRUIKTE TERMEN EN AFKORTINGEN.

Terminologie van weefseltransplantatie:

Oude term.	Nieuwe term.	Nieuw adjectief.	Definitie.
Autotransplantaat.	Autotransplantaat.	Autoloog.	Transplantaat waarbij donor en receptor dezelfde zijn.
Homotransplantaat.	Allotransplantaat.	Allogeen.	Transplantaat tussen genetisch verschillende leden van dezelfde species.
Heterotransplantaat.	Xenotransplantaat.	Xenogeen.	Transplantaat tussen leden van verschillende species.

ALS	Antilymphocyten serum.
CFA	Compleet adjuvans van Freund (zie blz. 28).
IgG	Immunoglobuline G.
NRS	Normaal konijnenserum (zonder complement).
RAFS	Serum van met CFA geïmmuniseerde konijnen.
RAGPLS (hoofdstuk 2) *	Konijn anti-cavia lymphocyten serum, bereid met CFA.
RAGPLS-CFA (hoofdstuk 2) *	RAGPLS bereid zonder CFA.
RALS (hoofdstuk 3) *	= RAGPLS-CFA (hoofdstuk 2).
RALS-CFA (hoofdstuk 3) *	= RAGPLS (hoofdstuk 2).
RALIgG	Immunoglobuline G fractie uit RALS
RALIgG-CFA	Immunoglobuline G fractie uit RALS-CFA

* In hoofdstuk 2 werden andere afkortingen gebezigd voor de verschillende antilymphocytair sera, dan in hoofdstuk 3. De gebruikte afkortingen zijn hier nogmaals omschreven, ten einde verwarring te voorkomen.

Curriculum vitae auctoris.

R. K. J. Koumans werd op 2 juni 1932 te Freiburg (i.B.) geboren. Na zijn gymnasium B opleiding aan de stedelijke gymnasia van Utrecht en Zutphen te hebben voltooid ving hij de studie der geneeskunde te Leiden aan, welke in 1959 met het arts-examen werd afgesloten.

Na zijn medische vorming verder te hebben voortgezet bij de Koninklijke Marine, begon hij zijn opleiding in de algemene chirurgie in 1961 op de afdeling heekunde van het Zuiderziekenhuis te Rotterdam, onder Prof. Dr. P. J. Kooreman. Na inschrijving in het specialistenregister was hij van januari 1968 tot mei 1969 als clinical and research fellow in surgery verbonden aan het Massachusetts General Hospital en het Shriners Burns Institute, Harvard Medical School, Boston.

Vervolgens trad hij wederom in dienst van de afdeling heekunde van het Zuiderziekenhuis, hoofd Dr. G. A. A. Olthuis, als chef de clinique en conservator.



and one gets



either a reaction



or no reaction

but anyhow



a publication

