
Aus der
Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

Direktor: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

**Einfluss unterschiedlicher Ischämiezeiten und der Immunadsorption auf
die Herzfunktion und die Entwicklung einer hyperakuten
Abstoßungsreaktion bei Verwendung von nicht-transgenen und hDAF-
transgenen Schweineherzen im xenogenen Working-Heart-Modell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sven Kriegeskorte

aus München

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. N. Mendler
Prof. Dr. med. M. Fischereder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. P. Brenner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2007

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	DIE GESCHICHTE DER XENOTRANSPLANTATION	7
1.2	AUSWAHL DER SPENDER- SPEZIES	8
1.3	GRUNDLAGEN DER XENOGENEN ABSTOßUNGSREAKTION	10
1.3.1	DIE PRÄFORMIERTEN NATÜRLICHEN ANTIKÖRPER UND IHR ZIELANTIGEN	10
1.3.2	DIE ROLLE DES KOMPLEMENTES BEI DER HAR	11
1.3.3	DIE ROLLE DER ENDOTHELZELLE IN DER HAR	16
1.3.4	DAS HISTOPATHOLOGISCHE BILD DER HAR	17
1.4	MÖGLICHKEITEN DER ÜBERWINDUNG DER HAR	18
1.4.1	ELIMINATION DER PRÄFORMIERTEN NATÜRLICHEN ANTIKÖRPER (PNAK)	19
1.4.2	MODIFIKATION DES XENOGENEN A-1-3- GAL EPITOPS	19
1.4.3	INHIBITION DES KOMPLEMENTSYSTEMS	20
1.5	AKUT VASKULÄRE ABSTOßUNG	22
1.6	ZELLULÄRE TRANSPLANTATABSTOßUNG	23
1.7	FRAGESTELLUNG	23
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	27
2.1	VERSUCHSTIERE	27
2.2	EINTEILUNG DER VERSUCHSGRUPPEN	28
2.3	OPERATIVES VORGEHEN	29
2.3.1	ANÄSTHESIE	29
2.3.2	HERZEXPLANTATION	29
2.3.3	PRÄPARATION DES HERZENS	30
2.4	WORKING-HEART-MODELL	31
2.5	IMMUNADSORPTION	35
2.6	SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	36
2.7	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	36
2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	37
3	<u>ERGEBNISSE</u>	38
3.1	HERZGEWICHT	38

3.2 HÄMODYNAMIK	39
3.2.1 LAUFZEIT	39
3.2.2 HERZZEITVOLUMEN GESAMT (HZV GES.)	40
3.2.3 STROKE-WORK-INDEX [SWI]	41
3.2.4 SPEZIFISCHER KORONARFLUß (SCF)	43
3.2.5 SPEZIFISCHER KORONARWIDERSTAND (KW)	44
3.3 SEROLOGIE	44
3.3.1 PARAMETER DER MYOZYTÄREN SCHÄDIGUNG	44
3.3.2 IMMUNOLOGISCHE PARAMETER	48
3.4 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	56
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>61</u>
4.1 DIE EX-VIVO PERFUSION IM WORKING-HEART-MODELL	61
4.2 DISKUSSION DER HÄMODYNAMISCHEN ERGEBNISSE	62
4.3 DISKUSSION DER SEROLOGISCHEN ERGEBNISSE	64
4.4 DISKUSSION DER HISTOLOGISCHEN ERGEBNISSE	66
4.5 GEFAHR XENOGENER INFESTIONEN (XENOZOONOSE)	67
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>70</u>
<u>6 AUSBLICK</u>	<u>72</u>
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>74</u>
<u>8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>85</u>
<u>9 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN</u>	<u>87</u>
<u>10 LEBENS LAUF</u>	<u>89</u>

1 Einleitung

Seit Professor Barnard 1967 am Groote- Schuur Krankenhaus in Kapstadt, Südafrika, die erste erfolgreiche allogene Herztransplantation durchführte, wurden weltweit insgesamt über 55000 Herzen transplantiert und Herztransplantationen sind inzwischen an über 200 Krankenhäusern möglich (Deng 2002). Sie stellen für viele Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz die letzte Möglichkeit dar.

Die fortschreitende Verbesserung der Operationstechnik, Hand in Hand mit der Aufdeckung der immunologischen Grundlagen der Transplantatabstoßungsreaktion und der Entwicklung verbesserter immunsuppressiver Medikamente, haben die allogene Herztransplantation zu einem Standardverfahren gemacht.

Die 1-Jahrüberlebensrate beträgt laut der International Society for Heart and Lung Transplantation inzwischen 86%, die 5-Jahresüberlebensrate liegt immer noch bei ca. 70% (Hertz 2002).

Aufgrund eines Mangels an menschlichen Spenderorganen ist es jedoch nicht möglich, jeden Patienten, der von einer Herztransplantation profitieren würde, auch zu operieren. Dieser Mangel ist vor allem durch den Aufschwung der Allotransplantation nach Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A im Jahr 1980, deutlich geworden (Schmoeckel 2000). Anfang der Neunzigerjahre konnten nur 15% der Patienten auf der Warteliste in den Vereinigten Staaten innerhalb eines Jahres operiert werden (Hoopes 1996). Obwohl die Dramatik der Situation inzwischen auch aufgrund verbesserter pharmakologischer Therapiemöglichkeiten der terminalen Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern, Beta-Blockern und Aldosteron-Antagonisten, sowie durch Fortschritte in der Anwendung von Kunstherzen und ventrikulärer Unterstützungssysteme etwas abgenommen hat (Deng 2002), besteht weiterhin ein eklatanter Mangel an Spenderorganen.

So konnten zwar in England in den Jahren 1995-1999 innerhalb von sechs Monaten 52,5% der gelisteten Patienten transplantiert werden, 11% der gelisteten Patienten starben jedoch während dieses Wartezeitraumes. Nach drei Jahren lag die Sterblichkeit im Durchschnitt bei ca. 17%, für Patienten, die auf eine Herz-Lungentransplantation warteten, betrug sie 36,5%

Einleitung

(Anyanwu 2002). Für den Patiententeil im schlechtesten kardialen Status ist die Mortalität auf der Warteliste noch deutlich höher (Deng 2002).

Bei insgesamt leichter Abnahme der Herztransplantationen und der Patienten auf der Warteliste wurden im Jahr 2001 in Deutschland laut Eurotransplant 394 Herzen verpflanzt, wobei 347 Personen auf der Warteliste standen (1998: 528 Operationen und 581 Patienten auf der Warteliste). Die Anzahl der gespendeten Organe ist in Deutschland, trotz der Neuauflage des Transplantationsgesetzes, von 502 im Jahr 1992 auf 374 Herzen im Jahr 2001 gesunken (DSO 2001). Dies bedeutet eine Verringerung der transplantationsfähigen Herzen um mehr als ein Viertel in weniger als zehn Jahren bei mindestens gleichbleibendem Bedarf.

In den Vereinigten Staaten nimmt die Zahl der Patienten auf den Wartelisten für eine Organtransplantation weiter zu. 2002 warteten ca. 80.000 Patienten auf eine Transplantation. Demgegenüber stehen ca. 24.000 durchgeführte Organspenden. Über 6300 Menschen starben 2002, während sie auf ihre Spenderorgan warteten. Allein von den ca. 7000 Patienten die für eine Herztransplantation gelistet waren, verstarben 2002 558, das entspricht ca. 8 %, bei ca. 2200 pro Jahr durchgeführten Transplantationen.

Manche Autoren gehen sogar noch von einem sehr viel höheren Bedarf an Spenderherzen in den Vereinigten Staaten aus. Evans rechnet mit bis zu 40.000 Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz pro Jahr, die von einer Transplantation profitieren könnten, was bedeuten würde, dass zur Zeit lediglich ca. 5% aller in Frage kommenden Patienten herztransplantiert würden (Evans 1998).

Der Druck ist so groß, dass jedes Jahr ca. 6000 Nierenlebendspenden und 300 Leberteilspenden, die eine erhebliche Belastung und Gefährdung für den Spender mit sich bringen, durchgeführt werden (Organ Procurement and Transplantation Network Annual Report 2003).

Es besteht zur Zeit keine Aussicht, dass das Spenderaufkommen je den bestehenden Bedarf an Spenderorganen decken wird. Somit stellt sich die Frage nach Alternativen zur Allotransplantation.

Die Xenotransplantation, als quasi unbegrenzte Organquelle, rückte hierbei schon früh in das Blickfeld der Forschung.

1.1 Die Geschichte der Xenotransplantation

Als Xenotransplantation bezeichnet man die Transplantation von Organen oder Geweben zwischen Individuen verschiedener Spezies. Da Tiere seit jeher vom Menschen auch als Lieferanten und Quelle medizinischer Produkte und Mittel, wie zum Beispiel dem Insulin, genutzt worden sind, ist der Schritt hin zur Verwendung kompletter tierischer Organe für den Menschen nicht weit.

Bevor die ersten Versuche unternommen werden konnten, mussten jedoch erst die technischen Mittel zur Durchführung einer solchen Operation entwickelt werden. Diese standen mit der Entwicklung von funktionierenden Gefäßanastomosen durch Alexis Carell 1902 zur Verfügung. Erste Transplantationsversuche verschiedener Organe, sowie allogene auch xenogene zwischen 1902 und 1908 durch Carrel und Guthrie, verliefen jedoch eher frustrierend. Selbst Allogotransplantate überlebten maximal wenige Wochen und letztendlich endeten alle Versuche im Transplantatversagen.

Erst mit der Entdeckung der immunologischen Grundlagen der Organabstoßung durch Medawar, Gibson und Billingham Mitte des Jahrhunderts und der nachfolgenden Entwicklung der ersten Immunsuppressiva wie 6-Mercaptopurin 1959, Azathioprin 1961 und deren Kombination mit Glukokortikoiden wurden die allgemeinen Grundlagen zur erfolgreichen allogenen Organtransplantation gelegt. In deren Folge entwickelte sich die allogene Nierentransplantation rasch zu einem erfolgreichen Therapieverfahren bei terminaler Niereninsuffizienz. Mit zunehmendem Einsatz dieser neuen Technik stieß man jedoch bald auf das Problem, dass nicht genügend transplantationsfähige Organe zur Verfügung standen. Auf der Suche nach Alternativen transplantierte Reemtsma et al. 1964 eine Reihe von Schimpansenieren in Patienten und erreichte ein maximales Transplantatüberleben von neun Monaten (Reemtsma 1964). Die erste klinische kardiale Xenotransplantation erfolgte ebenfalls 1964 durch Hardy, der damit der ersten allogenen Herztransplantation durch Barnard 1967 um 3 Jahre zuvorkam. Einem 68 Jahre alten Mann im kardiogenen Schock wurde, da kein geeignetes humanes Spenderorgan verfügbar war, ein, wohl für seine Größe zu kleines, Schimpansenherz eingepflanzt. Der Patient überlebte nur eine Stunde. In den folgenden Jahren folgten insgesamt neun weitere Berichte über Herz-Xenotransplantationen, die jedoch alle insgesamt enttäuschend verliefen. Tabelle 1 zeigt die publizierten Berichte in der Übersicht. Die längste Überlebensdauer mit 20 Tagen erreichten 1984 Bailey et al., die

Einleitung - Die Geschichte der Xenotransplantation

einem Neugeborenen mit hypoplastischem Linksherzsyndrom, das später als „Baby-Fae“ bekannt wurde, ein ABO-inkompatibles Pavianherz einpflanzten. In der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung fanden sich geringfügige Ablagerungen von Immunglobulinen perivaskulär im ventrikulären und atrialen Myokard. Die Befunde entsprachen am ehesten einer progredienten humoralen Abstoßungsreaktion, die auf die ABO-Inkompatibilität zurückgeführt wurde (Bailey 1985).

Jahr	Chirurg	Spender	Technik	IS	Überlebensdauer	Vermutete Ursache des Transplantatversagens
1964	Hardy(USA)	Schimpanse	Orthotop	Nein	2h	Herz zu klein →Kreislaufversagen
1968	Ross(UK)	Schwein	Heterotop	Nein	4 min	HAR
1968	Cooley (USA)	Schaf	Orthotop	Nein	10 min	HAR
1969	Marion (France)	Schimpanse	Unbekannt	Nein	4h	Pulmonarer Hochdruck, Rechtsherzversagen
1977	Barnard (SA)	Pavian	Orthotop	Nein	5 h	Herz zu klein → Kreislaufversagen
1977	Barnard (SA)	Schimpanse	Heterotop	Ja	4 d	Vaskuläre Abstoßung
1984	Bailey (USA)	Pavian	Orthotop	Ja	20 d	Vaskuläre Abstoßung
1992	Religa/ (Polen)	Schwein	Orthotop	Ja	23 h	Nicht bekannt
1996	Buruha (Indien)	Schwein	Orthotop	N.bek.	<24 h	Nicht bekannt

Erläuterungen: IS= Immunsuppression, HAR= Hyperakute Abstoßungsreaktion

Tab.1 Publierte Berichte klinischer xenogener Herztransplantationen (nach Taniguchi, Cooper 1997)

Wenn auch die bisherigen Erfahrungen mit der Xenotransplantation nur enttäuschende Ergebnisse gebracht haben, so lässt die aktuelle Entwicklung der Herzspenderzahlen doch keine andere Wahl, als nach Alternativen zur Allotransplantation zu suchen. Unter dem Eindruck neuer Erkenntnisse über die Mechanismen und molekularen Ursachen der HAR hat sich in den letzten Jahren wieder die Frage nach der klinischen Machbarkeit der kardialen Xenotransplantation gestellt. Hierbei stellt sich die Frage, welche Spezies hierzu am ehesten in Frage kommen würde.

1.2 Auswahl der Spender- Spezies

Nicht-Humane Primaten würden primär durch ihre phylogenetische Nähe und anatomische sowie physiologische Ähnlichkeit als die am besten geeigneten Organspender erscheinen.

Trotzdem sprechen jedoch eine Reihe von Gründen gegen die Verwendung von Primaten als Spendertiere.

Die nicht unter Artenschutz stehenden Primaten erreichen keine ausreichende Größe, um als Spender für die meisten Erwachsenen infrage zu kommen. Ihre Verfügbarkeit ist begrenzt und die Züchtung, bei geringen Nachkommenszahlen und relativ langen Generationszeiten, schwierig und kostspielig. Außerdem ist das Risiko der Übertragung von Infektionen (Chapmann 1995), wie die Übertragung endogener Retroviren, bei phylogenetisch eng verwandten Spezies vermutlich erhöht. Ebenso sprechen auch ethische Bedenken gegen eine derartige Verwendung der dem Mensch am nächsten und ähnlichsten Verwandten.

So scheint zur Zeit das Hausschwein als Organspender für den Menschen am geeignetsten zu sein (Cooper 1991). Schweine sind verhältnismäßig kostengünstig in hohen Zahlen bei geringem Platzbedarf zu züchten und ihr Herz weist viele anatomische und physiologische Ähnlichkeiten mit dem des Menschen auf. Da sie bereits seit langer Zeit vom Menschen als Nutztiere gehalten und massenweise geschlachtet werden und zudem ihre Herzklappen schon als Transplantate verwendet werden, bestehen gegen ihre Verwendung nur geringe ethische Vorbehalte. Sie gebären nach kurzer Tragezeit im Mittel 10 Ferkel und wachsen schnell, auf eine für den Menschen adäquate Größe, heran. Hierzu könnte besonders die Rasse der Miniaturschweine geeignet sein, die im Regelfall ein Gewicht von 135 kg nicht überschreitet. Durch die Möglichkeit zur Aufzucht unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen lassen sich die meisten bekannten Schweinezoonosen ausschließen. Die Übertragung von endogenen porcinen Retroviren (PERVs) kann zwar noch nicht völlig ausgeschlossen werden, aber die bis jetzt erfolgten Versuchen geben keinen Hinweis darauf. Zudem lebt der Mensch seit vielen Generationen in teilweise engster räumlicher Nähe zu Schweinen, ohne dass Übertragungsfälle beschrieben worden wären.

Die Möglichkeit, an Schweinen genetische Veränderungen vorzunehmen, spricht ebenfalls für ihre Verwendung in der Xenotransplantation.

Dennoch tritt bei der Verwendung von Schweineorganen ein entscheidendes Problem auf: Transplantiert man vaskularisiertes Gewebe von einer phylogenetisch so weit entfernten Spezies wie Schweinen, in Primaten, so führt dies zum Transplantatversagen innerhalb von Minuten bis Stunden (Perper 1966). Es kommt zu einem Vorgang, den man als hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) bezeichnet und der der Abstoßung von ABO-inkompatiblen Organen ähnelt. Kissmeyer-Nielsen beschrieb, dass diese HAR mit präformierten Antikörpern

gegen das Spenderorgan assoziiert ist (Kissmeyer-Nielsen 1966). Im Gegensatz dazu führt die Organübertragung zwischen phylogenetisch näher verwandten Spezies wie Ratte-Maus, Schaf-Ziege und Schimpanse-Mensch zu einer weniger drastisch verlaufenden, fortschreitenden vaskulären und zellulären Abstoßungsreaktion (Perper 1966). Calne bezeichnete daraufhin Spezieskombinationen, die das Phänomen der hyperakuten Abstoßung zeigen, als diskordant und solche, bei denen es ausblieb, als konkordant (Calne 1970).

1.3 Grundlagen der xenogenen Abstoßungsreaktion

1.3.1 Die präformierten natürlichen Antikörper und ihr Zielantigen

Die Grundlage der HAR liegt in der Bindung von präformierten natürlichen Antikörpern (PNAK) des Empfängers an endotheliale Antigene des Xenotransplantats und der daraus folgenden Aktivierung des Komplementsystems, sowie dem Verlust der antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels (Hoopes 1996).

Mehr als 90% dieser Antikörper binden an Glykolipide und -proteine, die als antigene Struktur Galaktose- $\alpha(1,3)$ Galaktose-Reste enthalten. Sie gehören zu einer größeren Gruppe von Antikörpern, zu denen auch Isohämagglutinine und andere α -Galaktosyl-Saccharid-Antikörper gehören (Platt 2001).

Die Synthese der Galaktose- $\alpha(1,3)$ Galaktose-Zuckerreste wird durch das Enzym $\alpha 1,3$ -Galaktosyltransferase katalysiert, das auf dem Endothel, aber auch auf anderen Zellarten in verschiedenen Organen (z. B. Lungen- und Nieren-Epithel) aller Säugetiere, zusammen mit seinem Produkt, vorkommt (Oriol 1993).

Die entscheidende Ausnahme bilden Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen (z. B. Paviane, Rhesusaffen), die kein funktionsfähiges Enzym mehr besitzen (Galili 1988), da bei ihnen vor ca. 20 Millionen Jahren im Laufe der Evolution das $\alpha(1,3)$ -Galaktosyltransferase-Gen inaktiviert wurde. 1991 ist es Joziase gelungen, ein dem $\alpha(1,3)$ -Galaktosyltransferase-Gen der Säugetiere homologes, stummes Gen im menschlichen Genom zu identifizieren. Es liegt auf dem Chromosom 9, in der Nähe der Loci, die für die ABO-Blutgruppen-Antigene codieren.

So kommt es beim Menschen und den Altweltaffen, analog zu den präformierten Antikörpern im ABO-Blutgruppensystem, zur Ausbildung der xenoreaktiven Antikörper ab der frühen postnatalen Periode durch Kontakt mit Darmbakterien, die diese Galaktosylreste ebenfalls exprimieren.

Der Gal α (1,3)Gal-Antikörper ist ein natürlicher, polyklonaler Antikörper, der ungefähr 1% der zirkulierenden Immunglobuline ausmacht (Rose 2002). Die PNAK gehören hauptsächlich den Klassen IgM und IgG an, in interindividuell variablen Verhältnissen (Roos 2001). Es wird angenommen, dass sein Vorhandensein einen Selektionsvorteil durch verbesserte Immunabwehr gegen bestimmte Infektionen darstellt (Hoopes 1996).

Die große Bedeutung der PNAK in der Ausbildung der HAR wird durch eine Reihe von Beobachtungen gestützt:

- Neugeborene Paviane, bei denen noch keine derartigen Antikörper nachgewiesen werden können, stoßen Schweineherzen nicht hyperakut ab (Kaplon 1994).
- Die Entfernung der Gal α (1,3)Gal-Antikörper verlängert das Transplantatüberleben (Platt 1990).
- Durch Reinfusion der Antikörper lässt sich die HAR aber wieder induzieren (Perper 1967).
- Der fast unmittelbare nach Reperfusion beginnende rasche Prozess der Abstoßung spricht ebenfalls für eine natürlich vorliegende Immunität des Empfängers und schließt eine Immunantwort durch Sensibilisierung aus.
- Die Ausbildung der HAR korreliert mit dem Vorhandensein von xenoreaktiven Antikörpern im Serum des Empfängers (Rose 1991).
- Im Xenotransplantat lassen sich entlang der Blutgefäße abgelagerte Antikörper des Empfängers nachweisen (Rose 1991).

1.3.2 Die Rolle des Komplements bei der HAR

Die Bindung der PNAK auf dem Endothel des Transplantats und die daraus folgende Aktivierung des Komplementsystems wird als der maßgebliche Vorgang in der Einleitung der

HAR betrachtet. Bei der HAR kommt es innerhalb weniger Minuten bis Stunden zum Transplantatversagen (Perper 1966). Makroskopisch zeigt sich eine Organschwellung und düstere Verfärbung, es kommt zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Organfunktion.

In der histologischen Untersuchung zeigen sich thrombotische Gefäßverschlüsse, ödematöse Schwellung, eine entzündliche Infiltration fleckige Nekroseareale und Ablagerungen von Komplement, Immunglobulinen und Fibrin im Kapillarbereich (Platt 1991). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass auch zusätzlich zellvermittelte Phänomene, wie die Antikörper-unabhängige Endothelzellaktivierung- oder Zerstörung durch Monozyten und Natürliche-Killer-Zellen, beim frühen Transplantatversagen eine Rolle spielen (Hoopes 1996).

Das Komplementsystem stellt einen entwicklungsgeschichtlich sehr alten Teil des menschlichen, unspezifischen humoralen Immunsystems dar und besteht aus ca. 20 Proteinen.

Die Bedeutung des Komplements wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich die Überlebensdauer von Xenotransplantaten durch Eingriffe in den Ablauf der Komplementkaskade verlängern lässt. So kann durch Zugabe von Cobra-Venom-Faktor, einem C3-Konvertase-Aktivator, der einen verstärkten Verbrauch von Komplementkomponenten bewirkt, oder durch löslichen Komplement-Rezeptor Typ 1 (sCR 1) eine HAR verhindert werden (Leventhal 1993, Gewurz 1967).

Bei der hyperakuten Abstoßung von Schweineorganen in Primaten erfolgt die Komplementaktivierung hauptsächlich über den klassischen Weg, durch die Bindung von IgM-Antikörpern an Gal- α (1,3)Gal-Resten auf der Endotheloberfläche (Dalmaso 1992).

Durch die Bindung am Antigen werden am Fc-Fragment des Antikörpers Bindungsstellen für C1q frei. Durch dessen Anbindung entsteht über zwei Zwischenschritte eine Serinprotease, die die klassische Komplementkaskade aktiviert. Das C1s-Enzym spaltet die Komponenten C4 und C2 in jeweils ein großes (C4b und C2b) und ein kleines Fragment (C4a und C2a). C4b bindet über eine extrem reaktive Thioesterbindung kovalent auf der Xenotransplantatoberfläche.

So gebundenes C4b reagiert mit C2, was dessen Spaltung durch die C1s-Protease mit folgender Bindung von C2b ermöglicht.

Der so auf der Zelloberfläche gebundene C4b2b-Komplex stellt die C3-Konvertase dar, wobei das C2b-Fragment die aktive Proteasenkomponente ist. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Spaltung von bis zu 1000 C3-Molekülen in C3a, einem Anaphylatoxin und C3b, das in großer

Zahl auf der Transplantatoberfläche bindet und zusammen mit C4b2b den C5-Konvertasekomplex (C4b2b3b) bildet.

Dieser schneidet C5 in das Anaphylatoxin C5a und in C5b, das die Aggregation des membranangreifenden Komplexes (MAC, C5b-9) anregt. Hierbei binden C5bC6C7 Komplexe auf der Membran. Durch die Anlagerung von C8 und 10-16 C9 Molekülen entsteht dann ein Kanal durch die Membran, der den Perforinporen ähnelt, die Natürliche Killerzellen und cytotoxische T-Zellen bilden können.

Die kleinen Spaltprodukte C3a, C4a und C5a wirken zusätzlich über spezifische Rezeptoren als Entzündungsmediatoren. Die größte Aktivität zeigt hierbei C5a. Es induziert eine Kontraktion der glatten Muskulatur und erhöht die Gefäßpermeabilität. C3a und C5a können über die Aktivierung von Mastzellen die Ausbildung einer Entzündungsreaktion durch Einwanderung von Leukozyten verstärken. C5a wirkt außerdem direkt auf Neutrophile und Makrophagen und verstärkt so ihre Anheftung an Gefäßwänden.

Es gibt aber Hinweise, dass es auch zu einer Antikörper-unabhängigen Komplementaktivierung, über den alternativen Weg, kommen kann (Hoopes 1996). Lösliches C3 wird durch spontane Hydrolyse ständig in C3a und C3b gespalten, das auf dem Endothel binden kann. An das gebundene C3b bindet Faktor B, der dem C2 des klassischen Weges entspricht. Dadurch kann B von der Plasmaprotease D in Ba und Bb gespalten werden. Der so auf der Zelloberfläche entstandene C3bBb-Komplex entspricht der C3-Konvertase des klassischen Weges. Durch Bindung an Properdin wird noch eine weitere Stabilisierung des Komplexes erreicht.

Der menschliche Organismus verfügt jedoch über eine Reihe teilweise membranständiger Proteine, die während verschiedener Phasen der Kaskade dazu dienen, eine überschießende Komplementaktivierung und eine unbeabsichtigte Schädigung körpereigener Zellen zu verhindern. Ein Großteil dieser Proteine (DAF, MCP, C4bBP, C8BP, Faktor -H und -I, S- und SP 40-Protein) gehört zu einer teilweise strukturell ähnlichen Gruppe von Komplement-regulierenden Proteinen (Regulators of Complement Activity, RCA):

- C1-Inhibitor (C1INH), ein Plasmaprotein, das an den aktiven Enzymteil von C1 bindet und dessen Freisetzung bewirkt. Auf diese Weise begrenzt C1INH die Zeit, in der C2 und C4 gespalten werden können.

Einleitung - Grundlagen der xenogenen Abstoßungsreaktion

- C4-bindendes Protein (C4BP), ein Plasmaprotein, das an C4b bindet und dabei C2b ersetzt. Es dient als Cofaktor für die Faktor I vermittelte Spaltung von C4b.
- Faktor I, ein Plasmaprotein, das, unterstützt von seinen Cofaktoren, die Spaltung von C3b und C4b katalysiert.
- Komplementrezeptor 1 (CR1), ein Membranprotein, das an C4b oder C3b bindet und dabei C2b oder Bb ersetzt und als Cofaktor für I dient.
- Faktor H, ein Plasmaprotein, das an C3b bindet und Bb ersetzt, ebenfalls ein Cofaktor von Faktor I.
- Membran-Cofaktor-Protein (MCP, CD46), ein membranständiges Protein, das die Inaktivierung von C3b und C4b durch Faktor I stimuliert.
- Decay-Accelerating-Factor (DAF, CD55), ein mit einem Phosphoinositol- Glykolipid-Schwanz verankertes Membranprotein, das auf allen Endothelzellen gefunden wird. Es verdrängt Bb von C3b und C2b von C4b und verhindert so die Bildung bzw. beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase.
- CD 59 (Protectin oder MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis), wie DAF ein membrangebundenes Protein, das die Bildung des MAC durch Hemmung der Bindung C8 an C9 verhindert.
- S-Protein und SP-40, Plasmaproteine, die den Einbau von MAC in die Membran blockieren.
- C8BP/HRF (C8-binding Protein, homologous restriction factor), ein membranständiges Protein, das an C8, C9 und Perforin bindet (Janeway 1997, Hoopes 1996).

Die durch die RCA bewirkte Eindämmung der Komplementaktivierung ist jedoch nach früherer Lehrmeinung speziesspezifisch.

Dies bedeutet, dass eine funktionierende Interaktion zwischen Komplementproteinen und RCA nur innerhalb einer Spezies stattfinden kann. Die auf der xenogenen Oberfläche exprimierten RCA-Proteine sind aufgrund molekularer Inkompatibilitäten nicht in der Lage,

Einleitung - Grundlagen der xenogenen Abstoßungsreaktion

die Komplementkaskade des Empfängers adäquat zu kontrollieren. Es kommt zu einer überschießenden Aktivierung (Rollins 1991, Atkinson 1991). Hierin finden sich auch einige der Ansätze, die HAR zu verhindern, wie noch im Folgenden erläutert werden wird.

Obwohl die direkte Zerstörung endothelialer Zellen durch den Membran- Angriffs- Komplex den wohl massivsten Vorgang während der hyperakuten Abstoßung darstellt, sind am Ablauf der HAR noch eine Reihe weiterer Mechanismen entscheidend beteiligt. So können auch zellvermittelte Phänomene, wie eine Antikörper-unabhängige Endothelzell-Aktivierung bzw. Zerstörung durch Natürliche Killerzellen (NK), die spezifisch mit dem xenogenen Endothel reagieren können und zirkulierende Monozyten zur Zerstörung des Transplantats beitragen (Goodmann 1996, Inveradi 1997).

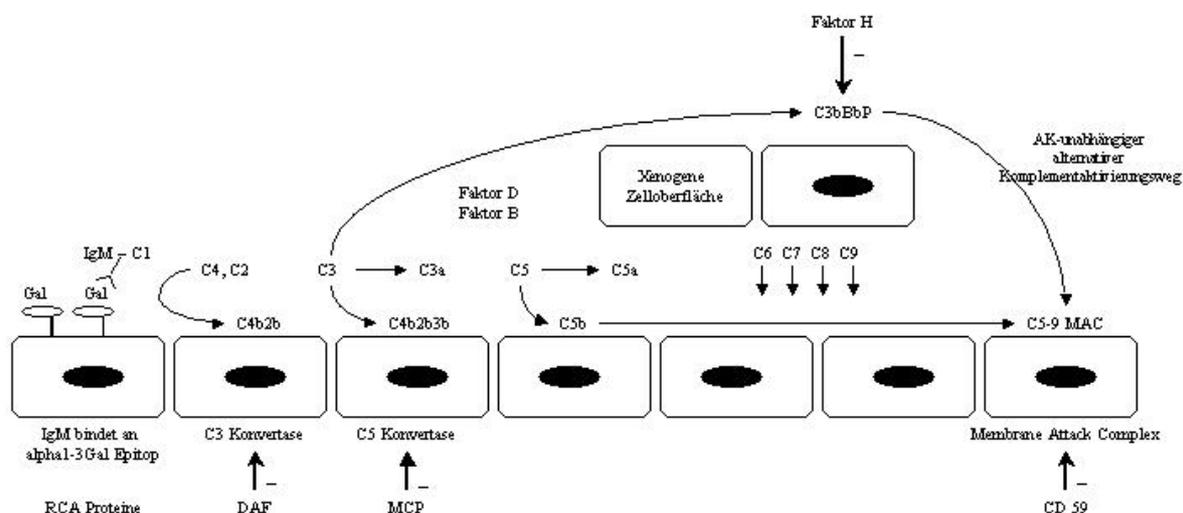


Abbildung 1: Aktivierung und Regulierung der Komplementkaskade

DAF spaltet die C3-Konvertase, MCP inaktiviert die C5-Konvertase und CD 59 inhibiert die Bildung des MAC (nach Hoopes 1996).

1.3.3 Die Rolle der Endothelzelle in der HAR

Trotz der Bedeutung, der durch die PNAK vermittelten Komplementaktivierung und der folgenden Endothelzellschädigung durch den MAC, ist histologisch ein so schwerer Endothelzellschaden nur in besonders ausgeprägten Fällen zu beobachten. Vorherrschend sind vielmehr Hämorrhagien, Thrombosen und ein interzelluläres Ödem (Platt 1991). Dies führte zu der Annahme, dass es in der Pathogenese der HAR zu einer, von einer Endothelzell-Lyse unabhängigen, Dysfunktion der kleinen Blutgefäße kommt. Ursächlich hierfür ist eine Endothelzellaktivierung, ausgelöst durch die Ablagerung der PNAK (Platt 1991, Bach 1992).

Im normalen Gewebe stellt das Endothel eine effektive Schranke dar, die den Durchtritt von Proteinen und Zellen selektiv inhibiert und zudem antikoagulatorische Eigenschaften aufweist. Durch die Antikörperablagerung kommt es zu einer Reihe von schnell und unmittelbar ablaufenden Prozessen, die die biologischen und physikalischen Charakteristika und die damit verbundenen Eigenschaften der Endothelzellen verändern:

- Es kommt zu Bildung von interzellulären Endothelzell-Lücken (gaps), die den Durchtritt von Zellen und Flüssigkeit ermöglichen (Saadi 1995).
- Verlust von endotheliale Thrombomodulin (TM). TM bindet Thrombin, das Protein C zu aktiviertem Protein C, einer antikoagulatorischen Substanz, umwandelt (Hoopes 1996).
- Verlust von endotheliale Heparansulfat. Ein zellassoziertes Proteoglykan, das Antithrombin III, ein antikoagulatorisch wirksames Protein, binden kann (Platt 1990).
- Verlust von Ecto-ADPase, einem endothelständigen Enzym, das aus Thrombozyten freigesetztes ADP spaltet und somit regulierend in die Plättchen-Aktivierung und -Aggregation eingreift (Robson 1996).
- Präsentation von P-Selektin auf der Endotheloberflächen. P-Selektin ist ein Adhäsionsmolekül, das Leukozyten- und Plättchen-Adhäsion vermittelt (Hoopes 1996).
- Freisetzung von Interleukin-1 α , das die Expression von Adhäsionsmolekülen, aber auch die Synthese von Gewebsthrombokinase bewirkt (Saadi 1995).

Weitere Faktoren, die unabhängig von den eben beschriebenen strukturellen Modifikationen, zu einer verstärkten Koagulationsneigung führen, sind wahrscheinlich molekulare Inkompatibilitäten zwischen Spender-Regulator- und Empfänger-Aktivator-Proteinen der Koagulationskaskade, entsprechend den Vorgängen in der Komplementkaskade.

So gibt es Hinweise, dass porcines Thrombomodulin, ein endotheliales Glycoprotein das Thrombin bindet und über die Aktivierung von Protein C und Protein S antikoagulatorische Effekte entwickelt hingegen humanes Protein C nur in sehr eingeschränktem Ausmaß aktivieren kann (Hoopes 1996).

Zusammenfassend kommt es also durch die Endothelzellaktivierung zu einer Reihe von Veränderungen, die eine erhöhte Koagulationsneigung, Vasokonstriktion, Thrombenbildung, Gefäßverschlüsse sowie die verstärkte Einwanderung und Bindung von Entzündungszellen nach sich ziehen.

1.3.4 Das histopathologische Bild der HAR

Das histopathologische Bild der HAR wird nach Rose (Rose 1996) in drei Stadien eingeteilt (Tab.2).

Es wird bestimmt durch interstitielles Ödem, vor allem initial venöser Thrombenbildung, Infiltration durch neutrophile Granulozyten und diffusen Hämorrhagien sowie Parenchym- und Kapillarnekrösen.

Tabelle 2:

Histologische Einteilung der HAR nach Rose 1996

Stufe 1: Initialstadium (leicht)

Das Myokard erscheint normal, abgesehen von:

- Thrombosierte Venolen
- Schwellung des Kapillarendothels

Stufe 2: Intermediär-Stadium (mäßig)

Zusätzlich zu Stufe 1:

- Interstitielles Ödem
- Bildung von Erythrozyten-Sludge im Kapillargebiet
- Vereinzelt kapilläre Thromben

Stufe 3: Spät-Stadium (schwer)

Zusätzlich zu Stufe 1 und 2

- Interstitielle Hämorrhagien
- Parenchymnekrosen
- Kapillarrupturen

1.4 Möglichkeiten der Überwindung der HAR

Um die durch die PNAK vermittelte HAR zu verhindern wurden verschiedene Ansätze entwickelt:

- Elimination der PNAK (durch Immunadsorption oder durch Bindung an lösliche α -Gal-Karbohydrate)
- Veränderungen am α 1-3Gal-Antigen (durch genetische Veränderung der Enzymexpression oder durch Verwendung von knock-out-Schweinen)
- Inhibition des Komplementsystems durch Zugabe von Komplement-hemmenden Substanzen wie CVF (Cobra-Venom-Faktor) oder sCR1 (soluble-complement-receptor-type 1) oder durch Entwicklung transgener Schweine, die humane RCA-Proteine exprimieren)

Die Ansätze werden im folgenden kurz vorgestellt.

1.4.1 Elimination der präformierten natürlichen Antikörper (PNAK)

Da diese Immunglobuline in der HAR eine zentrale Rolle spielen, wurden verschiedene Strategien entwickelt, sie aus dem Serum zu entfernen.

Die präoperative und extrakorporale Immunadsorption ist aktuell die gebräuchlichste Methode, zirkulierende Antikörper aus dem Serum des Organempfängers zu extrahieren. Hierzu wird das Serum des Empfängers mithilfe extrakorporaler Perfusion durch eine Säule geschickt, in der, über an eine Matrix gebundene Antikörper, unspezifisch Immunglobuline herausgefiltert werden. Dadurch kann eine signifikante Reduktion der anti-pig-Antikörperspiegel erreicht werden und sowohl im Working-Heart-Modell, als auch im Schwein-Pavian-Modell das Überleben eines Xenotransplantats verlängert werden (Leventhal 1995, Brenner 1999).

Problematisch an der unspezifischen Elimination von Immunglobulinen bleibt jedoch, die dadurch zu erwartende weitere Schwächung des Immunsystems. Dies könnte bei den ohnehin unter starker medikamentöser Immunsuppression stehenden Patienten das Infektionsrisiko noch vergrößern.

Eine andere Möglichkeit zur Absorption der PNAK ist, zumindest experimentell, die präoperative Perfusion eines Spenderorgans (z. B. einer Niere) mit dem Blut des Empfängers (Cooper 1988).

Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung der PNAK stellt die intravenöse Infusion löslicher α -Gal-Epitope, die an eine Trägersubstanz gebunden sind, dar (Teranishi 2003). Hierdurch können die Antikörper gebunden und somit inhibiert werden. Simon gelang es mit der Infusion von Gal- α 1-3Gal-Oligosacchariden die HAR im Schwein-Pavian-Modell zu verzögern, wenn auch nicht vollkommen zu verhindern (Simon 1998).

1.4.2 Modifikation des xenogenen α -1-3- Gal Epitops

Theoretisch wäre die genetische Ausschaltung, des für die α 1-3-Galactosyltransferase codierenden Gens und somit die Erzeugung von knock-out-Schweinen, die keine α 1-3-Gal-Epitope mehr synthetisieren können, eine sehr elegante Methode die HAR zu umgehen. Nachdem dies lange nicht möglich war, ist es erstmals 2002 einer Gruppe gelungen, α 1-3-Galactosyltransferase-knock-out-Schweine herzustellen (Lai 2002, Phelps 2003). Zum

aktuellen Zeitpunkt liegen jedoch noch kaum Ergebnisse über ihren Einsatz in Versuchsprotokollen zur Xenotransplantation vor.

Kuwaki et al. berichten jedoch über vielversprechende Ergebnisse in ersten Versuchen mit Herzen von α 1-3-Galactosyltransferase-knock-out-Schweinen. Bei acht heterotop in Paviane verpflanzten Herzen von α 1-3-Gal-knock-out-Schweinen, kam es bei keinem der Herzen zu einem Auftreten einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (Kuwaki 2005).

Im Vorfeld war bereits die Herstellung von transgenen Schweinen gelungen, die die Fucosyl-Transferase (H-Transferase) exprimieren, ein Enzym, das mit der Galactosyltransferase um ein Substrat konkurriert (Sandrin 1995), sowie von Schweinen, die die humane α -Galactosidase exprimieren, einem Enzym, das α 1-3-Galactosylreste abspalten kann (LaVecchio 1995). Vor allem mit einer Kombination beider Maßnahme konnte man eine deutliche Reduktion der α 1-3-Gal-Expression nachweisen (Osman 1997). Transgene Schweine, die die H-Transferase exprimieren, zeigen sich vor Zell-Lyse durch humane Antikörper und Komplement geschützt (Costa 1999).

Es gibt jedoch Hinweise, dass durch die transgene Expression der H-Transferase zuvor verborgene Kohlenhydratepitope exponiert werden, gegen die ebenfalls natürliche Antikörper vorliegen. Somit erscheint es zur Zeit zumindest fraglich, ob diese Modifikationen zur sicheren Verhinderung der HAR, zumindest als Einzelmaßnahmen, in der Praxis ausreichen.

1.4.3 Inhibition des Komplementsystems

Wenn man die zentrale Rolle des Komplementsystems in der HAR betrachtet, scheint es sinnvoll, über eine Hemmung oder Herunterregulation der Komplementkaskade in den Ablauf der HAR einzugreifen.

Eine Möglichkeit stellt hier die direkte Blockade des Komplementsystems durch Zugabe eines löslichen Regulators der Komplementaktivität dar. Dies ist möglich durch Substanzen wie Cobra-Venom-Faktor (CVF), löslicher Komplement Rezeptor Typ I (sCR1), C1-Inhibitor, Compstatin und löslichen Formen von CD 59, DAF und MCP (sCD59, sDAF, cMCP).

CVF verringert die Komplementaktivität durch Verbrauch von C3, einem Schlüsselenzym der Komplementkaskade. sCR1 blockiert den klassischen und alternativen Aktivierungsweg, indem es die Spaltung der C3 und der C5-Konvertase beschleunigt. Beide Substanzen sind in

der Lage, Komplementablagerungen im Xenotransplantat signifikant zu verringern und die HAR im Schwein-Primaten-Modell zu verhindern (Pruitt 1994, Kobayashi 1997).

Ein Nachteil stellt jedoch die Notwendigkeit der kontinuierlichen Infusion dar. Zudem wird durch eine unselektive Hemmung des Komplementsystems das Infektionsrisiko erhöht (Hoopes 1996).

Ein anderer Weg zur Regulierung der Komplementaktivität besteht in der Verwendung von Spenderschweinen, die transgen für humane, endothelständige komplementregulierende Proteine (Regulators of complement activity, RCA) sind. Dies beruht auf der Tatsache, dass diese RCA eine relative Speziespezifität aufweisen. So sind die porcinen RCAs nicht ausreichend in der Lage, die durch die Antikörperbindung auf dem Transplantat erfolgende Komplementaktivierung herunterzuregulieren (Atkinson 1991). Aufgrund dieser sogenannten Speziesinkompatibilität der RCA kommt es also zur überschießenden Komplementaktivierung, mit den Folgen der Endothelzellaktivierung, bis hin zur Zerstörung, die eines der Hauptmerkmale der HAR darstellt.

In der Folge gelang es, Schweine herzustellen, die für verschiedene humane RCAs, wie DAF (CD 55), MCP(CD 46) und CD 59, teilweise auch in Kombination, transgen waren. Hierdurch ist es in vielen Fällen möglich, eine HAR zu verhindern (Fodor 1994, McCurry 1995, Byrne 1997, Cozzi 1997, Diamond 2001). Es zeigte sich, dass die transgene Expression von CD55 (DAF), im Gegensatz zu CD59, am ehesten geeignet ist, eine HAR zu verhindern, was den Schluss nahe legt, dass bereits die Bildung von C5b67 Komplexen, (die durch CD59 nicht verhindert wird) zur Endothelaktivierung ausreicht (Ogata/Platt 2004).

Der Arbeitsgruppe um Davis White gelang es in Cambridge/England (Imutran Ltd.), Schweine herzustellen, die für humanen DAF (hDAF) transgen sind (Langford 1994). Eine Untersuchung über die Expression des Transgens in Lysaten verschiedener Organe von 30 dieser Schweinelinien zeigte in 73% der untersuchten Organe eine hDAF Expression (Cozzi 1997). Diese genetischen Veränderungen beeinflussten die Tiere weder in Bezug auf Gesundheit oder Wachstum, noch bezüglich sexueller Reifung oder Fortpflanzungsfähigkeit (Langford 1994).

1.5 Akut vaskuläre Abstoßung

Bei der Xenotransplantation zwischen konkordanten Spezies kommt es zu keiner HAR, da keine PNAK vorhanden sind. Dennoch kommt es zum Transplantatversagen innerhalb weniger Tage bis Wochen. Histologisch zeigen sich interstitielle Hämorrhagien, fokale Nekrosen, Fibrinablagerungen und eventuell thrombotische Gefäßverschlüsse. Wenn es bei diskordanten Transplantaten durch eine der vorher beschriebenen Maßnahmen gelingt, die HAR zu verhindern, kommt es zu einem ähnlichen Abstoßungsprozess, den man als akut vaskuläre Abstoßung oder verzögerte Xenotransplantatabstoßung (DXR) bezeichnet (Leventhal 1993).

Man nimmt an, dass die akut vaskuläre Abstoßung über eine Endothelzellaktivierung durch xenoreaktive Antikörper und mononukleäre Zellen ausgelöst wird. Immunhistologisch finden sich Antikörper- und Komplementablagerungen im Bereich des Gefäßendothels. Zusätzlich findet sich eine zunehmende Infiltration durch mononukleäre Zellen wie Makrophagen und NK-Zellen (Kobayashi 1997).

Durch die Aktivierung verliert die Endothelzelle ihre ursprünglich antithrombotischen und entzündungshemmenden Eigenschaften. Durch die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und der Sekretion pro-inflammatorischer, vasokonstriktiver und prothrombotischer Stoffe wie tissue factor, plasminogen activator inhibitor type 1, E-selectin und Thromboxan A₂ entsteht ein prothrombotisches Milieu, das zu thrombotischen Gefäßverschlüssen und in der Folge zu Infarzierungen im Transplantat führt (Ogata/Platt 2004, Pham 2004).

Zur Prävention der akut vaskulären Abstoßung existieren zur Zeit verschiedene Ansätze (Ogata/Platt 2004), die jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch Ziel intensiver Untersuchungen sind:

- Induktion einer immunologischen Toleranz gegenüber den Xenoantigenen durch präoperative Infusion von hämatopoetischen Stammzellen des Spenders.
- Verwendung von α 1-3-Glactosyltransferase-knock-out-Schweinen.
- Verhinderung der Endothelzellaktivierung.

- Induktion von Akkomodation (ABO-inkompatible Transplantate überleben teilweise auch nach Neubildung von Antikörpern gegen das Spenderorgan und trotz eines funktionierenden Komplementsystems, wenn kurz vor der Transplantation die Antikörper eliminiert worden sind (Bach 1991)).

1.6 Zelluläre Transplantatabstoßung

Es wird allgemein angenommen, dass es nach Überwindung der hyperakuten und der akuten vaskulären Abstoßung zum Auftreten einer zellulären und vermutlich chronischen Abstoßungsreaktion, ähnlich den Vorgängen bei der Allotransplantation, kommt. Unterstützt wird diese Annahme durch das Auftreten zellulärer Infiltrate bereits während der verzögerten Xenotransplantatabstoßung (Kobayashi 1997). Das Ausmaß der Abstoßungsreaktion ist noch unklar, es wird jedoch angenommen, dass die Reaktion im Vergleich zu einem Allotransplantat eher aggressiver ist (Pham 2004).

Zur Unterdrückung dieser zellulären Abstoßungsreaktion würden hier primär die bereits aus der Allotransplantation bekannten und verwendeten Immunsuppressiva zur Verwendung stehen, wie die Calcineurininhibitoren (z.B. Cyclosporin A oder Tacrolimus), Cyclophosphamid, Mycophenolat Mofetil, Kortikosteroide sowie ggf. zusätzlich experimentellere Substanzen wie Rituximab (Anti-CD-20 Antikörper), Anti-CD154 Antikörper oder Antithymozythen-Globuline.

1.7 Fragestellung

Wie im vorhergehenden Einleitungsteil dargestellt, besteht also weltweit eine große Diskrepanz zwischen dem Angebot an Spenderorganen und der Anzahl von Patienten, die von einer Organtransplantation profitieren würden. Weiterhin ist auf absehbare Zeit keine Veränderung dieses Mißverhältnisses zu erwarten, woraus sich die Notwendigkeit der Suche nach Alternativen zur allogenen Organ- und speziell Herztransplantation ableitet.

Die Xenotransplantation scheint hier eine Alternativmöglichkeit bieten zu können und die Verwendung von Schweinherzen scheint, aus den in den voranstehenden Teilen erörterten Gründen, die vielversprechendeste Möglichkeit zu sein. Da es sich jedoch hier um diskordante Spezies handelt, müssen Methoden entwickelt werden, die primär eine hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) verhindern können.

Bei der HAR kommt es initial zu einer Bindung der präformierten natürlichen Antikörper (PNAK) auf dem Endothel des Xenotransplantats und in Folge davon zu einer überschießenden Aktivierung des Komplementsystems, was in der Regel einen Verlust des Transplantats innerhalb von wenigen Stunden bedeutet.

Genetische Modifikationen der Spendertiere und eine Reduktion der PNAK auf der Empfängerseite scheinen, eine HAR verhindern zu können.

So kann durch die Verwendung von transgenen Schweineorganen, die einen humanen Regulator der Komplementaktivierung wie DAF auf dem Endothel exprimieren und die zusätzliche Elimination von Immunglobulinen des Typs IgM und IgG aus dem Serum des Empfängers über eine Immunadsorptionssäule eine HAR verhindert werden (McCurry 1995, Kozlowski 1998, Brenner 2005).

Diese Tatsachen konnten auch durch vorhergehende Arbeiten an unserem Institut gezeigt werden, sowohl am isolierten Herzen, als auch im orthotopen Schwein-Pavian-Modell (Schmoeckel 1996, Brenner 1999, 2005).

Bei von Brenner et al. im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen am erweiterten Langendorff-Working-Heart-Modell fiel auf, dass mit Humanblut perfundierte native Herzen von Landrasseschweinen nach einer kalten Ischämiezeit von 4 Stunden vor dem Einsatz im Modell, eine tendenziell bessere Pumpleistung entwickelten und einen tendenziell geringeren Anstieg von Markern einer Myokardschädigung im Serum zeigten, als die Herzen, die nur einer möglichst minimalen kalten Ischämiezeit unterzogen worden waren.

Ziel dieser Arbeit war es nun, den Einfluß unterschiedlich langer Ischämiezeiten, auf die Herzfunktion und die Entwicklung einer hyperakuten Abstoßungsreaktion im Working-Heart-Xenoperfusionsmodell, unter Verwendung von hDAF-transgenen Schweinerzen, teilweise zusätzlich mit Durchführung zweier Zyklen einer Säulenimmunadsorption, zu untersuchen.

Hierbei war besonders von Interesse, ob die kalte Ischämiezeit Veränderungen am Endothel induzieren würde. Gegebenenfalls würde es hierdurch zu Modifikationen der Endotheloberfläche, bis hin zur Ablösung, der endothelständigen Glykolipide und Oligosaccharide mit ihren endständigen α 1-3Gal-Gruppen kommen. Dieser Effekt war im Vorfeld von unserer Gruppe als eine mögliche Ursache der verbesserten hämodynamischen Funktion von Landrasseschweineherzen im Xenoperfusionsmodell nach einer Ischämiezeit von vier Stunden diskutiert worden (Brenner 1999).

Die These war, dass es durch diese kälte- bzw. reperfusionsinduzierten Veränderungen der α 1-3Gal-Epitope zu einer verminderten Bindung der PNAK auf der Organoberfläche kommt und es eventuell nach Ablösung der Epitope sogar zum Auftreten eines „Hapten“-artigen Effekts kommt, bei dem PNAK im Serum gebunden werden, was zu einer Abschwächung der HAR führen würde. Ähnliche kälteinduzierte Veränderungen waren zuvor bei Lewis-Blutgruppenantigenen beobachtet worden (Brenner 1999).

Andererseits war es fraglich, ob durch die kalte Ischämiezeit nicht eine Veränderung der transgenen RCA-Proteine mit einer möglicherweise folgenden Minderfunktion induziert würde.

Zu diesem Zweck teilten wir unsere Versuchsschweine, die alle für das humane Komplementregulatorprotein DAF transgen waren, in drei Versuchsgruppen ein. Bei einer Gruppe wurde eine Ischämiezeit von 4 Stunden eingehalten, die zweite Gruppe hatte eine Ischämiezeit von 6 Stunden und bei der dritten Gruppen wurden neben einer Ischämiezeit von 4 Stunden noch 2 Zyklen einer Immunadsorption auf Immunglobuline durchgeführt, bevor der Einsatz im Langendorffmodell erfolgte.

Als Kontrolle dienten eine Gruppe von Landrasseschweinen, bei denen eine Ischämiezeit von 4 Stunden eingehalten worden war.

Zur Beurteilung der Herzfunktion und des Grades einer Abstoßungsreaktion dienten uns in erster Linie die Laufzeit der Herzen im Modell und hämodynamische Parameter wie Blutdruck, Koronarfluß und Stroke-work-index, sowie laborchemische Parameter der myokardialen Schädigung, der Komplementaktivierung und des Komplementverbrauchs. Alle Herzen wurden zusätzlich feingeweblich auf Zeichen einer HAR und immunhistochemisch auf Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren als Ausdruck einer Abstoßungsreaktion untersucht.

Aufgrund der nur sehr begrenzten Verfügbarkeit der Schweine, mussten wir leider auf eine transgene Kontrollgruppe ohne Ischämiezeit verzichten.

Schmöckel et al. hatten hier jedoch bereits in einem dem unserem identischen Perfusionsmodell gezeigt, dass transgene Schweineherzen bei der Perfusion mit Humanblut keiner hyperakuten Abstoßung unterliegen und Herzen von herkömmlichen Landrasseschweinen in Bezug auf die hämodynamische Leistung überlegen sind. Sie zeigen

zudem einen weniger ausgeprägten Anstieg von Parametern der myokardialen Schädigung als auch der Endothelzellaktivierung (Schmöckel 1996).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die transgenen Schweine wurden von der Firma Imutran/Novartis zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um eine Kreuzung von Landrasse/Large white-Schweinen gemischten Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 12 und 32 kg. Sie waren zum Zeitpunkt der Lieferung zwischen 6 und 8 Wochen alt. Die transgenen Schweine wurden ca. zwei Wochen vorher aus einer Zuchtanlage in Correzana (Italien) in das Versuchsgut der LMU München (Oberschleißheim) geliefert und wenige Tage vor dem Versuch in das Institut für Chirurgische Forschung gebracht.

Die Tiere waren alle Nachkommen, einer auf dem Gefäßendothel human-Decay-Accelerating-Factor (hDAF) exprimierenden Linie. Diese war durch die Mikroinjektion eines Minigens in Schweinezygoten erzeugt worden. Dieses 6,5 kb große Minigen besteht aus einem 4 kb großen DNA-Fragment, das die 5'-untranslatierte Sequenz, die Signalpeptidsequenz, sowie das erste Exon und Intron des menschlichen DAF-Gens enthält. Dieses Fragment wurde mit einem, die restlichen Exons des DAF-Gens enthaltenden, cDNA-Fragment ligiert (Langford 1994).

Cozzi konnte bei Untersuchungen von insgesamt 30 verschiedenen Linien in insgesamt 73% der Proben aus unterschiedlichsten Organen die Expression von hDAF, in allerdings wechselnder Verteilung, nachweisen (Cozzi 1997).

Die Landrasseschweine der Kontrollgruppe waren zwischen 17 und 28 kg schwer und stammten aus dem Versuchsgut der LMU München in Oberschleißheim.

Die Versuche fanden alle in den Räumlichkeiten des Instituts für Chirurgische Forschung (ICF) des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität im Zeitraum zwischen Februar und November 1999 statt.

Die Unterbringung der Schweine in den Ställen des ICF erfolgte bereits einige Tage vor dem Operationszeitpunkt, was den Tieren eine gewisse Adaption an die neue Umgebung ermöglichte. Um den Stress noch weiter zu verringern, erfolgte die Unterbringung, soweit möglich, in Gruppen. Die Schweine standen ständig unter Fachaufsicht und wurden artgerecht

ernährt. Zum Zeitpunkt der Organentnahme waren sämtliche Tiere in gutem Ernährungs- und Gesundheitszustand.

2.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Die transgenen Tiere wurden in insgesamt drei Versuchsgruppen eingeteilt. Als Kontrolle diente zusätzlich eine Gruppe von 6 Landrasseschweinen. Diese Gruppe beruht auf Versuchen, die der Doktorand Harald Huber nach identischen Protokollen, am gleichen Perfusionsapparat, ebenfalls unter Anleitung und Mitarbeit von Dr. Brenner, 1998 in denselben Räumlichkeiten des Institut für Chirurgische Forschung durchführte.

Die erste Gruppe (G1: 4h-DAF) bestand aus vier hDAF-transgenen Schweinen mit einem Gewicht zwischen 15 und 18 kg und einem mittleren Gewicht von 16,3 kg ($\pm 0,58$ kg). Vor dem Einsatz im Perfusionmodell wurde eine kalte Ischämiezeit von vier Stunden eingehalten.

Die zweite Gruppe (G2: 6h-DAF) bestand aus vier hDAF-transgenen Schweinen mit einem Gewicht zwischen 12 und 29 kg und einem mittleren Gewicht von 21.6 kg ($\pm 3,3$ kg). Vor dem Einsatz im Perfusionmodell wurde eine kalte Ischämiezeit von sechs Stunden eingehalten.

Die dritte Gruppe (G3: 4h-DAF+ADA) bestand aus vier hDAF-transgenen Schweinen mit einem Gewicht zwischen 17 und 32 kg und einem mittleren Gewicht von 23,8 kg ($\pm 3,3$ kg). Vor dem Einsatz im Perfusionmodell wurde eine kalte Ischämiezeit von vier Stunden eingehalten. Weiterhin wurden mit dem Humanblut vor Perfusionsbeginn zwei Zyklen der beschriebenen Immunapharese durchgeführt.

Die Kontrollgruppe (G4: 4h-LR) bestand aus sechs Landrasseschweinen mit einem Gewicht zwischen 17 und 28 kg und einem mittleren Gewicht von 22,4 kg ($\pm 2,0$ kg). Vor dem Einsatz im Perfusionmodell wurde hier ebenfalls eine kalte Ischämiezeit von vier Stunden eingehalten.

Für die Dauer der kalten Ischämiezeit wurden die Herzen, nach einem weiter unten beschriebenen Verfahren, in 4°C kalter Celsior®-Kardioplegielösung aufbewahrt.

2.3 Operatives Vorgehen

2.3.1 Anästhesie

Die Tiere wurden zwölf Stunden vor dem Eingriff über Nacht nüchtern gelassen. Noch im Stall wurden dann zur Sedierung Azaperon (Stresnil ®) 2-4 mg/kg KG und darauf folgend Ketaminhydrochlorid (Ketavet ®) 20 mg/kg KG und Xylazinhydrochlorid (Rompun ®) 1 mg/kg KG über eine „Butterfly“-Kanüle in die Nackenfalte injiziert. Nach Einsetzen der Wirkung wurde ein peripher venöser Zugang in eine der Ohrvenen gelegt und das Tier in den Operationssaal gebracht.

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch intravenöse (i.v.) Gabe von Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl-Janssen ®) 25- 50 η g/ kg KG, sowie bei Bedarf Midazolam (Dormicum ®) 0,5- 1 mg. Über die Beatmungseinheit wurde zusätzlich ein Sauerstoff/Lachgasgemisch (O₂/N₂O 2:1) verabreicht. Zur Muskelrelaxierung wurde Pancuroniumbromid (Pancuronium-Curamed ®) 0,05- 0,1 mg/ kg KG verwendet.

2.3.2 Herzexplantation

Das Tier wurde in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert und fixiert. Danach erfolgte eine Tracheotomie und der Anschluss an die maschinelle Beatmung. Über die Brustwandseiten wurde ein EKG abgeleitet. Zur zentralen Volumen- und Medikamentengabe wurde die Arteria subclavia einer Seite freipräpariert und ein Zugang gelegt.

Es wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt und nach Blutstillung das Perikard longitudinal eröffnet. Die Aorta ascendens wurde von der A. pulmonalis freipräpariert, um das spätere Abklemmen zu ermöglichen. Als nächstes wurde die Vena cava superior auf Höhe der V. azygos freipräpariert und mit zwei Haltebändern umlegt, um das spätere Ligieren vorzubereiten. Die V. cava inferior wurde mobilisiert.

Als nächstes erfolgte die vollständige Heparinisierung durch i. v. Gabe eines Bolus von 5000 i. E. Heparin (Heparin-Ratiopharm ®). Darauf folgend wurde eine Kanüle zur Verabreichung der Kardioplegielösung in die A. ascendens eingebracht und mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert.

Um die Blutzufuhr zum Herzen zu stoppen wurde nun die V. cava superior ligiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt, sowie die V. cava inferior ca. 2 cm oberhalb des Zwerchfells abgeklemmt. Nach dem Abklemmen der Aorta distal der Kanüle wurde mit der Einleitung der 4° C kalten Kardioplegielösung (Celsior®) über ein Druckinfusionssystem begonnen. Parallel dazu, wurde das Herz extern durch Zugabe 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung gekühlt.

Danach wurde die V. cava inferior proximal der Klemme zur Druckentlastung des rechten Ventrikels durchtrennt und die linksatriale Herzohrspitze inzidiert, um den linken Ventrikel vor einer Druckschädigung zu schützen. Die Perfusion des Herzens mit der kalten, kardioplegischen Lösung wurde fortgesetzt, bis die aus dem rechten Vorhof austretende Lösung völlig klar war. Insgesamt wurden ca. 800 ml Celsior® zur Perfusion verwendet.

Es folgte die Sektion der Pulmonalvenen. Die Aorta wurde nahe der Klemme durchschnitten und der Truncus pulmonalis im Bifurkationsbereich abgetrennt, so dass das Herz aus der Perikardhöhle herausgenommen werden konnte.

2.3.3 Präparation des Herzens

Die Präparation des Herzens für den Einsatz im Perfusionssystem erfolgte, nachdem das Herz gewogen worden war, in einer Metallschüssel in 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung. Für die Anschlüsse an das Perfusionssystem wurden Kanülen benötigt, die in den Werkstätten des ICF gefertigt worden waren. In der Aortenwurzel wurde eine Kunststoffkanüle geschoben und mit starken Ligaturen befestigt. Auf dieselbe Art und Weise wurde eine Stahlkanüle in der A. pulmonalis platziert. Die Gefäße des linken Atriums wurden unterbunden und nach einer kleinen Inzision wurde eine weitere Metallkanüle eingesetzt und über Ligaturen fixiert. Für die Aorta erwies sich eine Kanüle mit ca. 1 cm Innendurchmesser als für alle Herzen praktikabel. Für den linken Vorhof und die Pulmonalarterie wurden, abhängig von der benötigten Größe, unterschiedliche Kanülen gewählt (5-10 mm Innendurchmesser).

Für die folgende Ischämiezeit wurde das so präparierte Herz in einem mit 4°C kalter Celsiorlösung® gefüllten Plastikbeutel verpackt. Um das Herz vor einer thermischen Schädigung durch direkten Kontakt mit Eis zu bewahren, wurde dieser Beutel noch in einer größeren, mit kalter NaCl-Lösung gefüllten Plastiktasche platziert. So geschützt wurde das Herz für vier oder sechs Stunden in einer mit Eis gefüllten Styroporbox aufbewahrt.

Dies entspricht der Vorgehensweise zur Organkonservierung bei der allogenen, humanen Herztransplantation.

Für spätere immunhistochemische Untersuchungen wurde auch ein möglichst langes Aortenstück mit in den Beutel gegeben.

2.4 Working-Heart-Modell

Das ex-vivo-Perfusionsmodell ist in Abbildung 2 schematisch und in Abbildung 3 im Foto dargestellt. Das verwendete Schlauchsystem wurde von der Firma Dideco bezogen. Die Befestigungsplattform wurde in den Werkstätten des ICF gefertigt. Nach der jeweiligen Ischämiezeit von vier oder sechs Stunden wurde das Herz in den Perfusionsapparat eingesetzt.

Zur Perfusion wurden 550 ml heparinisiertes Humanblut (100 i. E./ml) von Spendern beiderlei Geschlechts der Blutgruppen A und 0 verwendet. Das Blut wurde den Spendern unmittelbar vor Versuchsbeginn entnommen (maximal eine Stunde vorher).

In das mit NaCl vorgespülte, sowie angewärmte und dann luftblasenfrei mit Blut gefüllte System konnte dann das Herz eingesetzt werden, nachdem zwei bipolare Schrittmacherdrähte im Bereich des linken und rechten Ventrikels aufgenäht worden waren.

Die Aorta wurde über die eingesetzte Kanüle mit der Nachlastsäule konnektiert, ebenso wurde der linke Vorhof mit der Vorlastsäule verbunden. An die Kanüle der Pulmonalarterie wurde, um die Blutentnahme zu erleichtern, ein ca. 10 cm langes Schlauchstück gesteckt. Die Nachlastsäule hatte eine Gesamthöhe von 75 cm, was 55 mmHg entspricht; die Vorlastsäule befand sich 15 cm über dem linken Atrium, dies entspricht 11 mmHg.

Nach sorgfältiger Entlüftung und Füllung des Herzens konnte das Modell gestartet werden. Hierzu war im Regelfall eine Defibrillation mit internen Paddles notwendig. Falls sich nicht sofort ein Sinusrhythmus einstellte, wurde nun der Schrittmacher zur Überbrückung eingesetzt. Ansonsten war über die Schrittmacherdrähte die Ableitung eines epikardialen EKGs möglich.

Unser Modell erlaubte zwei Betriebsmodi:

- Die retrograde Perfusion des Herzens nach Langendorff

Von einem Auffangreservoir direkt unter dem Herzen gelangt das Blut, von einer Rollerpumpe getrieben, in den Oxygenator (Dideco, Modul 1500), der gleichfalls die Bluttemperatur durch ein Wasserzirkulationssystem auf 37 °C hält. Über eine Weiche gelangt das Blut von hieraus in die Nachlastsäule der Aorta. Die Koronarperfusion des Herzens erfolgt rein passiv. Der Druck der Nachlastsäule treibt das Blut bei geschlossener Aortenklappe in die Koronargefäße. Dieses Blut wird über den rechten Vorhof, Ventrikel und die Pulmonalarterie in das unter dem Herzen befindliche Auffangbecken geleitet, so dass hieraus direkt die Koronarperfusion bestimmt werden kann. Nicht in die Koronarien gelangtes Blut wird über die Nachlastsäule in das Auffangbecken abgeleitet.

- Der Working-Heart-Modus

Im Working-Heart-Modus gelangt das oxygenierte und erwärmte Blut über die Perfusionsweiche durch das Vorlastreservoir in den linken Vorhof und Ventrikel. Von dort wird das Blut in die Nachlastsäule ausgeworfen und über einen Abfluss, der auch der Messung des systemischen Herzeitvolumens dient, wieder dem Sammelbecken zugeführt.

Zu Versuchsbeginn wurden die Herzen 15 Min. lang im Langendorff-Modus passiv perfundiert. Danach erfolgte die Umschaltung auf den sogenannten Working-Heart-Modus (siehe Abb.2).

Die Temperatur wurde kontinuierlich über ein am Oxygenator angebrachtes Thermometer gemessen und bei 37 °C konstant gehalten. Glukose (4 g/h) und Insulin (15 IU/h) wurden dem System laufend hinzugefügt. Über ein Chiron Diagnostics 348 Gerät wurden in festgelegten Abständen der Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), der pH-Wert, Kalium (K), Calcium (Ca), Natrium (Na) und der Hämatokrit (Hkt) aus arteriellen, sowie venösen Proben bestimmt. Aus den venösen Proben wurde zusätzlich an einem Coulter-Gerät ein kleines Blutbild bestimmt. Der Calcium Spiegel wurde durch bedarfsgerechte Zugabe von Calciumgluconat im physiologischen Bereich gehalten, wobei meist eine einmalige Gabe zu Beginn des Versuches ausreichend war. Um den Blut-pH-Wert und die Blutgase im Normbereich zu halten wurde der Oxygenator mit Raumluft, der Sauerstoff (2 l/min) sowie CO_2 zugesetzt worden ist, betrieben. Falls die Einstellung des Blut-pHs zu späteren Versuchszeitpunkten nicht mehr ausschließlich über die CO_2 -Zufuhr möglich war, erfolgte die kalkulierte Zugabe von verdünntem Trometamol (Tris 36,34 % Braun).

Der Versuch galt als beendet, wenn das Herz nicht mehr in der Lage war, sich eigenständig, hämodynamisch wirksam zu kontrahieren. Es wurde aus dem System herausgenommen und erneut gewogen. Die Gesamtlaufzeit bis zu diesem Punkt im Working-Heart-Modus wurde als Marker für die Herzfunktion im Xenomodell benutzt.

Es wurden folgende hämodynamische Parameter bestimmt:

- Das systemische, koronare und gesamte Herzzeitvolumen.

Das systemische Herzzeitvolumen (HZV_{sys} [ml/min]), das koronare Herzzeitvolumen (HZV_{coro} [ml/min]) sowie das gesamte Herzzeitvolumen als Summe der beiden (HZV_{ges} [ml/min]) konnten mithilfe eines Messbechers über die Pulmonalarterie und die Nachlastsäule direkt am Modell bestimmt werden.

- Der Schlagarbeitsindex (Stroke-work-Index, SWI) [ergs/g].

Der SWI als wichtiger hämodynamischer Parameter wurde wie folgt berechnet:

$SWI \text{ [ergs/g]} = ((\text{mittl. art. Blutdruck} - \text{Vorlast}) * HZV * 1333) / (\text{Herzfrequenz} * \text{Herzgewicht})$

- Der spezifische Koronarwiderstand (KW) [arbitrary units, mmHg * min / ml]

$KW = \text{mittl. art. Blutdruck} / HZV_{coro}$

- Der spezifische Koronarfluß (SCF)[(ml / min) / g]

$\text{Spez. Koronarfluß} = HZV_{coro} / \text{Herzgewicht}$

- Die prozentuale Herzgewichtszunahme

$\text{Herzgewichtszunahme [\%]} = ((\text{Herzgewicht nach Perfusion} - \text{Herzgewicht vor Perfusion}) / \text{Herzgewicht vor Perfusion}) * 100$

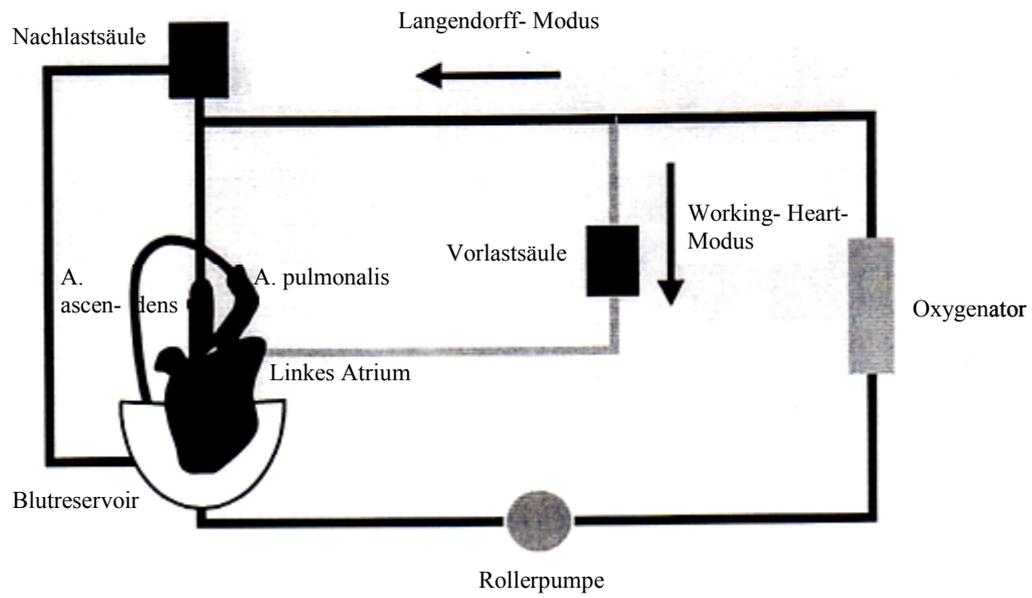


Abbildung 2: Das Working-Heart-Perfusionsmodell im Schema

(nach Brenner et al., 1999)

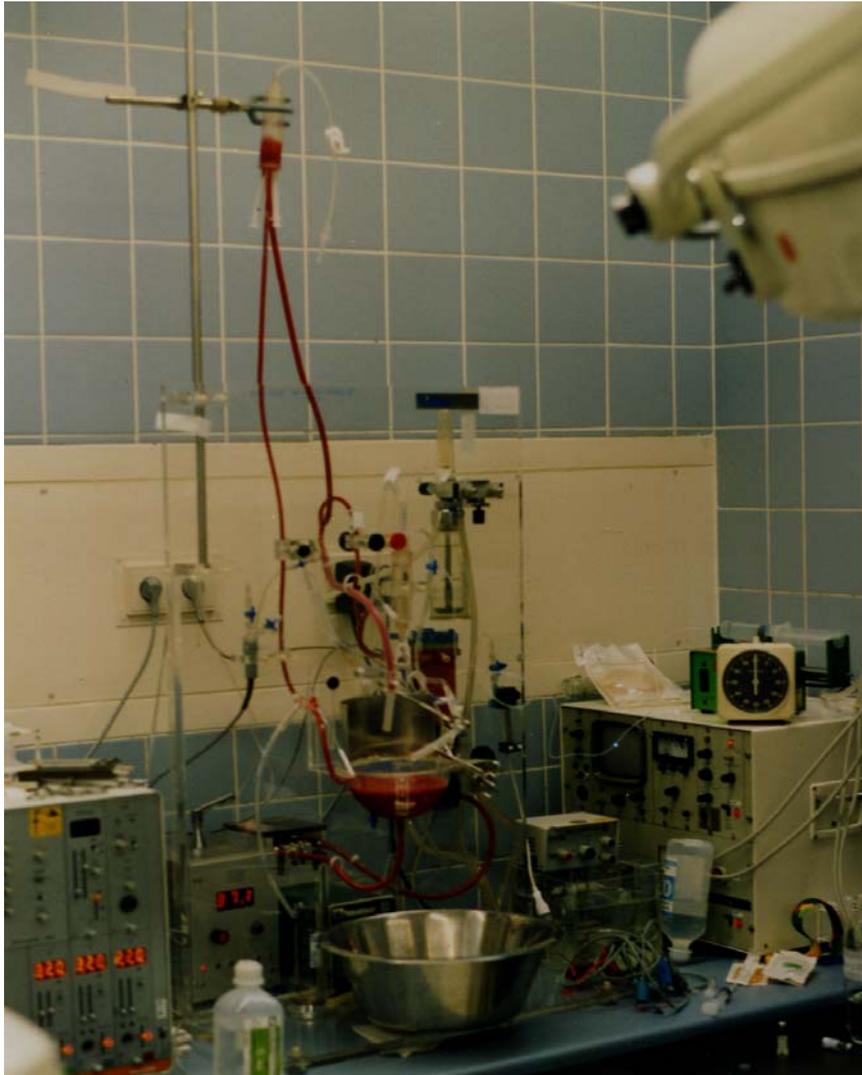


Abbildung 3: Das Working-Heart-Perfusionsmodell

Das Working-Heart-Perfusionsmodell ist vor Einsetzen des Herzens bereits mit Humanblut „vorgeladen“.

2.5 Immunadsorption

In einer der Versuchsgruppen wurden zusätzlich zu den vier Stunden Ischämiezeit noch zwei Zyklen einer Immunadsorption durchgeführt. Hierzu verwendeten wir wiederverwendbare Ig-Therasorb®-Säulen von der Firma Baxter/ Therasorb aus Unterschleißheim, Deutschland.

Das System besteht aus zwei verschiedenen Kreisläufen, angetrieben durch je eine Rollerpumpe. Im ersten Abschnitt wird das Blut über einen Filter in seine zellulären Teile und in das Plasma aufgeteilt. Über die zweite Pumpe wird nun eine der Säulen mit dem Plasma beschickt.

In der sterilen, pyrogen-freien Glassäule (Vol. 300 ml) befinden sich, an eine Sepharose-Matrix gebunden, polyklonale Schafantikörper gegen humane Immunglobuline der Klassen IgG (1-4), IgM und IgA, sowie gegen Immunkomplexe und verschiedene Immunglobulinfragmente. Nach dem Durchlauf wird das Plasma wieder in das System zurückgeführt und die gebundenen Antikörper werden mit einem Glycine und PBS Puffer aus der Säule herausgewaschen. Dieser Vorgang entspricht einem Immunadsorptionszyklus. Währenddessen kann die zweite Säule beladen werden. Somit werden die Säulen wiederverwendbar.

2.6 Serologische Untersuchungen

Während der Perfusion wurden zu festgelegten Zeiten in Serumröhrchen Blutproben aus der Arteria pulmonalis entnommen und bis Versuchsende in Eiswasser zwischengelagert. Die Entnahmezeitpunkte waren vor Beginn der Perfusion, zeitgleich mit Versuchsbeginn und dann nach 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 Minuten usw. bis Versuchsende. Nach Abschluß des Experiments wurden die Proben zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand in Cryotubes abpipetiert und bei -72°C eingefroren. Die nachfolgenden Bestimmungen wurden am Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern durchgeführt. Als Marker für eine myokardiale Schädigung wurden Kreatinkinase (CK), Kreatinkinase-MB (CK-MB), Laktatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT oder AST) bestimmt. Um die immunologischen Vorgänge während der Xenoperfusion zu erfassen, wurden die Immunglobuline der Klassen IgG, M und A sowie als Parameter für den Verbrauch von Komplementfaktoren C3, C4, Gesamtkomplement und Alternativ-Komplement bestimmt.

2.7 Histologische Untersuchungen

Nach Beendigung des Experiments wurden aus beiden Ventrikeln standardisiert Gewebeproben entnommen. Ein Teil der Proben wurde auf Korkplättchen mit Gewebekleber (Tissue-Tec®) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -72°C aufbewahrt, die restlichen Gewebestücke wurden in Formalinlösung konserviert. Die gefrorenen Myokardstücke wurden im Kryostat in 4–6 μm dünne Schichten geschnitten und mit monoklonalen Antikörpern auf IgG, IgM, IgA (Monoklonale Antikörper Maus-Mensch von Dakopatts, Dänemark), C3, C4 und MAC (C3, C4, C5b-9) (Monoklonale Antikörper

Maus-Mensch von Qudel, San Diego, USA) gefärbt. Ebenso wurde die endotheliale hDAF-Expression nachgewiesen (Antikörper BRIC216 IB-GRL Research Products, Estree, UK). Die Färbungen wurden mithilfe eines UniTect™ Kits durchgeführt (Mouse Immunohistochemistry System, Oncogene Science, Cambridge, UK).

Die formalinfixierten Proben wurden in Paraffin eingegossen, geschnitten und nach Standardprotokollen mit Hämatoxylin und Eosin (H. E.) gefärbt.

Die Auswertung der Histologien erfolgte primär qualitativ auf Basis der histopathologischen Einteilung der HAR nach Rose, wobei die einzelnen Präparate jeweils nach Grad der Abstoßung oder Anfärbung in 4 Kategorien eingeteilt wurden, wie auch bei Brenner beschrieben (Brenner 2003). Als Kontrollgruppe diente eine Reihe von Schweineherzen, die an unserem Perfusionsapparat mit Schweineblut perfundiert worden sind. Diese Serie war schon 1998 von Brenner und Huber am ICF durchgeführt worden (Brenner 1999, Brenner 2000).

2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Der SEM wurde statt der Standardabweichung verwendet, da es sich um kleine Fallzahlen mit teilweise großen Abweichungen vom Mittelwert handelt. In den Kurven- und Balkendiagrammen werden jeweils die Mittelwerte angegeben, wobei der SEM als senkrechter Balken dargestellt wird. Die Ergebnisse der Gruppen werden bezüglich der Variablen Laufzeit, SWI, SCF, CK, CK-MB, IgG und C3c zu den Versuchszeitpunkten 60, 120, 180, 240 und 300 Minuten mithilfe des Wilcoxontests für abhängige Stichproben miteinander verglichen (SPSS 7.5 for Windows, SPSS Inc. Chicago, USA). Ein Unterschied wird als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 Herzgewicht

In allen vier Gruppen konnte eine deutliche Zunahme des Herzgewichts beobachtet werden (Abb. 4).

Die absolute Zunahme an Herzgewicht beträgt im Mittel $31,5 \pm 5,95$ g in der Gruppe 4h-DAF, $32,75 \pm 6,07$ g in der Gruppe 6h-DAF, $35,85 \pm 5,86$ g in der Gruppe 4h-DAF+ADA und $33,6 \pm 2,91$ g in der Kontrollgruppe 4h-LR. Somit ist die absolute Gewichtszunahme in allen Gruppen ungefähr gleich groß. Bezieht man die Gewichtszunahme noch auf das ursprüngliche Herzgewicht und die Laufzeit im Perfusionsmodell, zeigen sich ähnliche Ergebnisse (Abbildungen 4 und 5).

Die größte Zunahme an Herzgewicht, bezogen auf Laufzeit und Ursprungsgewicht, findet sich in der Kontrollgruppe 4h-LR mit $5,22 \pm 0,81$ % Gewichtszunahme/Stunde, gefolgt von $4,52 \pm 0,65$ % Gewichtszunahme/Stunde in der Gruppe 4h-DAF, $3,89 \pm 0,84$ % Gewichtszunahme/Stunde in der Gruppe 4h-DAF+ADA und $3,84 \pm 0,63$ % Gewichtszunahme/Stunde in der 6h-DAF-Gruppe (Abb. 5).

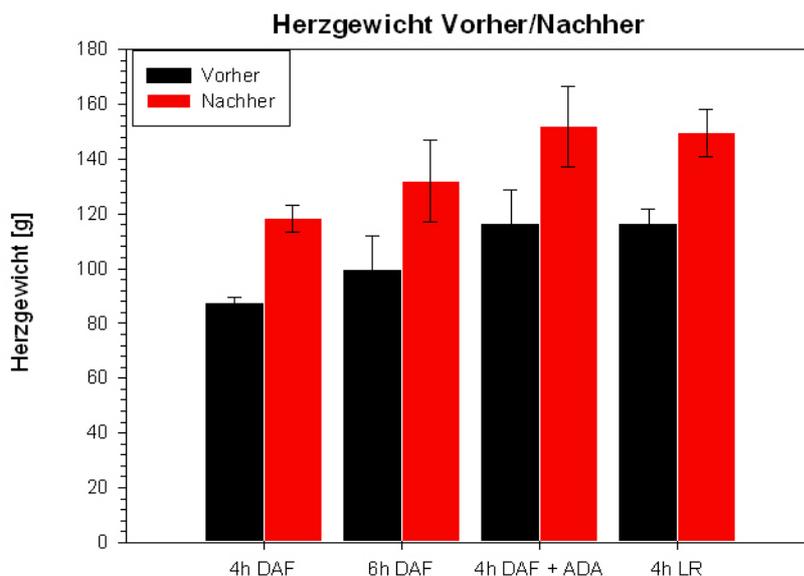


Abbildung 4: Die absolute Herzgewichtszunahme.

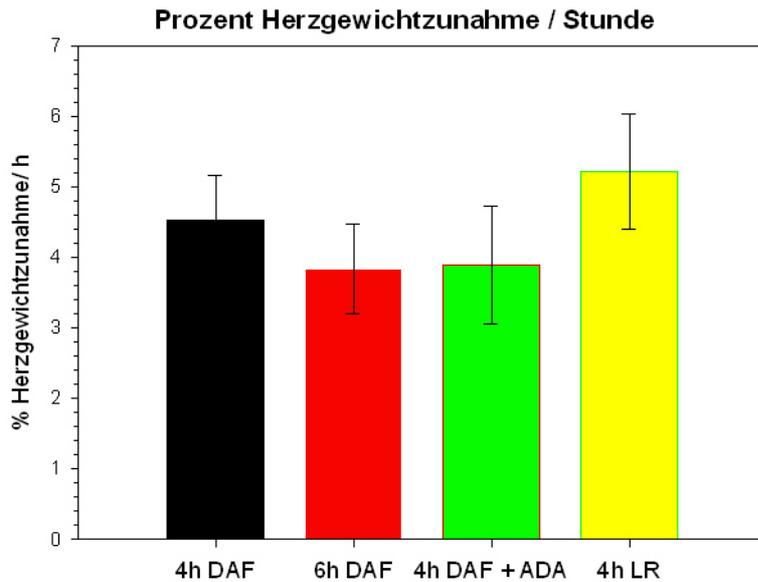


Abbildung 5: Die Herzgewichtszunahme in %/h

Die größte Herzgewichtszunahme bezogen auf Ausgangsgewicht und Laufzeit findet sich in der nicht-transgenen Kontrollgruppe.

3.2 Hämodynamik

3.2.1 Laufzeit

Die längste Laufzeit im Working-Heart-Perfusionsmodell wurde mit $532,5 \pm 60,47$ min in der Gruppe 6h-DAF erreicht. Etwas geringere Laufzeiten konnten im Mittel $502,5 \pm 22,91$ min und $472,5 \pm 33,3$ min, in den Gruppen 4h-DAF+ADA bzw. 4h-DAF beobachtet werden. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Die deutlich kürzeste Laufzeit wurde jedoch in der nicht transgenen Kontrollgruppe erzielt ($354 \pm 37,22$ min.) (Abb. 6). Der Unterschied zu den Versuchsgruppen ist hier signifikant.

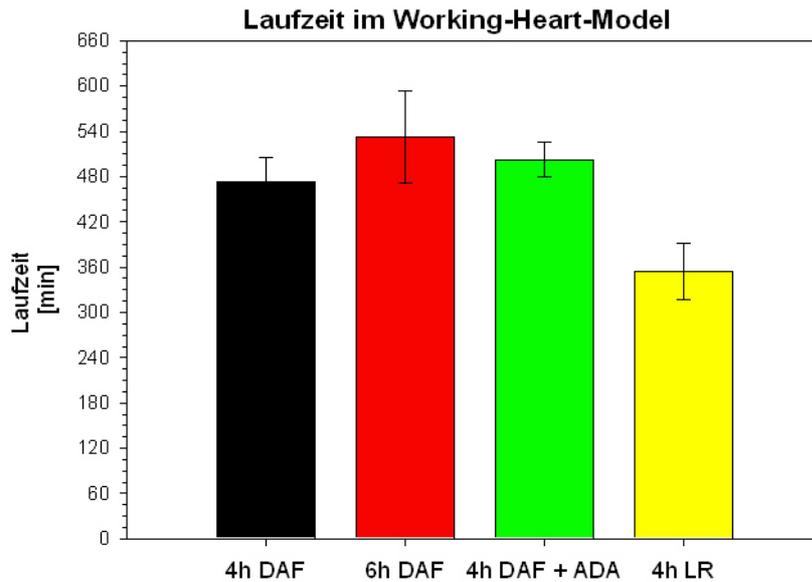


Abbildung 6: Die Gesamtlaufzeit

In der Kontrollgruppe zeigt sich die kürzeste Laufzeit.

3.2.2 Herzzeitvolumen gesamt (HZV ges.)

Bei der Darstellung des gesamten Herzzeitvolumens, das heißt die Summe aus dem koronaren und dem systemischem Volumen pro Minute bestehen zwischen den drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Die tendenziell höchsten Werte finden sich in der 4h-DAF+ADA Gruppe gefolgt von der 4h-DAF und der 6h-DAF-Gruppe. Hier ist jedoch zu beachten, dass in der 4h-DAF+ADA-Gruppe auch die größten Herzen (siehe 3.1) verwendet wurden. Das zu jedem Zeitpunkt geringste Herzzeitvolumen wird in der nicht transgenen Kontrollgruppe erreicht.

Allen Gruppen gemeinsam ist das relativ konstante Absinken des HZV über den gesamten Versuchszeitraum. Die erreichten Maximalwerte sind 490 ml/min in der 4h-DAF+ADA, 370 ml/min in der 4h-DAF, 310 ml/h in der 6h-DAF und 260 ml/min in der Landrasse-Gruppe.

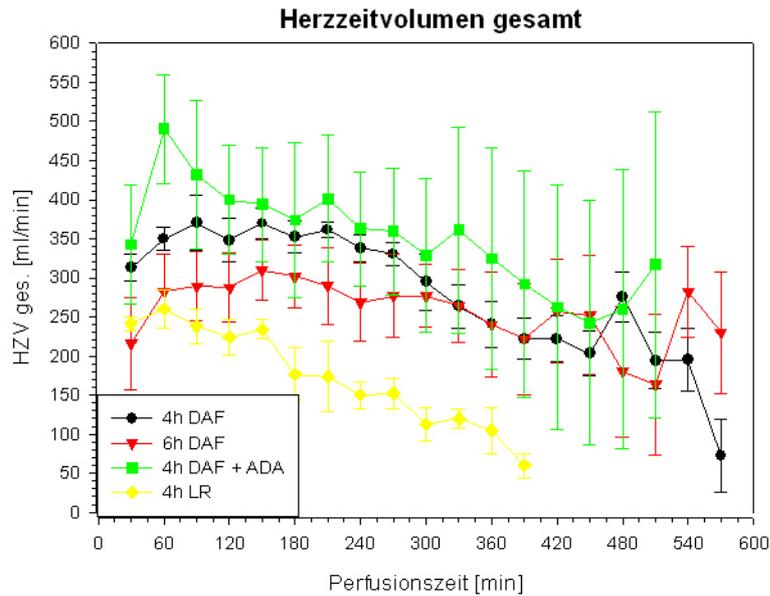


Abbildung 7: Das Gesamtherzzeitvolumen

Das absolut gemessen, höchste Pumpvolumen wird in der ADA-Gruppe erreicht.

3.2.3 Stroke-Work-Index [SWI]

Der Stroke-Work-Index (SWI) dient zur Beurteilung der Herzaktivität durch Einbeziehung des mittleren Blutdrucks, der systemischen Auswurfsleistung und der Herzfrequenz, bezogen auf das relative Herzgewicht. Er ist somit geeignet, die Pumpleistung unterschiedlich großer Herzen miteinander zu vergleichen.

In allen vier Gruppen wird der Maximalwert im Working-Heart-Modus nach 60 Minuten erreicht (Abb. 8).

In den Gruppen 4h-DAF, 4h-DAF+ADA und LR folgt ein kontinuierliches Absinken des SWI.

Das in der Graphik sichtbare, teilweise Wiederansteigen des SWI in den transgenen Versuchsgruppen zu späten Versuchszeitpunkten ist ein rein statistischer Effekt. Er beruht darauf, dass ab diesem Versuchszeitpunkt bereits einige Versuche terminiert sind und ihre hämodynamischen Parameter, die kurz vor Versuchsende eher niedrig waren, plötzlich nicht mehr in die Statistik miteingehen. Betrachtet man die einzelnen SWI-Verläufe, kommt es in keinem Fall zu einem Wiederansteigen.

Den höchsten Kurvenverlauf zeigt die 4h-DAF-Gruppe. Nachdem in der 60. Minute, zusammen mit der 4h-DAF+ADA-Gruppe, mit 2992 ergs/g, der in allen Gruppen höchste Wert erreicht wird, kommt es bis zur 210. Minute nur zu einem verhältnismäßig geringen Abfall der Pumpleistung. In der 4h-DAF+ADA-Gruppe kommt es hingegen nach dem Erreichen des Zenits in der 60. Minute zu einem rascheren Abfall des SWI. Verglichen mit diesen beiden Gruppen wird in der 6h-DAF-Gruppe ein deutlich niedrigeres Ausgangsniveau erreicht, gefolgt von einem weiteren kontinuierlichem Abfall bis zur 150. Minute. Von der 180. bis zur 420. Minute folgt dann aber ein relativ konstanter Kurvenverlauf. Den niedrigsten Kurvenverlauf zeigt die nicht transgene Kontrollgruppe 4h-LR. Ausgehend von den niedrigsten Ausgangswerten, kommt es nach Erreichen des niedrigsten Maximalwerts (1672 ergs/g) in der 60. Minute zu einem deutlichen, kontinuierlichem weiteren Abfall des SWI.

Die 4h-DAF-Gruppe unterscheidet sich an allen bestimmten Zeitpunkten signifikant von der Kontrollgruppe. Die anderen beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich nur bei 240 und 300 Minuten Versuchsdauer signifikant von der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen gibt es nur zwischen den Gruppen mit 4 und 6 Stunden Ischämiezeit ohne Immunadsorption zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten.

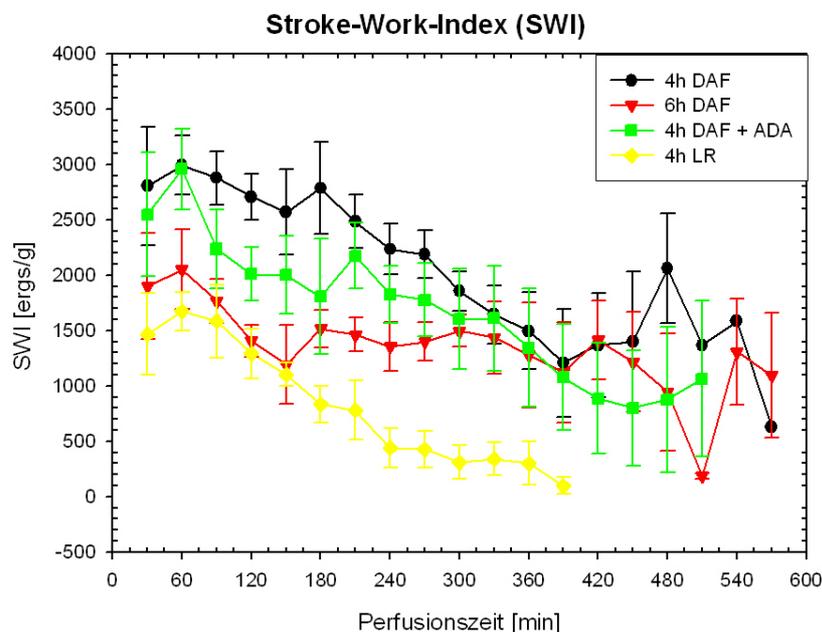


Abbildung 8: Der Stroke-Work-Index

Den höchsten Kurvenverlauf zeigt die transgene 4h-DAF-Gruppe, der niedrigste findet sich in der nicht transgenen 4h-LR-Gruppe.

3.2.4 Spezifischer Koronarfluß (SCF)

Der spezifische Koronarfluß, d. h. der Koronarfluß in ml pro Minute pro Gramm Herzgewicht, nimmt in den transgenen Versuchsgruppen einen gleichartigen Verlauf ohne signifikante Unterschiede, wobei die 4h-DAF-Gruppe die tendenziell höchsten Werte erreicht, gefolgt von der 4h-DAF+ADA und dann der 6h-DAF-Gruppe. In diesen Gruppen sieht man einen relativ steilen Anstieg des SCF und das Erreichen eines Maximums nach ca. 180 Minuten (4h-DAF 3,38 (ml/min)/g, 6h-DAF 3,04 (ml/min)/g, 4h-DAF+ADA 3,32 (ml/min)/g) es folgt eine relativ konstante Plateauphase bis zur ca. 270. Minute, dann ein konstanter Abfall des SCF bis Versuchsende. Im Vergleich dazu kommt es in der Kontrollgruppe nur zu einem leichten Anstieg des SCF mit Erreichen eines Höchstwertes nach 150 Minuten von 1,95 (ml/min)/g und folgend fortgesetztem Abnehmen des spezifischen Koronarflusses.

Bei 120, 180, 240 und 300 Minuten ist der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe signifikant. Die Versuchsgruppen untereinander zeigen keine signifikanten Unterschiede.

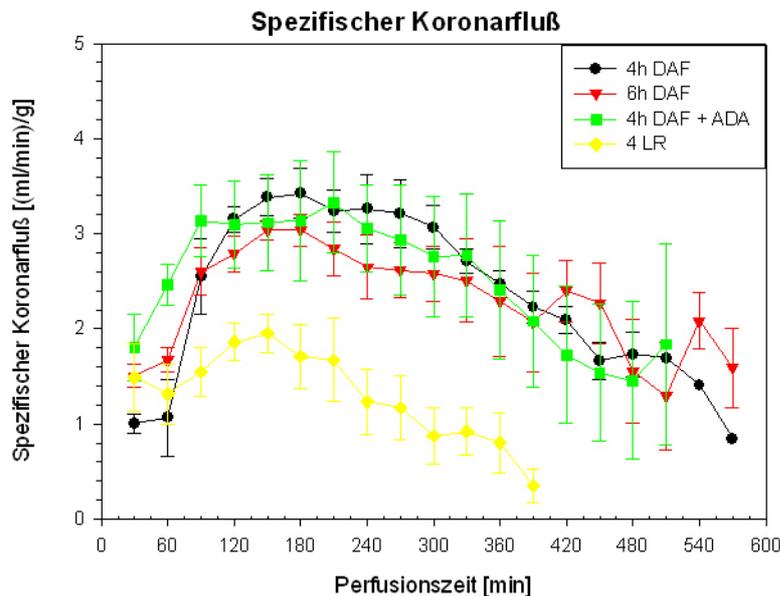


Abbildung 9: Der spezifische Koronarfluß

Den höchsten Kurvenverlauf zeigt die transgene 4h-DAF Gruppe, der niedrigste findet sich in der nicht transgenen 4h-LR-Gruppe.

3.2.5 Spezifischer Koronarwiderstand (KW)

Der Spezifische Koronarwiderstand nimmt in allen Gruppen einen ähnlichen, nicht signifikant voneinander abweichenden Verlauf (Abb. 10). Ausgehend von unterschiedlich hohen Ausgangswerten kommt es zunächst in allen Gruppen zu einem deutlichen Abfall des Widerstands mit einem Minimum ungefähr nach 90 Minuten. Im weiteren Verlauf des Versuches kommt es dann, ebenfalls in allen Gruppen, zu einem langsamen Wiederansteigen des Koronarwiderstandes.

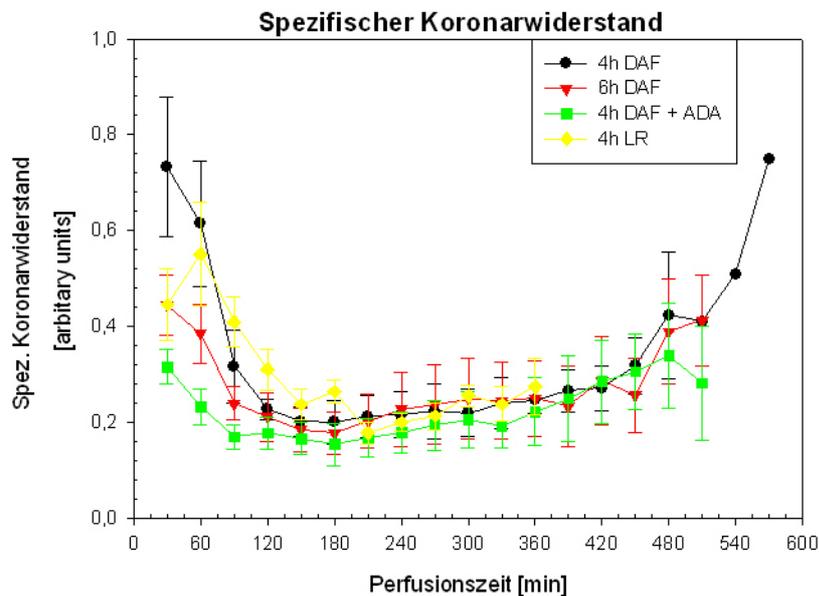


Abbildung 10: Der spezifische Koronarwiderstand

Alle Gruppen zeigen einen ähnlichen, nicht signifikant unterschiedlichen Verlauf. Initial deutlicher Abfall, Erreichen des Minimums nach ca. 90 Minuten, dann kontinuierliche Wiedezunahme des KW.

3.3 Serologie

3.3.1 Parameter der myozytären Schädigung

Als Maß für den Untergang von Herzmuskelgewebe bestimmten wir aus den zu festgesetzten Zeitpunkten entnommenen Blutproben folgende Parameter: Kreatinkinase (CK) mit ihrem Isoenzym MB (CK-MB), Lactatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), bzw. Aspartat-Amino-Transferase (AST).

3.3.1.1 Kreatinkinase (CK) und Kreatinkinase Isoenzym MB (CK-MB)

Die verschiedenen Isoenzyme der Kreatinkinase liegen bei Menschen und Schwein hauptsächlich in Gehirn und Muskelzellen vor, wobei das Isoenzym MB eine besondere Spezifität für die Herzmuskulatur aufweist (Thomas 1998). Aufgrund des Versuchsaufbaus ist davon auszugehen, dass die gemessene CK so gut wie ausschließlich aus den Myozyten des perfundierten Schweineherzens stammt.

In den Versuchen zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein kontinuierlicher Anstieg der CK sowie des Isoenzyms CK-MB. Ausgehend von einem CK-Ausgangswert im humanphysiologischen Normalbereich unterscheiden sich jedoch die Anstiegsgeschwindigkeit und der erreichte Maximalwert in den einzelnen Gruppen erheblich. Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigt die 4h-DAF-Gruppe den flachsten Anstieg und den niedrigsten Endwert (CK_{\max} 5986 U/l). In der Immunadsorptionsgruppe 4h-DAF+ADA zeigt sich nur ein geringfügig steilerer Anstieg (CK_{\max} 5618 U/l) (Abb. 11). Ein deutlich schnelleres Zunehmen der CK und CK-MB Masse findet sich jedoch in der 6h-DAF-Gruppe (CK_{\max} 12086U/l). Hier wird auch, ein im Vergleich zur 4h-DAF und 4h-DAF+ADA-Gruppe, ca. doppelt so hoher CK-Endwert erreicht. Den steilsten Anstieg und die höchsten CK-Maximalwerte wurden in der 4h-LR Kontrollgruppe gemessen. Die Höchstwerte liegen hier um ungefähr den Faktor drei über denen der 4h-DAF-Gruppe (CK_{\max} 17260 U/l). Ein ähnlicher Kurvenverlauf findet sich auch in den CK-MB-Kurven, wobei hier jedoch, wie in der Grafik zu erkennen, die Kurven der Kontrollgruppe 4h-LR und der 6h-DAF-Gruppe näher beieinander liegen (Abb. 4.8).

Innerhalb der Versuchsgruppen gibt es bei der CK keine signifikanten Unterschiede. Zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen 4h-DAF und 4h-DAF+ADA bestehen nach 60, 120 und 180 Minuten jeweils signifikante Unterschiede. Die Unterschiede zwischen allen Gruppen bei den Werten für die CK-MB sind nicht signifikant.

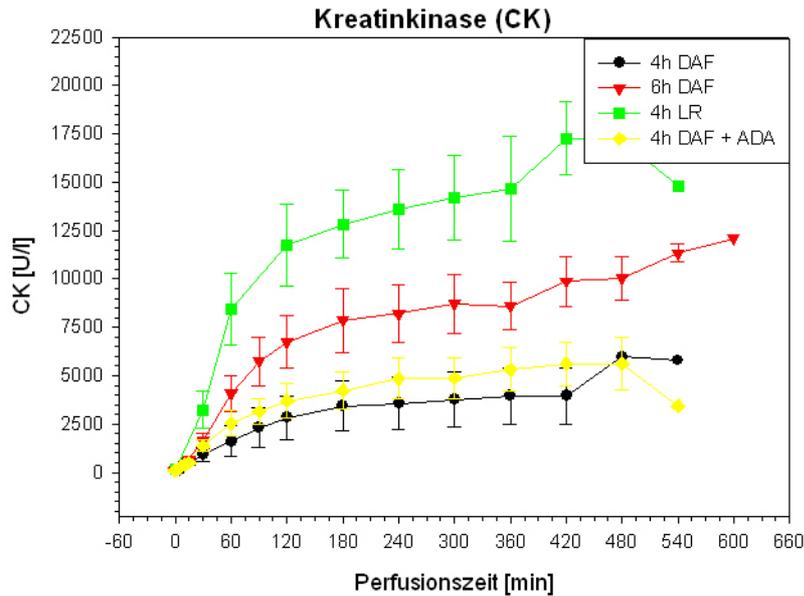


Abbildung 11: Die Kreatinkinase

Die Anstiegssteilheit und der Maximalwert der CK (als Parameter für Myokardschaden) sind in der 4h-LR und 6h-DAF Gruppe höher als in der 4h-DAF und 4h-DAF+ADA-Gruppe.

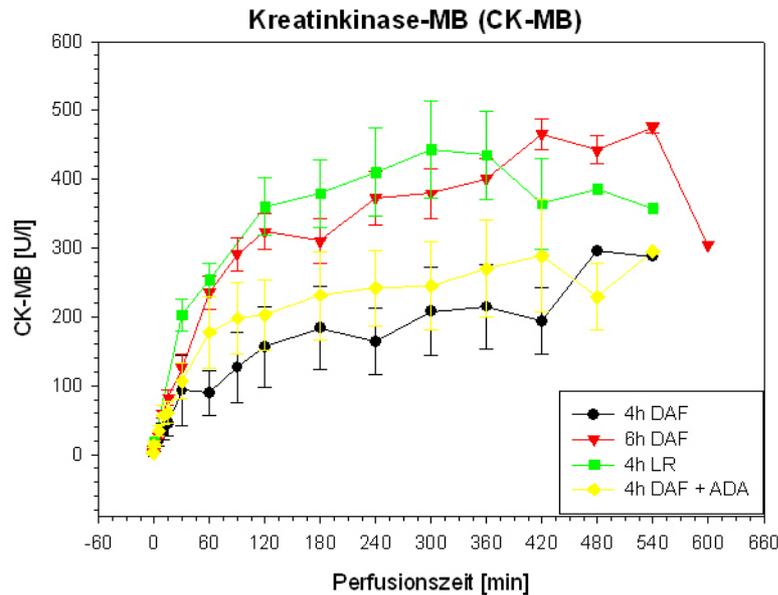


Abbildung 12: Die Kreatinkinase-MB

Bei der CK-MB zeigt sich eine, dem CK-Verlauf, weitgehend entsprechende Kurve.

3.3.1.2 Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein fast ubiquitäres Enzym. Sie kommt in fast allen Geweben, sowie in Erythrozyten vor und ist somit ein relativ unspezifischer Marker für

Zelluntergang und Hämolyse (Thomas 1998). Entsprechend zu dem CK-Verlauf, zeigt sich von einem physiologischen Ausgangswert aus, in allen Gruppen ein kontinuierlicher LDH-Anstieg. Auch hier zeigt sich in der nicht transgenen Kontrollgruppe ein sehr viel steilerer Anstieg und ein Zenit (LDH_{max} 6665 U/l), der ca. um den Faktor 2 höher ist als der Höchstwert in der 4h-DAF-Gruppe (LDH_{max} 3110 U/l) oder der 4h-DAF+ADA-Gruppe (LDH_{max} 2697 U/l), die wieder den flachsten Kurvenverlauf aufweisen. Die transgene Gruppe mit der sechsständigen Ischämiezeit (LDH_{max} 4195 U/l) liegt zwischen den Gruppen mit 4 Stunden Ischämie und der Kontrollgruppe.

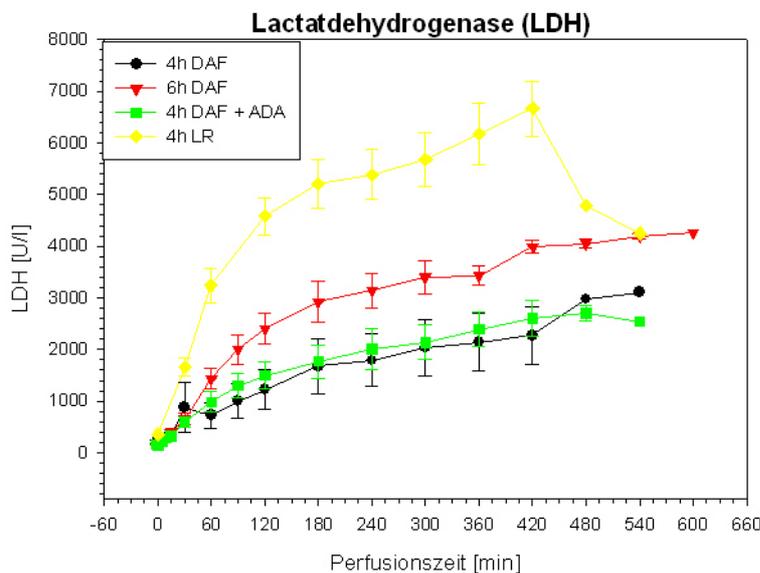


Abbildung 13: Die Lactatdehydrogenase

Die LR-Kontrollgruppe hat im Vergleich zur 4h-DAF und 4h-DAF+ADA-Gruppe einen deutlich steileren Anstieg und höhere LDH Endwerte. Die 6h-Ischämiegruppe liegt dazwischen.

3.3.1.3 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bzw. nach neuer Nomenklatur die Aspartat-Amino-Transferase (AST) liegt in allen Geweben in Form von zwei Isoenzymen vor, die im Zytoplasma bzw. in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die Orte mit der höchsten Aktivität sind die Leber, sowie die Herz- und die Skelettmuskulatur (Thomas 2000). Es dient uns somit als weiterer Parameter zur Bestimmung von Zelluntergang bzw. myozytärer Schädigung. Die Kurve zeigt entsprechend einen Verlauf, der den Verlaufskurven der anderen Parameter myozytärer Schädigung ähnelt.

Der steilste Anstieg an Enzymaktivität und die höchsten Endwerte werden in der nicht transgenen Kontrollgruppe beobachtet (GOT_{\max} 2016 U/l), wohingegen die geringsten Werte in der 4h-DAF (GOT_{\max} 1057U/l) und 4h-DAF+ADA-Gruppe (GOT_{\max} 630 U/l) gemessen werden. Die 6h-Ischämiegruppe liegt im Zwischenbereich (GOT_{\max} 1560 U/l) (Abb. 4.10).

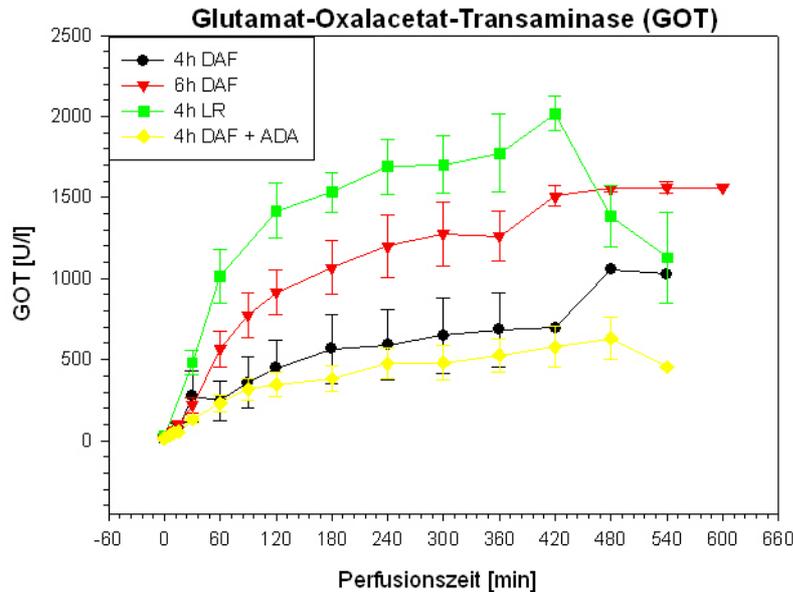


Abbildung 14: Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Der Kurvenverlauf entspricht den Verläufen der anderen Parametern myozytärer Schädigung (LDH, CK, CK-MB).

3.3.2 Immunologische Parameter

Als immunologische Parameter wurden die drei vorherrschenden Immunglobulinklassen M, G und A, sowie die Komplementfaktoren C3 und C4 bestimmt. Weiterhin wurden Messungen des Gesamtkomplement und des Anteils, des über den alternativen Weg aktivierten Komplements durchgeführt.

Die Bindung der PNAK an die α 1-3Gal-Oberflächenstrukturen des xenogenen Transplantats ist der bedeutendste Schritt in der Einleitung der HAR. Die PNAK setzen sich zum größten Teil aus IgM und IgG-Antikörpern zusammen. Somit werden diese der zirkulierenden Blutmenge durch Bindung an die xenogenen Epitope entzogen. Dies lässt sich auch dadurch zeigen, dass sich in xenogenen Transplantaten immunhistochemisch, vor allem perivaskulär, große Mengen der verschiedenen Antikörper, vor allem des Typs IgM und IgG, anfärben lassen.

Wir verwenden somit die Höhe und die Geschwindigkeit des Immunglobulinspiegelabfalls als ein Marker für die hyperakute Abstoßungsreaktion.

In der 4h-DAF+ADA Versuchsgruppe wurden vor Beginn der Xenoperfusion, wie bereits im Material und Methoden Teil beschrieben, zwei Zyklen einer Immunadsorption durchgeführt. Mit diesem Vorgang werden über an eine Trägersubstanz gebundene polyklonale Antikörper gegen humanes IgG und IgM, unspezifisch Immunglobuline aus dem Serum gebunden und ihr Spiegel somit signifikant gesenkt.

3.3.2.1 Immunglobulin G (IgG)

Immunglobulin G ist mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kD das im menschlichen Serum am häufigsten vorkommenden Immunglobulin und macht ca. 80 % der Gesamtimmunglobuline aus (Harrison's Principles of Internal Medicine, 2003).

Die IgG-Ausgangsspiegel der einzelnen Versuchsgruppen wichen in unseren Messungen teilweise deutlich voneinander ab, da hier die interindividuelle Schwankungsbreite der Spiegel der Spender relativ breit ist. Dieses Phänomen kommt vor allem in der 4h-DAF-Gruppe zu tragen und macht hier die verhältnismäßig große Standardabweichung aus.

Der Ausgangsspiegel der 4h-DAF und 6h-DAF-Gruppen waren 11,76, bzw. 8,97 g/l. Unmittelbar nach Perfusionsbeginn kommt es zu einem raschen Abfall der Spiegel auf 8,03 bzw. 6,80 g/l nach 10 Minuten., die dann allerdings für den Rest der Perfusionszeit auf relativ konstantem Niveau bleiben. Dies entspricht einem Abfall des IgG-Spiegels um 32 % in der 4h-DAF und um 24 % in der 6h-DAF-Gruppe.

In der Immunadsorptionsgruppe (4h-DAF+ADA) zeigt sich erwartungsgemäß ein sehr viel deutlicherer Abfall der IgG-Spiegel, da hier ja Immunglobuline über die Immunadsorptionssäulen, wie zuvor beschrieben, entfernt worden sind.

Es liegt hier ein Ausgangswert von 9,46 g/l vor. Zehn Minuten nach Perfusionsbeginn finden sich nur noch 2,63 g/l IgG, was ungefähr 72 % des Ausgangswerts entspricht. Während des weiteren Verlaufs kommt es auch hier zu keinen weiteren größeren Schwankungen. In der Kontrollgruppe findet sich ein Ausgangsspiegel von 10,96 g/l, der innerhalb von 10 Minuten auf 6,6 g/l abfällt, was einem relativen Abfall um 39 % entspricht (Abb. 15).

In den drei Versuchsgruppen ist gegen Ende des Versuchs tendenziell noch eine leichte weitere Spiegelabnahme zu beobachten.

Den deutlichsten Abfall an Immunglobulinen finden wir erwartungsgemäß in der Gruppe, in der die Immunglobuline über die Therasorb®-Säulen entfernt worden sind (4h-DAF+ADA-Gruppe). Die drei anderen Gruppen liegen relativ nah beieinander, mit 39 % hat hier die Kontrollgruppe den zweithöchsten Spiegelabfall.

Die Gruppe 4h-DAF+ADA unterscheidet sich zu allen bestimmten Zeitpunkten signifikant von den Gruppen 4h-LR und 6h-DAF und bei 240 und 300 Minuten von der 4h-DAF-Gruppe.

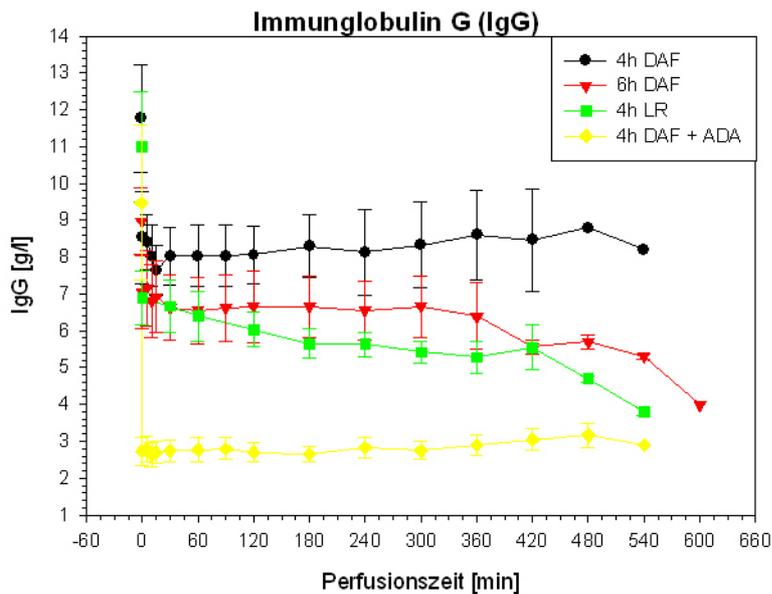


Abbildung 15: Das Immunglobulin IgG

In allen Gruppen kommt es zu einem Spiegelabfall innerhalb der ersten 10 Min. (4h-DAF 32 %, 6h-ADA 24 %, 4h-ADA+DAF 72 %, 4h-LR 39 %)

3.3.2.2 Immunglobulin M (IgM)

IgM stellt mit einem Molekulargewicht von 950 kD 5-10 % der menschlichen Immunglobuline dar. Es ist mit seiner Pentamer-Struktur hauptsächlich für die primäre, noch relativ unspezifische humorale Immunantwort verantwortlich, kann aber über verschiedene Signalwege die Entwicklung spezifischerer IgG-Antikörper fördern. Sein Anteil an den PNAK ist interindividuell stark schwankend (Roos, 2001). IgM-Antikörper binden die C1-Komponente des Komplements über die CH4-Domäne und sind somit ein wichtiger Aktivator der Komplementkaskade (Harrison's Principles of Internal Medicine, 2003).

Wie aus der graphischen Darstellung ersichtlich, ähnelt der Verlauf der IgM-Spiegel den Darstellungen der IgG-Meßwerte. In allen Gruppen kommt es, ausgehend von, vor allem in

der 4h-DAF-Gruppe, relativ variablen Ausgangswerten, zu einem schnellen und deutlichen Absinken der Spiegel. So fallen die IgM-Spiegel in der 4h-DAF-ADA Gruppe von initial 1,67 g/l auf 1,13 g/l nach 10 Minuten, entsprechend in der 6h-DAF von 1,18 auf 0,9 und 1,32 auf 0,55 g/l in der 4h-LR-Gruppe. Dies entspricht relativen Veränderungen um 32 % (4h-DAF), 23 % (6h-DAF) und 58 % (4h-LR). In der Immunadsorptionsgruppe zeigt sich ein IgM-Abfall von 1,13 auf 0,47 g/l, was 58 % entspricht. Der stärkste IgM-Abfall zeigt sich somit in der 4h-LR Gruppe und der 4h-DAF+ADA Gruppe. Die IgM-Verluste in der 4h-DAF und 6h-DAF-Gruppe sind deutlich geringer.

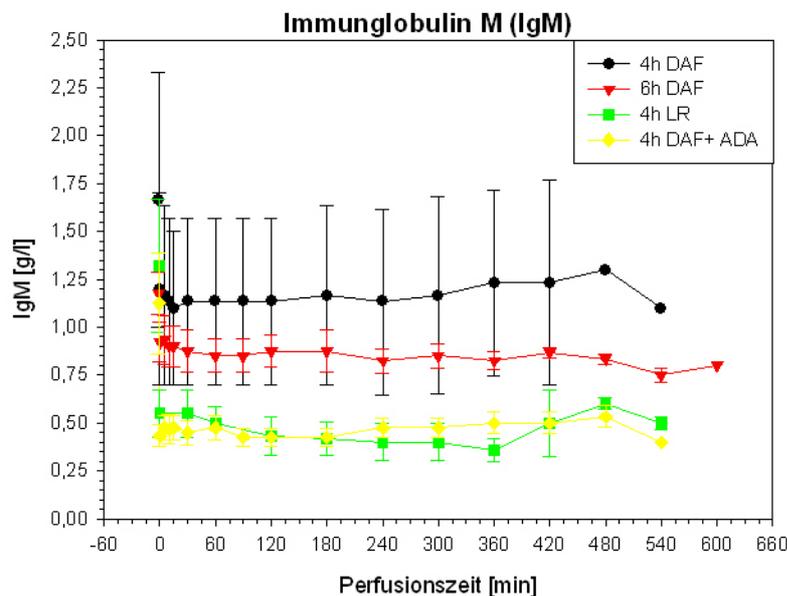


Abbildung 16: Das Immunglobulin IgM

Der Verlauf ähnelt dem der IgG-Spiegel, relative Veränderungen: 32 % (4h-DAF), 23 % (6h-DAF), 58 % (4h-LR) und 58 % (4h-DAF+ADA).

3.3.2.3 Immunglobulin A (IgA)

IgA macht ca. 13 % der Immunglobuline aus. Es liegt mit einem Molekulargewicht von 160-400 kD als Monomer und Dimer vor. Physiologisch ist seine Konzentration in den Schleimhautsekreten als Dimer am höchsten (Harrison's Principles of Internal Medicine, 2003).

Entsprechend den IgG und IgM-Verläufen kommt es auch hier unmittelbar nach Versuchsbeginn zu einem raschen Abfall der IgA-Spiegel auf ein Niveau, das dann den Rest des Versuchs über relativ konstant gehalten wird. So fällt der IgA-Spiegel in der 4h-DAF-Gruppe von initial 2,37 auf 1,67 g/l (29,6 %), in der 6h-DAF-Gruppe von 1,26 auf 0,9 g/l, was

28,6 % entspricht, in der 4h-DAF+ADA-Gruppe von auf 2,28 auf 0,9 g/l (60,5 %) und in der Kontrollgruppe fällt der IgA-Spiegel von 1,97 auf 1,32 g/l (33 %) (Abb. 17).

Zusammenfassend fällt auf, dass sich die Verläufe der drei Immunglobulinspiegel während der Versuche ähneln. Allen Gruppen ist gemeinsam, dass es innerhalb der ersten Versuchsminuten zu einem drastischen Absinken der Werte kommt, die so erreichten Werte jedoch über die weitere Zeitdauer hinweg verhältnismäßig konstant bleiben und es zu keinen weiteren signifikanten Schwankungen kommt.

Die, im Verhältnis zum Ausgangswert geringste Spiegelveränderung ist in allen Versuchen in der 6h-DAF-Gruppe zu beobachten, knapp gefolgt von der 4h-DAF-Gruppe. Der deutlichste Immunglobulinverlust ist stets in der Immunadsorptionsgruppe zu finden. Die Kontrollgruppe liegt zwischen den transgenen Gruppen mit und ohne ADA.

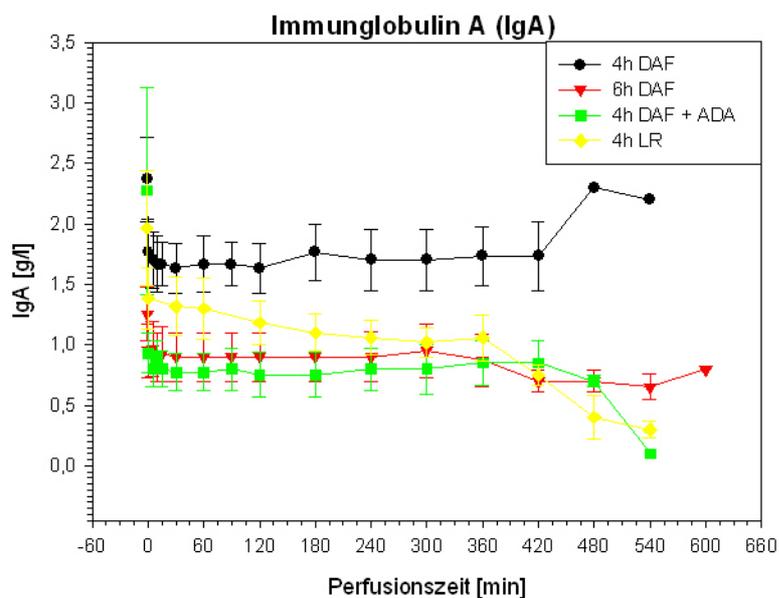


Abbildung 17: Das Immunglobulin IgA

Relative IgA-Spiegel-Veränderungen: Initial und nach 10 min 30 % (4h-DAF), 29 % (6h-DAF), 33 % (4h-LR) und 61% (4h-DAF+ADA).

3.3.2.4 Komplementfaktoren C3 und C4

Die Bestimmung von Komplementfaktoren wie C3 und C4 ist sonst ein vor allem in der Rheumathologie verwendetes Instrument in der Diagnostik der Aktivität von Autoimmunkrankheiten, bei denen es durch die Bindung von Autoantikörpern an

körpereigene Strukturen, oder Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen zu einer Komplementaktivierung kommt.

Die Aktivierung der Komplementkaskade, vor allem durch die am Xenotransplantat bindenden Antikörper, ist, wie beschrieben, einer der zentralen Schritte im Ablauf der HAR. Hierbei kommt es durch überschießende Aktivierung des Systems zu einem Verbrauch von Komplementfaktoren. So sind in immunhistochemischen Färbungen die angelagerten Komplementbestandteile im Xenotransplantat nachweisbar. Somit dienen sinkende Spiegel der Komplementfaktoren in unserem Modell als Parameter einer Abstoßungsreaktion.

C3 wird von der C3-Konvertase gespalten und nimmt dann an der Bildung der C5-Konvertase teil, die die Bildung des finalen Membranangreifenden Komplexes (MAC) einleitet. Es spielt somit sowohl im alternativen, als auch im herkömmlichen Aktivierungsweg eine zentrale Rolle.

C4, das von C1 gespalten wird, ist mit seinem C4b-Teil zusammen mit C2b an der Entstehung der C3-Konvertase beteiligt. Es spielt, soweit bekannt, im alternativen Aktivierungsweg keine Rolle.

Die Verlaufskurven von C3 und C4 sind sich sehr ähnlich. Von einem gewissen Ausgangsniveau aus kommt es innerhalb weniger Minuten zu einem deutlichen Abfall der C3 und C4-Mengen, die sich dann aber im weiteren Versuchsablauf nur noch geringfügig bewegen.

Von einem Ausgangswert von 0,99 aus fällt C3 in der 4h-DAF Gruppe auf 0,71 g/l nach 10 min (28 %) in der 6h-DAF Gruppe von 0,99 auf 0,74 g/l (25 %) und in der 4h-DAF+ADA Gruppe von 0,79 auf 0,37 g/l (53 %).

Einen ähnlichen Verlauf finden wir auch bei den C4-Messungen. C4 fällt in der 4h-DAF-ADA-Gruppe von 0,17 auf 0,072 g/l (58 %) nach 10 Minuten, in der 6h-DAF-Gruppe von 0,18 auf 0,13 g/l (27 %) und in der 4h-DAF-Gruppe von 0,17 auf 0,12 g/l (29 %).

Für die Kontrollgruppe wurden leider keine Messungen der Komplementfaktoren durchgeführt.

Die Unterschiede zwischen der Immunadsorptionsgruppe und den beiden Gruppen ohne Immunadsorption sind für die Gruppe 6h-DAF an allen bestimmten Zeitpunkten und für die 4h-DAF-Gruppe nach 120 und 240 Minuten signifikant.

Ergebnisse - Serologie

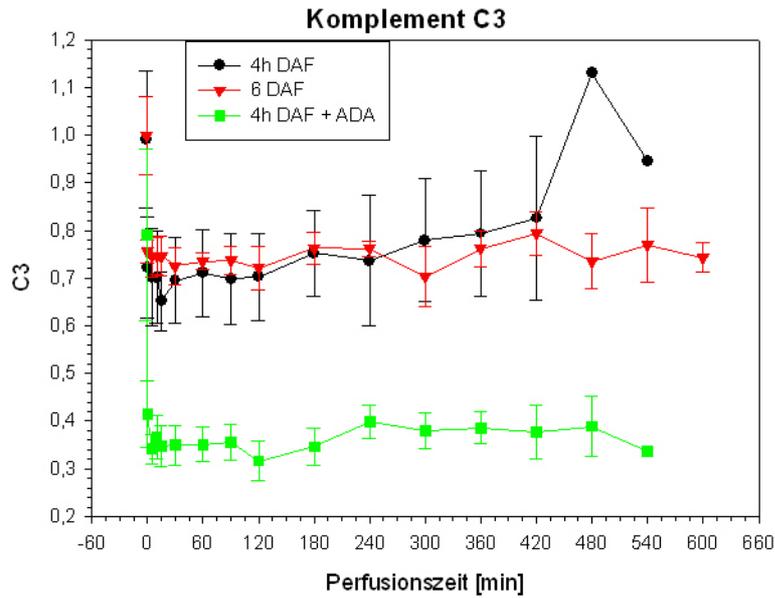


Abbildung 18: Der Komplementfaktor C3 [g/l]

In der 4h-DAF-Gruppe fällt der C3-Spiegel nach 10 Minuten um 28 %, in der 6h-DAF-Gruppe um 25 % und in der 4h-DAF+ADA Gruppe um 53 %.

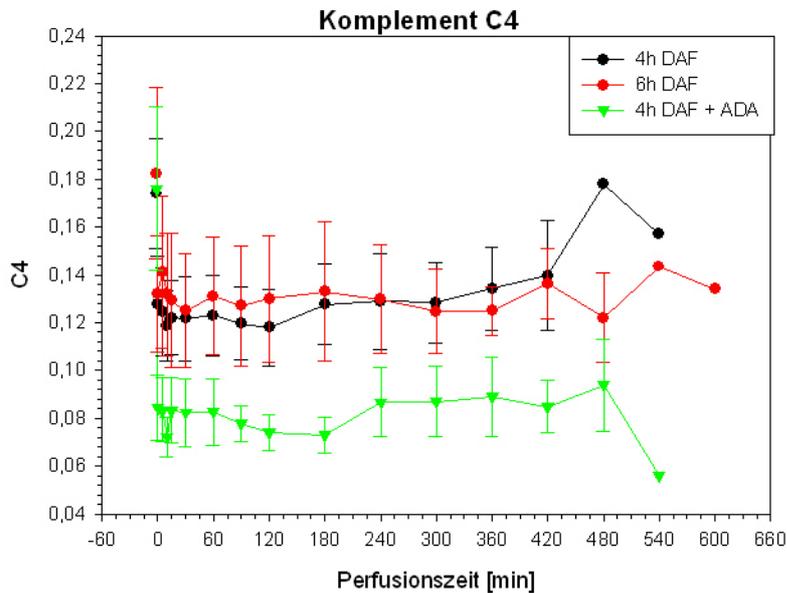


Abbildung 19: Der Komplementfaktor C4 [g/l]

Es finden sich entsprechende Ergebnisse im Vergleich zu den C3 Messungen (4h-DAF 29 %, 6h-DAF 27 %, 4h-DAF+ADA 58 % Abfall des C4-Spiegels).

3.3.2.5 Gesamt-Komplement und Alternativ-Komplement

In den Kurven des Gesamt- und Alternativ-Komplements lassen sich jeweils unter den drei Gruppen, wie aus den graphischen Darstellungen hervorgeht, keine relevanten Unterschiede feststellen (Abb. 20 und 21). Leider haben wir auch hier, aus labortechnischen Gründen, keine Werte für die Kontrollgruppe.

In der 4h-DAF-Gruppe fällt das Gesamt-Komplement von 1030 auf 405 U/ml (61 %) nach 10 Min, entsprechend von 1250 auf 420 U/ml (66 %) in der 6h-DAF-Gruppe und von 815 auf 327 U/ml (60 %) in der 4h-DAF+ADA-Gruppe. Generell kommt es hier zu einem Verlauf, den wir von den anderen immunologischen Parameteren her kennen: Ein initial steiler Abfall der Werte, dann aber Verbleiben auf relativ konstantem Niveau.

Die entsprechenden Werte nach 15 Minuten in der Bestimmung des Alternativ-Komplements lauten: 4h-DAF fällt von 102 auf 50 % (51 %), 6h-DAF von 124 auf 58 % (53 %) und 4h-DAF+ADA von 108,75 auf 30 % (72%). Im Vergleich zum Gesamt-Komplement fällt hier auf, dass die Werte nach dem initialen Abfall in allen Gruppen tendenziell langsam weiter abfallen.

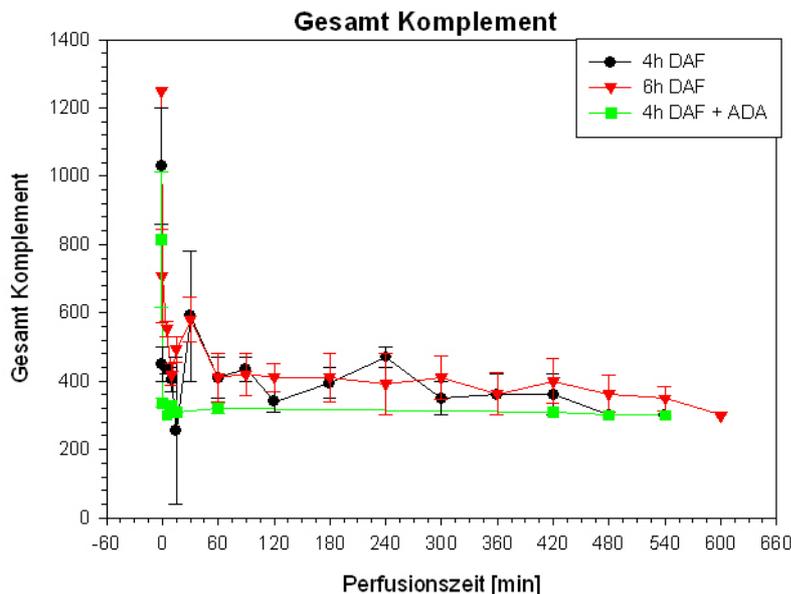


Abbildung 20: Das Gesamt-Komplement [U/ml]

Nach initialem Abfall erfolgt ein Stagnieren der Werte. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

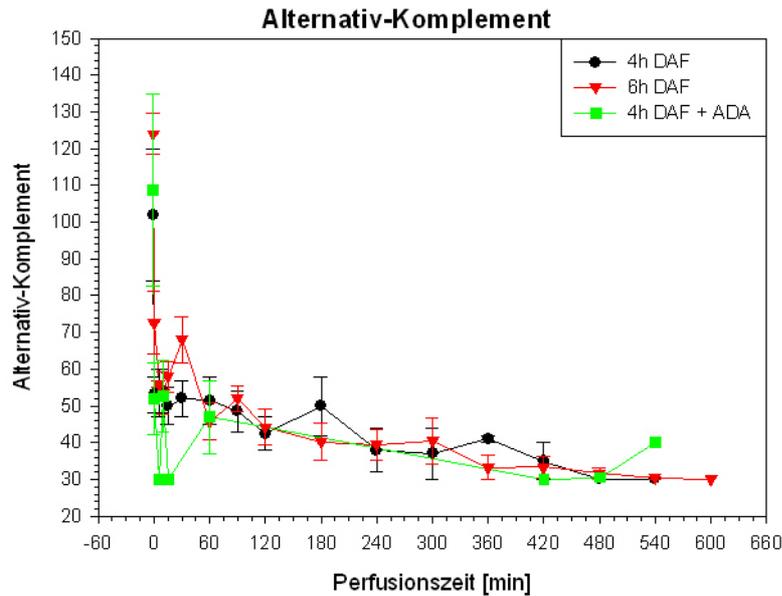


Abbildung 21: Das Alternativ-Komplement [%]

Nach einem anfänglich deutlichem Abfall folgt ein konstant langsames Weiterabsinken, aber ohne relevante Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.4 Histologie und Immunhistochemie

Die von uns durchgeführten H.E.-Färbungen, sowie immunhistochemischen Nachweise von Immunglobulinen und Komplementfaktoren wurden verwendet, um Unterscheidungen zwischen ischämie- und reperfusionsbedingten Schädigungen und HAR-bedingten Veränderungen des Gewebes, soweit möglich, treffen zu können. Zudem verwendeten wir BRIC 126-Antikörper, um die Expression von hDAF nachweisen zu können (siehe Abb. 24).

Auch nach einer Ischämiezeit von 4 bzw. 6 Stunden zeigen sich bei Färbungen an Aortenstücken mit einem für hDAF spezifischen Antikörper (BRIC 126) deutlich positive Ergebnisse, ohne quantitative oder qualitativen Unterschiede zu Vergleichsproben, die keiner Ischämiezeit ausgesetzt waren.

In der 6h-DAF-Gruppe zeigt sich im Vergleich zu den Gruppen mit kürzerer Ischämiezeit aber tendenziell eine Zunahme an intrazellulärem Ödem sowie vermehrt Einzelzellnekrosen und umschriebene perivaskuläre Hämorrhagien, was auf einen ausgeprägteren Ischämie- bzw. Reperfusionsschaden hinweist.

In den immunhistochemischen Färbungen auf Immunglobuline und Komplementbestandteile zeigen sich in allen Gruppen geringe Einlagerungen von Immunglobulinen. Komplementfaktoren lassen sich nur minimal anfärben.

In den H.E.-Färbungen lassen sich in allen transgenen Gruppen keine Zeichen einer HAR finden.

Zwischen den Herzen der transgenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe fallen außerdem bereits makroskopisch nach Versuchsende Unterschiede auf, die mit den eben erwähnten Befunden korrelieren.

So wirken die abgestoßenen Herzen der Kontrollgruppe insgesamt deutlich verquollener mit einer livid-dunkelroten Farbe, ebenso finden sich bereits makroskopisch sichtbar multiple dunkle Verfärbungen, die nekrotischen Arealen entsprechen. Im Gegensatz dazu wirken die Herzen der Versuchsgruppen mit geringerer Schwellung und Verfärbung deutlich weniger verändert. Dunkle Nekroseareale kommen zudem fast überhaupt nicht vor (siehe Abb. 22 und 23).

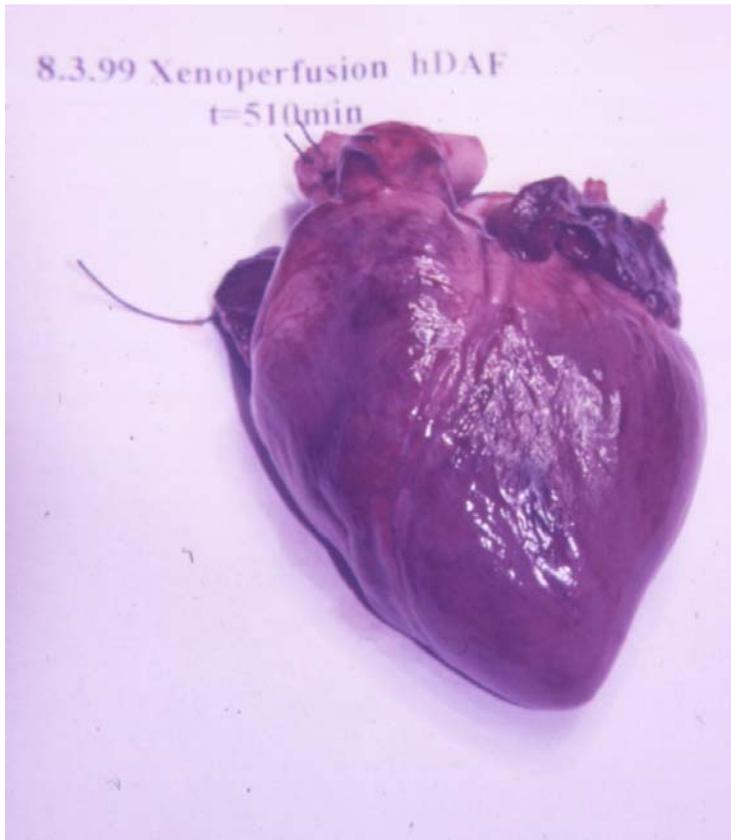


Abbildung 22: Ein hDAF-transgenes Herz der Gruppe 1 (4h-DAF) nach 8½ h Xenoperfusion

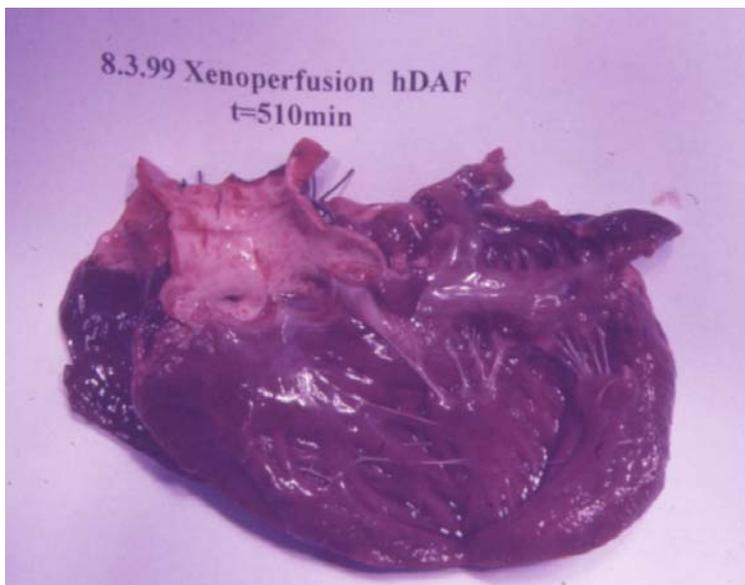


Abbildung 23: Ein Herz der Gruppe 1(4h-DAF) nach 8½ h Xenoperfusion

Das Herz zeigt auch makroskopisch nach 8½ h keine Zeichen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

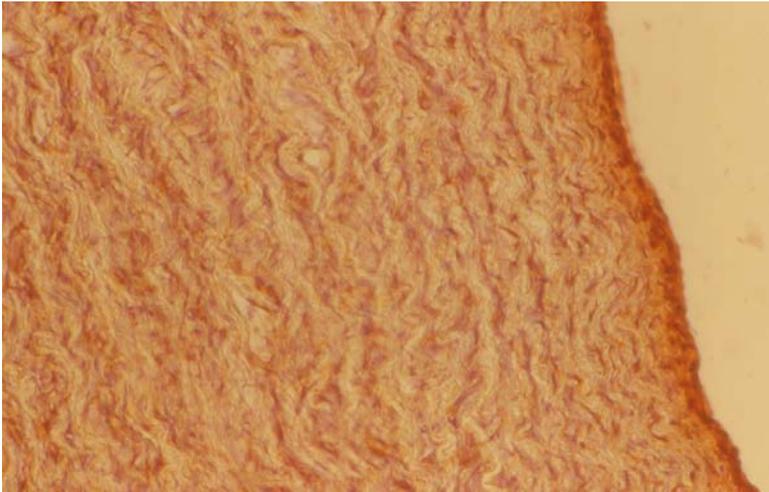


Abbildung 24: Eine hDAF-Färbung der Aortenwand (Vergr. 150mal)

Bei Anfärbung von hDAF im Bereich der Aortenwand unmittelbar nach Perfusionsende mittels dem BRIC 126-Antikörper findet eine Anfärbung vor allem am Endothel statt.

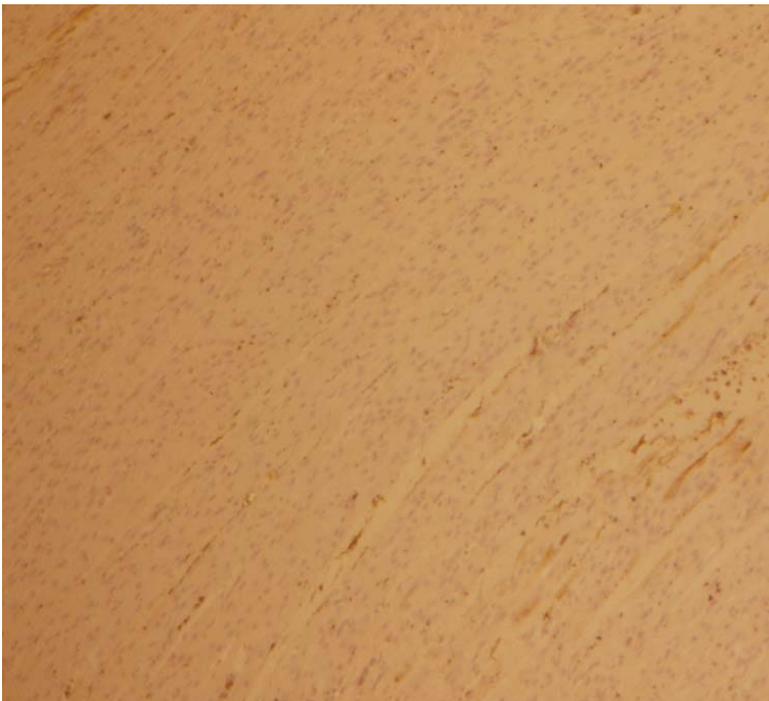


Abbildung 25: IgG-Färbung von Gewebe aus dem linken Ventrikel (Verg. 100mal).

Bei Anfärbung von IgG-Ablagerungen in einem hDAF Herzen der Gruppe 1 (4h-DAF) nach Versuchsende kommen vor allem perivaskulär leichte IgG-Ablagerungen vor.

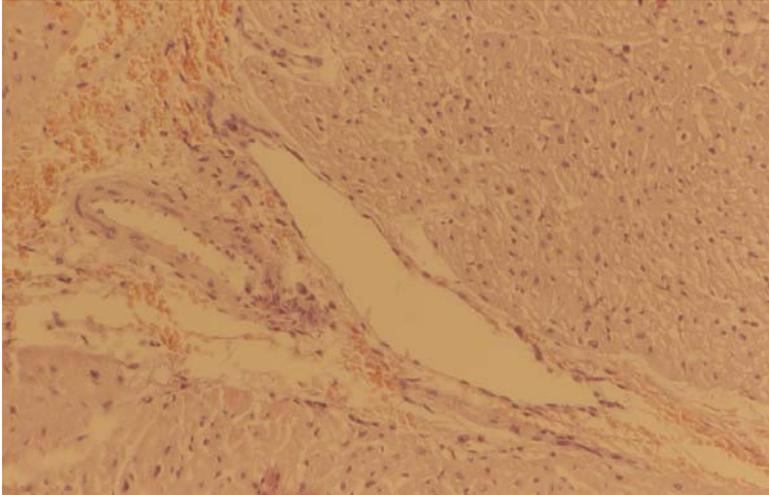


Abbildung 26: Eine H.E.-Färbung von Myokard und Koronargefäßen (Verg. 100mal).

Die H.E.-Färbung eines hDAF-6h-Herzens nach Versuchsende zeigt eine kleine Koronararterie angeschnitten, sowie eine größere Vene und mehrere Erythrozyten. Außer einer leichten ödematösen Auflockerung des Gewebes sieht man keine Anzeichen für eine HAR.

4 Diskussion

4.1 Die ex-vivo Perfusion im Working-Heart-Modell

Wir haben für unsere Arbeit ein ex-vivo-Perfusionsmodell zur Untersuchung der hyperakuten Abstoßung und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung gewählt und dafür in unseren Versuchen ein sogenanntes modifiziertes Langendorff-Working-Heart-Modell verwendet.

Auf der Grundlage des von Langendorff 1895 entwickelten Perfusionsmodells für Herzen, das allerdings nur eine passive retrograde Perfusion der Koronarien bei leeren Ventrikeln ermöglicht, ist von Forty et al. ein Modell beschrieben worden, das die Verwendung eines wirklich gegen eine Nachlastsäule arbeitenden, sich über die eigene Kontraktion mit Blut versorgenden Herzens, ermöglicht (Forty 1993). Auf dieser Basis ist das in unseren Versuchen verwendete Perfusionsmodell am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität für unsere Zwecke weiterentwickelt worden (Suckfüll 1994).

Mit diesem Modell ist es möglich, eine Xenotransplantation zwischen Schweineherz und Mensch zu simulieren und ausführliche hämodynamische, serologische und histologische Daten zu gewinnen.

Die Versuche sind aufgrund des relativ einfachen Versuchsaufbaus gut reproduzierbar und operationstechnische und empfängerbedingte Schwierigkeiten und Komplikationen, die nichts mit der eigentlichen Abstoßungsreaktion zu tun haben, aber bei Schwein-auf-Affe Versuchen häufig große Schwierigkeiten machen, sind fast auszuschließen.

Zudem ist es unter den Working-Heart-Bedingungen möglich, direkte Aussagen über Veränderungen der hämodynamischen Parameter im Verlauf einer Abstoßungsreaktion zu treffen.

Im Gegensatz zum Langendorff-Modell, wo die Versorgung des Herzens über eine passive Koronarperfusion erfolgt, kann man im Working-Heart-Modell zusätzlich einen Endpunkt und damit eine Gesamtlaufzeit festlegen: nämlich dann, wenn das Herz nicht mehr in der Lage ist, einen für seine eigene Versorgung notwendigen Druck aufzubauen.

Trotz der genannten Vorzüge hat das Modell aber auch signifikante Limitationen.

So ist das Herz von anderen Organen isoliert und sonst vorhandenen Mechanismen der renalen und hepatischen Clearance entzogen. Durch Zugabe von Pufferlösung, Glucose, Insulin und Regulation der Blutgase ist nur eine grobe Regulation des Milieus möglich.

Zudem weiß man aus allogenen Perfusionsversuchen, dass es auch hier nach einigen Stunden zu einem Abfall der hämodynamischen Parameter und zu einem Anstieg von Entzündungsparametern wie IL-6 und TNF- α kommt. Folge ist ein Pumpversagen, am ehesten als Ausdruck einer allgemeinen systemischen Aktivierung von Endothelzellen, dem Komplementsystem und Granulozyten, ausgelöst durch die extrakorporale Zirkulation, zunehmende Metabolisierung essentieller Blutbestandteile und eine fehlende Clearance toxischer Abbauprodukte (Dunning 1994).

Ein weiterer Nachteil ist, dass die zirkulierende Blutmenge, aufgrund der notwendigen Beschränkung auf einen humanen Spender, in unseren Versuchen auf 550 ml beschränkt war. Die Menge der vorhandenen PNAK wäre somit eher als niedrig anzusehen, was eventuell eine verminderte Virulenz der HAR zur Folge haben könnte.

Weiterhin ist in unserem Modell die Zugabe von Heparin zur Antikoagulation notwendig. Es ist jedoch berichtet worden, dass Heparin einen hemmenden Einfluß auf die Komplementaktivierung, vor allem über den alternativen Schenkel, haben kann (Ekre 1985).

Allerdings wird Heparin heutzutage auch bei der allogenen Herztransplantation routinemäßig verwendet.

4.2 Diskussion der hämodynamischen Ergebnisse

Bei der Betrachtung der hämodynamischen Messergebnisse sowie der Gesamtlaufzeit und der Gewichtszunahme fällt auf, dass die drei transgenen Versuchsgruppen der nicht transgenen Kontrollgruppe in allen Belangen überlegen sind.

Die Herzen der Kontrollgruppe erreichen die kürzeste Laufzeit mit der dabei relativ am ausgeprägtesten Gewichtszunahme und zeigen dabei die geringste Pumpfunktion.

Ab der 60. Minute kommt es zum Beispiel zu einem raschen, konstanten Abfall des Stroke-Work-Index (SWI) und des Herzzeitvolumens, was das Fortschreiten der HAR widerspiegelt.

Im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion kommt es, ausgelöst durch die Bindung der PNAK auf dem Endothel der Schweineherzen, zu einer Komplement- und Endothelzellaktivierung sowie im weiteren zur Entwicklung eines interstitiellen Ödems mit Gefäßverschlüssen, Thrombosen und schließlich zu Parenchymnekrosen (Platt 1991).

Dementsprechend finden wir in unseren transgenen Gruppen eine geringer ausgeprägte relative Gewichtszunahme sowie in allen Gruppen deutlich bessere hämodynamische Verläufe, was dafür spricht, dass hier eine HAR verhindert werden kann. Es kommt zu weniger ödematöser Einlagerung und die Pumpfunktion bleibt länger erhalten, bei signifikant längerer Laufzeit.

In der am kürzesten laufendenden transgenen Gruppe (4h-DAF) liegt die durchschnittliche Laufzeit immer noch 25 % über der Kontrollgruppe; in der Gruppe G2 (6h-DAF), die durchschnittlich am längsten pumpt, sind es sogar 33 %.

Beim Vergleich der einzelnen transgenen Gruppen untereinander fällt auf, dass die Versuchsgruppen mit 4 Stunden Ischämiezeit (4h-DAF) und 4 Stunden Ischämiezeit und Immunadsorption (4h-DAF+ADA) bei fast allen hämodynamischen Parametern die höchsten Messwerte erzielen, gefolgt von den Herzen mit 6 Stunden kalter Ischämie (6h-DAF).

In Bezug auf die hämodynamische Funktion im Perfusionsversuch scheint die Durchführung von 2 Zyklen einer Immunadsorption keinen Effekt zu erzielen. Die 4h-ADA+DAF Gruppe erreicht zwar die höchsten Herzzeitvolumina (HZV), hier ist jedoch zu beachten, dass die Herzen in dieser Versuchsgruppe auch überdurchschnittlich groß gewesen sind. Bei Betrachtung des SWI, der auch die Herzgröße mit einbezieht, erreicht die 4h-DAF Gruppe den höchsten Kurvenverlauf. Die Gruppe mit der längsten Ischämiezeit zeigt die schwächste Pumpfunktion in Bezug auf SWI, HZV und spezifischen Koronarfluß, was auf eine zunehmende myokardiale Schädigung bei weiterer Ausdehnung der Ischämiezeit schließen lässt.

Betrachtet man den spezifischen Koronarwiderstand, so fällt auf, dass es bei allen Gruppen zuerst bis ca. 120 Minuten nach Versuchsbeginn zu einer Abnahme des Widerstandes kommt, ab diesem Zeitpunkt nimmt der Koronarwiderstand bis Versuchsende kontinuierlich zu. Entsprechend spiegelbildlich verhält sich in allen Versuchsgruppen der Koronarfluß.

Ähnliche Beobachtungen waren bereits in früheren Xenoperfusionsversuchen von Schmoeckel et al. gemacht worden. Eine initial bestehende Vasokonstriktion aufgrund

Hypothermie und initial erhöhte Endothelinspiegel, eventuell als Ausdruck eines Reperfusionsschadens, könnten hierfür in Betracht kommen (Schmoeckel 2000).

In allen Hämodynamikkurven fällt eine scheinbare Wiederannäherung der Kurven der transgenen Gruppen ab der ca. 400. Minute auf. Dies entspricht jedoch nicht den tatsächlichen Verhältnissen, sondern ist Ergebnis einer statistischen Verzerrung, die darauf beruht, dass zu einem so späten Versuchszeitpunkt in vielen Gruppen bereits Versuche abgebrochen sind und damit präterminal schlechte Leistungsparameter plötzlich nicht mehr in die Statistik mit eingehen.

4.3 Diskussion der serologischen Ergebnisse

Bei der Auswertung der Messergebnisse der Serumenzyme CK, CK-MB, LDH und GOT zeigt sich bei allen Parametern dasselbe Bild.

In unseren Versuchen haben wir diese Enzyme als Parameter einer fortschreitenden Abstoßungsreaktion mit Zelluntergang, Parenchymnekrosen und Hämolyse gewertet.

In der nicht transgenen Gruppe der Landrasseschweine kommt es bei allen bestimmten Enzymen zu einem signifikant schnelleren und ausgeprägteren Anstieg der Messwerte, mit Maxima, die teilweise bis zu dreimal höher sind (z.B. bei der CK) als bei den transgenen Gruppen.

Dieser ausgeprägte Anstieg, ausgelöst durch Freisetzung der Enzyme aus lysierten Myokardzellen ist ein deutliches Merkmal einer HAR.

Dementsprechend findet sich in den transgenen Gruppen ein deutlich weniger ausgeprägter Enzymanstieg. Auffällig ist hier jedoch, dass die Gruppe mit einer Ischämiezeit von 6 Stunden (6h-DAF) bei allen Enzymen deutlich höhere Werte erreicht als die beiden Gruppen mit nur 4 Stunden Ischämiezeit (4h-DAF und 4h-DAF+ADA).

Die verlängerte Ischämiezeit führt also zu einem stärkeren Zelluntergang im Vergleich zu einer kürzeren Ischämiezeit. Wir führen diese Beobachtung auf eine stärkere ischämiebedingte Zellschädigung im Sinne eines Reperfusionsschadens zurück. Daß dennoch bessere Ergebnisse erzielt werden als in der Landrassengruppe, spricht für die noch vorhandene Funktionsfähigkeit des hDAF-Proteins auch nach längerer Ischämiezeit.

Im Vergleich der zwischen der 4h-DAF Gruppe und der Gruppe mit der zusätzlichen Immunadsorption 4h-DAF+ADA fällt kein wesentlicher Unterschied auf.

Im Hinblick auf eine Zellschädigung, scheint die Immunadsorption somit keinen zusätzlichen Benefit zu bringen.

Der in allen transgenen Gruppen auftretende signifikante Anstieg der Enzyme ist unserer Ansicht nach Ausdruck einer Myokardschädigung durch Ischämie und Reperfusion sowie Ausdruck der allgemeinen Aktivierung durch die fehlende Clearance und Hämolyse bei extrakorporaler Zirkulation, was auch die histologische Untersuchung zeigt, in der sich hier keine Anzeichen einer HAR finden.

Betrachtet man die Verläufe der Immunglobuline fällt auf, dass es bei allen Gruppen zu einem raschen initialen Abfall der Spiegel innerhalb weniger Minuten kommt, die dann aber im weiteren Verlauf konstant bleiben. Der jeweils geringste Abfall der Ig-Spiegel findet sich in der transgenen Gruppe mit 4 Stunden Ischämiezeit. Dies bestärkt unsere Annahme, daß sich durch das transgene humane DAF-Protein auch nach einer Ischämiezeit von 4 Stunden eine HAR verhindern lässt. Der Spiegelabfall könnte damit erklärt werden, dass es zu einer Bindung von Antikörpern auf dem Transplantat kommt oder die Antikörper durch unter Ischämieeinfluß abgelöste, frei zirkulierende α 1-3Gal-Epitope abgebunden werden.

Dementsprechend entgegengesetzt sehen die Verläufe in der Kontrollgruppe aus. Hier kommt es zu einem sofortigen, ausgeprägtem Abfall der Immunglobuline, was zusammen mit der abnehmenden Pumpfunktion für eine HAR spricht. Die Ig binden auf den α 1-3Gal-Epitopen und werden somit der Zirkulation entzogen. Dafür spricht auch der besonders ausgeprägte Abfall bei den IgM-Antikörpern, die einen Großteil der xenoreaktiven Antikörpern ausmachen.

In den Gruppen mit Immunadsorption zeigt sich erwartungsgemäß bereits vor Beginn der Perfusion ein deutlicher Rückgang der Spiegel, was die Effektivität der Adsorptionssäulen beweist. Nach nur zwei Zyklen kommt es zu einem Abfall der IgG-Spiegel um 72% und der IgM und IgA-Spiegel um 58 % bzw. 61 %, was eine etwas geringere Effektivität der Immunadsorption im Vergleich zu unseren Versuchen mit Cynomolgusaffen und Pavianen darstellt (Brenner 2003).

Unklar bleibt allerdings, wieso es auch in der Gruppe mit 6 Stunden Ischämiezeit zu einem, im Vergleich zur 4h-DAF-Gruppe, so ausgeprägten IgG und IgM-Abfall kommt.

Für die Messungen der Komplementfaktoren C3 und C4 liegen uns leider nur Messungen aus den transgenen Versuchsgruppen vor. Es ist somit leider nicht möglich aus dem Abfall, der in allen Gruppen auftritt, Aussagen bezüglich einer HAR oder deren Verhinderung zu machen, da keine Vergleichswerte aus der nicht transgenen Versuchsgruppe vorliegen. Nach den getroffenen Beobachtungen bei den anderen immunologischen Parametern wäre jedoch in dieser Gruppe ein noch deutlich ausgeprägter Abfall zu erwarten. Der Komplementverbrauch in den transgenen Gruppen wäre somit eher als Ausdruck der allgemeinen Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation zu sehen.

In der Immunadsorptionsgruppe hingegen kommt es im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen zu einer im Verhältnis ca. doppelt so hohen Reduktion der Komplementfaktoren.

Dies könnte durch eine Bindung von Komplementfaktoren an in der ADA-Säule bereits gebundene Antikörper bedingt sein und dürfte den Effekt der Immunadsorption auf die Abmilderung einer HAR verstärken.

4.4 Diskussion der histologischen Ergebnisse

Auch nach einer Ischämiezeit von 4 bzw. 6 Stunden zeigten sich bei Färbungen an Aortenstücken mit einem für hDAF spezifischen BRIC 126-Antikörper deutlich positive Ergebnisse, ohne quantitative oder qualitativen Unterschiede zu Vergleichsproben, die keiner Ischämiezeit ausgesetzt waren.

Dies spricht dafür, dass die transgenen hDAF-Proteine auch nach längerer Ischämiezeit noch unverändert physiologisch endothelständig sind und sich somit nicht abgelöst oder signifikant verändert haben.

Für eine auch nach Ischämiezeit noch vorhandene Funktion des hDAF spricht auch, dass sich in den H.E.-Färbungen nach 4 und 6 Stunden keine Zeichen einer HAR finden.

In der 6 Stunden Ischämiegruppe zeigt sich aber tendenziell eine Zunahme an intrazellulärem Ödem sowie vermehrt Einzelzellnekrosen und umschriebene perivaskuläre Hämorrhagien, was auf einen verstärkten Ischämie- bzw. Reperfusionsschaden hinweist.

In den immunhistochemischen Färbungen auf Immunglobuline und Komplementbestandteile zeigen sich in allen Gruppen geringe Einlagerungen von Immunglobulinen. Komplementfaktoren lassen sich nur minimal anfärben. Auch diese Ergebnisse sprechen

dafür, dass durch das hDAF eine HAR, auch nach einer Ischämiezeit von 4 und 6 Stunden, effektiv verhindert worden ist.

Das sich auch in der Immunadsorptionsgruppe interstitielle Einlagerungen von Immunglobulinen, insbesondere IgM finden, spiegelt die Tatsache wieder, dass sich in dieser Gruppe die Immunglobulinspiegel durch die Immunadsorption nur um ca. 70 % haben senken lassen und es somit noch zu einer Ablagerung kommen konnte.

4.5 Gefahr xenogener Infektionen (Xenozoonose)

Es ist eine auch aus der Allotransplantation bekannte Problematik, dass über Transplantate Infektionskrankheiten übertragen werden können. Gerade bei immunsupprimierten Patienten können daraus letal verlaufende Infektionen entstehen (Nalesnik 1994).

Bei der Übertragung infektiöser Erreger über Speziesgrenzen hinweg, tritt zusätzlich das Problem auf, dass Erreger, die in ihrem ursprünglichen Wirtsorganismus keinen oder nur geringe Krankheitssymptome hervorrufen, plötzlich große Pathogenität entwickeln können. Ob und wie sehr sich die Pathogenität eines Erregers beim Sprung über die Speziesgrenze hinweg verändert, ist aber nicht vorauszusagen.

Unter Zoonose versteht man somit eine Krankheit, die durch Übertragung eines tierischen Pathogens auf den Menschen, unter natürlichen Umständen entstanden ist. Eine infektiöse Erkrankung, die durch die Übertragung xenogenen Gewebes erworben wurde, wird als Xenozoonose oder Xenose bezeichnet (Michaels 1994).

Fishman und Patience nennen eine weitere Reihe von Faktoren, die zudem das Infektionsrisiko in der Xenotransplantation erhöhen könnten (Fishman/ Patience 2004):

- Das Xenotransplantat dient als Reservoir für die Spendererreger, die dem Immunsystem des Empfängers dadurch entzogen sind.
- Über das Verhalten dieser Erreger in immunsupprimierten Patienten ist nichts bekannt.
- Neue klinische Symptome, die durch solche Infektionen verursacht werden, können nur schwer als solche erkannt werden.
- Fehlen spezifischer laboratorischer Tests für solche Infektionen.

- Inkompatibilitäten zwischen den MHC-Antigenen könnten die Effektivität der Immunantwort des Empfängers reduzieren.

Beispiele für derartige Erreger von Zoonosen sind der Ebola, der Marburg, oder der HI-Virus, die ursprünglich alle von Affen auf den Menschen übertragen worden sind aber auch das Hanta-Virus, ursprünglich bei Mäusen auftretend, SARS (severe acute respiratory syndrome), ausgelöst durch einen Coronavirus und wohl auch BSE (Fishman/ Patience 2004).

Hierin wird auch die weitergehende Problematik der Xenozoonosen erkennbar. Es handelt sich nicht nur, wie bei der Allotransplantation, um ein weiteres Risiko, das der Empfänger zu tragen hat, sondern es könnten Auswirkungen für die gesamte Menschheit entstehen. Falls sich die Viren so weiterverändern, dass eine Übertragung von Mensch zu Mensch möglich wird, besteht die Gefahr großer Epidemien, räumlich und zeitlich eng begrenzt wie bei den Ebola-Ausbrüchen in Zentralafrika, aber auch weltweit verbreitet und mit ungeheuren Auswirkungen, nicht nur medizinisch, sondern auch ganze Sozial- und Wirtschaftssysteme bedrohend, wie der HI-Virus in Afrika.

Vom Schwein ist bekannt, dass es zahlreiche bakterielle, parasitäre, protozoäre, fungale und virale Zoonosen übertragen kann. Hierzu gehören, neben vielen anderen, die Brucellose und Leptospirose, Anthrax, die Aspergillose, und Influenza- und Herpesviren wie EBV und CMV (Cooper 1991).

Der porcine Cytomegalievirus (PCMV) kann zum Beispiel im Schwein-Pavian-Modell Transplantatinfektionen verursachen und zur Endothelschädigung und Entstehung einer Verbrauchskoagulopathie beitragen (Gollackner 2003).

Dennoch sollten diese bekannten Zoonosen bei der Xenotransplantation nur eine geringe Rolle spielen. Denn, anders als bei der Allotransplantation, besteht bei der Xenotransplantation die Möglichkeit, sämtliche bekannte Infektionen vorher weitgehend auszuschließen.

Dies ist möglich durch die Aufzucht gnotobiotischer Schweine, das heißt vollkommen erregerefreier Tiere. Nachdem die Tiere unter aseptischen Bedingungen operativ zur Welt gebracht werden, werden sie in keimfreien Boxen isoliert aufgezogen und mit speziellem, sterilem Futter ernährt (Onions 2000). Zudem können routinemäßige Screening-Untersuchungen durchgeführt werden. Somit sollte das Problem der Übertragung von

Infektionen bei der Xenotransplantation, im Gegensatz zur Allotransplantation, weniger Schwierigkeiten aufwerfen.

Die Übertragung von endogenen Retroviren, das heißt Viren, die ins Genom ihrer Wirtsrace permanent integriert sind und von der Mutter an das Kind weitergegeben werden, lässt sich so jedoch nicht ausschließen. Sie sind bei Säugetieren weit verbreitet und verursachen bei ihrer Wirtsrace im Regelfall keine Krankheiten, können jedoch teilweise die Zellen anderer Spezies infizieren (Cooper 1991).

Bei Schweinen sind zur Zeit drei eng verwandte Typen von endogenen porcinen Retroviren bekannt (PERV A, B, C), die infektiöses Potential besitzen. Zwei davon können menschliche Zellen *in vitro* infizieren (Patience 1997). Ob diese Infektion einen Krankheitswert hat und ob sie auch *in vivo* stattfinden würde, ist zur Zeit noch unklar.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist jedoch weder eine *in-vivo*-Infektion menschlicher Zellen bekannt noch eine Schweine betreffende Krankheit, die durch diese Gruppe von PERV verursacht worden wäre.

Außerdem konnte in einer ausführlichen Untersuchung von 160 Patienten, die in der Vorgeschichte vitales Schweinegewebe oder eine extrakorporale Organperfusion erhalten hatten, keine Infektion nachgewiesen werden (Paradis 1999).

Zudem stellt eine neuere Studie die Möglichkeit in Aussicht, PERV-freie Schweine zu züchten (Clark 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Risiko der speziesübergreifenden Infektion durch die Xenotransplantation noch nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden kann und weitere Untersuchungen nötig sind. Hierin kann jedoch kein Grund gesehen werden, die Xenotransplantation im Gesamten zu verwerfen.

So wird eine engmaschigste Überwachung der Transplantatempfänger nötig sein. Hierzu müssen internationale Abmachungen und Übereinkünfte getroffen werden, die helfen ein standardisiertes System der Nachsorge festzulegen, Screening-Test zu etablieren und allgemein zugänglichen Datenbanken zu schaffen, in denen alle Erfahrungen gesammelt werden können. Erste Vorstöße werden hierzu bereits, unterstützt von OECD und WHO in der Consultation on Xenotransplantation Surveillance gemacht.

5 Zusammenfassung

Der zunehmende Bedarf an Spenderherzen, bei einem parallel dazu eher sinkenden Angebot an Spenderherzen, hat in den letzten Jahren die Suche nach Alternativen zur Allotransplantation verstärkt. Die Xenotransplantation als Ausweg aus dieser Misere ist hier ein Forschungsschwerpunkt, wobei die Verwendung von Schweineorganen zur Zeit allgemein als am vielversprechendsten angesehen wird.

Das initiale Problem stellt hier jedoch das Problem der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) dar, die zwischen diskordanten Spezies auftritt. Grundlage der HAR ist eine Antikörper vermittelte Immunreaktion des Empfängers (Menschen bzw. Primaten) gegen bei allen anderen Säugetieren ubiquitär vorkommende Oberflächenantigene, die eine komplementvermittelte Zerstörung des transplantierten Organs innerhalb weniger Stunden zur Folge hat.

Mit Maßnahmen wie der Immunadsorption zur Reduktion dieser Antikörper einerseits und andererseits Modifikation der Transplantatoberfläche durch Herstellung transgener Schweine (z.B. für hDAF), ist es jedoch in letzter Zeit gelungen, die HAR effektiv zu verhindern.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß unterschiedlicher Ischämiezeiten und der Immunadsorption auf die Herzfunktion und Abstoßungsreaktion in einem Working-Heart-Perfusionsmodell zu untersuchen.

Hierzu wählten wir drei Versuchsgruppen (je n=4) von hDAF-transgenen Schweineherzen und perfundierten sie mit Humanblut nach einer Ischämiezeit von 4 Stunden (G1), 6 Stunden (G2) bzw. nach einer Ischämiezeit von 4 Stunden und zusätzlich 2 Zyklen einer Immunadsorption (G3). Als Kontrollgruppe dienten die Herzen einer Gruppe von 6 Landrasseschweinen, bei denen eine Ischämiezeit von 4 Stunden eingehalten worden war (G4).

Bei allen transgenen Herzen konnte auch nach der Ischämiezeit eine HAR im Gegensatz zu den Landrasseschweinen verhindert werden.

Das transgene hDAF-Protein konnte auch nach vier- und sechsständiger Ischämiezeit noch auf dem Endothel nachgewiesen werden und die HAR somit verhindern.

Zusammenfassung

Nach einer Ischämiezeit von 4 Stunden zeigte sich eine noch gute Pumpfunktion und ein nur moderater Anstieg der Herzenzyme, was z.B. den Transport eines Xenotransplantats über kurze Strecken denkbar machen würde.

Nach 6 Stunden Ischämiezeit zeigte sich allerdings eine schlechtere Herzfunktion (ausgedrückt durch den SWI) und deutlich höhere Parameter der myozytären Schädigung, was wir als Ausdruck eines ausgeprägten Ischämie- bzw. Reperfusionsschadens sehen.

Eine Ischämiezeit über 4 Stunden hinaus sollte also vermieden werden, da dies zu einer fortschreitenden myozytären Schädigung führt.

Im Working-Heart-Modell zeigte sich hinsichtlich der Pumpfunktion, den serologischen Parametern myozytärer Schädigung oder der Histologie kein signifikanter zusätzlicher Benefit hinsichtlich einer zusätzlichen Immunadsorption.

Nachdem es nun möglich geworden ist, die HAR zu überwinden, muß sich in weiteren Untersuchungen zeigen, ob es auch gelingt, die nicht unmittelbar PNAK-vermittelten, verzögert ablaufenden Abstoßungsreaktionen zu kontrollieren, um die Xenotransplantation Wirklichkeit werden zu lassen.

6 Ausblick

Angesichts der in den letzten Jahren rasant fortschreitenden Entwicklung im Bereich der kardialen Xenotransplantation stellt sich die Frage, wann der erste klinische Einsatz eines Schweineherzens bei einem humanen Patienten erfolgt und um was für ein Patientenkollektiv es sich optimalerweise handeln würde.

Im Jahr 2000 sind von einem Komitee der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation, das sich speziell mit Fragen der Xenotransplantation beschäftigt hat, eine Reihe von Vorschlägen gemacht worden, unter welchen Bedingungen erste klinische Studien zur kardialen Xenotransplantation in Frage kämen.

Es wird verlangt, dass in Primatenversuchen eine Mehrheit der Tiere eine Mindestüberlebensdauer von 3 Monaten erreicht. Mehrere Tiere sollten zudem mindestens 6 Monate überlebt haben und die gewählten immunsuppressiven Regime müssten ohne gravierende Nebenwirkungen sein (Cooper 2000).

Aktuellste Untersuchungen machen Hoffnung, dass diese Voraussetzungen in naher Zukunft erreicht werden könnten.

So berichtet McGregor et al. von einer durchschnittlichen Überlebensrate von 96 Tagen (max. 137 Tage) bei heterotop in Paviane verpflanzten CD46-transgenen Schweineherzen. Die PNAK des Empfängers konnten zusätzlich durch Zugabe eines α 1-3Gal-Konjugats erfolgreich geblockt werden (McGregor 2005).

Zudem liegen erste erfolversprechende Ergebnisse mit α 1-3Gal-knock-out-Schweinen vor. Bei ebenfalls heterotoper Transplantation konnte hier eine mittlere Überlebenszeit der Transplantate von 78 Tagen (max. 179 Tage) erreicht werden (Kuwaki 2005).

Bei beiden Versuchen war jedoch eine thrombotische Mikroangiopathie mit sukzessiver Ischämie für das Transplantatüberleben letztendlich limitierend.

Orthotope Studien stehen hier allerdings noch aus.

In unserer eigenen Gruppe konnte bei Verwendung von orthotop in Paviane verpflanzten hDAF transgenen Herzen bei einer kleinen Gruppe ein mittleres Überleben von 14,6 Tagen (max. 20 Tage) erreicht werden (Brenner 2005).

Angesichts des aktuellen Standes käme als erstes Einsatzfeld von Schweineherzen wohl nur das „bridging“ in Frage, das heißt nur zur Überbrückung des Zeitraumes, bis für den Empfänger ein allogenes Transplantat zur Verfügung stehen würde (Ibrahim 2005).

Hierfür wäre jedoch erforderlich, dass in präklinischen Studien zumindest eine Gleichwertigkeit der Xenotransplantate mit den aktuell zum „bridging“ verwendeten Kunstherz- und linksventrikulären Unterstützungssystemen in Aussicht gestellt wird.

Zur Zeit gelingt es mithilfe dieser Systeme ca. 70 % der Patienten bis zu einer Allotransplantation zu retten (Ibrahim 2005).

Für die weitere Zukunft erscheint somit eine weitere Kombination der verschiedenen Ansätze erfolgversprechend. Es ist wahrscheinlich, dass die Abstoßungsreaktion durch Verwendung multitransgener α 1-3Gal-knock-out-Schweine (Zhou 2005) und Immunadsorption weiter vermindert werden kann. Die entscheidende Frage wird dann jedoch sein, ob es gelingt, die Mechanismen der verzögert ablaufenden und der zellulären Abstoßungsreaktion besser zu verstehen und zu kontrollieren.

7 Literaturverzeichnis

- 1 2004 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1994-2003. Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, Rockville, MD; United Network for Organ Sharing, Richmond, VA; University Renal Research and Education Association, Ann Arbor, MI.
- 2 Anyanwu AC, Rogers CA, Murday AJ; Steering Group. Intrathoracic organ transplantation in the United Kingdom 1995-99: results from the UK cardiothoracic transplant audit. *Heart*. 2002, 87(5):449-54.
- 3 Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol*. 1991, 86 Suppl 1:27-30.
- 4 Bach FH Dalmasso AP,Platt JL,. Xenotransplantation: A current perspective. *Transplant Rev* 1992, 6: 163-174
- 5 Bach FH, Turman MA, Vercellotti GM, Platt JL, Dalmasso AP. Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant Proc*. 1991; 23(1 Pt 1):205-7.
- 6 Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate.*JAMA*. 1985, 20;254(23):3321-9.
- 7 Bhatti FN, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chavez G, Goddard M, Dunning JJ, Wallwork J, White DJ. Three-month survival of HDAF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc*. 1999; 31(1-2):958.
- 8 Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichensperner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. The influence of antibody and complement removal with a Ig-Therasorb

- column in a xenogeneic working heart model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 15(5):672-9.
- 9 Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S494-503.
- 10 Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Effects of prolonged cold storage time in xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999; 18(12):1211-7.
- 11 Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Uchita S, Brandl U, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichenspurner H, Reichart B. Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoadsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons. *Transplant Proc.* 2005;37(1):483-6.
- 12 Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Eder V, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Brandl U, Meiser B, Reichenspurner H, Hammer C, Reichart B. Mean xenograft survival of 14.6 days in a small group of hDAF-transgenic pig hearts transplanted orthotopically into baboons. *Transplant Proc.* 2005;37(1):472-6
- 13 Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoadsorption of antibodies and complement factors. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S508-17.
- 14 Brenner P. Einfluß von Immunadsorption auf xenogene Abstoßungsmechanismen im Perfusionsmodell und bei der Xenotransplantation von Landrasse- und hDAF-transgenen Schweineherzen in Primaten. 2003. München, Univ., Habil.-Schr.,1453 S.
- 15 Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation.* 1997; 15;63(1):149-55.

- 16 Calne RY. Organ Transplantation between widely- disparate species. *Transplant Proc* 1970; 2: 550-556.
- 17 Chapman LE, Folks TM, Salomon DR, Patterson AP, Eggerman TE, Noguchi PD. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med*. 1995;333(22):1498-501.
- 18 Clark DA, Fryer JF, Tucker AW, McArdle PD, Hughes AE, Emery VC, Griffiths PD. Porcine cytomegalovirus in pigs being bred for xenograft organs: progress towards control Xenotransplantation. 2003 Mar;10(2):142-8
- 19 Cooper DK, Tseng YL, Saidman SL. Alloantibody and xenoantibody cross-reactivity in transplantation. *Transplantation*. 2004;77(1):1-5.
- 20 Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL jr., Zuhdi N. The pig as potential organ donor for man. In: Cooper DKC, Kemp E; Reemtsma K, White DJG (eds.). *Xenotransplantation*, 1st ed. Heidelberg:Springer Verlag, 1991:481-500.
- 21 Cooper DK, Human PA, Lexer G, Rose AG, Rees J, Keraan M, Du Toit E. Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplant*. 1988;7(3):238-46.
- 22 Cooper DK, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, SchmoeckelM, Shirakura R, Warner Stevenson L; Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation. Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19(12):1125-65.
- 23 Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Ditullio PA, Ebert KM, Fodor WL. Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J*. 1999;13(13):1762-73.

Literaturverzeichnis

- 24 Cozzi E, Tucker AW, Langford GA, Pino-Chavez G, Wright L, O'Connell MJ, Young VJ, Lancaster R, McLaughlin M, Hunt K, Bordin MC, White DJ. Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor. *Transplantation*. 1997;64(10):1383-92.
- 25 Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol*. 1992;140(5):1157-66.
- 26 Deng MC. Cardiac transplantation. *Heart*. 2002 Feb;87(2):177-84.
- 27 Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL, Logan JS. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation*. 2001;71(1):132-42.
- 28 Dunning JJ, Pierson RN 3rd, Bradley PC, White DJ, Wallwork J. A comparison of the performance of pig hearts perfused with pig or human blood using an ex-vivo working heart model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1994;8(4):204-6.
- 29 Ekre HP. Inhibition of human and guinea pig complement by heparin fractions differing in affinity for antithrombin III or in average molecular weight. *Int J Immunopharmacol*. 1985;7(2):271-80.
- 30 Evans RW. Cardiac replacement: Estimation of need, demand and supply. In: Rose EA, Stevenson LW. *Management of end-stage heart disease*. Philadelphia: Lipincott-Rave;1998. p. 13-24.
- 31 Fishman JA, Patience C. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant*. 2004;4(9):1383-90.
- 32 Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W, Squinto SP. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(23):11153-7.

- 33 Forty J, White DG, Wallwork J. A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106(2):308-16.
- 34 Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988;263(33):17755-62.
- 35 Gewurz H, Clark DS, Cooper MD, Varco RL, Good RA. Effect of cobra venom-induced inhibition of complement activity on allograft and xenograft rejection reactions. *Transplantation.* 1967;5(5):1296-303.
- 36 Gollackner B, Mueller NJ, Houser S, Qawi I, Soizic D, Knosalla C, Buhler L, Dor FJ, Awwad M, Sachs DH, Cooper DK, Robson SC, Fishman JA. Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation.* 2003;75(11):1841-7.
- 37 Goodman DJ, Von Albertini M, Willson A, Millan MT, Bach FH. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation.* 1996;61(5):763-71.
- 38 Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, Boucek MM, Mohacsi PJ, Edwards LB, Keck BM. The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21(9):950-70.
- 39 Harrison's Principles of Internal Medicine. Dt. Ausgabe der 15 Aufl./ in Zusammenarbeit mit der Charite. Hrsg. der dt. Ausgabe Manfred Dietl- Berlin; Leiben: ABW, Wiss. Verlag, 2003.
- 40 Hoopes CW, Platt JF. Molecular strategies for clinical xenotransplantation in cardiothoracic surgery. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996;8(2):156-74.
- 41 Ibrahim Z., Ezzelarab M., Kormos R., Cooper D. K. C.. Which patient first? Planning the first clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2005; 12 168-172.

- 42 Inverardi L, Clissi B, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Pardi R. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation*. 1997;63(9):1318-30.
- 43 Janeway CA, Travers P, et al. *Immunologie*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akadem. Verlag, 2002. 777 S.
- 44 Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts. *Transplantation*. 1995;59(1):1-6.
- 45 Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. 1966;2(7465):662-5.
- 46 Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Neethling FA, Wright LJ, Rose AG, White DJ, Cooper DK. Delayed xenograft rejection in C3-depleted discordant (pig-to-baboon) cardiac xenografts treated with cobra venom factor. *Transplant Proc*. 1996;28(2):560.
- 47 Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, Cooper DK. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation*. 1997;64(9):1255-61.
- 48 Kozlowski T, Ierino FL, Lambrigts D, Foley A, Andrews D, Awwad M, Monroy R, Cosimi AB, Cooper DK, Sachs DH. Depletion of anti-Gal(alpha)1-3Gal antibody in baboons by specific alpha-Gal immunoaffinity columns. *Xenotransplantation*. 1998;5(2):122-31.
- 49 Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*. 2005;11(1):29-31.

- 50 Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002;295(5557):1089-92. Epub 2002 Jan 3.
- 51 Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch* 1895, 61: 291-332.
- 52 Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, Richards A, White DJ. Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant Proc*. 1994;26(3):1400-1.
- 53 LaVecchio JA, Dunne AD, Edge AS. Enzymatic removal of alpha-galactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. *Transplantation*. 1995;60(8):841-7.
- 54 Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM 3rd, Dalmaso AP, Platt JL. The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. *Transplantation*. 1993;56(1):1-8.
- 55 Leventhal JR, Sakiyalak P, Witson J, Simone P, Matas AJ, Bolman RM, Dalmaso AP. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation*. 1994;57(6):974-8.
- 56 Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM 3rd, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation*. 1993;55(4):857-65; discussion 865-6.
- 57 Leventhal JR, John R, Fryer JP, Witson JC, Derlich JM, Remiszewski J, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM 3rd. Removal of baboon and human anti-porcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies. *Transplantation*. 1995;59(2):294-300.
- 58 McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med*. 1995;1(5):423-7.

- 59 McGregor CG, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS. Cardiac xenotransplantation: Recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(3):844.e1.
- 60 Michaels MG, McMichael JP, Brasky K, Kalter S, Peters RL, Starzl TE, Simmons RL. Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplantation.* 1994;57(10):1462-5.
- 61 Michaels MG, Simmons RL. Xenotransplant-associated zoonoses. Strategies for prevention. *Transplantation.* 1994;57(1):1-7.
- 62 Nalesnik MA, Starzl TE. Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, and posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplant Sci.* 1994;4(1):61-79.
- 63 Ogata K, Platt JL. Cardiac xenotransplantation: future and limitations. *Cardiology.* 2004;101(1-3):144-55.
- 64 Onions DE, Witt CJ. Xenotransplantation: an overview of microbiological risks and potentials for risk management. *Rev Sci Tech.* 2000;19(1):289-301.
- 65 Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DK. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation.* 1993;56(6):1433-42.
- 66 Osman N, McKenzie IF, Ostenried K, Ioannou YA, Desnick RJ, Sandrin MS. Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14677-82.
- 67 Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN)/ Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). Annual Report 2003.
- 68 Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med.* 1997;3(3):282-6.

Literaturverzeichnis

- 69 Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 1999;285(5431):1236-41.
- 70 Perper RJ, Najarian JS. Experimental renal heterotransplantation. I. In widely divergent species. *Transplantation*. 1966;4(4):377-88.
- 71 Perper RJ, Najarian JS. Experimental renal heterotransplantation. II. Closely related species. *Transplantation*. 1966;4(4):700-712.
- 72 Perper RJ, Najarian JS. Experimental renal heterotransplantation. III. Passive transfer of transplantation immunity. *Transplantation*. 1967;5(3):514-33.
- 73 Pham MX, Hunt SA, Johnson FL. Cardiac xenotransplantation. *Coron Artery Dis*. 2004;15(2):99-105.
- 74 Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*. 2003;299(5605):411-4. Epub 2002 Dec 19.
- 75 Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM, Najarian JS, Bach FH. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today*. 1990;11(12):450-6; discussion 456-7.
- 76 Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation*. 1991;52(2):214-20.
- 77 Platt JL. The immunological hurdles to cardiac xenotransplantation. *J Card Surg* 2001;16(6):439-47.

- 78 Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, Marsh HC Jr, Collins BH, Levin JL, Mault JR, Heinle JS, Ibrahim S, Rudolph AR, et al. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation*. 1994;57(3):363-70.
- 79 Reemtsma K, McCracken Bh, Schlegel JU, Pearl M. Heterotransplantation of the kidney: Two clinical experiences. *Science*. 1964;143:700-2.
- 80 Robson SC, Candinas D, Siegel JB, Kopp C, Millan M, Hancock WW, Bach FH. Potential mechanism of abnormal thromboregulation in xenograft rejection: loss of ecto-ATPases upon endothelial cell activation. *Transplant Proc*. 1996;28(2):536.
- 81 Rollins SA, Zhao J, Ninomiya H, Sims PJ. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J Immunol*. 1991;146(7):2345-51.
- 82 Roos A, Daha MR. Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. *Transpl Immunol*. 2002;9(2-4):257-70.
- 83 Rose AG. Understanding the pathogenesis and the pathology of hyperacute cardiac rejection. *Cardiovasc Pathol*. 2002;11(3):171-6.
- 84 Rose AG, Cooper DK. A histopathologic grading system of hyperacute (humoral, antibody-mediated) cardiac xenograft and allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15(8):804-17.
- 85 Rose AG, Cooper DK, Human PA, Reichenspurner H, Reichart B. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transplant*. 1991;10(2):223-34.
- 86 Rosengard AM, Cary NR, Langford GA, Tucker AW, Wallwork J, White DJ. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. *Transplantation*. 1995;59(9):1325-33.
- 87 Saadi S, Holzknicht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med*. 1995;182(6):1807-14.

- 88 Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohn S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat Med.* 1995;1(12):1261-7.
- 89 Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-Konig W, White DJ, Muller-Hocker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation.* 1996;62(6):729-34.
- 90 Schmoeckel JM. Xenotransplantation hDAF-transgener Schweineherzen: Untersuchungen ex vivo und im Primatenmodell.. Lengerich, Pabst. 2000.
- 91 Simon PM, Neethling FA, Taniguchi S, Goode PL, Zopf D, Hancock WW, Cooper DK. Intravenous infusion of Gal α 1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation.* 1998;65(3):346-53.
- 92 Suckfull M, Mudsam M, Pieske O, Enders G, Babic R, Hammer C. Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model. *Transpl Int.* 1994;7(5):324-8.
- 93 Suckfull MM, Pieske O, Mudsam M, Babic R, Hammer C. The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation.* 1994;57(2):262-7.
- 94 Teranishi K, Alwayn IP, Buhler L, Gollackner B, Knosalla C, Huck J, Duthaler R, Katopodis A, Sachs DH, Schuurman HJ, Awwad M, Cooper DK. Depletion of anti-Gal antibodies by the intravenous infusion of Gal type 2 and 6 glycoconjugates in baboons. *Xenotransplantation.* 2003;10(4):357-67.
- 95 Thomas, Lothar (Hrsg.). *Labor und Diagnose.* Th-Books Verlagsges., 5. Aufl. 2000.
- 96 Zhou CY, McInnes E, Copeman L, Langford G, Parsons N, Lancaster R, Richards A, Carrington C, Thompson S. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation.* 2005;12(2):142-8.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung und Regulierung der Komplementkaskade	15
Abbildung 2: Das Working-Heart-Perfusionsmodell im Schema	34
Abbildung 3: Das Working-Heart-Perfusionsmodell	35
Abbildung 4: Die absolute Herzgewichtzunahme	38
Abbildung 5: Die Herzgewichtzunahme in %/h	39
Abbildung 6: Die Gesamtlaufzeit	40
Abbildung 7: Das Gesamtherzzeitvolumen	41
Abbildung 8: Der Stroke-Work-Index	42
Abbildung 9: Der spezifische Koronarfluß	43
Abbildung 10: Der spezifische Koronarwiderstand	44
Abbildung 11: Die Kreatinkinase	46
Abbildung 12: Die Kreatinkinase-MB	46
Abbildung 13: Die Lactatdehydrogenase	47
Abbildung 14: Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	48
Abbildung 15: Das Immunglobulin IgG	50
Abbildung 16: Das Immunglobulin IgM	51
Abbildung 17: Das Immunglobulin IgA	52
Abbildung 18: Der Komplementfaktor C3 [g/l]	54
Abbildung 19: Der Komplementfaktor C4 [g/l]	54
Abbildung 20: Das Gesamt-Komplement [U/ml]	55
Abbildung 21: Das Alternativ-Komplement [%]	56
Abbildung 22: Ein hDAF-transgenes Herz der Gruppe 1 (4h-DAF) nach 8½ h Xenoperfusion	58
Abbildung 23: Ein Herz der Gruppe 1(4h-DAF) nach 8½ h Xenoperfusion	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Eine hDAF-Färbung der Aortenwand (Vergr. 150mal)	59
Abbildung 25: IgG-Färbung von Gewebe aus dem linken Ventrikel (Verg. 100mal).	59
Abbildung 26: Eine H.E.-Färbung von Myokard und Koronargefäßen (Verg. 100mal).	60

9 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADA	Immunadsorption
C3	Komplementfaktor 3
C4	Komplementfaktor 4
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Isoenzym MB der Kreatinkinase
CVF	Cobra-Venom-Factor
DAF	Decay-Accelarating-Factor (Ein Komplement-regulierendes Protein, CD 55)
DXR	Delayed-Xenograft-Rejection (Verzögerte Xenotransplantabstoßungsreaktion)
H.E.	Hämatoxylin Eosin
Gal	Endständiger Galaktosylrest
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, AST
hDAF	humaner DAF (Bei Menschen vorkommender DAF)
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
HZV	Herzeitvolumen
ICF	Institut für Chirurgische Forschung der LMU
Ig	Immunglobulin
IS	Immunsuppression
KW	Spezifischer Koronarwiderstand
LDH	Lactat-Dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

MAC	Membrane-Attack-Complex (Die Endstrecke des Komplementsystems)
MCP	Membrane-Cofactor-Protein (Ein Komplement-regulierendes Protein, CD 46)
NaCl	0,9 %-Natrium-Chlorid-Lösung
NK	Natürliche Killerzelle
PERV	Porcine endogene Retroviren
PNAK	Präformierte natürliche Antikörper
RCA	Regulators of Complement Activity (Eine Gruppe von Komplement-regulierenden Proteinen)
SCF	Spezifischer Koronarfluß
sCR	soluble-Complement-Receptor (Löslicher Komplement Rezeptor)
SWI	Stroke-Work-Index (Schlagarbeits-Index)

10 Lebenslauf

Sven Michael Kriegeskorte

Geburtstag/-ort: 15.02.1975, München

Adresse: Georgenstr. 83, 80798 München

e-mail: sven.kriegeskorte@web.de

Ausbildung

- 1994 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Neubiberg -
- 1994/95 Ableistung des Zivildienstes bei der Johanniter Unfallhilfe, Ottobrunn
- 1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
- 2002 Ablegung des 3. Staatsexamens an der LMU München

Praktisches Jahr (10/2001 – 09/2002)

- Tertial I Innere Medizin: Medizinische Poliklinik Innenstadt, LMU München
- Tertial II Urologie: Klinikum Großhadern, LMU München
- Tertial III Chirurgie: Krankenhaus Schwabing, Lehrkrankenhaus der LMU München

Arzt im Praktikum (02/2003 – 08/2004)

Medizinische Poliklinik Innenstadt, LMU München

eingesetzt im Bereich Innere/ Allgemein Medizin, Rheumatologie und Kardiologie

Seit 10/2004

Facharztausbildung zum Internisten/ Kardiologen an der Klinik Augustinum in München